

学位論文題名

血液サンプルに基づいた2型糖尿病遺伝子診断のための 疾患感受性遺伝子群の探索

学位論文内容の要旨

糖尿病患者数は世界的に増加しており、有効な診断法、治療法開発の必要性が極めて高い。糖尿病は1型と2型に区分されるが、相対的なインスリン作用不足により特徴づけられる2型糖尿病患者が全体の90%以上を占めており、その発症要因には遺伝因子と環境因子が存在する。ゲノム上の配列置換等を検出することで2型糖尿病感受性遺伝子の探索が疾患モデル動物、またヒト検体を用いて盛んに行われている。その結果、感受性遺伝子が徐々に明らかになりつつあるが、いまだ発症との関わりについては不明な点も多い。

近年、大量の遺伝子発現解析を同時に行なう手法としてDNAマイクロアレイが用いられており、糖尿病をはじめ多くの疾患感受性遺伝子の解明に応用されている。ゲノムレベルの変異を調べるだけでなく、転写・翻訳調節を明らかにする事は疾患発症メカニズムを予測する上で重要である。多くの遺伝子発現変動を網羅的に解析できるマイクロアレイはそのための有用な手法である。

これまでの糖尿病感受性遺伝子の発現解析は、主に糖尿病主要臓器の肝臓、骨格筋、脂肪組織で行われてきた。しかし臨床的にこれらの臓器を用いた遺伝子発現解析を発症前に行なう事は困難である。そこで我々は採取が最も容易な組織である血液（白血球）サンプルに着目した。本研究では2型糖尿病自然発症モデルであるOtsuka-Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF)ラットおよびKK-A^y Ta / Jcl (KK-A^y)マウスを用いて、白血球で発現変動する糖尿病感受性遺伝子を抽出する事を目的にDNAマイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を行った。次に病態変化を反映している遺伝子の抽出を行うために、同時に肝臓での遺伝子発現解析を行うことで白血球との間で遺伝子発現変動の共通性を調べた。最後に抽出遺伝子が糖尿病発症に実際に寄与する可能性があるか否かを調べる必要が生じる。そこで抽出遺伝子に対するsiRNAを設定し、マウスにHydrodynamics法を用いて静脈投与することで肝臓特異的な遺伝子ノックダウン実験を行った。

OLETFラットの発症モニタリングの結果から、6週齢のOLETFラットを発症前モデルに設定し、絶食(12時間)とインスリン負荷(5 U/kg BW)を適応したのち、白血球と肝臓からTotal RNAを抽出し遺伝子発現変動を検出した。

その結果、両臓器それぞれにおいて2倍以上の発現変動を示す合計1080遺伝子が検出された。そのうち両臓器で共通して発現変動を示す遺伝子は57遺伝子（絶食負荷4遺伝子、インスリン負荷53遺伝子）であった。これらの遺伝子群のうち30遺伝子が既知の2型糖尿病感受性遺伝子であった。この結果は白血球において、発症前に2型糖尿病感受性遺伝子の発現

変動が起こっていることを示している。また57遺伝子のうち28遺伝子は、何らかの形でヒトにおいてその発現が報告されている。今回の解析結果は血液サンプルを用いた2型糖尿病発症前遺伝子診断の可能性を示唆するものである。

OETF ラットと同様に、KK-A^yマウスを用いた遺伝子発現変動解析を行った。KK-A^yマウスでは発症前を4週齢に設定し、コントロールに Balb/c マウスを用いて絶食負荷とインスリン負荷を適応した後、白血球と肝臓のサンプリングを行った。マウス全ゲノム DNA マイクロアレイを用いて両臓器の遺伝子発現変動を検出した結果、白血球と肝臓で共通して発現変動を示した遺伝子数は絶食時に81遺伝子、インスリン負荷時には89遺伝子であり、その中には既知の2型糖尿病感受性遺伝子も含まれていた。

