

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

生活習慣と遺伝子型による2型糖尿病発症リスク
予測法の開発

平成20年度 総合研究報告書

主任研究者 原 一雄

平成21(2009)年 4月

目 次

I. 総括研究報告	
生活習慣と遺伝子型による2型糖尿病発症リスク予測法の開発	
原 一雄 -----	3
II. 分担研究報告	
1. 新規2型糖尿病感受性遺伝子の機能解明	
門脇 孝 -----	10
2. インスリン抵抗性に関する糖尿病感受性遺伝子の同定	
山内 敏正 -----	13
3. インスリン分泌不全に関する糖尿病感受性遺伝子の同定	
戸辺 一之 -----	16
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----
	20
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----
	22

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）

総括研究報告書

生活習慣と遺伝子型による2型糖尿病発症リスク予測法の開発

主任研究者 原 一雄 東京大学医学部附属病院 講師

研究要旨：本研究は、日本人で2型糖尿病発症リスクを上昇させる感受性遺伝子とその多型を明らかにすることで、糖尿病の1次予防を効率的に行うハイリスク者スクリーニング法開発のための基礎的データを得ることを目的としている。まず、罹患同法対法による全ゲノム解析と候補遺伝子アプローチによって、AMP キナーゼ $\alpha 2$ サブユニット遺伝子、HNF4 α 遺伝子が日本人における2型糖尿病感受性遺伝子であることを報告した。また、欧米人で明らかになった2型糖尿病感受性遺伝子について日本人における意義を検討し、TCF7L2 遺伝子、HHEX 遺伝子が日本人においても糖尿病感受性遺伝子として一定の役割を担っていることを明らかにした。また、染色体 11 番の領域で有意に2型糖尿病と相関する新規の遺伝子多型を見出したが、当該遺伝子の欠損マウスについてその表現型を解析したところ、インスリン分泌低下を示し、当該遺伝子がグルコース応答性のインスリン分泌に関与していることが判明した。これまでに判明した複数の糖尿病感受性遺伝子多型の情報を統合して判定することによって、2型糖尿病の高リスク者をスクリーニング出来る可能性が示唆された。

分担研究者

門脇 孝 東京大学医学部附属病院
教授

山内 敏正 東京大学医学部附属病院
特任准教授

戸辺 一之 富山大学医学部附属病院
教授

泌不全に関わっているのか、インスリン抵抗性に関わっているのかを、当該遺伝子改変動物の表現型を解析することで明らかにする。また、諸外国で2型糖尿病感受性遺伝子として報告された遺伝子に、日本人での糖尿病易罹患性における意義を検討する。以上により、2型糖尿病発症リスク予測法開発の基礎的データを得る。

A. 研究目的

2型糖尿病はインスリン分泌低下にインスリン抵抗性が加わって発症する多因子病である。本研究では、インスリン分泌不全によって2型糖尿病を発症させやすくしている感受性遺伝子と、インスリン抵抗性によって2型糖尿病を発症させやすくしている感受性遺伝子を同定する。機能が未知の新規2型糖尿病感受性遺伝子については、インスリン分

B. 研究方法

(1)インスリン分泌不全に関与する感受性遺伝子の解明：罹患同胞対法による全ゲノム解析によって同定した9箇所（1p36-p32, 2q34, 3q26-q28, 6p23, 7p22-p21, 9p, 11p13-p12, 15q13-q21, 20q12-q13）の日本人2型糖尿病感受性遺伝子座について、インスリン分泌に関与しているこ

とが報告されている遺伝子について SNP を利用した相関解析によって日本人 2 型糖尿病感受性遺伝子としての意義を検討する。特に染色体 20 番の領域には、膵 β 細胞の発生・分化に重要であり、若年発症で常染色体優性遺伝の様式をとる単一遺伝子病の原因遺伝子 HNF-4 α が位置しており、有望な候補であった。また、アイスランドとデンマーク、米国の研究グループから TCF7L2 (Transcription Factor 7-Like 2) 遺伝子が 2 型糖尿病感受性遺伝子であると報告され (Nature Genet 38:320-323, 2006)、インスリン分泌に重要な役割を担っている GLP (Glucagon like peptide)-1 遺伝子の発現を調節する転写因子であるためインスリン分泌低下に関与する糖尿病感受性遺伝子の有望な候補と考えられた。そこで TCF7L2 遺伝子多型を利用した相関解析を行い日本人における意義を検討した。

(2) インスリン抵抗性に関与する感受性遺伝子の解明：日本人 2 型糖尿病感受性遺伝子座のうち染色体 1 番の領域については、骨格筋の収縮によって活性化され、インスリン感受性物質アディポネクチンの作用を媒介する AMP キナーゼ $\alpha 2$ サブユニット (PRKAA2) 遺伝子が位置しており、本遺伝子の機能低下はインスリン抵抗性を引き起こすことが推測される。そこで PRKAA2 遺伝子の SNP を利用した相関解析によって本遺伝子の 2 型糖尿病感受性遺伝子としての意義を検討した。

(3) 機能未知の新規 2 型感受性遺伝子の同定：SNP による相関解析によって

統計学的に 2 型糖尿病と関連しても、当該遺伝子の機能が明らかにすることが、2 型糖尿病遺伝素因における役割の解明には必須である。本研究では SNP による相関解析によって新たに 2 型糖尿病感受性遺伝子であることが推測された遺伝子について遺伝子欠損マウスの表現型を解析することによって、当該遺伝子がインスリン分泌に関与しているのか、インスリン抵抗性に関与しているのかを明らかにする。また、ヒト組織を利用した発現解析によって、SNP の遺伝子型が当該遺伝子の発現に影響を与えているか否かについて検討を行う。

(倫理面への配慮)平成 15 年 7 月 30 日に厚生労働省によって策定された「臨床研究に関する倫理指針」を遵守して研究を遂行する。その具体的な配慮として、臨床研究を実施するに当たり、被験者の個人情報の保護のために、本研究で提供される試料はすべて個人識別情報(カルテ番号, 名前, 住所など)を除き、連結可能匿名化した上で解析に利用される。連結可能のための対応表は他の一切のコンピューターと切り離されたコンピューターに専用の ID とパスワードによって厳重に保管される。また、当該コンピューターは民間警備会社によるセキュリティシステムによって守られ、不特定多数の者の出入りができない専用の部屋に設置されるため個人情報の保護については厳格に行っている。

