

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 12 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18925

研究課題名(和文) 遺伝情報を用いた糖尿病の発症・進展予測モデルの構築と予防的応用に関する研究

研究課題名(英文) A modeling and simulation approach to determining the risk for diabetes incorporating the genetic polymorphisms

研究代表者

鬼木 健太郎 (Oniki, Kentaro)

熊本大学・大学院生命科学研究部(薬)・助教

研究者番号：00613407

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、遺伝・臨床情報を基に、糖尿病の個別化予防・治療を目指して以下の成果を得た。

検討1. 糖尿病との関連の強い非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) について、BMIの個体間変動を基にした NAFLD予測モデルを構築し、NAFLD予防のためのBMI目標値を個別に推定できる可能性を示した。検討2. インスリン抵抗性改善、抗炎症作用等に関与すDsbA-Lの遺伝子変異が統合失調症患者の肥満リスク上昇に関係することを明らかにした。検討3. 飲酒量の規定因子として知られるALDH2の活性低下遺伝子型がgamma-GTと関連して、NAFLDリスク上昇に関与することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：・We established a BMI-based prediction model for non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) using a NONMEM program. The determination of the high-risk group for NAFLD based on a population NAFLD model may be useful for individualized health promotion.

・We showed that the disulfide bond-forming oxidoreductase A-Like protein(DsbA-L) rs1917760 polymorphism leads to a decreased expression of DsbA-L mRNA in PBMCs from Schizophrenia(SCZ) patients, resulting in an increased risk for being overweight in SCZ male patients. Therefore, the DsbA-L T/T genotype may be a novel risk factor for predicting an overweight status in SCZ male patients.

・We showed that the inactive aldehyde dehydrogenase (ALDH2)*2 allele may potentially be a novel risk factor for NAFLD in relation to an elevated gamma-glutamyl transferase level.

研究分野：医療薬学

キーワード：NAFLD 糖尿病 DsbA-L NONMEM 統合失調症 肥満 ALDH2

1. 研究開始当初の背景

近年、血糖・血圧・脂質などの異常が体に記憶され、その後長年にわたって糖尿病合併症の発症や進展に影響を及ぼす“メタボリックメモリー”が注目され[Kahn et al. *Lancet*. 2014]、糖尿病の早期発見と予防の重要性が改めて認識されている。

申請者は、糖尿病やその合併症の早期予防に遺伝情報を用いたハイリスク群の抽出と、個々に応じた生活改善や積極的な治療介入が有用と考え、抗酸化酵素や薬物代謝酵素の遺伝子型が糖尿病やその関連疾患に及ぼす影響について、生活習慣や臨床情報との関係と共に独自の研究成果を多数報告した[Oniki et al. *Toxicol Lett*. 2013他]。糖尿病の発症・進展に関わる遺伝子型は、網羅的に遺伝子解析を行うゲノムワイド関連解析により 500 以上抽出されているが[Hivert et al. *Nat Rev Endocrinol*. 2014 他]、それらに基づいた予防は未だ臨床応用に至っていない。その原因には遺伝子型の影響は生活習慣や他の遺伝子型との組み合わせで異なるため、各遺伝子型の影響を正確に定量化できていないことが挙げられる。そのため、遺伝情報の臨床応用には申請者が行ってきたような詳細な臨床情報を考慮した多角的な解析が不可欠であることが、近年改めて提唱されている[Davies et al. *Clin Chem*. 2011]。

2. 研究の目的

本研究では申請者らのこれまでの研究成果を進展させ、ゲノムワイド関連解析で抽出された遺伝子を含め、糖・脂質代謝関連遺伝子や肥満遺伝子について、糖尿病やその関連疾患との関係について、詳細な臨床情報と共に解析することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、糖尿病又はそれとの関連が強い肥満や非アルコール性脂肪性肝疾患を早期予防することを目的として、それらに関わる遺伝要因と非遺伝要因の影響を定量化した他、それらの結果を統合して、疾患発症・進展予測モデルの構築を試みた。

