

ス刺激でのインスリン分泌が改善された。したがって、これらの遺伝子はインスリン分泌と関係するだけでなく、SU 剤による膵β細胞障害を防ぐ、治療介入の標的となりうる可能性もある。Rps6ka2 がコードする ribosomal S6 キナーゼ 2 型は、細胞の増殖に関係するとされ、膵β細胞の増殖や生存に重要な意義を持つ可能性はある。Zfp36l2 がコードするタンパクは、Zn フィンガードメインをもつことからおそらくは転写因子である。EGF (表皮増殖因子) やフォルボールエステル (TPA) に反応して早期から発現が増加すると報告されていることから、やはり細胞増殖に関係すると考えられる一方、p53 の制御下でアポトーシスを誘導する可能性も示唆されている。細胞株を用いた系なので、検証は難しいが、我々が構築したモデルを、細胞増殖の変化やアポトーシスを生じる前段階という観点からとらえ直してみるのも面白いだろう。なお Prss23 がコードするタンパクは、セリンプロテアーゼであり、卵巣機能との関係が報告されているが、膵β細胞での機能は不明である。

しかし、これらの3遺伝子が、インスリン分泌に関係する分子メカニズムは全く不明であった。その機構を探るために、siRNA で発現を抑制した細胞についてさらに網羅的遺伝子発現解析を行ったが、現時点では十分な機能的な意義付けは完了していない。今後、他の薬剤で処理した細胞と比較したり、得られた遺伝子群に対していわゆるネットワーク解析を行うなどして、手がかりを追求したい。

また Group1 遺伝子のうち、Glibenclamide 処理で発現が減少していた Txnip については、ノックダウンにより予想に反して GSIS の増強傾向が見られた。Txnip がコードするタンパク Thioredoxin interacting protein は、

Thioredoxin の機能を抑制することにより、酸化ストレスを増強させると言われている。また、膵β細胞においては、高グルコースにより発現が強く誘導され、過剰発現させるとアポトーシス誘導作用を示すことが報告されている (Minn2005)。Glibenclamide 処理で発現が減少した意義は明らかでないが、膵β細胞においてインスリン分泌に対する未知の効果もあるのかもしれない。ただし、siRNA は標的遺伝子以外の配列にも予期せぬ効果を及ぼす「オフターゲット効果」が知られているので、表現型の解析には原則として複数の siRNA について結果の再現性をみる必要があり、今回の結果の解釈も慎重に行う必要がある。

一方 Group2 (100 μM Tolbutamide で発現が変化するが、10 μM Glibenclamide で変化しなかった) 遺伝子については、今回の我々の系では、ノックダウンにより、いずれもインスリン分泌に対して明らかな効果は見られなかった。

ただし、Group2 のうち特に 100 μM Tolbutamide 処理で発現が増加する遺伝子は、もともと Glibenclamide 処理による GSIS 障害の出現に抑制的に働く可能性を期待しており、この点を検証するためには、むしろ過剰発現が必要であり、本実験のようなノックダウンをメインとする研究デザインは、必ずしも最適ではなかったかもしれない。

いずれにしても、以上の遺伝子は、二次無効の候補遺伝子としての解析も期待され、今後進めてゆきたい。また、主任研究者が行っているゲノムワイド多型解析において、陽性となった多型部位のゲノム上の位置から真に二次無効に関与する遺伝因子を探索する際、絞り込みを行うための有用な分子リストとなりうると思われる。

E. 結論

「SU 剤による β 細胞障害」のユニークな *in vitro* モデル系を確立し、網羅的発現解析から、インスリン分泌障害の出現と共に発現が変化する興味深い遺伝子が多数得られ、そのいくつかにおいてはインスリン分泌における意義が強く示唆された。これらは、膵 β 細胞の生理学にとっても興味深いだけでなく、臨床的にも、「SU 剤による二次無効」の遺伝因子、あるいは治療介入の重要な標的となる可能性がある。今後得られた分子について、機能的・遺伝学的意義のさらなる検討が期待される。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Fukushima-Uesaka H, Saito Y, Maekawa K, Kamatani N, Kajio H, Kuzuya N, Noda M, Yasuda K, Sawada J-I. Genetic variations and haplotype structures of transcription factor Nrf2 and its cytosolic reservoir protein Keap1 in Japanese. **Drug Metab Pharmacokinet** 22(3):212-9, 2007
- 2) Takeuchi F, Yanai K, Inomata H, Kuzuya N, Kajio H, Honjo S, Takeda N, Kaburagi Y, Yasuda K, Shirasawa S, Sasazuki T, Kato N. Search of type 2 diabetes susceptibility gene on

chromosome 20q. **Biochem Biophys Res Commun** 357(4):1100-1106, 2007.

- 3) Fukushima-Uesaka H, Saito Y, Maekawa K, Hasegawa R, Suzuki K, Yanagawa T, Kajio H, Kuzuya N, Noda M, Yasuda K, Tohkin M, Sawada J-I. Genetic variations of the ABC transporter gene *ABCC3* in a Japanese population. **Drug Metab Pharmacokinet** 22 (2) 129-135, 2007.
- 4) Takeuchi F, Ochiai Y, Serizawa M, Yanai K, Kuzuya N, Kajio H, Honjo S, Takeda N, Kaburagi Y, Shirasawa S, Sasazuki T, Kato N. Search for type 2 diabetes susceptibility genes on chromosome 1q, 3q and 12q. **J Hum Genet** 2008, *in press*

2. 学会発表

特になし

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

安田和基、澤田純一、斎藤嘉朗、佐井君江「スホニルウレア剤による二次無効発現の予測診断方法、該方法に用いられるプローブ及び検査キット」(仮称)：出願準備中

表1：解析対象とした遺伝子

Group1	Glibenclamide処理で発現が変化し、Tolbutamide処理で変化しなかったもの			
Glibenclamide処理で発現増加(5遺伝子)				
Rps6ka2	Prss23	Kif2	Zfp36l2	Socs6
Glibenclamide処理で発現減少(1遺伝子)				
Txnip				
Group2	Tolbutamide処理で発現が変化し、Glibenclamide処理で変化しなかったもの			
Tolbutamide処理で発現増加(4遺伝子)				
Trib3	Ddit3	Ndr4		LOC68259
Tolbutamide処理で発現減少(1遺伝子)				
Csrp2				