C. 研究結果

(1) インスリン分泌不全に関与する感受性遺伝子の解明：日本人 2 型糖尿病感受性遺伝子座のうち染色体 20 番の領域には、膵 β 細胞の発生・分化に重要

な役割をもっている HNF-4 α 遺伝子が位置していた。そこで HNF-4 α 遺伝子はインスリン分泌不全に関与する感受性遺伝子の候補として有望と考えられたため本遺伝子の SNP による相関解析を行ったところ、膵 β 細胞特異的なプロモーター領域に存在する SNP の組み合わせによるハプロタイプと 2 型糖尿病とが一貫して有意な相関を示し、本遺伝子が日本人における 2 型糖尿病感受性遺伝子であることが明らかとなった (Diabetes 55:1260-4, 2006)。また、最近アイスランドとデンマーク、米国の研究グループから TCF7L2 (Transcription Factor 7-Like 2) 遺伝子の領域に 2 型糖尿病と有意に相関する遺伝子多型を複数認めたと報告がなされた (Nature Genet. 38:320-323, 2006)。本遺伝子はインスリン分泌に重要な役割を担っている GLP (Glucagon like peptide)-1 遺伝子の発現を調節する転写因子であるためインスリン分泌低下に関与する糖尿病感受性遺伝子の有望な候補と考えられた。そこで TCF7L2 遺伝子多型を利用した相関解析を行ったところ、TCF7L2 遺伝子多型 rs7903146 が有意に 2 型糖尿病と相関し ($p=0.0018$)、リスクアリル保持者は糖尿病のリスクが 1.69 倍上昇していた。さらに対象者を BMI 25 未満の非肥満者に限定するとそのオッズ比は 2.24 とさらに上昇することが明らかになり、インスリン抵抗性というよりは、痩せ型でインスリン分泌不全を来すタイプの 2 型糖尿病を引き起こしやすくしていることが推測された (Diabetologia 50:747-751, 2007)。欧米人で 2 型糖尿病感受性遺伝子として報告された

HHEX 遺伝子上の 3 つの SNP は互いに連鎖不平衡にあり、いずれも有意に 2 型糖尿病と相関した (rs5015480, オッズ比 [OR] = 1.46 [95% CI 1.20-1.77], $p = 2.0 \times 10^{-4}$; rs7923837, [OR]=1.40 [95% CI 1.17-1.68], $p = 2.0 \times 10^{-4}$; rs1111875, (OR)=1.30 [95% CI 1.11-1.52], $p=0.0013$)。HHEX 遺伝子と近隣の KIF11 遺伝子、IDE 遺伝子を含む 267kb の範囲において、27 個の tag SNP に関して連鎖不平衡マップを作成したところ、これらの 3 遺伝子がひとつの連鎖不平衡ブロックに含まれていた欧米人と異なり、日本人では KIF11, IDE 遺伝子を含むブロックと、HHEX を含むブロックの 2 つが互いに独立していた。よって日本人における検討から、この範囲における 2 型糖尿病感受性遺伝子は HHEX 遺伝子であることが示された。また、FTOrs8050136, CDKAL1rs7756992, CDKN2Brs10811661, SCL30A8rs13266634 多型も多重検定であることを考慮しなければ 2 型糖尿病と有意な相関を示した (FTO, OR = 1.22 [95% CI 1.03-1.46], $p = 0.025$; CDKAL1, OR = 1.20 [95% CI 1.03-1.39], $p = 0.017$; CDKN2B, OR = 1.22 [95% CI 1.05-1.41], $p = 0.0076$; SCL30A8, OR = 1.19 [95% CI 1.03-1.37], $p = 0.016$)。このうち CDKAL1rs7756992 と CDKN2Brs10811661 多型は HOMA によるインスリン分泌指標と有意な相関を示し、リスクアリル保持者ではインスリン分泌が有意に低下していた。HOMA-IR によるインスリン抵抗性指標と有意な相関を示す遺伝子多型

は存在しなかった。欧米人においては肥満を介して2型糖尿病感受性を発揮している肥満遺伝子として報告されているFTO遺伝子多型は、日本人においてはBMIとの相関は認められなかった。

(2)インスリン抵抗性に関与する感受性遺伝子の解明：日本人2型糖尿病感受性遺伝子座のうち染色体1番の領域については、骨格筋の収縮によって活性化され、インスリン感受性物質アディポネクチンの作用を媒介するAMPキナーゼ α 2サブユニット(PRKAA2)遺伝子が位置している。そこで本遺伝子と2型糖尿病との相関を検討したところSNPrs2051040がインスリン抵抗性と有意に相関し、更にrs2051040を含むハプロタイプが有意に2型糖尿病と相関することから本遺伝子がインスリン抵抗性に関与する2型糖尿病感受性遺伝子であることを明らかにした(Diabetes 55: 919-23, 2006)。本遺伝子型は2型糖尿病発症リスクの推定に役立つと考えられ特許を出願した(PRKAA2遺伝子多型による2型糖尿病発症素因の検出方法」特許出願2005-121591)。

(3)機能未知の新規2型感受性遺伝子の同定：日本人2型糖尿病感受性遺伝子座のうち、染色体11番(11p13-p12)の領域は、日本人を対象とした他のグループによる全ゲノム解析によっても一致して糖尿病との連鎖が報告され(J Hum Genet 2004 49:629-34)日本人に特異的な2型糖尿病感受性遺伝子座として極めて有望な領域である。そこで本領域について網羅的なSNPによる相関解析を行ったところ、複数のDNA