対象者：人間ドック受診者 865 名、糖尿病患者 650 名、統合失調症患者 321 名

遺伝子型判定：申請者が糖尿病との関連性を見出した遺伝子及び肥満遺伝子や糖・脂質代謝関連遺伝子のうち、Aldehyde dehydrogenase2 (ALDH2) 遺伝子多型(rs 671)、Disulfide-bond A oxidoreductase-like protein (DsbA-L, 別名: glutathione S-transferase K1) 遺伝子多型(rs1917760)、patatin-like phospholipase 3 (PNPLA3) 遺伝子多型(rs 738409) を Taqman-PCR 法にて判定した。統計解析には、非線形混合効果モデル(NONMEM)やロジスティック回帰分析、重回帰分析、一般化推定方程式等を用いた。脂

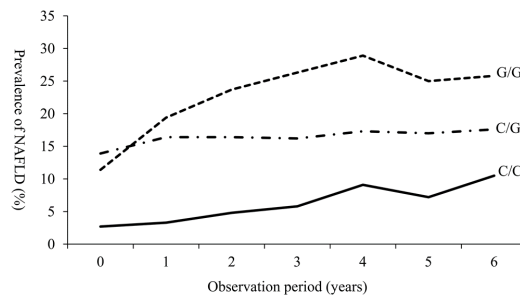
肪肝の診断には肝超音波検査の結果を使用した。

4. 研究成果

(1) PNPLA3 遺伝子多型と非肥満 NAFLD の関係に関する検討結果

アジア人における非肥満者 (BMI : 25kg/m² 未満) の NAFLD 罹患率は高く、加えて糖尿病や脂質異常症等の合併率も高い。PNPLA3 の遺伝子変異 (rs738409, c.444C>G) は NAFLD のリスク因子として知られるが、非肥満者における影響は明らかではない。そこで、本検討では、人間ドック受診者のうち、飲酒習慣のある者とウイルス肝炎マーカー陽性者を除外した 591 例 (61.2±10.5 歳) を横断解析、継続的データが得られた 341 例 (67.5±6.0 歳) を縦断解析の対象として (観察期間 : 5.5 ±1.1 年) 検討した。

PNPLA3 C/C 型、C/G 型、G/G 型の頻度はそれぞれ 27.3%、53.9%、18.8% であった。横断解析では、非肥満群において G/G 型は C/C 型と比べて NAFLD 罹患率が高く (オッズ比 : 3.06, P<0.05)、その影響は縦断解析においても確認された (オッズ比 : 5.47, P<0.05、下図参照)。



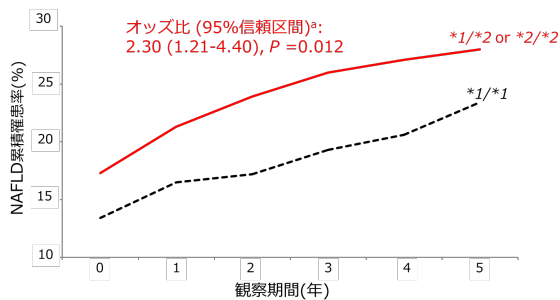
一方、肥満者では、G/G 型で NAFLD リスクが高い傾向を示したものの有意な影響は認めなかった。PNPLA3 G/G 型保有者は、たとえ BMI が基準値内であっても NAFLD リスクが高いことを初めて示した。NAFLD は慢性肝炎や肝硬変等の肝疾患のみならず、糖尿病や心血管疾患のリスク因子であり、本研究結果はアジア人における NAFLD 並びにその合併症の早期予防・治療において重要な知見であると考える。

(2) ALDH2 遺伝子多型と NAFLD との関係に関する検討結果

ALDH2 は、ミトコンドリアにおいて、アセトアルデヒドをはじめとして、種々の活性アルデヒド体の代謝に関与しており、肝保護的に働くと考えられる。また、gamma-glutamyl transferase (GGT) は、飲酒や肝機能のマーカーとして知られているが、NAFLD 患者においても上昇する。そこで、本検討では、ALDH2 遺伝子多型が NAFLD 罹患率に及ぼす影響について、GGT の値と共に検討した。対象は飲酒習慣のない 341 名の人間ドック受診者 (観察期間約 5 年) とした。

初めに、受信者操作特性 (ROC) 曲線を用いて、GGT による NAFLD の予測性を評価した

ところ、曲線下面積 (AUC) は 0.65 ($P < 0.05$) であった。さらに、最小 2 乗法により GGT のカットオフ値を算出したところ、25.5IU/L であった。次に、ALDH2 遺伝子型毎に NAFLD 罹患率を比較したところ、ALDH2*2 アレル保有者で NAFLD 罹患率が高かった (図 1)。従って、一般化推定方程式を用いて、ALDH2 遺伝子型と NAFLD リスクの関係を検討したところ、ALDH2*2 アレル保有者は、NAFLD リスクが有意に高く (オッズ比: 2.30、95%信頼区間: 1.21-4.40、下図参照)、その影響は $GGT > 25.5IU/L$ の群でより強かった (オッズ比: 4.28、95%信頼区間: 1.80-10.19)。

