

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年3月31日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009年度～2011年度

課題番号：21591152

研究課題名（和文） ヒトとマウスの相同性を駆使した1型糖尿病遺伝子の同定ならびに機能解析

研究課題名（英文） Identification and characterization of susceptibility genes for type 1 diabetes by using syntenic homology between human and mouse

研究代表者

池上 博司（IKEGAMI HIROSHI）

近畿大学・医学部・教授

研究者番号：20221062

研究成果の概要（和文）：

1型糖尿病遺伝子の解析をヒトとマウスの染色体相同性を駆使して進めた結果、主効果遺伝子であるHLAとの関連にサブタイプ間で差を認めること（劇症と他のサブタイプ間で質的差異、緩徐進行と急性発症間で量的差異）、臓器特異性を決定する遺伝子としてインスリン特異的転写因子MafAが胸腺でのインスリン発現量の変化を介して1型糖尿病の疾患感受性に関与することが示された。

研究成果の概要（英文）：Susceptibility genes for type 1 diabetes were studied by using syntenic homology between mouse and human. Contribution of HLA to type 1 diabetes was shown to be different among three subtypes of type 1 diabetes: qualitative difference between fulminant and other subtypes, and quantitative difference between slowly progressive and acute-onset. Functional polymorphisms of MafA, an insulin transactivator, were associated with reduced expression of insulin in the thymus and susceptibility to type 1 diabetes both in mice and humans through the reduced expression of insulin in the thymus.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：1型糖尿病、劇症1型糖尿病、緩徐進行1型糖尿病、遺伝子、HLA

1. 研究開始当初の背景

1型糖尿病は膵細胞に対する臓器特異的自己免疫疾患であると同時に、複数の遺伝子から構築される遺伝因子と環境因子の複雑な相互作用によって発症する多因子疾患でもある。1型糖尿病の分子メカニズム解明と

それに基づく予防法・治療法の構築には疾患感受性遺伝子の同定と機能解析が不可欠であるが、遺伝因子の全貌は必ずしも明らかでなかった。

2. 研究の目的

本研究では、疾患モデル解析（実験動物

学・分子遺伝学)ならびにヒト多因子疾患(臨床病態・分子遺伝学)の両者を通じて長年蓄積・構築してきた研究成果ならびに研究体制を基盤として、1型糖尿病の責任遺伝子の同定ならびに機能解析を行うとともに、モデル動物との相同性を駆使して、ヒトでは解析不可能な実験を行い、1型糖尿病における体質に基づいたテーラーメイド医療の構築に資する基盤情報を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

1型糖尿病のモデル動物であるNODマウスにおいてこれまで解析を進めてきた疾患感受性遺伝子の領域を限局し、原因遺伝子の同定ならびに機能解析を進めるとともに、ヒト対応遺伝子の多型検索ならびに疾患との関連解析・機能解析を進めて、マウス・ヒト両面から1型糖尿病遺伝子の解明を進めた。

主要遺伝子：

モデル動物・ヒト両者で関与が示唆されているMHC領域の主要遺伝子(*Idd1*, *IDDM1*)に関して、複数のコンポーネントより構築される遺伝子複合体の全貌解明を進めた。具体的には、1型糖尿病患者545名を詳細な臨床病型解析に基づいてサブタイプに分類(急性発症典型名：338名、緩徐進行1型糖尿病：127名、劇症1型糖尿病：80名)し、健常対照者396名とともにHLAクラス(*DRB1*, *DQB1*)、クラス(*A*, *B*, *C*)の遺伝子解析および拡大HLA領域(約8.5Mb)の候補遺伝子SNP(n=101)を網羅的に解析した。

膵細胞特異性に関与する遺伝子：

・臓器特異性を決定する遺伝因子の解析：
自己免疫性甲状腺疾患(AITD)患者における膵島自己免疫の実態を解明するとともに、膵島自己免疫および甲状腺自己免疫それぞれに関与する遺伝因子を分別解析する目的で、AITD患者866名(Graves病546名、橋本病320名)と対照者503名(非自己免疫性甲状腺疾患221名、健常対照者282名)のHLAならびにCTLA4遺伝子を解析した。