パネルで2型糖尿病と相関する遺伝子多型を見出した。本遺伝子が糖代謝における役割について報告がなかったものの、公開データベース(NCBIなど)から本遺伝子が糖代謝関連臓器で実際に発現していることが判明し有望であると考えられた。そこで本遺伝子の欠損マウスの表現型を解析することによって、本遺伝子の機能について個体レベルで検討を行った。本遺伝子欠損マウスはOGTT(Oral Glucose Tolerance Test:経口ブドウ糖負荷試験)におけるインスリン分泌能が野生型に比べて低下していること、高脂肪食負荷時の膵島面積が野生型に比べて小さいことから、本遺伝子がインスリン分泌低下を来す2型糖尿病感受性遺伝子であることが示唆された。同時に、ヒトから同意を得て採取された脂肪組織の遺伝子発現解析によって、本遺伝子多型の糖尿病のリスクを上昇させるアリル保持者は非保持者に比較して有意に本遺伝子の発現が低下していることが判明した。

D. 考察

日本人において2型糖尿病との相関を示したHNF-4 α 遺伝子、TCF7L2遺伝子、HHEX遺伝子は普遍的な2型糖尿病感受性遺伝子と考えられる。TCF7L2遺伝子は欧米人では糖尿病のリスクを上昇させるアリルの頻度が高く、糖尿病の遺伝素因全体に占める役割が大きいのに比べて、日本人ではその頻度が低いことから役割はそれほど大きくないと考えられた。新たに2型糖尿病との相関を見出した染色体11番上の遺伝子はグルコース応答性のインスリン分泌に一定の役割を担っており、当該遺伝子内にあるSNPの遺伝子型によ

て発現が低下するためにインスリン分泌不全を来して糖尿病を発症しやすくなることが示唆された。

更に、これまでに明らかになった2型糖尿病感受性遺伝子多型の糖尿病リスクを上昇させるアリル（リスクアリル）の個数が多いほど糖尿病リスクは有意に上昇するものの、リスクアリルの保持数に年齢、性別、BMI(Body mass index)などの臨床指標も合わせた方が、リスクアリルの個数のみよりも、より正確に糖尿病のリスクを推定できることが判明した。

E. 結論

個々の2型糖尿病感受性遺伝子単独では糖尿病リスクの上昇は30%程度であり、それ自体で糖尿病を予測する感度・特異度は高くない。しかしながら本研究や内外の研究で明らかになった複数の感受性遺伝子に、今後も明らかにされる糖尿病感受性遺伝子、年齢・性別・BMIなどの臨床情報を組み合わせることによって糖尿病リスクがある程度の正確性を持って予測できることが期待される。日本における糖尿病罹患者数の多さや今後の増加率を考慮すると、今後この分野の発展がますます望まれる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1.論文発表

(1) Miyake K, Yang W, Hara K, Yasuda K, Horikawa Y, Osawa H, Furuta H, Ng MC, Hirota Y, Mori H, Ido K, Yamagata K, Hinokio Y, Oka Y, Iw

asaki N, Iwamoto Y, Yamada Y, Seino Y, Maegawa H, Kashiwagi A, Wang HY, Tanahashi T, Nakamura N, Takeda J, Maeda E, Yamamoto K, Tokunaga K, Ma RC, So WY, Chan JC, Kamatani N, Makino H, Nanjo K, Kadowaki T, Kasuga M. Construction of a prediction model for type 2 diabetes mellitus in the Japanese population based on 11 genes with strong evidence of the association. *J Hum Genet.* 54(4): 236-41, 2009

(2) Yasuda K, Miyake K, Horikawa Y, Hara K, Osawa H, Furuta H, Hirota Y, Mori H, Jonsson A, Sato Y, Yamagata K, Hinokio Y, Wang HY, Tanahashi T, Nakamura N, Oka Y, Iwasaki N, Iwamoto Y, Yamada Y, Seino Y, Maegawa H, Kashiwagi A, Takeda J, Maeda E, Shin HD, Cho YM, Park KS, Lee HK, Ng MC, Ma RC, So WY, Chan JC, Lyssenko V, Tuomi T, Nilsson P, Groop L, Kamatani N, Sekine A, Nakamura Y, Yamamoto K, Yoshida T, Tokunaga K, Itakura M, Makino H, Nanjo K, Kadowaki T, Kasuga M. Variants in KCNQ1 are associated with susceptibility to type 2 diabetes mellitus. *Nature Genetics* 40(9):1092-7, 2008

(3) Unoki H, Takahashi A, Kawaguchi T, Hara K, Horikoshi M, Andersen G, Ng DP, Holmkvist J, Borch-Johnsen K, Jørgensen T, Sandbaek A, Lauritzen T, Hansen T, Nurbaya S, Tsunoda T, Kubo M, Babazono T, Hirose H, Hayashi M, Iwamoto Y, Kashiwagi A, Kaku K, Kawamori R, Tai ES, Pedersen O, Kamatani N, Kadowaki T, Kikkawa R, Nakamura Y, Maeda S. SNPs in KCNQ1 are associated with susceptibility to type 2 diabetes in East Asian and European popula