図1: 遺伝子発現抑制による グルコース応答性インスリン分泌への影響

- Group 1 Glibで増加した遺伝子 -

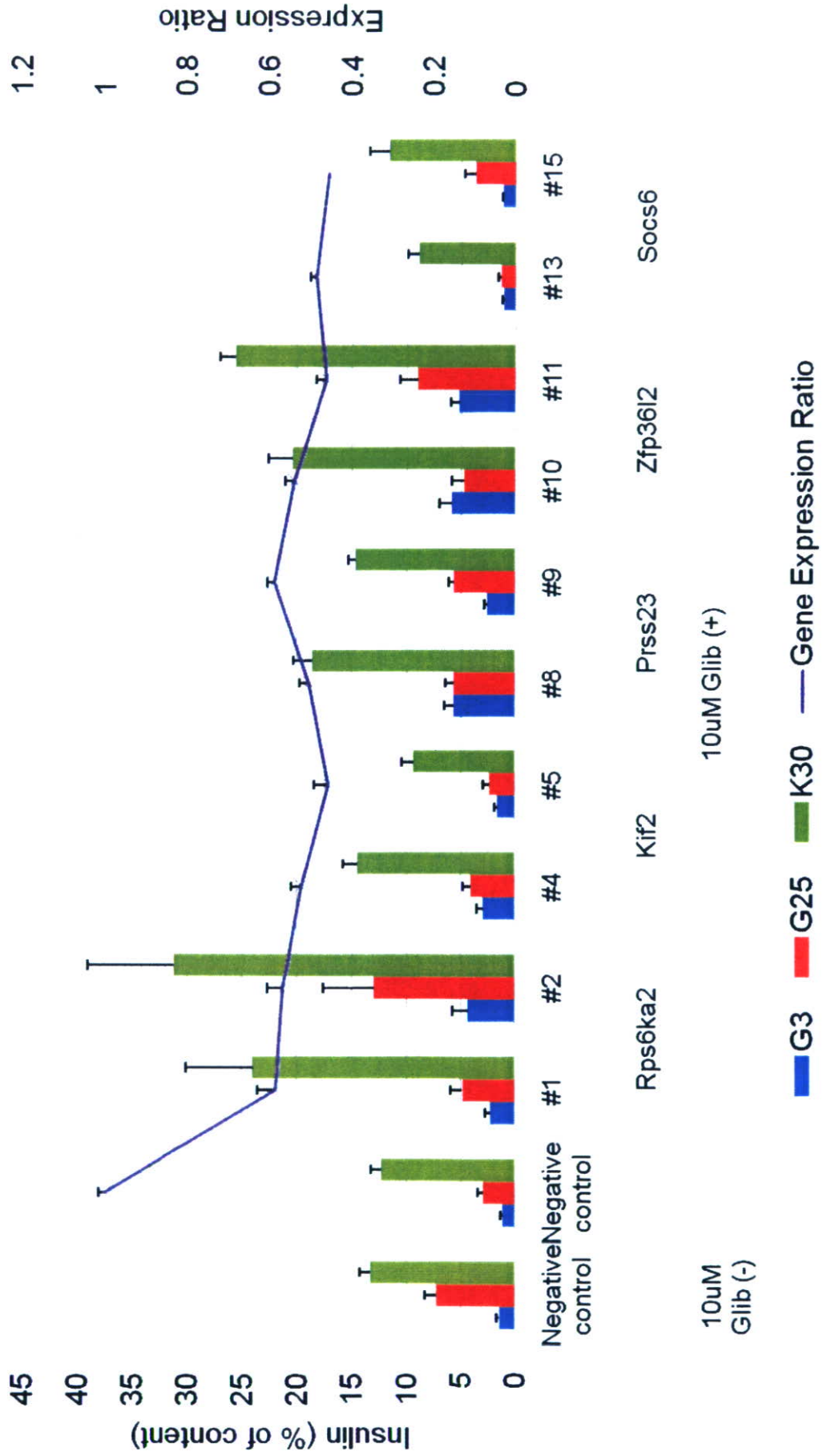
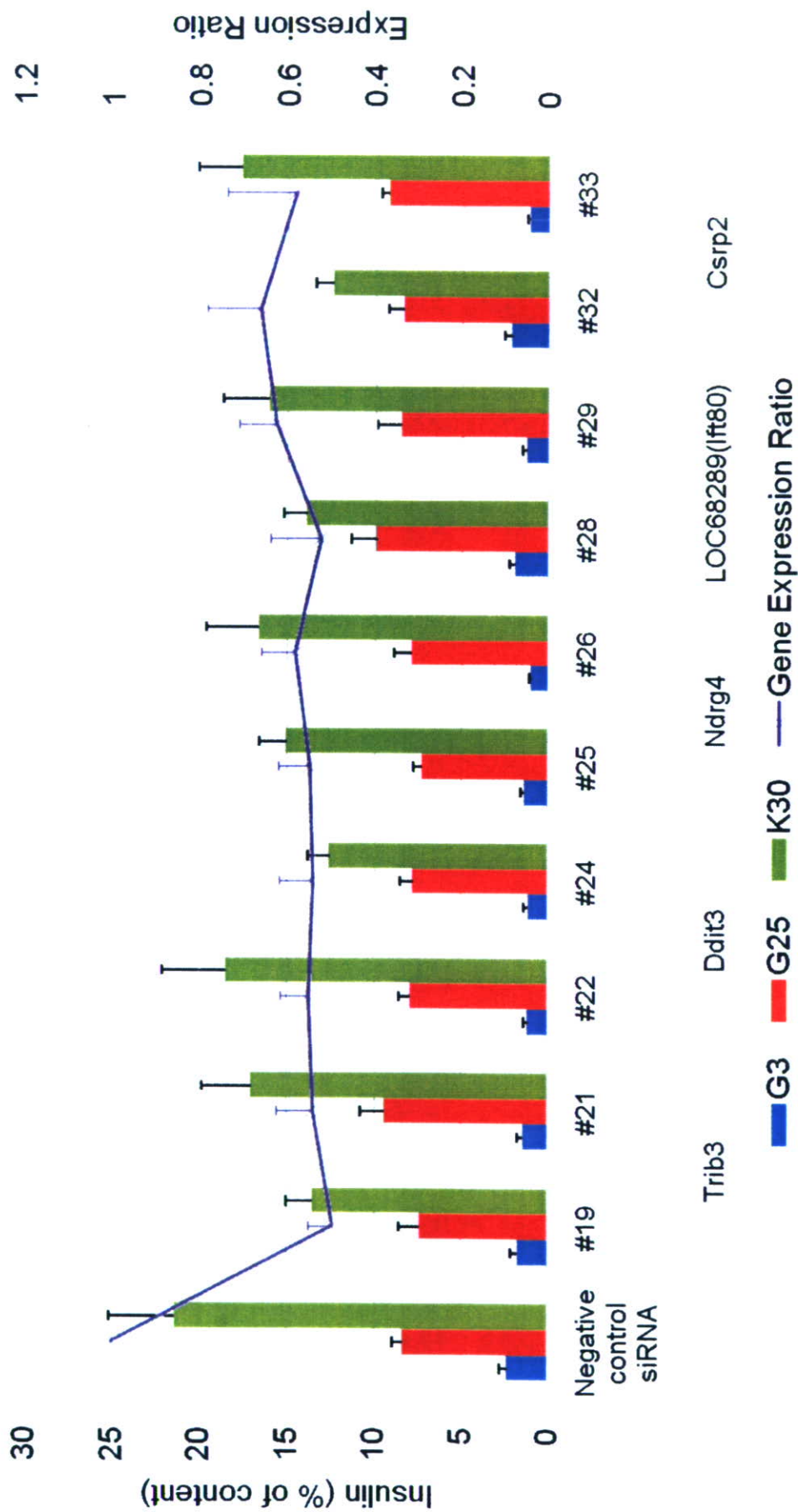


図2: 遺伝子発現抑制による
 グルコース応答性インスリン分泌への影響
 - Group 2 5遺伝子 -



GSISとの直接の関連性を示唆する遺伝子は見出せなかった

インスリン分泌促進型経口糖尿病薬の薬物応答関連候補遺伝子の多型解析

分担研究者 齋藤嘉朗 国立医薬品食品衛生研究所 機能生化学部 室長

研究要旨： 二次無効群 83 例、長期有効群（対照群）290 例、早期無効群 16 例につき、酸化ストレス関連 2 遺伝子（*TXNIP* 及び *GLRX*）のシーケンシングによる遺伝子多型解析及びハプロタイプ解析を行ったが、二次無効群と長期有効群（対照群）間で有意な頻度差を伴う多型・ハプロタイプは見いだされなかった。また膵β細胞機能関連の 21 遺伝子の多型解析をタイピングにて行い、単相関解析で 9 種の有意な多型を見いだした。さらに昨年度同定した多型を含めて多変量解析を行い、二次無効予測モデルを確立した。