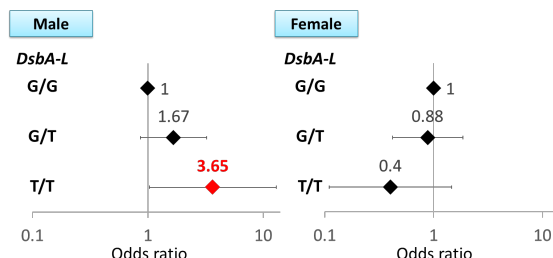


一方で、観察期間中に対象者の体重や BMI に変化は認めなかった。

(3) DsbA-L 遺伝子多型が統合失調症患者の肥満に及ぼす影響に関する検討結果

DsbA-L は脂肪細胞においてアディポネクチンの多量体化(活性化)に関与し、その mRNA は BMI と逆相関することが報告されている。一方、統合失調症患者は不規則な食生活や運動不足、抗精神病薬の服用により肥満のリスクが高い。本研究では、DsbA-L 遺伝子変異 (rs1917760, G-1308T) が統合失調症患者の肥満に及ぼす影響を検討した。統合失調症患者 329 名 (男 187 名/女 142 名、 50.7 ± 15.2 歳) と年齢、性別を一致させた人間ドック受診者 305 名 (対照群) を対象に、DsbA-L 遺伝子変異と肥満との関係をロジスティック回帰分析、BMI との関係を重回帰分析により検討した。さらに、統合失調症患者 14 名を対象に、末梢血単核中の DsbA-L mRNA と DsbA-L 遺伝子変異並びに肥満との関係を重回帰分析により検討した。

統合失調患者の男性においてのみ、DsbA-L T/T 型保有者は G/G 型保有者と比べて、肥満リスク (オッズ比: 3.80、 $P < 0.05$) 並びに BMI [偏回帰係数 (B) : 1.31、 $P < 0.05$] が高かった。一方で、統合失調症患者の女性や対照群では有意な影響を認めなかった (下図参照)。



また、統合失調症患者の DsbA-L mRNA は DsbA-L T/T 型保有者 ($B: -1.42$, $P < 0.05$) や肥満者 ($B: -1.50$, $P < 0.05$) で低かった。

統合失調症患者では、DsbA-L T/T 型が DsbA-L mRNA の低下に関与し、男性では肥満リスクが上昇することが示唆された。

(4) 非アルコール性脂肪性肝疾患の Modeling & Simulation 結果

本検討では、上記の知見を基に、NONMEM を用いて、BMI の個体間変動に基づく NAFLD 予測モデルを構築し、その予防のための BMI 目標値を個々に設定することを試みた。人間ドック受診者 396 名のうち、飲酒習慣のある者 (一日アルコール摂取量: 男性 30 g 以上、女性 20 g 以上) とウイルス性肝炎マーカー陽性者を除外した 333 名 (68.1 ± 5.8 歳、観察期間 5.0 ± 1.3 年) を対象とした。NAFLD 罹患率と BMI の関係性をシグモイド曲線により表し、さらに臨床検査値や生活習慣、研究成果 (1) で非肥満 NAFLD のリスク因子として示した PNPLA3 遺伝子多型の影響を加味した上で、NAFLD 罹患率を予測する logit モデルを構築した。モデルの予測性は ROC 曲線で評価した。また、最小 2 乗法を用いて logit のカットオフ値を算出し、対象者毎に BMI のカットオフ値を推定した。

構築した最終モデル式を以下に示す。

$$\text{Logit} = -5 + \{\text{Logitmax} \times (\text{BMI} - 17) 3.43\} / \{(\text{BMI}50 - 17) 3.43 + (\text{BMI} - 17) 3.43\}$$