- tions. *Nature Genetics* 40(9):1098-102, 2008
- (4) Wang G, Watanabe M, Imai Y, Hara K, Manabe I, Maemura K, Horikoshi M, Kohro T, Amiya E, Sugiyama T, Fujita T, Kadowaki T, Yamazaki T, Nagai R. Genetic variations of Mff-2/ARID5B confer risk of coronary atherosclerosis in the Japanese population. *Int Heart J.* 49(3):313-27, 2008
- (5) Miyake K, Horikawa Y, Hara K, Yasuda K, Osawa H, Furuta H, Hirota Y, Yamagata K, Hinokio Y, Oka Y, Iwasaki N, Iwamoto Y, Yamada Y, Seino Y, Maegawa H, Kashiwagi A, Yamamoto K, Tokunaga K, Takeda J, Makino H, Nanjo K, Kadowaki T, Kasuga M. Association of TCF7L2 polymorphisms with susceptibility to type 2 diabetes in 4,087 Japanese subjects. *J Hum Genet.* 53(2):174-80, 2008
- (6) Horikoshi M, Hara K, Ito C, Shojima N, Nagai R, Ueki K, Froguel P, Kadowaki T. Variations in the HHEX gene are associated with increased risk of type 2 diabetes in the Japanese population. *Diabetologia.* 50(12):2461-6, 2007
- (7) Ochi M, Osawa H, Hirota Y, Hara K, Tabara Y, Tokuyama Y, Shimizu I, Kanatsuka A, Fujii Y, Ohashi J, Miki T, Nakamura N, Kadowaki T, Itakura M, Kasuga M, Makino H. Frequency of the G/G genotype of resistin single nucleotide polymorphism at-420 appears to be increased in younger-onset type 2 diabetes. *Diabetes.* 56 (11):2834-8, 2007
- (8) Horikoshi M, Hara K, Ito C, Nagai R, Froguel P, Kadowaki T. A genetic variation of the transcription factor 7-like 2 gene is associated with risk of type 2 diabetes in the Japanese population. *Diabetologia.* 50(4):747-51, 2007
- (9) Yokoi N, Kanamori M, Horikawa Y, Takeda J, Sanke T, Furuta H, Nanjo K, Mori H, Kasuga M, Hara K, Kadowaki T, Tanizawa Y, Oka Y, Iwami Y, Ohgawara H, Yamada Y, Seino Y, Yano H, Cox NJ, Seino S. Association studies of variants in the genes involved in pancreatic beta-cell function in type 2 diabetes in Japanese subjects. *Diabetes.* 55(8):2379-86, 2006
- (10) Kadowaki T, Yamauchi T, Kubota N, Hara K, Ueki K, Tobe K. Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. *J Clin Invest.* 116(7):1784-92, 2006
- (11) Hara K, Horikoshi M, Kitazato H, Ito C, Noda M, Ohashi J, Froguel P, Tokunaga K, Tobe K, Nagai R, Kadowaki T. Hepatocyte nuclear factor-4alpha P2 promoter haplotypes are associated with type 2 diabetes in the Japanese population. *Diabetes.* 55(5):1260-4, 2006
- (12) Horikoshi M, Hara K, Ohashi J, Miyake K, Tokunaga K, Ito C, Kasuga M, Nagai R, Kadowaki T. A polymorphism in the AMPKalpha2 subunit gene is associated with insulin resistance and type 2 diabetes in the Japanese population. *Diabetes* 55(4):919-23, 2006
2. 学会発表
- (1) Horikoshi M, Hara K, Ito C, Froguel P et al. A polymorphism in the TCF7L2 is associated with the risk of type 2 diabetes in the Japanese population.

67th Scientific Sessions of the American Diabetes Association. 1146-P Chicago, USA. June, 2007

(2)Horikoshi M, Hara K, Ito C, Shojima N et al. Variations in the *HHEX* gene are associated with increased risk of type 2 diabetes in the Japanese population. First Meeting of EASD Study Group of Genetics of Diabetes (EASD-SGGD), Malaga, Spain. October, 2007.

(3)Horikoshi M, Hara K, Ito C, Shojima N, Genomic Disorders 2008 Wellcome Trust Conference Centre, Cambridge UK, March, 2008

(4)Horikoshi M, Hara K, Shojima N, Ito C et al. Variations in the *TCF7L2* and *HHEX* genes independently confer Type 2 Diabetes Susceptibility on Japanese Population.

68th Scientific Sessions of the American Diabetes Association. 1146-P San Francisco, USA. June, 2008

H.知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

PRKAA2 遺伝子多型による2型糖尿病発症素因の検出方法
(特許出願 2005-121591)

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）

総括研究報告書

新規2型糖尿病感受性遺伝子の機能解明

分担研究者 門脇 孝 東京大学医学部附属病院 教授

研究要旨：糖尿病は細小血管症によるQOL(生活の質)の低下と動脈硬化促進による心筋梗塞・脳卒中発症のリスク増大を介して健康寿命を短縮している最大の問題の一つである。本研究は、日本人の2型糖尿病遺伝素因を解明し2型糖尿病の1次予防を効率的に行うためのハイリスク者スクリーニング法開発の基礎的データを得ることを目的としている。9ヶ所の日本人糖尿病感受性遺伝子座の中で染色体11番(11p13-p12)の領域については網羅的相関解析によって一貫して有意に2型糖尿病と相関する遺伝子多型を見出した。本遺伝子の糖代謝における役割は全く不明であったため、当該遺伝子の欠損マウスの表現型の解析により個体レベルで本遺伝子の機能について検討したところ、グルコース応答性のインスリン分泌に関与していることが明らかになった。

A.研究目的

2型糖尿病はインスリン分泌低下にインスリン抵抗性が加わって発症する多因子病である。本研究では、インスリン分泌不全によって2型糖尿病を発症させやすくしている感受性遺伝子と、インスリン抵抗性によって2型糖尿病を発症させやすくしている感受性遺伝子を同定する。機能が未知の新規2型糖尿病感受性遺伝子については、インスリン分泌不全に関わっているのか、インスリン抵抗性に関わっているのかを、当該遺伝子改変動物の表現型を解析することで明らかにする。また、諸外国で2型糖尿病感受性遺伝子として報告された遺伝子に、日本人での糖尿病易罹患性における意義を検討する。以上により、2型糖尿病発症リスク予測法開発の基礎的データを得る。

B.研究方法

全ゲノム解析によってマップした2型糖尿病感受性遺伝子座のうち、染色体1

番、3番、20番以外の6箇所の染色体領域に含まれるSNPのうち、国際HAPMAP projectによるハプロタイプブロック・ハプロタイプ標識SNPの情報によって疾患感受性遺伝子を効率よく同定することができるSNPを選択する。3つの独立した糖尿病・糖代謝正常者のDNAパネル(既に文書による同意を得てDNAを抽出済み)で一貫して2型糖尿病と相関を示すSNPを同定し、日本人2型糖尿病感受性遺伝子としての意義を検討する。機能が既知であるか否かに関わらず日本人2型糖尿病感受性遺伝子座に含まれるSNPを網羅的に解析するため、機能の未知な糖尿病感受性遺伝子も同定することが出来る。そのような機能未知であるが、3つのDNAパネルで一貫して2型糖尿病と相関を示す多型を含む遺伝子について遺伝子欠損マウスの表現型を詳細に解析し、当該遺伝子がインスリン分泌不全に関与するのかインスリン抵抗性に関与するのかなどについて明らかにする。