A. 研究目的

本邦の糖尿病患者は約900万人に達する。糖尿病は治癒することなく、失明・腎症等の合併症を引き起こす。2型糖尿病の治療にはインスリン分泌促進型経口糖尿病薬が繁用されている。しかし、低血糖等の副作用や、一定の割合で投与初期から十分な薬効が得られない「一次無効」が起こり、また一旦は薬効が得られたものの長期連用により薬効が消失する「二次無効」が約2割で発生し臨床問題となっている。これらには遺伝因子の関与も示唆されているが、相関する遺伝子多型の報告は極めて少ない。

本分担研究はインスリン分泌促進型経口糖尿病薬、特にスルホニルウレア剤（以下、SU 剤）の薬効最適化とその持続を目指して、候補遺伝子多型解析を行い、他の分担研究者の結果と合わせて、患者毎の遺伝子型に基づく投薬法（投薬量及び薬物選択法）を確立することを目的とする。

今年度は、二次無効発現との相関解析のために、膵β細胞からのインスリン分泌の維持に重要と思われる遺伝子で、日本人の多

型情報が乏しい *TXNIP* 及び *GLRX* につきシーケンシングによる多型探索を行った。このうち *TXNIP* は、昨年度分担研究者・安田部長による SU 剤障害によるインスリン分泌障害 *in vitro* モデルにて、有意な変化が見られた遺伝子である。また膵β細胞機能関連の 21 遺伝子の多型解析をタイピングにて行い、ケース群とコントロール群のアリル頻度等を比較して、二次無効発現と相関する多型を探索した。

B. 研究方法

1) シーケンシングによる遺伝子多型同定、連鎖不平衡解析、及びハプロタイプ解析

検体は、分担研究者である国立国際医療センター研究所・安田和基部長より供与頂いたもの（計 389 検体）を使用した。

今年度、解析した *TXNIP* 及び *GLRX*（のシーケンシングの概略は以下の通りである。対象領域はプロモーター領域、エクソン領域およびその近傍のイントロン領域とした。ゲノム DNA（約 50 ng）を用いて、ロングレンジ PCR 法にて、まず第 1 段目の

増幅を行った。即ち、複数の約 2.3-6 kb の領域につき、Z-Taq DNA polymerase (宝バイオ㈱、滋賀) を用いて増幅反応を行った。PCR 反応は 98°C で 5 秒、55°C で 5 秒、及び 72°C で 190 秒を 30 サイクル行った。第 2 段目の PCR 反応は各エクソン (領域) を増幅するために行った。即ち、第 1 段目の PCR 産物を一部用いて、Ex-Taq DNA polymerase (宝バイオ㈱) により増幅反応を行った。PCR 反応は 94°C で 5 分処理後、94°C で 30 秒、60°C で 1 分、及び 72°C で 2 分を 30 サイクル行い、最後に 72°C で 7 分処理した。PCR 産物を PCR Product Pre-Sequencing Kit (USB Co., Cleveland, OH, USA) にて処理した後、ABI BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を用いたサイクルシーケンシング反応を行った。反応液を DyeEx96 Kit (Qiagen, Hilden, Germany) にて処理し過剰の塩基等を除いた後、ABI Prism 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems) にて配列を解析した。低頻度で検出された多型については、再度ゲノム DNA からの増幅・シーケンシングを行い、その存在を確認した。

連鎖不平衡解析はソフトウェア SNPalyze ver. 7.0 (Dynacom, Yokohama, Japan) により行い、 $|D'|$ 値および r^2 値で連鎖の強さを評価した。解析の結果を視覚的に表示するため、 $|D'|$ 値および r^2 値の大きさ(0~1)を 10 段階の青色の濃さで表すマクロを MS Excel を用いて開発したものを使用した。さらにハプロタイプ解析をソフトウェア LDSUPPORT (Kitamura Y. et al., Ann. Hum. Genet. 66: 183-193 (2002)) により行った。

2) タイピング系の開発

昨年度までの *TNFAIP3*, *LAPP*, *HMOX1*,

IPF1, *GPX1*, *ABCG2* に引き続き、転写因子関連の 2 遺伝子 (*Gene X* 及び *Gene Y*) について、ハプロタイプ解析結果に基づき、パイロシーケンシング法による簡便なタイピング系を開発し、患者検体の解析に利用した。対象は頻度約 3%以上のハプロタイプのタグとなる多型 (*Gene X*: 6 多型、*Gene Y* 4 多型) とした。まず各多型部位を含む断片をゲノム DNA (約 20-25 ng) より Ex-Taq DNA polymerase または LA-Taq DNA polymerase 及び GC buffer I (*Gene X* の 1 多型、*Gene Y* の 4 多型) を用いて特異的に増幅した。この際、それぞれのプライマーのいずれか一方は、ビオチンラベルしたものをを用いた。PCR 条件は 94°C で 5 分処理後、94°C で 30 秒、55°C または 60°C で 45 秒、72°C で 30 秒を 50 サイクル行い、最後に 72°C で 5 分処理した。PCR 産物を 0.5 mM EDTA, 1 M NaCl, 0.05% Tween 20 を含む 5 mM Tris-HCl (pH 7.6) 中で Streptavidin-Sepharose High Performance (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) と 10 分インキュベートして結合させ、MultiScreen-HV Plate (Millipore Corp., Billerica, MA, USA) に移した。0.2 M NaOH を添加して 1 分間処理することにより 1 本鎖化し、さらに洗浄後、2 mM Mg-acetate を含む 20 mM Tris-acetate (pH 7.6) 中でビーズを懸濁し、96-well PSQ plate (Biotage AB, Uppsala, Sweden) に移した。シーケンシングプライマーを 10 pmol 分加え、95°C で 2 分間処理した後、室温まで冷却し、シーケンシングプライマーと PCR 産物をハイブリダイズさせた。これを PSQ™96MA (Biotage AB) 及び PSQ 96 SNP Reagent Kit (Biotage AB) を用いてミニシーケンシング反応を行い、多型を解析した。

3) TaqMan 法による遺伝子多型タイピング

二次無効との相関解析のため、TaqMan SNP Genotyping Assay Kit (Applied Biosystems)を用いたタイピングを、SU 剤の二次無効群、長期有効群（対象群）及び早期無効群のゲノム DNA 計 389 検体につき行った。対象は *SLC30A8*, *TCF7L2*, *PPARG*, *HHEX*, *IGF2BP2* 等の 19 種の遺伝子の既知多型約 26 種で、添付のマニュアル通り行い解析した。

4) 二次無効との相関解析

二次無効については、長期有効患者（対照群：5 年以上 SU 剤を使用し、インスリン治療に移行していない）290 名、二次無効患者（3 年以上 SU 剤を使用し、現在はインスリン治療に移行）83 名、早期無効患者（SU 剤開始後、3 年未満でインスリン治療に移行）16 名分の検体が分担研究者の安田和基部長より供与された。このうち、抗グルタミン酸デカルボキシラーゼ抗体陽性が疑われる患者等を除き、長期有効群（対照群）278 名、二次無効群 80 名、早期無効群 15 名につき、相関解析に供した。また SU 剤有効 11 年以上の長期有効群 130 名（SU 剤使用歴 17 ± 4 年、中央値 \pm 四分位偏差）及び SU 剤使用 10 年以内でインスリン治療に移行した二次無効群 42 名（ 6 ± 2 年）という、フェノタイプの差が大きいサブグループの検体間でも解析を行った（表 1）。なお、サブグループ間では、SU 剤使用歴（および現在の HbA_{1c} 値）を除き、患者背景因子において有意な差は認められなかった。今年度解析が終了した多型は、*SLC30A8*, *TCF7L2*, *PPARG*, *HHEX*, *IGF2BP2* 等の 2 型糖尿病との相関が示された遺伝子、及びインスリン分泌、酸化ストレス、アポトーシス関連等の計 23 遺伝子の約 65 多型であり、上記 1) 項～3) 項の結果を用いて、