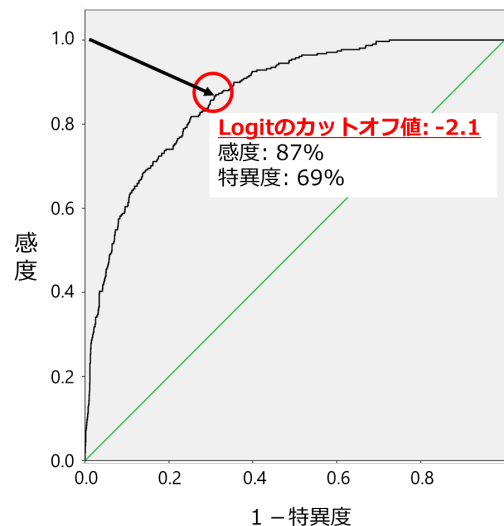
$$\text{Logitmax} = 4.17 + 1.02 \text{ 女性} - 0.060 \times (\text{HDL コレステロール} - 69.4)$$

$$+ 0.009 \times (\text{LDL コレステロール} - 120)$$

$$\text{BMI}50 = 17 + 6.42 \times 0.760 \text{ PNPLA3 C/G 遺伝子型} \times 0.591 \text{ PNPLA3 G/G 遺伝子型} \times (\text{HbA1c} / 5.88) - 3.34$$

*Logitmax, Logit の最大値; BMI50, Logitmax の 50% 値における BMI

ROC 曲線による NAFLD モデルの予測性は高く (ROC 曲線下面積: 0.868, $P < 0.001$)、Logit のカットオフ値 (-2.08) から、対象者毎に BMI のカットオフ値を推定できた (下図参照)。



以下の表に、模擬受診者を対象とした BMI 目標値の推定結果を示す。

	性別	HDL-C (IU/L)	LDL-C (IU/L)	HbA1c (%)	PNPLA3 遺伝子型	目標 BMI
模擬 症例 1	男	60	120	6.0	C/C	26.6
模擬 症例 2	男	60	120	6.0	C/G	24.3
模擬 症例 3	男	60	120	6.0	G/G	22.7

構築した NAFLD 予測モデルから、女性や LDL コレステロール高値、HDL コレステロール低値の受診者では、BMI の増加に伴う NAFLD リスクの上昇幅が大きく、PNPLA3 遺伝子変異保有者や HbA1c 高値の受診者では、より低い BMI から NAFLD リスクが上昇すると考えられた。さらに、本モデル式と受診者の個体要因から、NAFLD 予防のための BMI 目標値を個別に推定できる可能性を示した。本研究結果は、個々の患者に適した NAFLD 予防法の確立する上で、有用な情報となると期待する。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 18 件)

Sonoda A, Kondo Y, Tsuneyoshi Y, Iwashita Y, Nakao S, Ishida K, Oniki K, Saruwatari J, Irie T, Ishitsuka Y. Predictive factors for effectiveness and safety of enoxaparin for total knee arthroplasty in aged Japanese patients: a retrospective review. *J Pharm Health Care Sci.* 2017;18:3-6. doi: 10.1186/s40780-017-0075-x. 査読有

Morita K, Saruwatari J, Tanaka T, Oniki K, Kajiwara A, Miyazaki H, Yoshida A, Jinnouchi H, Nakagawa K. Common variants of HNF1A gene are associated with diabetic retinopathy and poor glycemic control in normal-weight Japanese subjects with type 2 diabetes mellitus. *J Diabetes Complications.* 2017;31:483-488. doi:10.1016/j.jdiacomp.2016.06.007. 査読有

Akasaka T, Sueta D, Arima Y, Tabata N, Takashio S, Izumiya Y, Yamamoto E, Yamamuro M, Tsujita K, Kojima S, Kaikita K, Kajiwara A, Morita K, Oniki K, Saruwatari J, Nakagawa K, Ogata Y, Matsui K, Hokimoto S. Association of CYP2C19 variants and epoxyeicosatrienoic acids on patients with microvascular angina. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2016; 311: H1409-H1415.

doi:10.1152/ajpheart.00473.2016. 査読有

Nishimura M, Ueda M, Saruwatari J, Nakashima H, Ogusu N, Aoki A, Tsuchimine S, Matsuda K, Iwashita K, Ono T, Oniki K, Shimoda K, Yasui-Furukori N. Influence of the cytochrome P450 2D6 *10/*10 genotype on the pharmacokinetics of paroxetine in Japanese patients with major depressive disorder: a population pharmacokinetic analysis. *Pharmacogenet Genomics.* 2016;26:403-413.