(倫理面への配慮)「ヒトゲノム・遺伝子解析研究のための倫理指針」「疫学研究に関する倫理指針」「臨床研究に関する倫理指針」を遵守し、書面による本研究への同意が得られた者のみを対象として研究を遂行する。更に指針の策定を受けて本学に設置された倫理審査委員会の承認を得て(承認番号 421)研究計画書に従い研究を実施する。具体的な配慮の項目としては以下の通り。①研究で使用される試料に関して:既に提供されているDNAなどの試料は、遺伝子解析研究での利用を明示した上で同意が文書で得られているもののみを研究対象としており問題はない。本研究で新規に提供される試料は、全て指針に従って採取される。②個人情報の保護に関して:本研究で提供される試料はすべて、個人識別情報(カルテ番号、名前、住所など)を管理する個人識別情報管理者により匿名化される。連結可能のための対応表は、個人識別情報管理者のもとで厳重に管理され、個人の情報を処理するコンピューターは他の一切のコンピューターと切り離され、個人識別情報管理者によって保管される。更に、個人識別情報管理者以外は、連結可能匿名化番号と個人識別情報との連結が不可能なようにする。東大病院では主任研究者の原一雄により個人情報匿名化システムが確立している(J.Hum.Genet.48:327-330, 2003) ③予測される試料提供者に対する危険や不利益に関して:試料提供は主として前腕の静脈からの採血によっており身体的危険はほとんどないといっている。また提供された試料は解析に先立って速やかに匿名化されるので、試料等提供者の尊厳と人権は十分に保護されていると考えられる。また、本研究

は多因子病としての2型糖尿病の感受性遺伝子を対象としており、単一遺伝子病の様に必ずしも遺伝カウンセリングが必要となるケースは少ないと思われるが、予想外の遺伝病の存在が明らかになった場合の予測される病態や予後、治療方針などにつき、結果の開示に伴い本人および家族に医学的あるいは心理的問題を生じる可能性があり、遺伝カウンセリングなどの体制を準備している。

C.研究結果

罹患同胞対による全ゲノム解析で同定した9箇所の日本人2型糖尿病感受性遺伝子座のうち染色体11番(11p13-p12)の領域は、日本人を対象とした他のグループによる全ゲノム解析によっても一致して糖尿病との連鎖が報告され(J Hum Genet 2004 49:629-34)、日本人に特異的な2型糖尿病感受性遺伝子座として極めて有望な領域である。そこで本領域について網羅的なSNPによる相関解析を行ったところ、2型糖尿病と一貫して相関する遺伝子多型を同定した。本遺伝子の生体内での機能については殆ど明らかにされていなかったため、統計学的には本遺伝子が2型糖尿病感受性遺伝子であると考えられたものの、生物学的にみても本遺伝子が糖脂質代謝に関与していることの確認が必要であった。そこで本遺伝子の欠損マウスの解析により本遺伝子の機能について個体レベルで検討を行った。本遺伝子欠損マウスはOGTT(Oral Glucose Tolerance Test:経口ブドウ糖負荷試験)におけるインスリン分泌能が野生型に比べて低下していること、高脂肪食負荷時の膵島面積が野生型に比べて小さいことから、本遺伝子がインス

リン分泌低下を来す2型糖尿病感受性遺伝子であることが示唆された。同時に、ヒトから同意を得て採取された脂肪組織の遺伝子発現解析によって、本遺伝子多型の糖尿病のリスクを上昇させるアリル保持者は非保持者に比較して有意に本遺伝子の発現が低下していることが判明した。

D. 考察

新たに2型糖尿病との相関を見出した染色体11番上の遺伝子はグルコース応答性のインスリン分泌に一定の役割を担っており、当該遺伝子内にあるSNPの遺伝子型によって発現が低下するためにインスリン分泌不全を来して糖尿病を発症しやすくなることが示唆された。

E. 結論

新たに2型糖尿病との相関を見出した染色体11番上の遺伝子について、どのような経路を利用してグルコース応答性のインスリン分泌に関与しているかを今後明らかにしていく。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1: Horikoshi M, Hara K, Ito C, Shojima N, Nagai R, Ueki K, Froguel P, Kadowaki T. Variations in the HHEX gene are associated with increased risk of type 2 diabetes in the Japanese population. *Diabetologia* 50(12):2461-6, 2007

2: Ochi M, Osawa H, Hirota Y, Hara K, Tabara Y, Tokuyama Y, Shimizu I,

Kanatsuka A, Fujii Y, Ohashi J, Miki T, Nakamura N, Kadowaki T, Itakura M, Kasuga M, Makino H. Frequency of the G/G genotype of resistin single nucleotide polymorphism at -420 appears to be increased in younger -onset type 2 diabetes. *Diabetes*. 56(11):2834-8, 2007.

3: Horikoshi M, Hara K, Ito C, Nagai R, Froguel P, Kadowaki T. A genetic variation of the transcription factor 7-like 2 gene is associated with risk of type 2 diabetes in the Japanese population. *Diabetologia* 50(4):747-51, 2007

H. 知的財産権の出願・登録状況

(ア) 特許出願

なし

(イ) 実用新案登録

なし

(ウ) その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
分担研究報告書

生活習慣と遺伝子型による2型糖尿病発症リスク 予測法の開発
—インスリン抵抗性に関する糖尿病感受性遺伝子の同定—

分担研究者 山内 敏正 東京大学医学部附属病院 特任准教授

研究要旨：2型糖尿病は心筋梗塞・脳卒中発症のリスク増大によって国民の健康をおびやかしている。本研究は、先に明らかにした日本人2型糖尿病感受性遺伝子座について一塩基多型による相関解析を行い、2型糖尿病遺伝素因の全貌を解明する。既に、日本人の糖尿病感受性遺伝子座として同定した9ヶ所の染色体領域のうち染色体1番の領域（1p36-p32）についてはAMPキナーゼ $\alpha 2$ サブユニット遺伝子が、インスリン抵抗性を惹起して2型糖尿病を起こしやすくしている感受性遺伝子であることを報告した(Diabetes 55: 919-23, 2006)。