アリル頻度差およびゲノタイプ頻度差を中心に解析した。また統計解析は、Fisher の正確確率検定を Prism ver. 4.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) または SNPalyze ver. 7.0 で、多変量解析を JMP ver. 6.0 (SAS Institute, Cary, NC, USA) により行った。

（倫理面への配慮）

本研究は患者検体由来のヒトゲノム DNA を対象にし、遺伝子多型解析を行うと共に、臨床データを取り扱うものであり、「ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針」及び「臨床研究に関する倫理指針」を遵守し、研究倫理審査委員会の承認のもとに行った。

C. 研究結果

1) シーケンシングによる遺伝子多型同定、連鎖不平衡解析、及びハプロタイプ解析
a) *TXNIP*：昨年度の分担研究者・安田部長による解析で、SU 剤障害によるインスリン分泌障害 *in vitro* モデル系において、有意な変化が見られた遺伝子である。本遺伝子は膵β細胞にて高グルコース刺激で発現レベルが上昇し、アポトーシスを誘導することが知られている。酸化ストレス耐性を与えるチオレドキシンと相互作用し、その活性を押さえる働きをする。SU 剤有効 14 年以上の長期有効群 92 名及び SU 剤使用 10 年以内でインスリン治療に移行した二次無効群 42 名の検体をシーケンシング解析したところ、16 種の新規を含む 21 多型を同定した。このうちアミノ酸置換を伴うものは 4 種であり、すべて新規であった。本多型情報を用いて連鎖不平衡解析を行ったところ、本遺伝子は 1 ブロックでハプロタイプ

を解析することが妥当と考えられ、18種のハプロタイプが推定された。このうち頻度約1%以上のものは7種であった。

b) *GLRX*: 本遺伝子がコードするグルタレドキシンは、上記チオレドキシンと並ぶ重要な抗酸化ストレス蛋白である。SU 剤有効14年以上の長期有効群92名及びSU 剤使用10年以内でインスリン治療に移行した二次無効群42名の検体をシーケンシング解析したところ、3種の新規を含む8多型を同定した。このうちアミノ酸置換を伴うものは含まれていなかった。本多型情報を用いて連鎖不平衡解析を行ったところ、本遺伝子は1ブロックでハプロタイプを解析することが妥当と考えられ、11種のハプロタイプが推定された。このうち頻度約1%以上のものは7種であった。

2) タイピング系の開発

転写因子関連の遺伝子 *Gene X* 及び *Gene Y* の、それぞれ6, 4種のタグ多型につき、開発したパイロシーケンシング法によるタイピングを試みたところ、解析した全ての多型及び検体(389例)につき明瞭なタイピング結果が得られた。また、数検体につき直接シーケンシングを行い、その結果を本パイロシーケンシング法による結果と比較したところ、完全に一致した。

3) TaqMan 法による遺伝子多型タイピング

19種の遺伝子の既知多型約26種(主としてハプロタイプタグ多型や機能変化が報告された多型)につき、TaqMan 法によるタイピングを行い、解析した全ての多型及び検体(389例)につき明瞭なタイピング結果が得られた。

4) 二次無効との相関解析

まずシーケンシングを行った *TXNIP* 及び *GLRX* については、SU 剤有効14年以上の長期有効群92名及びSU 剤使用10年以内でインスリン治療に移行した二次無効群42名という、フェノタイプの差が大きいサブグループの検体に関して解析を行ったが、長期有効群と二次無効群の比較で、有意な頻度差を示す多型・ハプロタイプは認められなかった。

次に、パイロシーケンシング法を開発した *Gene X* 及び *Gene Y* に関し、長期有効群278名及び二次無効群80名の間で、多型頻度及びハプロタイプ頻度を比較したが、有意な差は認められなかった。しかし、SU 剤有効11年以上の長期有効群130名及びSU 剤使用10年以内でインスリン治療に移行した二次無効群42名という、フェノタイプの差が大きいサブグループ間で比較したところ、有意な差が認められる遺伝子多型及びハプロタイプを見いだした(*Gene X*、多型A: $p=0.0036$ 、多型B: $p=0.039$ 、ハプロタイプA: $p=0.0041$)。

TaqMan 法で解析した遺伝子多型の中、長期有効群(対照群)278名及び二次無効群80名の間で、多型頻度及びハプロタイプ頻度を比較したが、1多型を除き有意な差は認められなかった。しかし、SU 剤有効11年以上の長期有効群130名及びSU 剤使用10年以内でインスリン治療に移行した二次無効群42名の間で比較したところ、ゲノタイプモデルやアレルモデルで、4遺伝子の7多型が有意となった($p=0.045\sim 0.0029$)。この中の1遺伝子は、昨年度の長期有効群(対照群)278名及び二次無効群80名間の解析で有意な頻度差が認められた3種の多型の中の1種を含む遺伝子中の別の多型である。そこでタグ多型を用いてハプロタイ

プを解析し、ハプロタイプ頻度差を解析したところ、2種が $p=0.0048$ および $p=0.0051$ で有意となった。

そこで有意な頻度差が多く認められたサブグループの検体を用いて、昨年度および今年度で有意となった6遺伝子の11多型、並びに患者背景因子を説明変数として多変量解析を行ったところ、4種の多型が二次無効発現の有意な説明変数となり、二次無効予測モデルを確立した(表2)。SU剤の開始年齢等の患者背景因子は有意な変数として残らなかった。

D. 考察

最終年度である今年度は、二次無効発現と相関する遺伝子多型の探索を中心に行い、23遺伝子約65多型につき対象患者検体の解析を行った。昨年度分と合わせて、約40遺伝子115多型の解析を行ったことになる。相関解析は、主としてSU剤有効11年以上の長期有効群130名及びSU剤使用10年以内でインスリン治療に移行した二次無効群42名というサブグループ間でアリル頻度等を比較した。その結果、5種の遺伝子の9多型が有意な頻度差を示した。これらの遺伝子は、膵β細胞におけるインスリン分泌能及びその維持等に重要な遺伝子であり、二次無効発現との相関は合理的に説明可能である。また多型を含めた多変量解析では、患者背景因子が有意な変数とならず、4種の遺伝子多型のみが有意となった。このことから本予測系を用いれば、患者背景因子に左右されず遺伝子多型結果のみで、二次無効発現をある程度事前予測しうると考えられる。従って、本系は二次無効回避を目的として、各患者に適した医薬品を選択する際に、非常に有用と考えられ

る。本系で二次無効発現が予測された場合には、他の薬物治療やインスリン治療に移行するなどの対策を早期に取ることにより、合併症の減少や患者のQOL改善につながることを期待される。

E. 結論

SU剤の二次無効との相関解析で、ハプロタイプタグ多型や機能変化が報告された多型につき、昨年度より継続して開発したタイピング系等を用いて、二次無効群、長期有効群(対照群)、早期無効群につき23遺伝子65多型の解析を行い、単相関解析で9種の有意な多型を見いだした。さらに本研究で相関が明らかとなった多型11種を用いた多変量解析を行い、二次無効予測モデルを確立した。

謝辞

協力研究者の国立医薬品食品衛生研究所・機能生化学部・部長・澤田純一博士、同・医薬安全科学部・室長・頭金正博博士、同・代謝生化学部・主任研究官・佐井君江博士に感謝申し上げます。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) H. Fukushima-Uesaka, Y. Saito, K. Maekawa, R. Hasegawa, K. Suzuki, T. Yanagawa, H. Kajio, N. Kuzuya, M. Noda, K. Yasuda, M. Tohkin and J. Sawada: Genetic variations of the ABC transporter gene ABCC3 in a Japanese population. Drug Metab.