これら170遺伝子から2型糖尿病発症前遺伝子診断に適応出来る可能性をもつ遺伝子を抽出する必要がある。そのためには抽出遺伝子の機能が2型糖尿病の病態と何らかの関わりを持つかを検証することが必要となる。本研究ではマウス in vivo ノックダウン系を用いて遺伝子機能解析を行った。ターゲット遺伝子に対するオリゴ siRNA を設計し、それを肝臓に送り込む事で遺伝子ノックダウンを行った。ノックダウンの結果、血糖値変動が見られればその遺伝子は病態と何らかの関わりがあると推察可能である。機能解析の手法としてノックダウン系を用いることから KK-A^yマウスの肝臓で発現亢進を示し、かつ2型糖尿病発症との因果関係が不明な3遺伝子を選択し、機能解析のためのターゲット遺伝子とした。

Asparagine synthetase (Asns), Glycerophosphodiester phosphodiesterase domain containing 3 (Gd3), S100 calcium binding protein A10 (S100a10)の3遺伝子に対して各々4種類の siRNA 配列を設定し、Hepa 1-6細胞を用いた配列スクリーニングののちHydrodynamics法により Balb/c マウス1匹あたり150 μg のオリゴ siRNA を投与した。Hydrodynamics法は現在のところ非ウイルスベクターを介した投与法のなかでは、最も高率に外来性核酸を in vivo で臓器に導入可能な方法である。投与の際のネガティブコントロールとして Green Fluorescence Protein (GFP)を、ポジティブコントロールとして糖新生の律速酵素である Phosphoenolpyruvate carboxykinase (Pck1)を用いた。Balb/c マウスを用いて投与48時間後の血糖値と肝臓中のターゲット遺伝子の mRNA 量を評価したところ、Pck1を始め Asns, Gd3, S100a10のいずれのノックダウン投与の場合も、有意な血糖値低下とターゲット遺伝子 mRNA の減少が確認された。このことは、今回抽出した3遺伝子が新規2型糖尿病感受性遺伝子である可能性を示唆するものである。

本研究の結果から、(1) OETF ラットおよび KK-A^yマウスの白血球と肝臓を用いた網羅的共通発現変動遺伝子解析の結果、既知の2型糖尿病感受性遺伝子を含む発症前遺伝子診断に適応できる可能性をもつ遺伝子群の抽出に成功した。(2) 白血球で肝臓と共通した遺伝子発現変動を示す遺伝子群が確認出来たことから、抽出遺伝子群は2型糖尿病病態を反映している可能性が高く、白血球を用いた2型糖尿病遺伝子診断システム構築の可能性が示唆された。(3) Asn, Gd3, S100a10 遺伝子について in vivo ノックダウン実験を行ったところ、有意な血糖値降下と肝臓での mRNA 量の減少が確認された。これらの遺伝子の2型糖尿病発症への寄与と遺伝子診断・治療への適応の可能性が示唆された。と考えられる。今後はさらに他の診断候補遺伝子の機能解析を行い、ヒト検体を使った解析、それらの情報を統合して複数の診断用遺伝子を選定しそれらを組み合わせて発現解析することで、信頼性の高い2型糖尿病発症前遺伝子診断システムの構築が可能となるであろう。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 原 島 秀 吉
副 査 教 授 井 関 健
副 査 助 教 授 紙 谷 浩 之
副 査 講 師 平 野 剛

学 位 論 文 題 名

血液サンプルに基づいた2型糖尿病遺伝子診断のための 疾患感受性遺伝子群の探索

メタボリックシンドロームの患者数はその予備軍も含め世界的に急増しており、効果的な予防対策と治療法の確立は社会的急務となっている。糖尿病は1型（インスリン依存型）と2型（インスリン非依存型）に分類可能であり、2型糖尿病患者が全体の90%以上を占める。その発症予防は主に生活習慣指導と血糖値モニタリングにより行われているが、現状では患者数の増加に歯止めをかけるには至っていない。