A. 研究目的

2型糖尿病はインスリン分泌低下にインスリン抵抗性が加わって発症する多因子病である。本研究では、インスリン分泌不全によって2型糖尿病を発症させやすくしている感受性遺伝子と、インスリン抵抗性によって2型糖尿病を発症させやすくしている感受性遺伝子を同定する。機能が未知の新規2型糖尿病感受性遺伝子については、インスリン分泌不全に関わっているのか、インスリン抵抗性に関わっているのかを、当該遺伝子改変動物の表現型を解析することで明らかにする。また、諸外国で2型糖尿病感受性遺伝子として報告された遺伝子に、日本人での糖尿病易罹患性における意義を検討する。以上により、2型糖尿病発症リスク予測法開発の基礎的データを得る。

B. 研究方法

全ゲノム解析によってマップした2型糖尿病感受性遺伝子座のうち、染色体1番、3番、20番以外の6箇所の

染色体領域に含まれるSNPのうち、国際HAPMAP projectによるハプロタイプブロック・ハプロタイプ標識SNPの情報によって疾患感受性遺伝子を効率よく同定することができるSNPを選択する。3つの独立した糖尿病・糖代謝正常者のDNAパネル(既に文書による同意を得てDNAを抽出済み)で一貫して2型糖尿病と相関を示すSNPを同定し、日本人2型糖尿病感受性遺伝子としての意義を検討する。日本人2型糖尿病感受性遺伝子座に含まれる遺伝子のうちインスリン作用に関与している機能的にも候補となる遺伝子についてはより重点的・詳細にSNPのタイピングを行い、日本人2型糖尿病感受性遺伝子としての意義を明らかにしていく。

(倫理面への配慮)「ヒトゲノム・遺伝子解析研究のための倫理指針」「疫学研究に関する倫理指針」「臨床研究に関する倫理指針」を遵守し、書面による本研究への同意が得られた者のみを対象として研究を遂行する。更に指針の策定を受けて本学に設置され

た倫理審査委員会の承認を得て(承認番号 421)研究計画書に従い研究を実施する。具体的な配慮の項目としては以下の通り。①研究で使用される試料に関して：既に提供されている DNA などの試料は、遺伝子解析研究での利用を明示した上で同意が文書で得られているもののみを研究対象としており問題はない。本研究で新規に提供される試料は、全て指針に従って採取される。②個人情報の保護に関して：本研究で提供される試料はすべて、個人識別情報(カルテ番号, 名前, 住所など)を管理する個人識別情報管理者により匿名化される。連結可能のための対応表は、個人識別情報管理者のもとで厳重に管理され、個人の情報を処理するコンピューターは他の一切のコンピューターと切り離され、個人識別情報管理者によって保管される。更に、個人識別情報管理者以外は、連結可能匿名化番号と個人識別情報との連結が不可能なようにする。東大病院では主任研究者の原一雄により個人情報匿名化システムが確立している(J.Hum.Genet.48:327-330, 2003)。③予測される試料提供者に対する危険や不利益に関して：試料提供は主として前腕の静脈からの採血によっており身体的危険はほとんどないといってよい。また提供された試料は解析に先立って速やかに匿名化されるので、試料等提供者の尊厳と人権は十分に保護されていると考えられる。また、本研究は多因子病としての2型糖尿病の感受性遺伝子を対象としており、単一遺伝子病の様に必ずしも遺伝カウンセリングが必要となるケースは少ないと思われるが、予想外

の遺伝病の存在が明らかになった場合の予測される病態や予後、治療方針などにつき、結果の開示に伴い本人および家族に医学的あるいは心理的問題を生じる可能性があり、遺伝カウンセリングなどの体制を準備している。

C. 研究結果

罹患同胞対による全ゲノム解析で同定した9箇所の日本人2型糖尿病感受性遺伝子座のうち染色体1番の領域についてはAMPキナーゼ α 2サブユニット(*PRKAA2*)のSNP(rs2051040)がインスリン抵抗性と有意に相関し、rs2051040を含むハプロタイプが有意に2型糖尿病と相関することからインスリン抵抗性を介する2型糖尿病感受性遺伝子であることを明らかにして報告した(Diabetes 55:919-23, 2006)。本遺伝子は、骨格筋において筋収縮によって活性化される酵素で、運動によるインスリン抵抗性改善に関与していることが分かっている。最近、AMPキナーゼ α 2サブユニットはインスリン抵抗性改善物質アディポネクチンの作用を媒介する鍵分子であることが判明しており、本遺伝子多型によって骨格筋などでインスリン抵抗性が惹起され2型糖尿病になりやすくなっていることが示唆された。本遺伝子多型は2型糖尿病発症リスクの推定に役立つと考えられたため特許を出願した(「*PRKAA2* 遺伝子多型による2型糖尿病発症素因の検出方法」、発明者：門脇 孝、原 一雄 他1名、出願人：東京大学、特許出願2005-121591)。また我々は、アディポネクチンの2種類の特異的受

容体(*ADIPOR1,R2*)を単離・同定することに成功しているが *ADIPOR1,R2* 両遺伝子の SNP についてもインスリン抵抗性・2型糖尿病との相関について網羅的に検討を行った。その結果両遺伝子とも日本人のインスリン抵抗性や糖尿病の主要な感受性遺伝子とは考えにくいという結果を得て報告した (*Diabetologia* 2005 48:1307-14)。両遺伝子については、当該領域を直接シーケンス法で網羅的に多型の検索を行ったにも関わらずインスリン抵抗性や2型糖尿病との相関を認める多型を認めなかった。

D. 考察

AMP キナーゼ α 2サブユニット遺伝子のインスリン抵抗性を上昇させる多型の頻度は比較的高く、日本人の2型糖尿病遺伝素因に占める割合も比較的大きいと考えられる。本遺伝子多型による2型糖尿病発症リスクの推定法を産業化するため、出願特許(「PRKAA2 遺伝子多型による2型糖尿病発症素因の検出方法」、特許出願 2005-121591)をしかるべき企業へライセンスングしていくことを考えている。