・胸腺における自己抗原発現調節機構の解析：
膵細胞特異的遺伝子であるインスリン遺伝子に関して、胸腺におけるインスリン遺伝子発現調節機構を cis-element ならびに trans-activator の両面から詳細に解析した。具体的には、胸腺における自己抗原インスリンの発現量を生後日齢毎に1型糖尿病モデルマウス(NOD)とコントロールマウス(C3H/He)で比較解析するとともに、膵細胞でインスリン遺伝子発現に関与する転写因子(PDX1, NeuroD, MafAなど)と胸腺における自己抗原発現のマスターレギュレーターであるAireの発現状況を解析した。NODマ

ウスの胸腺で見いだしたインスリン発現低下の原因を解明する目的で、胸腺で発現を見いだしたインスリン特異的転写因子MafAの塩基配列を決定し、プロモーター領域に多数のバリエーションを見いだした。見いだしたバリエーションがプロモーター機能に及ぼす影響を解析する目的でルシフェラーゼを用いたレポーターアッセイを行った。さらに、ヒト対応遺伝子であるMAFAに関して96名を対象に全塩基配列を決定し、新たに見いだした多型の機能解析を行うとともに、1型糖尿病患者138名、2型糖尿病患者347名ならびに健常対照者348名を対象に関連解析を行った。

4. 研究成果

主要遺伝子(MHC)：

劇症1型糖尿病のHLAはクラスII遺伝子、クラスII遺伝子、網羅的SNP解析のいずれに関して急性発症1型糖尿病・緩徐進行1型糖尿病と質的に異なること、緩徐進行1型糖尿病のHLAは急性発症典型例と質的には同じであるが、量的に差を認め、急性発症1型糖尿病の発症には感受性HLAが2つ必要であるのに対して、緩徐進行1型糖尿病では感受性HLAが1つであっても発症しうることが示された。劇症1型糖尿病のHLAが急性発症と質的に異なるのは成因の違い(劇症：特発性、急性発症・緩徐進行：自己免疫性)を反映している可能性が考えられるのに対して、緩徐進行1型糖尿病が優性発症と量的に異なるのは、同じ自己免疫性という成因で破壊の強さ・速さの面で異なることを反映するものと考えられる。

細胞特異的遺伝子：

・AITD患者におけるGAD抗体の陽性率はAITD全体で5.8%、Graves病で7.1%と健常対照者の2.1%に比し有意に高率であり、甲状腺自己免疫には高率に膵島自己免疫を合併することが示された。GAD抗体陽性のAITD患者には高率に糖尿病を合併し、GAD陽性患者は陰性患者に比し、発症年齢が有意に若く、BMIが有意に低く、インスリン使用率が有意に高く、1型糖尿病の臨床的特徴を有していた。遺伝解析ではGAD陽性AITD患者において1型糖尿病疾患感受性HLAが有意に高頻度であるのに対し、GAD陰性AITD患者では甲状腺特異的HLAならびにCTLA4遺伝子多型との関連が顕著であった。以上の結果から、GAD陽性AITD患者は、臨床的にも、遺伝学的にも1型糖尿病の特徴を有していることが明らかとなった。

・胸腺における自己抗原インスリン(Ins2)の発現は生後いずれの日齢においても1型糖尿病モデルNODマウスにおいてコントロールマウスに比して有意に低下していた。膵細胞においてインスリン発現に関与する転