Pharmacokinet., 22: 129-135, 2007.

- 2) H. Fukushima-Uesaka, Y. Saito, K. Maekawa, N. Kamatani, H. Kajio, N. Kuzuya, M. Noda, K. Yasuda and J. Sawada: Genetic variations and haplotype structures of a transcriptional factor Nrf2 and its cytosolic reservoir protein Keap1 in Japanese. Drug Metab. Pharmacokinet., 22: 212-219, 2007.

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

2. 学会発表

- 1) Y. Saito, M. Tohkin, H. Fukushima-Uesaka, K. Maekawa, K. Sai, R. Hasegawa, N. Kamatani, K. Suzuki, H. Kajio, N. Kuzuya, M. Noda, T. Yanagawa, K. Yasuda, and J. Sawada: Haplotype structures of *ABCC8* and *KCNJ11* genes and their influence on glimepiride efficacy. 8th International Society for the Study of Xenobiotics Meeting, (October 11, 2007, Sendai, Japan.).
- 2) 斎藤嘉朗, 頭金正博, 福島(上坂) 浩実, 前川京子, 佐井君江, 長谷川隆一, 鎌谷直之, 鈴木佳寿子, 柳川達生, 梶尾裕, 葛谷信明, 野田光彦, 安田和基, 澤田純一: スルホニルウレア剤グリメピリドの有効性に対する受容体 *ABCC8* 及びトランスポーター *ABCG2* のハプロタイプの影響。第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 合同大会(平成19年12月13日、横浜)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

二次無効発現と相関する遺伝子多型につき、特許出願を予定している。

表1 SU剤有効11年以上の長期有効群(130名)及びSU剤使用10年以内でインスリン治療に移行した二次無効群(42名)の背景因子

	Control (Treatment with SU: >10 years)	Secondary failure (Treatment with SU: ≤10 years)
n (men/women)	79/51	26/16
Age (years)	73±5.5	70±4.8
Age at diagnosis (years)	48±7.5	49±7.3
Type 2 diabetic patients in family	60.2%	60.0%
Term of type 2 diabetes (years)	23±6.0	20±6.5
Age at SU intake begin (years)	53.5±6.4	53±6.5
Treatment with SU (years)	17±4.0	6±2
Treatment with insulin (years)	-	7.5±3.4
HbA1c (%)	7.2±0.6	8.4±0.9
FBS (mg/dl)	143±20.0	160±37.1
BMI (kg/m ²)	22.7±1.8	23.4±2.0
Total cholesterol	192±19.9	194±24.5
HDL cholesterol	48.5±9.6	50±10.5
Triglycerides (mg/dl)	106±44.4	105±46.5

Data were median ± interquartile deviation. Values were compared by Mann-Whitney U-test or Fisher's exact test.

Region	5'-flanking			5'-UTR	Exon 2	Exon 5	Exon 6		Exon 8 (3'-UTR)				Num- ber	Fre- quency		
Position	-1314	-427	-222	-209	278	805	836	842	+402	+624	+1036	+1046				
Nucleotide change	ins A	A>T	C>A	C>T	C>T	A>G	A>G	G>A	C>T	ins A	C>G	A>T				
Amino acid change					P93L	I269V	Y279C	S281N								
Haplotype	*1	*1a												98	0.366	
		*1b													76	0.284
		*1c													62	0.231
		*1d													6	0.022
		*1e													6	0.022
		*1f													3	0.011
	*1 others													11	0.041	
	*2	*2a													3	0.011
	*3	*3a													1	0.004
	*4	*4a													1	0.004
	*5	*5a													1	0.004
													268	1.000		

図1. TXNIP 遺伝子の日本人におけるハプロタイプ構造 (頻度 0.01 未満の*1 ハプロタイプは、*1 others としてまとめ、これらハプロタイプのみが有する遺伝子多型は割愛した。)

Region		Exon 2	Intron 2	Exon3 (3'-UTR)			3'-flanking	Number	Frequency
Position		225	IVS2 +126	*423	*702	*975	*1013 (*993+20)		
Nucleotide change		T>C	T>C	C>T	C>T	ins A	G>C		
Amino acid change		I75I							
Haplotype	*1	*1a						169	0.631
		*1b						40	0.149
		*1c						18	0.067
		*1d						16	0.060
		*1e						7	0.026
		*1f						7	0.028
		*1g						5	0.019
		*1 others						6	0.022
								268	1.000

図2. *GLRX* 遺伝子の日本人におけるハプロタイプ構造
(頻度 0.01 未満の *1 ハプロタイプは、*1 others としてまとめ、
これらハプロタイプのみが有する遺伝子多型は割愛した。)

表2. 多変量解析 (ロジスティック回帰分析) による二次無効発現予測モデル

Variable	Coefficient	χ^2 value	P value	R ²
				0.1385
Gene A SNP 1	-0.745	9.56	0.0020	
Gene B SNP 2	0.730	6.25	0.0124	
Gene C SNP 3	-0.610	4.96	0.0259	
Gene D SNP 4	-0.449	4.86	0.0275	

Analyzed by forward ($p < 0.1$) and backward ($p < 0.1$) stepwise procedures.

インスリン分泌促進型経口糖尿病薬による二次無効発現に関する
ゲノム網羅的遺伝子多型解析

分担研究者 前川 京子 国立医薬品食品衛生研究所 機能生化学部 主任研究官

研究要旨： インスリン分泌促進型経口糖尿病薬、特にスルホニルウレア剤（SU 剤）の二次無効との相関解析のために、Affymetrix 社の Gene Chip Human Mapping 250K Nsp Array を用いたゲノム網羅的遺伝子多型解析を継続した。SU 剤長期有効患者 140 名、二次無効患者 71 名による相関解析の結果、100 個の多型が $p < 0.001$ で二次無効と相関した。

A. 研究目的

日本人における糖尿病の約95%以上を占める2型糖尿病の治療にはインスリン分泌促進型経口糖尿病薬（主として、スルホニルウレア型糖尿病薬：SU剤）が繁用されている。しかし、SU剤の「二次無効」、すなわち、治療効果を発揮したSU剤が一定期間経過した後、臨床的に効かなくなり、インスリン治療へ移行する、という現象が、糖尿病の診療において約2割で発生する。二次無効により血糖コントロールが不良になり高血糖状態が続くと、インスリン感受性の低下や膵臓細胞死によるインスリン分泌低下を引き起こし、さらなる薬効低下・合併症の併発をもたらす。二次無効の発現が予測可能となれば、当該患者に対し、他の作用機構を有する経口糖尿病薬の使用や併用、又はインスリン治療への早期移行等を行うことが可能となり、患者のQOLの向上や合併症の減少につながると期待される。また、二次無効に関与する分子の解明は新たな創薬の基盤ともなる。