doi:10.1097/FPC.0000000000000228. 査読有

Akasaka T, Hokimoto S, Sueta D, Tabata N, Sakamoto K, Yamamoto E, Yamamuro M, Tsujita K, Kojima S, Kaikita K, Kajiwara A, Morita K, Oniki K, Saruwatari J, Nakagawa K, Ogata Y, Ogawa H. Sex differences in the impact of CYP2C19 polymorphisms and low-grade inflammation on coronary microvascular disorder. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2016; 310:H1494-500.

doi:10.1152/ajpheart.00911.2015. 査読有

Tabata N, Hokimoto S, Akasaka T, Sueta D, Arima Y, Sakamoto K, Yamamoto E, Izumiya Y, Yamamuro M, Tsujita K, Kojima S, Kaikita K, Morita K, Oniki K, Saruwatari J, Nakagawa K, Ogawa H. Helicobacter Pylori-seropositivity along with genetic and environmental factors predicts clinical outcome after acute coronary syndrome. *Int J Cardiol.* 2016;212:54-56.

doi:10.1016/j.ijcard.2016.03.034. 査読有

Oniki K, Morita K, Watanabe T, Kajiwara A, Otake K, Nakagawa K, Sasaki Y, Ogata Y, Saruwatari J. The longitudinal effect of the aldehyde dehydrogenase 2*2 allele on the risk for nonalcoholic fatty liver disease. *Nutrition & Diabetes.* 2016;6:e210. doi: 10.1038/nutd.2016.17. 査読有

Tabata N, Sueta D, Akasaka T, Arima Y, Sakamoto K, Yamamoto E, Izumiya Y, Yamamuro M, Tsujita K, Kojima S, Kaikita K, Morita K, Oniki K, Saruwatari J, Nakagawa K, Hokimoto S. Helicobacter pylori Seropositivity in Patients with Interleukin-1 Polymorphisms Is Significantly Associated with ST-Segment Elevation Myocardial Infarction. *PLoS One.* 2016;11: e0166240. doi: 10.1371/journal.pone.0166240. 査読有

Kajiwara A, Ishizuka T, Yamamura M,

Murase M, Koda H, Hirota S, Morita K, Oniki K, Saruwatari J, Nakagawa K. Prescription of triazolam for the elderly in Japan: A sub-analysis of the drug event monitoring project by the Japan Pharmaceutical Association. *Clin Neuropsychopharmacol Ther*. 2016;7:48-53. DOIなし. 査読有
猿渡淳二、鬼木健太郎、平田憲史郎、石津棟暎. 抗てんかん薬のTDMと有効血中濃度域の考え方. *臨床化学*. 2016;45:233-239. 査読なし
鬼木健太郎、猿渡淳二. 検査からみる神経疾患 抗てんかん薬のファルマコゲノミクス検査. *Clinical Neuroscience*. 2016;34:1170-1171. 査読なし
Kajiwara A, Yamamura M, Murase M, Koda H, Hirota S, Ishizuka T, Morita K, Oniki K, Saruwatari J, Nakagawa K. Safety analysis of zolpidem in elderly subjects 80 years of age or older: adverse event monitoring in Japanese subjects. *Aging & Mental Health*. 2016;20:611-615. doi:10.1080/13607863.2015.1031640. 査読有
Kajiwara A, Kita A, Saruwatari J, Miyazaki H, Kawata Y, Morita K, Oniki K, Yoshida A, Jinnouchi H, Nakagawa K. Sex Differences in the Renal Function Decline of Patients with Type 2 Diabetes. *J Diabetes Res*. 2016;46:26382. doi:10.1155/2016/4626382. 査読有
Soraoka H, Oniki K, Matsuda K, Ono T, Taharazako K, Uchiyashiki Y, Kamihashi R, Kita A, Takashima A, Nakagawa K, Yasui-Furukori N, Kadowaki D, Miyata K, Saruwatari J. The Effect of Yokukansan, a Traditional Herbal Preparation Used for the Behavioral and Psychological Symptoms of Dementia, on the Drug-Metabolizing Enzyme Activities in Healthy Male Volunteers. *Biol Pharm Bull*. 2016;39:1468-1474. doi:10.1248/bpb.b16-00248. 査読有
Oniki K, Kamihashi R, Tomita T, Ishioka M, Yoshimori Y, Osaki N, Tsuchimine S, Sugawara N, Kajiwara A, Morita K, Miyata K, Otake K, Nakagawa K, Ogata Y, Saruwatari J, Yasui-Furukori N. Glutathione S-transferase K1 genotype and overweight status in schizophrenia patients: A pilot study. *Psychiatry Res*. 2016;239:190-195. doi:10.1016/j.psychres.2016.03.025. 査読有
Oniki K, Morita K, Watanabe T, Kajiwara A, Otake K, Nakagawa K, Sasaki Y, Ogata Y, Saruwatari J. The longitudinal effect of the aldehyde dehydrogenase