写因子の中で MafA のみが胸腺で発現しており、胸腺髄質細胞においてインスリンと共発現していることがタンパクレベルでも確認された。胸腺における MafA の発現も 1 型糖尿病モデル NOD マウスにおいてコントロールマウスに比して有意に低下しており、インスリンと MafA の発現量の間には有意の正相関を認めた。一方、Aire の発現には両群間で差を認めなかった。MafA とインスリンの発現低下の因果関係を解明する目的で、MafA ノックアウトマウスの胸腺におけるインスリン遺伝子発現を解析すると、有意の発現低下を認めた。さらに NOD マウスにおける MafA の発現低下の原因を解明する目的で NOD マウスにおける MafA 遺伝子の全塩基配列を決定した結果、プロモーター領域を中心に多数の塩基置換を同定した。NOD とコントロールで MafA プロモーター活性をルシフェラーゼを用いたレポーターアッセイで比較すると NOD の MafA プロモーターで有意の活性低下を認めた。ヒト対応遺伝子である MAFA の全塩基配列を決定した結果、調節領域ならびにコーディング領域に複数の多型を同定した。調節領域に同定した VNTR 多型ならびにコーディング領域に同定したアミノ酸置換を伴う多型の機能を解析した結果、いずれもが機能変化をとともなう機能多型であることが確認された。さらに、これら 2 つの多型で構成されるハプロタイプのうち、量と機能の両面で MAFA の機能を高めるハプロタイプが 1 型糖尿病と負の相関を示すことが示された。以上の結果から、ヒト・マウスいずれにおいてもインスリン特異的転写因子 MafA が胸腺でのインスリン発現量の変化を介して 1 型糖尿病の疾患感受性に関与する可能性が示された。

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)

Ikegami H (他 67 名、42 番目):

Meta-analysis of genome-wide association studies identifies 8 new loci for type 2 diabetes in East Asians. *Nature Genet*, 査読有、44:67-72, 2012

Ikegami H (他 64 名、45 番目):

Association of genetic variation in FTO with risk of obesity and type 2 diabetes in up to 96,551 East and South Asians. *Diabetologia*, 査読有、55:981-95, 2012

Ikegami H (他 7 名、8 番目): Prolonged hyperinsulinemia after subcutaneous injection of 2400 U regular insulin in a suicide attempt: Time course of serum

insulin with frequent measurements. *J Diabetes Invest*, 査読有、2012 (in press)

Ikegami H, Noso S, Babaya N, Kawabata Y. Genetics and pathogenesis of type 1 diabetes: prospects for prevention and intervention. *J Diabetes Invest*, 査読有、2:415-420, 2011

Ikegami H (他 15 名、16 番目): Clinical and genetic characteristics of patients with autoimmune thyroid disease with anti-islet autoimmunity. *Metabolism*, 査読有、60:761-766, 2011

Ikegami H (他 11 名、5 番目): Type 1 diabetes and interferon therapy: a nationwide survey in Japan. *Diabetes Care*, 査読有、34:2084-2089, 2011

Ikegami H (他 17 名、11 番目): Association of genetic variants for susceptibility to obesity with type 2 diabetes in the Japanese individuals. *Diabetologia*, 査読有、54: 1350-1359, 2011

Ikegami H (他 14 名、4 番目): Analysis of the HLA and non-HLA susceptibility loci in Japanese type 1 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev*, 査読有、27:844-848, 2011

Ikegami H (他 12 名、8 番目): Attenuated food anticipatory activity and abnormal circadian locomotor rhythms in Rgs16 knockdown mice. *PLoS ONE*, 査読有、6, 2011 Mar 11. [Epub (e17655)]

Ikegami H (他 10 名、11 番目): Insulin transactivator MafA regulates intra-thymic expression of insulin and affects susceptibility to type 1 diabetes. *Diabetes*, 査読有、59:2579-87, 2010

Ikegami H (他 10 名、11 番目): Direct evidence for susceptibility genes for type 2 diabetes on mouse chromosomes 11 and 14. *Diabetologia*, 査読有、53:1362-1371, 2010

Ikegami H (他 8 名、7 番目): Nuclear hormone retinoid X receptor (RXR) negatively regulates the glucose-stimulated insulin secretion of pancreatic β -Cells. *Diabetes*, 査読有、59 (11):2854-61, 2010