SU剤の二次無効は、膵β細胞の「疲弊」などと表現されることもあるが、その分子メカニ

ムは明らかでない。また、二次無効に遺伝因子が関与することは示唆されつつも、これと相関する多型についての報告は、欧米人を対象とした*IRS1*及び*KCNJ11*に関する2報のみである。そこで本研究では、ゲノム網羅的遺伝子多型の解析により二次無効と相関する多型を探索することを目的とする。

B. 研究方法

1) Gene Chip Human Mapping 250K Nsp Array を用いたアッセイ

実験は、分担研究者安田和基先生（国立国際医療センター研究所）より供与されたSU 剤長期有効患者 82 名、二次無効患者 288 名のゲノム DNA を試料とし、Affymetrix 社の添付のマニュアルに従い、行った。すなわち、全ゲノム DNA 250 ng を制限酵素 Nsp I（New England Biolabs, Ipswich, MA, USA）で消化し、4 塩基(bp)の特異的突出末端に対応するアダプター（Affymetrix GeneChip Mapping 250K Nsp assay kit に含む、Affymetrix Japan Inc., 東京）を T4 DNA Ligase（New England Biolabs）を

用いてライゲーションした。アダプターを付加した DNA フラグメントを、アダプター配列を認識するプライマー (PCR Primer 002, Affymetrix GeneChip Mapping 250K Nsp assay kit に含む、Affymetrix Japan Inc.) を用いて PCR 増幅した。すなわち、鋳型 DNA、プライマー、TITANIUM Taq DNA polymerase (Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA, USA)、dNTP mixture (宝バイオ(株)、滋賀) 及び添加剤として GC-Melt (宝バイオ(株)) を含む PCR 反応溶液を、94°C で 3 分処理後、94°C で 30 秒、60°C で 45 秒、及び 68°C で 15 秒を 30 サイクル行い、最後に 68°C で 7 分処理した。アガロースゲル電気泳動にて 250-2000 bp のサイズのフラグメントが優先的に増幅していることを確認した後、DNA Amplification Clean-Up Kits (Clontech Laboratories, Inc.) を用いて PCR 産物を精製した。精製した PCR 産物を吸光度法により定量し、その 90 µg を DNase I (Affymetrix GeneChip Mapping 250K Nsp assay kit に含む、Affymetrix Japan Inc.) を用いて断片化した。アガロースゲル電気泳動にて 180 bp 以下のサイズに断片化されたことを確認し、Terminal Deoxynucleotidyl Transferase (Affymetrix GeneChip Mapping 250K Nsp assay kit に含む、Affymetrix Japan Inc.) を用いて末端標識した。標識した鋳型 DNA を含むハイブリダイゼーションカクテルを 49°C で 17 時間インキュベートして、アレイにハイブリダイズさせた (Hybridization oven 640, Affymetrix Japan Inc.)。インキュベーション後、アレイを洗浄・染色し (Fluidics Station 450, Affymetrix Japan Inc.)、専用スキャナー (GeneChip Scanner 3000, Affymetrix Japan Inc.) 及び GeneChip Operating Software (GCOS, Affymetrix Japan Inc.) を用いて蛍光画像を

解析した。

2) ジェノタイプの決定、データクリーニング及び相関解析

GeneChip Genotyping Analysis Software (GTYPE, Affymetrix Japan Inc.) にて各プローブのシグナル強度を算出し、Dynamic Model (DM) アルゴリズムにより各アレイのアレル判定率を評価した。DM アルゴリズムによるアレル判定率が 93% 以下の場合には再実験を行うとともに、Modified Partitioning Around Medoids Mapping (MPAM) アルゴリズムによりサンプルにコンタミネーションがないことを確認した。DM アルゴリズムにより 93% 以上のアレル判定率が得られたサンプルは Bayesian Robust Linear Model with Mahalanobis distance classifier (BRLMM) アルゴリズムを用いてクラスタリング解析を行い、得られた遺伝子型を最終判定とし、以後の解析に使用した。

全タイピングデータは、関連解析ツール GQuest (Stargen, Tokyo, Japan) により (A) 「各多型につきアレル判定率が 90% 以上であり」、かつ (B) 「Fisher の正確確率検定を用いた Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) 法則への適合度検定により $p > 0.05$ (多重性は Bonferroni により補正)」、かつ (C) 「minor allele frequency (MAF) が 5% 以上であること」の 3 つの条件でフィルタリングを行い、すべてを満たす多型を相関解析に用いた。なお、case 群及び control 群の各群別の HWE 法則への適合性は SNPalyze (Dynacom, Yokohama, Japan) により評価した。

相関解析には、GQuest (Stargen) を使用し、アレルの個数に基づく傾向性の有無をコクラン・アーミテージ検定により検定した。さらに (1) 対立遺伝子 (Allele) モデル、(2) 共有性 (codominant) モデル、(3) 優性 (dominant) モデル、(4) 劣性 (recessive) モデルに対するカイ二乗検定及び Fisher の正確法検定により p 値を

算出した。多重比較法として、log Quantile-Quantile (QQ) p-value plotを用いた。相関解析における検出力の算出には、GdesignPlus (Stargen)またはフリーソフトウェアの R を使用した。

(倫理面への配慮)

本研究は患者検体由来のヒトゲノム DNA を対象にし、遺伝子多型解析を行うと共に、臨床データを取り扱うものであり、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」及び「臨床研究に関する倫理指針」を遵守し、研究倫理審査委員会の承認のもとに行った。

C. 研究結果

1) Gene Chip Human Mapping 250K Nsp Array を用いた アッセイ

SU 剤長期有効患者 140 名 (男性 91 名、女性 49 名)、二次無効患者 71 名 (男性 42 名、女性 29 名) につき、実験を終了した。DM アルゴリズムによる平均アレール判定率は 94.72% (AA call: 39.37%, AB call 23.71%, BB call: 36.92%) であり、BRLMM アルゴリズムによる平均アレール判定率は 98.39% (AA call: 38.20%, AB call 25.41%, BB call: 36.39%) であった。SU 剤長期有効患者及び二次無効患者の平均 SU 剤使用期間は、それぞれ 15.0 ± 6.7 年、 11.2 ± 7.3 年であった。これらの検体を以下の相関解析に用いた。

2) データクリーニング及び相関解析

Nsp Array に含まれる 262,264 個の single nucleotide polymorphism (SNP) のうち、(A) 「各多型につきアレール判定率が 90% 以上であり」、かつ (B) 「Fisher の正確確率を用い

た Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) 法則への適合度検定により $p > 0.05$ (多重性は Bonferroni により補正)」、かつ (C) 「minor allele frequency (MAF) が 5% 以上であること」のすべての条件を満たす SNP は 176,826 個であり、全 SNP 総数の 67.4% であった。これらの SNP の各染色体 (Chr1-Chr22, ChrX) における分布を表 1 に示す。上記の 3 条件を満たす SNP は全ての染色体に均等に分布していた。

フィルタリング後の SNP 176,826 個につき、各種の統計モデルにより SU 剤長期有効患者群と二次無効患者群間で相関解析を行った。コクラン・アーミテージ検定で $p < 0.001$ を示した SNP のうち、対立遺伝子モデル、共有性モデル、優性モデル、劣性モデルのいずれかに対するカイ二乗検定 (または Fisher の正確確率検定) においても $p < 0.001$ を示した SNP の数は、表 1 に示すように 100 個であった。これら 100 個の SNP のアレール判定率、HWE 検定の p 値、MAF の平均値はそれぞれ、98.6%、 $p = 0.57$ 、MAF = 0.23 であった。低い p 値を示した SNP につき、その解析結果の一部を表 2 にまとめた。これらの中には、アポトーシス関連のシグナル伝達分子、脂質代謝に関与する分子、タンパク質分解酵素等をコードする遺伝子の領域内または、その近傍に位置する SNP 等が含まれていた。また、上記 4 つのモデルのいずれかに対するカイ二乗検定 (または Fisher の正確確率検定) または、コクラン・アーミテージ検定において $p < 0.001$ 及び $p < 0.01$ を示した SNP の数は、それぞれ 267 個及び 3005 個であった (表 1)。