E. 結論

本研究によって、インスリン抵抗性に関与する2型糖尿病感受性遺伝子としてAMP キナーゼ α 2サブユニット遺伝子を同定した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

- 1: Horikoshi M, Hara K, Ito C, Shojima N, Nagai R, Ueki K, Froguel P, Kadowaki T. Variations in the HHEX gene are associated with increased risk of type 2 diabetes in the Japanese population. *Diabetologia*.50(12):2461-6, 2007
- 2: Ochi M, Osawa H, Hirota Y, Hara K, Tabara Y, Tokuyama Y, Shimizu I, Kanatsuka A, Fujii Y, Ohashi J, Miki T, Nakamura N, Kadowaki T, Itakura M, Kasuga M, Makino H. Frequency of the G/G genotype of resistin single nucleotide polymorphism at -420 appears to be increased in younger-onset type 2 diabetes. *Diabetes*. 56(11):2834-8, 2007.
- 3: Horikoshi M, Hara K, Ito C, Nagai R, Froguel P, Kadowaki T. A genetic variation of the transcription factor 7-like 2 gene is associated with risk of type 2 diabetes in the Japanese population. *Diabetologia* 50(4):747-51, 2007

H.知的財産権の出願・登録状況

(ア)特許出願

なし

(イ)実用新案登録

なし

(ウ)その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
分担研究報告書

生活習慣と遺伝子型による2型糖尿病発症リスク 予測法の開発
—インスリン分泌不全に關与する糖尿病感受性遺伝子の同定—
分担研究者 戸辺 一之 富山大学附属病院内科学 教授

研究要旨：2型糖尿病は心筋梗塞・脳卒中発症のリスク増大によって国民の健康をおびやかしている。本研究は、先に明らかにした日本人2型糖尿病感受性遺伝子座について一塩基多型による相関解析を行い、2型糖尿病遺伝素因の全貌を解明する。更に2型糖尿病の易罹患性・分子病態の新規診断法を開発し実際の臨床現場に応用・実用化する。既に、日本人の糖尿病感受性遺伝子座として同定した9ヶ所の染色体領域のうち染色体 20 番の領域(20q12-q13)は HNF4 α 遺伝子がインスリン分泌不全を来たして2型糖尿病を発症しやすくしている2型糖尿病感受性遺伝子であることを報告した(Diabetes 55:1260-4, 2006)。また、欧米から報告されたTCF7L2 遺伝子、HHEX がインスリン分泌不全を来たして2型糖尿病を発症しやすくしている2型糖尿病感受性遺伝子であることを報告した

A. 研究目的

2型糖尿病はインスリン分泌低下にインスリン抵抗性が加わって発症する多因子病である。本研究では、インスリン分泌不全によって2型糖尿病を発症させやすくしている感受性遺伝子と、インスリン抵抗性によって2型糖尿病を発症させやすくしている感受性遺伝子を同定する。機能が未知の新規2型糖尿病感受性遺伝子については、インスリン分泌不全に関わっているのか、インスリン抵抗性に関わっているのかを、当該遺伝子改変動物の表現型を解析することで明らかにする。また、諸外国で2型糖尿病感受性遺伝子として報告された遺伝子に、日本人での糖尿病易罹患性における意義を検討する。以上により、2型糖尿病発症リスク予測法開発の基礎的データを得る。

B. 研究方法

全ゲノム解析によってマップした2型糖尿病感受性遺伝子座のうち、染色体1番、3番、20番以外の6箇所の染色体領域に含まれるSNPのうち、国際HAPMAP projectによるハプロタイプブロック・ハプロタイプ標識SNPの情報によって疾患感受性遺伝子を効率よく同定することができるSNPを選択する。3つの独立した糖尿病・糖代謝正常者のDNAパネル(既に文書による同意を得てDNAを抽出済み)で一貫して2型糖尿病と相関を示すSNPを同定し、日本人2型糖尿病感受性遺伝子としての意義を検討する。日本人2型糖尿病感受性遺伝子座に含まれる遺伝子のうちインスリン作用に關与している機能的にも候補となる遺伝子についてはより重点的・詳細にSNPのタイピングを行い、日本人2型糖尿病感受性遺伝子とし

ての意義を明らかにしていく。

(倫理面への配慮)「ヒトゲノム・遺伝子解析研究のための倫理指針」「疫学研究に関する倫理指針」「臨床研究に関する倫理指針」を遵守し、書面による本研究への同意が得られた者のみを対象として研究を遂行する。更に指針の策定を受けて本学に設置された倫理審査委員会の承認を得て(承認番号 421)研究計画書に従い研究を実施する。具体的な配慮の項目としては以下の通り。①研究で使用される試料に関して：既に提供されている DNA などの試料は、遺伝子解析研究での利用を明示した上で同意が文書で得られているもののみを研究対象としており問題はない。本研究で新規に提供される試料は、全て指針に従って採取される。②個人情報の保護に関して：本研究で提供される試料はすべて、個人識別情報(カルテ番号、名前、住所など)を管理する個人識別情報管理者により匿名化される。連結可能のための対応表は、個人識別情報管理者のもとで厳重に管理され、個人の情報を処理するコンピューターは他の一切のコンピューターと切り離され、個人識別情報管理者によって保管される。更に、個人識別情報管理者以外は、連結可能匿名化番号と個人識別情報との連結が不可能なようにする。東大病院では主任研究者の原一雄により個人情報匿名化システムが確立している(J.Hum.Genet.48:327-330, 2003)。③予測される試料提供者に対する危険や不利益に関して：試料提供は主として前腕の静脈からの採血によっており身体的危険はほとんどないといってよい。また提供された試料

は解析に先立って速やかに匿名化されるので、試料等提供者の尊厳と人権は十分に保護されていると考えられる。また、本研究は多因子病としての2型糖尿病の感受性遺伝子を対象としており、単一遺伝子病の様に必ずしも遺伝カウンセリングが必要となるケースは少ないと思われるが、予想外の遺伝病の存在が明らかになった場合の予測される病態や予後、治療方針などにつき、結果の開示に伴い本人および家族に医学的あるいは心理的問題を生じる可能性があり、遺伝カウンセリングなどの体制を準備している。