Ikegami H (他 21 名、10 番目): Common variants at the GCK, GCKR, G6PC2-ABCB11, and MTNR1B loci are

associated with fasting glucose in two Asian populations. Diabetologia、査読有、53:299-308, 2010

Ikegami H (他 12 名、2 番目) : Differential association of HLA with three subtypes of type 1 diabetes: fulminant, slowly progressive and acute-onset. Diabetologia 52: 2513-2521, 2009

Ikegami H (他 12 名、3 番目) : Genetic association between the IL2RA and mode of onset of type 1 diabetes in the Japanese population. J Clin Endocrinol Metab、査読有、94:947-52, 2009

Ikegami H (他 14 名、4 番目) : Association of type 1 diabetes with two loci on 12q13 and 16p13 and the influence coexisting thyroid autoimmunity in Japanese. J Clin Endocrinol Metab、査読有、94:231-235, 2009

Ikegami H (他 15 名、7 番目) : Confirmation of multiple risk loci and genetic impacts by a genome-wide association study of type 2 diabetes in the Japanese population. Diabetes、査読有、58:1690-1699, 2009

Ikegami H (他 10 名、9 番目) : The onset of diabetes in three out of four sisters: a Japanese family with type 1 diabetes. a case report. Endocrine J、査読有、56: 767-772, 2009

[学会発表] (計 29 件)

池上博司 (1 番目) 1 型糖尿病の遺伝子、第 46 回糖尿病学の進歩、2012 年 3 月 10 日、岩手

池上博司 (他 10 名、11 番目) 甲状腺中毒性周期性四肢麻痺患者における KCNJ18 遺伝子の新規多型検索、第 54 回日本甲状腺学会学術集会、2011 年 11 月 22 日、大阪

池上博司 (1 番目) 自然発症モデル動物を用いた糖尿病の遺伝解析、第 25 回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会、2011 年 11 月 5 日、東京

馬場谷成、池上博司 (他 6 名、7 番目) 糖尿病・肥満発症因子解明のための戦略・脂肪分布制御遺伝子座 F11n のコンソミック解析、第 25 回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会、2011 年 11 月 5 日、東京

池上博司 (1 番目) 1 型糖尿病疾患感受性遺伝子: HLA と non-HLA、第 9 回 1 型糖

尿病研究会、2011 年 10 月 30 日、神奈川
池上博司 (他 15 名、16 番目) 自己免疫疾患の臓器特異性: 円形脱毛症における腓島自己免疫の実態と遺伝解析 甲状腺自己免疫との比較、第 9 回 1 型糖尿病研究会、2011 年 10 月 30 日、神奈川
池上博司 (1 番目) 1 型糖尿病: Up to Date、第 48 回日本糖尿病学会近畿地方会、2011 年 10 月 29 日、大阪

Ikegami H (1 番目) Genetics of type 1 diabetes in East Asia、The 16th Japan-Korea Symposium on Diabetes Mellitus、2011.10.21、Tokyo

Babaya N、Ikegami H (他 5 名、6 番目) Susceptibility to Insulin Resistance, Adiposity and Obesity is Mapped to Proximal Region of Mouse Chromosome 14、The 16th Japan-Korea Symposium on Diabetes Mellitus、2011.10.21、Tokyo

池上博司 (他 11 名、12 番目) 自己免疫疾患の臓器特異性を規定する体質に関する検討: 円形脱毛症に合併する甲状腺および腓島自己免疫の実態と遺伝解析、第 61 回日本体質医学会総会、2011 年 10 月 9 日、東京

Ikegami H (他 6 名、3 番目) Heterogeneity of class HLA genotypes in patients with fulminant type 1 diabetes in Japan、The 3rd Scientific Meeting of the Asian Association for the Study of Diabetes、2011.7.23、China