各モデルで得られた検定結果の p 値に対して log Quantile - Quantile (QQ) p-value plot を作製し、多重比較法による検討を行った。Fisher の正確確率検定による劣性モデル

の QQ plot を図 1a に示す。低い p 値を示した上位 4 個の SNP において、それらの p 値が、観測値の一様分布から外れて期待値よりも小さい値を示したことから、二次無効との関連性が強く示唆された。これらのうち、2 個は 7 番及び 12 番染色体の遺伝子のない領域に属していたが、残り 2 個は、共に 9 番染色体に位置し(図 1b)、それぞれ rRNA のプロセッシングに関与する因子及び転写制御因子をコードする遺伝子上流 20kb 内に位置していた。

D. 考察

SU 剤の二次無効は、臨床上約 2 割で認められるが、その分子メカニズムが不明な点が多く、これと相関する遺伝子多型を探索するためには網羅的遺伝子多型解析が最も有効な手段である。しかし、ゲノム網羅的多型解析においては、多量な遺伝子多型データを扱うため、その品質管理が不可欠である。解析 SNP の抽出条件として、昨年の子備解析と同様、各 Chip のアレル判定率を 93%以上とし、SNP ごとのアレル判定率を 90%以上、マイナーアレル頻度を 5%以上に設定した。実際、BRLMM アルゴリズムによる Chip ごとのアレル判定率の最小値は、96.7%であった。また、二次無効と相関を示した 100 個の SNP の HWE 検定における p 値の最小値は $p=0.004$ (Bonferroni による補正前) であり、100 個のうち 91 個は $p>0.1$ であった。これらの結果より、タイピングの正確性及び遺伝継承法則への適合性は、十分に保証されていると考える。

今回、SU 剤長期有効患者 140 名、二次無効患者 71 名における相関解析から、100 個の多型が $p<0.001$ で二次無効と相関した。これらの中には、アポトーシス関連のシグナル伝達分子、脂質代謝に関与する分子、

タンパク質分解酵素等をコードする遺伝子の領域内または、その近傍に位置する SNP 等が含まれていた。しかしながら、タイプ I の誤りの多重性を考慮すると、現時点で、これらの SNP が二次無効に関与すると判断することはできない。また、QQ p -value plot における多重比較法において有意であった 4 個の SNP の検出力は、0.55 - 0.65 であり十分ではなかった。

今後の予定として、現時点で二次無効との相関が示唆される候補 SNP につき、さらに検体数を増やして 2 次スクリーニングを行う予定である。図 3 に、コントロール群の母比率 0.2 の SNP に対し、1 次スクリーニングの有意水準を $p=0.001$ 、全体の有意水準を $p=2.5e-7$ としたとき(独立法)の、検体数と検出力の関係をオッズ比ごとに示した。2 次タイピングと並行して、患者の背景因子を取り入れた新たな解析モデルの構築や、連鎖不平衡に基づく原因 SNP 及びハプロタイプの同定、候補 SNP の *in vitro* 機能解析についても考慮していきたい。

E. 結論

SU 剤の二次無効と相関する遺伝子多型を探索するため、Affymetrix 社の Gene Chip Human Mapping 250K Nsp Array を用いたゲノム網羅的遺伝子多型解析を継続した。SU 剤長期有効患者 140 名、二次無効患者 71 名の相関解析の結果、100 個の多型が $p<0.001$ で二次無効と相関し、これらの中には、アポトーシス関連のシグナル伝達分子、脂質代謝に関与する分子、タンパク質分解酵素等をコードする遺伝子の領域内または、その近傍に位置する SNP が含まれていた。また QQ p -value plot による多重比較法において 4 個の SNP が二次無効と有意に相関した。

なお、協力研究者である国立医薬品食品衛生研究所・機能生化学部・澤田純一部長、及びフリーソフトウェアの R のプログラミングにご協力頂いた(株)スタージェンの上辻茂男博士に感謝する。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

表1 データクリーニング及び相関解析

染色体	総タイピングSNP数 (個)	フィルタリング後のSNP数*		各種の検定で低いp値を示したSNP数(個)		
		(個)	(%)	検定①	検定②	検定③
Chr1	19865	13151	66.2	6	22	264
Chr2	22213	14668	66.0	10	28	305
Chr3	18379	12389	67.4	3	16	218
Chr4	19058	12513	65.7	10	22	214
Chr5	17164	11623	67.7	3	9	176
Chr6	17144	12038	70.2	2	10	203
Chr7	13950	9662	69.3	5	10	146
Chr8	14839	10107	68.1	2	19	171
Chr9	11941	8273	69.3	7	20	135
Chr10	14277	9614	67.3	10	16	149
Chr11	13306	9138	68.7	2	8	151
Chr12	13058	8888	68.1	6	13	145
Chr13	11117	7422	66.8	7	9	127
Chr14	8181	5531	67.6	6	15	100
Chr15	7011	4701	67.1	5	13	80
Chr16	7024	4804	68.4	2	7	81
Chr17	4854	3213	66.2	3	7	57
Chr18	8148	5347	65.6	6	10	95
Chr19	2692	1848	68.6	1	2	45
Chr20	5837	3948	67.6	2	4	62
Chr21	3935	2712	68.9	2	2	47
Chr22	2519	1820	64.3	0	5	34
ChrX	5705	3596	63.0	ND	ND	ND
不明	47	20	42.6	0	0	0
	262264	176626	67.4	100	267	3005

ND, not determined

* HWE法則への適合度検定はX染色体には適用していない。

検定①: コクラン・アーミテージ検定で $p < 0.001$ を示したSNPのうち、対立遺伝子モデル、共有性モデル、偏性モデル、劣性モデルのいずれかに対するカイニ乗検定(またはFisherの正確確率法検定)またはコクラン・アーミテージ検定のいずれかの検定で $p < 0.001$ を示したSNPの数

検定②: 対立遺伝子モデル、共有性モデル、偏性モデル、劣性モデルに対するカイニ乗検定(またはFisherの正確確率法検定)またはコクラン・アーミテージ検定のいずれかの検定で $p < 0.001$ を示したSNPの数

検定③: 対立遺伝子モデル、共有性モデル、偏性モデル、劣性モデルに対するカイニ乗検定(またはFisherの正確確率法検定)またはコクラン・アーミテージ検定のいずれかの検定で $p < 0.01$ を示したSNPの数