C. 研究結果

罹患同胞対による全ゲノム解析で同定した9箇所の日本人2型糖尿病感受性遺伝子座のうち染色体20番の領域については、若年発症で家族内に糖尿病が多発し常染色体優性遺伝の形式をとる糖尿病の1サブタイプであるMODY3(maturity onset diabetes of the young)の原因遺伝子HNF-4 α が存在した。HNF-4 α は膵 β 細胞の発生・分化に関与しており、本遺伝子の機能低下はインスリン分泌不全を来たして2型糖尿病発症を惹起することが予測された。そこでHNF-4 α のSNPによる相関解析を行ったところ、特に、膵特異的プロモーターに存在するSNPの組み合わせによるハプロタイプが有意に2型糖尿病と相関を示し、HNF-4 α 遺伝子が日本人2型糖尿病の疾患感受性遺伝子であることが明らかになった。(Diabetes 55:1260-4, 2006)。また、最近アイスランドとデンマーク、米国の研究グループからTCF7L2

(Transcription Factor 7 - Like 2) 遺伝子の領域に 2 型糖尿病と有意に相関する遺伝子多型を複数認めたと報告がなされた(Nature Genet 38:320-323, 2006)。本遺伝子はインスリン分泌に重要な役割を担っている GLP (Glucagon like peptide)-1 遺伝子の発現を調節する転写因子であるため、TCF7L2 遺伝子は機能的にみてもインスリン分泌低下に関与する糖尿病感受性遺伝子の有望な候補と考えられた。そこで我々は、日本人を対象に TCF7L2 遺伝子の 2 型糖尿病感受性遺伝子としての役割を検討するために TCF7L2 遺伝子多型を利用した相関解析を行った。その結果 TCF7L2 遺伝子多型 rs7903146 が有意に 2 型糖尿病と相関し($p=0.0018$)、リスクアリル保持者は糖尿病のリスクが 1.69 倍上昇していた。さらに対象者を BMI 25 未満の非肥満者に限定するとそのオッズ比は 2.24 とさらに上昇することが明らかになり、インスリン抵抗性というよりは、痩せ型でインスリン分泌不全を来すタイプの 2 型糖尿病を引き起こしやすくしていることが推測された(Diabetologia 50:747-751, 2007)。

D. 考察

日本人において 2 型糖尿病との相関を示した HNF-4 α 遺伝子、TCF7L2 遺伝子、HHEX 遺伝子はインスリン分泌不全を来すことによって 2 型糖尿病を発症させやすくする普遍的な 2 型糖尿病感受性遺伝子と考えられる。TCF7L2 遺伝子は欧米人では糖尿病のリスクを上昇させるア

リルの頻度が高く、糖尿病の遺伝素因全体に占める役割が大きいのに比べて、日本人ではその頻度が低いことから役割はそれほど大きくないと考えられた。新たに 2 型糖尿病との相関を見出した染色体 11 番上の遺伝子はグルコース応答性のインスリン分泌に一定の役割を担っており、当該遺伝子内にある SNP の遺伝子型によって発現が低下するためにインスリン分泌不全を来して糖尿病を発症しやすくなることが示唆された。

更に、これまでに明らかになった 2 型糖尿病感受性遺伝子多型の糖尿病リスクを上昇させるアリル(リスクアリル)の個数が多いほど糖尿病リスクは有意に上昇するものの、リスクアリルの保持数に年齢、性別、BMI (Body mass index) などの臨床指標も合わせた方が、リスクアリルの個数のみよりも、より正確に糖尿病のリスクを推定できることが判明した。

E. 結論

個々の 2 型糖尿病感受性遺伝子単独では糖尿病リスクの上昇は 30% 程度であり、それ自体で糖尿病を予測する感度・特異度は高くない。しかしながら本研究や内外の研究で明らかになった複数の感受性遺伝子に、今後も明らかにされる糖尿病感受性遺伝子、年齢・性別・BMI などの臨床情報を組み合わせることによって糖尿病リスクがある程度の正確性を持って予測できることが期待される。日本における糖尿病罹患患者数の多さや今後の増加率を考慮すると、今後この分野の発

展がますます望まれる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

特になし

H. 知的財産権の出願・登録状況

(ア) 特許出願

なし

(イ) 実用新案登録

なし

(ウ) その他

なし

II. 研究成果の刊行一覧

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻	ページ	出版年
Miyake K, Yang W, Hara K, Yasuda K et al	Construction of a prediction model for type 2 diabetes mellitus in the Japanese population based on 11 genes with strong evidence of the association.	<i>J Hum Genet</i>	54	236-41	2009
Yasuda K, Miyake K, Horikawa Y, Hara K et al	Variants in KCNQ1 are associated with susceptibility to type 2 diabetes mellitus.	<i>Nature Genetics</i>	40	1092-7	2008
Unoki H, Takahashi A, Kawaguchi T, Hara K et al	SNPs in KCNQ1 are associated with susceptibility to type 2 diabetes in East Asian and European populations	<i>Nature Genetics</i>	40	1098-102	2008
Wang G, Watanabe M, Imai Y, Hara K et al	Genetic variations of Mrf-2/ARID5B confer risk of coronary atherosclerosis in the Japanese population.	<i>Int Heart J</i>	49	313-27	2008
Horikoshi M, Hara K, Ito C, Shojima N et al	Variations in the <i>HHEX</i> gene are associated with increased risk of type 2 diabetes in the Japanese population.	<i>Diabetologia</i>	50	2461-6	2007
Ochi M, Osawa H, Hirota Y, Hara K et al	Frequency of the G/G genotype of resistin single nucleotide polymorphism at -420 appears to be increased in younger-onset type 2 diabetes.	<i>Diabetes</i>	56	2834-8	2007
Horikoshi M, Hara K, Ito C, Nagai R et al	A genetic variation of the transcription factor 7-like 2 gene is associated with risk of type 2 diabetes in the Japanese population.	<i>Diabetologia</i>	50	747-51	2007
Yokoi N, Kanamori M,	Association studies of variants in the genes involved	<i>Diabetes</i>	55	2379-86	2006