池上博司 (1 番目) モデル動物とヒトの対比による多因子疾患の解明、第 58 回日本実験動物学会総会、2011 年 5 月 26 日、東京

池上博司 (他 6 名、3 番目) 劇症 1 型糖尿病における Class HLA と臨床的特徴の関連、第 54 回日本糖尿病学会年次学術集会、2011 年 5 月 21 日、北海道

池上博司 (1 番目) 1 型糖尿病の遺伝解析: GWAS 研究から見えること、第 54 回日本糖尿病学会年次学術集会、2011 年 5 月 20 日、北海道

池上博司 (他 17 名、18 番目) 円形脱毛症患者における甲状腺および腓島自己免疫疾患合併例の検討、第 84 回日本内分泌学会学術集会、2011 年 4 月 23 日、兵庫

能宗伸輔、池上博司 (他 6 名、7 番目) インスリン転写調節因子 MafA は胸腺におけるインスリン発現と 1 型糖尿病疾患感受性に関与する、第 60 回日本体質医学会総会、2010 年 10 月 16 日、熊本

池上博司 (他 5 名、6 番目) 劇症 1 型糖尿病における抗 GAD 抗体と HLA の関連、第 8 回 1 型糖尿病研究会、2010 年 10 月 10 日、長崎

川畑由美子、池上博司 (他 16 名、17 番

目) 1型糖尿病の遺伝解析：濃厚発症家系におけるrare variantの探索、第8回1型糖尿病研究会、2010年10月10日、長崎

Noso S, Ikegami H. (他7名、8番目) MafA is a key regulator of insulin expression in the thymus, 46th Annual Meeting EASD, 2010.9.21, Stockholm, Sweden

川畑由美子、池上博司(他16名、17番目) 1型糖尿病濃厚発症家系における疾患感受性遺伝子解析 rare variantの探索、第53回日本糖尿病学会学術集会、2010年5月27日、岡山

21 池上博司、1型糖尿病の分子遺伝学：モデル動物からのメッセージ、第24回糖尿病・肥満動物学会 会長講演、2010年1月22日、大阪

22 能宗伸輔、池上博司(他17名、18番目) 複数の自己免疫疾患に対する疾患感受性遺伝子FCRL3と1型糖尿病との関連解析、第7回1型糖尿病研究会、2009年11月7日、和歌山

23 池上博司(他10名、11番目) 自己免疫性甲状腺疾患(AITD)患者における膵島自己免疫 臨床的病態および遺伝的背景に関する検討、第52回日本甲状腺学会、2009年11月4日、名古屋

24 池上博司(他10名、11番目) ミトコンドリア遺伝子変異を伴いネフローゼ症候群を併発した若年発症糖尿病の一例、第46回日本糖尿病学会近畿地方会、2009年11月3日、京都

25 Ikegami H (他10名、10番目)、Amelioration of type 2 diabetes mellitus by compensatory augmentation of beta cell number/mass in a mouse model of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)、第15回日本遺伝子治療学会、2009年7月10日、大阪

26 池上博司(他5名、3番目) 劇症1型糖尿病におけるClass II HLA遺伝子型の検討、第52回日本糖尿病学会年次学術集会、2009年5月23日、大阪

27 池上博司(他13名、14番目) 自己免疫性甲状腺疾患(AITD)患者における膵島自己免疫の実態及び臨床的・遺伝的背景の検討、第82回日本内分泌学会学術集会、2009年4月23日、前橋

6. 研究組織

(1)研究代表者

池上 博司 (IKEGAMI HIROSHI)

近畿大学・医学部・教授

研究者番号：20221062

(2)研究分担者

川畑 由美子 (KAWABATA YUMIKO)

近畿大学・医学部・准教授

研究者番号：80423185

能宗 伸輔 (NOSO SHINSUKE)

近畿大学・医学部・講師

研究者番号：90460849

馬場谷 成 (BABAYA NARU)

近畿大学・医学部・講師

研究者番号：10449837

(3)連携研究者：なし