図1a Log Quantile-Quantile (QQ) p-value plot

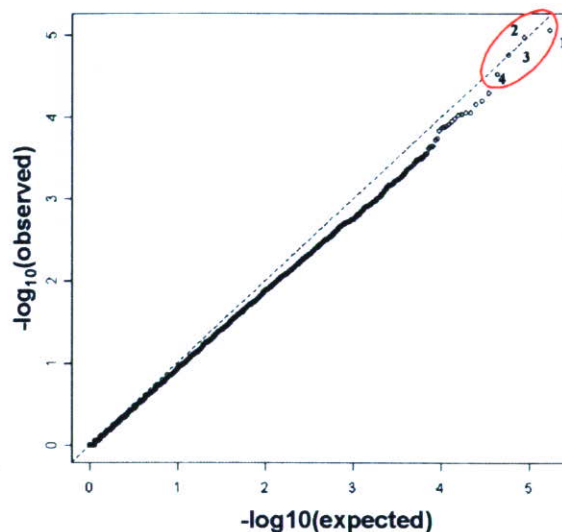


図1b 各染色体におけるp値の分布

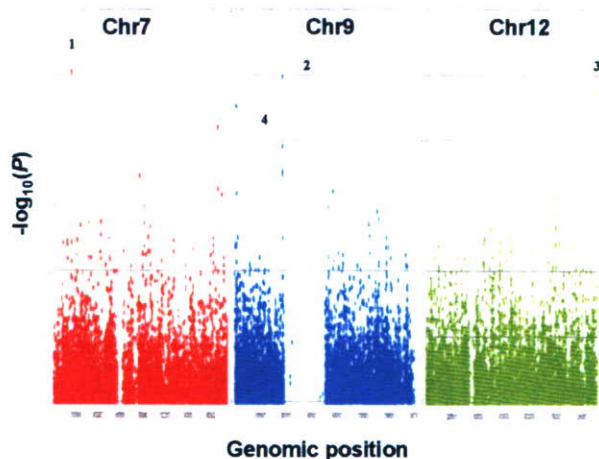
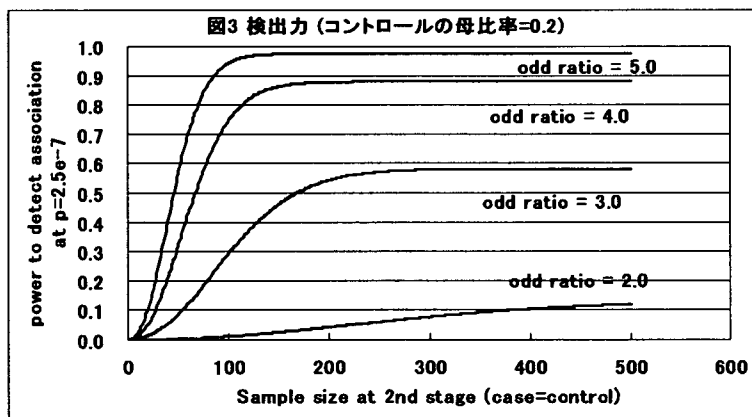


表2 二次無効と相関したSNPの例

SNP	染色体	マイナーアレル頻度		オッズ比	95%信頼区間	Cochrane-Armitage p value	location
		SU剤長期有効患者	SU剤二次無効患者				
SNP01	9	0.021	0.113	5.8	2.22-15.2	9.41E-05	intron
SNP02	13	0.143	0.289	2.4	1.49-3.40	4.16E-04	intron
SNP03	9	0.299	0.464	2.0	1.33-3.10	5.26E-04	intron
SNP04	2	0.404	0.585	2.1	1.38-2.63	7.25E-04	3' flanking (Distance:7.9kb)
SNP05	1	0.272	0.437	2.1	1.36-3.176	8.21E-04	intron
SNP06	8	0.139	0.275	2.3	1.42-3.86	8.27E-04	intron
SNP07	10	0.336	0.176	0.4	0.26-0.70	8.96E-04	intron
SNP08	6	0.361	0.535	2.0	1.35-3.08	1.04E-03	intron
SNP09	4	0.259	0.394	1.9	1.21-2.87	5.03E-03	5' flanking (Distance:12.4kb)
SNP10	3	0.411	0.549	1.7	1.16-2.63	5.84E-03	intron
SNP11	9	0.485	0.341	0.5	0.35-0.85	9.62E-03	intron



厚生労働科学研究費補助金(創薬基盤推進研究事業)
分担研究報告書

インスリン分泌促進型経口糖尿病薬の薬物応答関連遺伝子の多型に関する機能解析

分担研究者 埴岡伸光 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 准教授

研究要旨:日本人で新たに見出された変異型 HNF4A(1型及び2型)の転写活性並びに変異型 CYP2C8の酵素機能を明らかにすることを目的とした。HNF4A については、pcDNA3.2-DEST ベクターに導入した1型及び2型の野生型(1-WT 及び 2-WT)及びそれぞれの変異型(1-Mutant 及び 2-Mutant)を HNF1A のプロモーター領域(HNF4A 結合部位を含む)が導入された pGL3-Basic ベクター並びに phRL-TK ベクターと共に COS-7 細胞にトランスフェクションし、デュアルルシフェラーゼレポーターアッセイにより転写活性を測定した。その結果、1-Mutant 及び 2-Mutant の転写活性はいずれもそれぞれの野生型と比べて有意な差は認められなかった。一方、CYP2C8 は、野生型 CYP2C8 (CYP2C8*1A)及びアミノ酸置換を伴う変異型 CYP2C8(CYP2C8*X 及び CYP2C8*Y) cDNA を作製し、pGYR1 ベクターに導入してそれぞれの酵素蛋白質(CYP2C8.1(野生型)、CYP2C8.X 及び CYP2C8.Y)を酵母(*Saccharomyces cerevisiae* AH22 株)で発現した。酵母細胞マイクロゾームを用いたウェスタンブロット分析において陰性対照を除く野生型及び変異型 CYP2C8 いずれにおいても抗ヒト CYP2C8 抗体と交差するタンパク質バンドが検出された。また、CYP2C8 発現酵母細胞マイクロゾームを用いて還元型 CO 差スペクトルを測定したところ、野生型及び CYP2C8.X では 450 nm に吸収極大を示したが、CYP2C8.Y ではそのピークは極めて低かった。酵素機能の解析はパクリタキセル 6 α -水酸化活性を測定することにより行い、野生型 CYP2C8 の活性は 4.68 pmol/min/CYP であった。CYP2C8.X の活性は野生型 CYP2C8 とほぼ同程度であったが、CYP2C8.Y では全く活性は検出されなかった。このことは、CYP2C8*Y が引き起こすアミノ酸置換はパクリタキセルに対する CYP2C8 の触媒活性に影響を与えることが示唆された。

A. 研究目的

トルブタミド、グリメピリドやグリベンクラミドなどのインスリン分泌促進型経口糖尿病薬(SU 剤)は2型糖尿病治療の第一選択薬としてよく使用されている。しかし、SU 剤には原因がまだ解明されていない“二次無効”という問題があり、これが治療における投与規定因子となっている。

Fukushima-Uesaka ら[1]は、最近日本人の2型糖尿病患者から新たに、2つの連鎖する HNF4A の遺伝子多型を同定している(1154C>T (A385V) 及び 1193T>C (M398T) (1-Mutant、2-Mutant))。HNF4A は、転写活性化因子の一つであり、肝臓、小腸及び腎臓などの組織に発現し、CYP や UGT

などの薬物代謝酵素の発現・誘導に関与していることが報告されている[2]。これら薬物代謝酵素の mRNA、タンパク質量及び代謝活性には大きな個人差があることが知られており、SU 剤の一次無効との関連性が指摘されている。従って、SU 剤の薬効最適化の根拠となる情報を得るためにはこれまで報告されている薬物代謝酵素の遺伝子多型のみならず HNF4A の遺伝子多型も考慮した基礎的検討が必要である。

SU 剤は主に肝臓に発現している CYP により代謝されることが報告されている。なかでも CYP2C 分子種(CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19)がそれらの代謝に重要な役割を果たしていることが示唆されてい