2*2 allele on the risk for nonalcoholic fatty liver disease. *Nutr Diabetes*. 2016;6:e210.

doi:10.1038/nutd.2016.17. 査読有
Nakashima H, Oniki K, Nishimura M, Ogusu N, Shimomasuda M, Ono T, Matsuda K, Yasui-Furukori N, Nakagawa K, Ishitsu T, Saruwatari J. Determination of the Optimal Concentration of Valproic Acid in Patients with Epilepsy: A Population Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Analysis. *PLoS One*. 2015;10:e0141266. doi:10.1371/journal.pone.0141266. 査読有
Oniki K, Saruwatari J, Izuka T, Kajiwara A, Morita K, Sakata M, Otake K, Ogata Y, Nakagawa K. Influence of the PNPLA3 rs738409 Polymorphism on Non-Alcoholic Fatty Liver Disease and Renal Function among Normal Weight Subjects. *PLoS One*. 2015;10:e0132640. doi:10.1371/journal.pone.0132640. 査読有

[学会発表](計6件)

鬼木健太郎、工藤未来、小野達昌、松田和樹、武藤奈瑠美、居塚智子、渡邊丈久、大竹宏治、緒方康博、猿渡淳二. BMIの個体間変動に基づくNAFLD予測モデルの構築とその予防的応用に関する検討. 第16回分子予防環境医学研究会大会. 2017年2月3日~4日. 熊本市国際交流会館(熊本県・熊本市)

鬼木健太郎、工藤未来、小野達昌、武藤奈瑠美、渡邊丈久、猿渡淳二. BMIの個体間変動に基づくNAFLDリスクの予測モデルの構築. 第108回日本消化器病学会九州支部例会・第102回日本消化器内視鏡学会九州支部例会. 2016年11月25日~26日. ホテル日航熊本(熊本県・熊本市)

鬼木健太郎、中嶋洋生、西村美紀、大楠直樹、小野達昌、松田和樹、古郡規雄、石津棟暎、猿渡淳二. 抗てんかん薬バルプロ酸の治療効果に関する母集団薬物動態薬力学解析. 医療薬学フォーラム2016/第24回クリニカルファーマシーシンポジウム. 2016年6月25日~26日. 滋賀県立芸術劇場びわ湖ホール(滋賀県・大津市)

鬼木健太郎、渡邊丈久、武藤奈瑠美、佐々木裕、猿渡淳二. Aldehyde dehydrogenase 2 遺伝子変異が非アルコール性脂肪性肝疾患に及ぼす影響. 第52回日本肝臓学会総会. 2016年5月19日~20日. ホテルニューオータニ幕張(千葉県・千葉市)

鬼木健太郎、大崎夏海、上橋諒子、富田哲、石岡雅道、土嶺章子、菅原典夫、大竹宏治、緒方康博、古郡規雄、猿渡淳二. Disulfide-bond A oxidoreductase-like

protein 遺伝子変異と統合失調症患者の肥満との関係. 日本薬学会第 136 年会. 2016 年 3 月 26 日 ~ 29 日. パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

鬼木健太郎、武藤奈瑠美、守田和憲、居塚智子、梶原彩文、坂田美咲、北愛矢菜、熊谷直樹、大竹宏治、緒方康博、中川和子、猿渡淳二. 非アルコール性脂肪性肝疾患予防のための非肥満者における PNPLA3 遺伝子変異の意義. 第 25 回日本医療薬学会年会. 2015 年 11 月 21 日 ~ 23 日. パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.pharm.kumamoto-u.ac.jp/Labs/tiryougaku/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鬼木 健太郎 (ONIKI, Kentaro)

熊本大学・大学院生命科学研究部・助教

研究者番号: 00613407