本研究は2型糖尿病発症に関わる遺伝要因に着目し、臨床検体として採取が容易な血液サンプルの遺伝子発現変動を発症前にモニタリングすることで、より簡便で確実な発症前診断を可能とするシステムの構築を最終目標とする。初めに2型糖尿病感受性遺伝子である calpain 10 遺伝子の発現変動を、発症前の2型糖尿病自然発症モデルである Otsuka-Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) ラットで検討したところ、白血球、肝臓、骨格筋で calpain 10 遺伝子の有意な発現低下が確認された。2型糖尿病感受性遺伝子が白血球において発現変動し、その発現変動が白血球と2型糖尿病主要臓器である肝臓、骨格筋の間で同時に起こっている事を示唆している。そこで calpain 10 同様の遺伝子発現変動が他の遺伝子で確認されるかを調べるために、白血球と肝臓の遺伝子発現変動を DNA マイクロアレイで網羅的に調べた。

発症前の OLETF ラットと、同じく2型糖尿病モデルである KK-A^y マウスの白血球と肝臓の遺伝子発現プロファイルを作成し、両臓器の遺伝子発現プロファイルを比較して共通発現変動遺伝子の有無を確認した。

12時間の絶食とインスリン負荷条件の下、発症前（6週齢）の OLETF ラットの白血球と肝臓で共通して2倍以上の発現変動を示す遺伝子は57遺伝子（絶食負荷4遺伝子、インスリン負荷53遺伝子）抽出された。これらの遺伝子群

のうち30遺伝子が既知の2型糖尿病感受性遺伝子であり、28遺伝子は機能がヒトにおいて報告されている遺伝子であった。次に発症前（4週齢）のKK-A^yマウスを用いて同様の実験を行った。その結果、共通して発現変動を示した遺伝子数は絶食時に81遺伝子、インスリン負荷時には89遺伝子であり、その中には既知の2型糖尿病感受性遺伝子も含まれていた。

OLETFラットとKK-A^yマウスを用いて得られた227遺伝子が2型糖尿病発症前遺伝子診断用候補遺伝子群と考えられる。これらの遺伝子群を用いて発症前遺伝子診断が可能か否かを判断するには、抽出遺伝子の機能が2型糖尿病の病態に寄与する必要がある。

その確認を行うためにマウスを用いて *in vivo* ノックダウン系を構築し抽出遺伝子の機能解析を行った。ターゲット遺伝子に対するオリゴ siRNA をハイドロダイナミクス法により投与し、肝臓で遺伝子ノックダウンを行った。機能解析の手法としてノックダウン系を用いることから、KK-A^yマウスの共通発現変動遺伝子群の中から肝臓で発現亢進を示し、かつ2型糖尿病発症との因果関係が不明な asparagine synthetase (Asns), glycerophosphodiester phosphodiesterase domain containing 3 (Gdpd3), S100 calcium binding protein A10 (S100a10) の3遺伝子をターゲット遺伝子とした。KK-A^yマウス1匹あたり150 μ g の siRNA をハイドロダイナミクス法により投与し、48時間後と2週間後の絶食時血糖値を測定したところ、48時間後で Asns 遺伝子、2週間後で Gdpd3 遺伝子ノックダウン時に有意な血糖値低下が確認された。同時にこれら2遺伝子の肝臓中 mRNA 定量を行ったが、こちらは有意な発現量の低下が検出できなかった。血糖値低下とターゲット遺伝子の mRNA 量減少が相関しない理由は不明であるが、mRNA の量的変動と血糖値降下が観察される間に時間差が存在する、ハイドロダイナミクス法による肝臓への siRNA 導入効率が投与毎に変動する、等の可能性が推測される。

以上、本研究は OLETF ラットおよび KK-A^y マウスの白血球と肝臓を用いた網羅的共通発現変動遺伝子解析の結果、既知の2型糖尿病感受性遺伝子を含む発症前遺伝子診断用候補遺伝子群を抽出し、肝臓での Asn, Gdpd3 遺伝子ノックダウンにより KK-A^y マウスに絶食時血糖値低下を誘起する事に成功した。これら2遺伝子は発症前診断用遺伝子と新規2型糖尿病感受性遺伝子である可能性が示唆される。今後は他の抽出遺伝子も含めて機能解析を行い、動物モデルから得られる機能情報とヒトの遺伝子発現情報と統合する事で、信頼性の高い2型糖尿病発症前遺伝子診断システムの構築を目指す。