

機関番号：14501

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21700449

研究課題名 (和文) 1 型糖尿病モデル KDP ラットにおける修飾遺伝子座の解明

研究課題名 (英文) Identification of modifier loci for type 1 diabetes in the KDP rat

研究代表者

横井 伯英 (YOKOI NORIHIDE)

神戸大学・大学院医学研究科・特命准教授

研究者番号：70311610

研究成果の概要 (和文) : 1 型糖尿病モデル KDP ラットにおける 2 つの主要遺伝子 (MHC と Cblb) 以外の修飾遺伝子の同定を最終的な目標として、2 種類の交配から作出したラットを用いた遺伝解析を行った。その結果、糖尿病の発症を修飾する複数の遺伝子座が同定され、そのうちのいくつかは日齢特異的および性別特異的に作用することが示唆された。KDP ラットにおける 1 型糖尿病の発症に關与する遺伝子座の全体像が明らかになった。

研究成果の概要 (英文) : To identify modifier genes for type 1 diabetes in the Komeda diabetes-prone (KDP) rat, we performed genetic analysis using progeny produced from two different crosses. Genetic analysis of these two crosses revealed that modifier genes are located on several chromosomal regions, and that some of them showed age- or sex-specific effects. A whole picture of the genetic loci for type 1 diabetes in the KDP rat was clarified.

交付決定額

(金額単位：円)

|        | 直接経費      | 間接経費      | 合計        |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2009年度 | 1,800,000 | 540,000   | 2,340,000 |
| 2010年度 | 1,600,000 | 480,000   | 2,080,000 |
| 年度     |           |           |           |
| 年度     |           |           |           |
| 年度     |           |           |           |
| 総計     | 3,400,000 | 1,020,000 | 4,420,000 |

研究分野：分子遺伝学・実験動物学

科研費の分科・細目：実験動物学・実験動物学

キーワード：遺伝学・遺伝子・糖尿病・動物モデル・ラット

## 1. 研究開始当初の背景

1 型糖尿病は多因子疾患であり、主に自己免疫の機序により膵臓のインスリン分泌細

胞 (膵β細胞) が破壊されることにより発症する。1 型糖尿病の発症機序を解明するには感受性遺伝子を同定し、その病態発症におけ

る役割を解明することが重要である。1型糖尿病の感受性遺伝子やそれらの病態発症における役割の全貌を解明するためには、遺伝的にも環境的にも統御可能な動物モデルを用いた解析が有力な手段である。

申請者は、1型糖尿病を自然発症する KDP ラットの開発当初からその遺伝学的解析を中心となって遂行してきた (Yokoi et al., J. Clin. Invest. 1997)。その結果、MHC 以外の主要遺伝子として Cb1b を同定し、2つの主要遺伝子 (MHC と Cb1b) による 1型糖尿病発症モデルを提唱するに至った (Yokoi et al., Nature Genet. 2002; Yokoi N., Exp. Anim. 2005)。Cb1b は自己免疫反応を規定し、MHC は膵β細胞に対する免疫反応の特異性を規定すると考えられる。

この発症モデルを検証するため、KDP ラットと同一の MHC 型を有する正常系統である TM ラットに Cb1b 変異を組み込んだコンジュニック系統 (TM. KDP-Cb1b) を作出したところ、2つの主要遺伝子によって 1型糖尿病を発症することが確認された (Yokoi et al., Diabetes 2007)。しかし、コンジュニック系統では発症率が低く抑えられたことから、2つの主要遺伝子以外に発症を修飾する遺伝子の存在が強く示唆された。

## 2. 研究の目的

本研究では、KDP ラットにおける糖尿病の発症を修飾する遺伝子の同定を最終的な目標にして研究を遂行する。具体的には、

- (1) コンジュニック系統 (TM. KDP-Cb1b) を用いた遺伝解析を行い、修飾遺伝子座を同定する。
- (2) 位置的候補遺伝子解析を行い、修飾遺伝子座の候補遺伝子を同定する。

## 3. 研究の方法

### (1) F2 仔を用いた遺伝解析

コンジュニックと KDP ラットを交配して F1 仔を作出し、さらに F1 同士の交配により F2

仔を作出して糖尿病の発症について観察するとともに全ゲノム・スキャンを行い、修飾遺伝子の染色体上の位置を同定する。

### (2) 戻し交雑 (N2) 仔を用いた遺伝解析

コンジュニックと KDP を交配して作出した F1 にコンジュニックを戻し交配して N2 仔を作出し、糖尿病の発症について観察するとともに全ゲノム・スキャンを行い、修飾遺伝子の染色体上の位置を同定する。

### (3) 候補遺伝子解析 (位置的候補遺伝子アプローチ)

修飾遺伝子が存在する染色体領域について候補遺伝子解析による遺伝子変異の検索を行う。具体的には、ラットのゲノム情報だけでなく、ヒトやマウスにおける相同な染色体領域のゲノム情報を活用して免疫系の中でも特に T 細胞の活性化制御や膵β細胞の抗原提示に関与すると考えられる候補遺伝子を探索する。また、マイクロアレイを用いてコンジュニックと KDP の胸腺や脾臓などの組織における網羅的遺伝子発現解析を行い、染色体の位置情報を考慮して候補遺伝子を抽出する。

## 4. 研究成果

### (1) F2 仔を用いた遺伝解析

コンジュニックと KDP ラットを交配して F2 仔を約 300 匹作出し、糖尿病の発症について観察した (図 1)。F1 は KDP ラットと同様に発症開始日齢が早く、発症率は約 80% であった。F1 が KDP とほぼ同様の発症率を示したことから、KDP ラットの遺伝的背景に優性の遺伝様式で作用する修飾遺伝子が存在することが示唆された。F2 の発症率は約 70% であり、F2 全個体について全染色体に散在する SSLP マーカーを用いてゲノム・スキャンを行った。その結果、糖尿病の発症と有意な関連が認められる複数の染色体領域が同定された。また、日齢特異的および性別特異的に作用する遺伝子座が存在することが示唆された。さらに、膵島

炎や甲状腺炎の発症や程度に関与する修飾遺伝子座が存在することが示唆された。

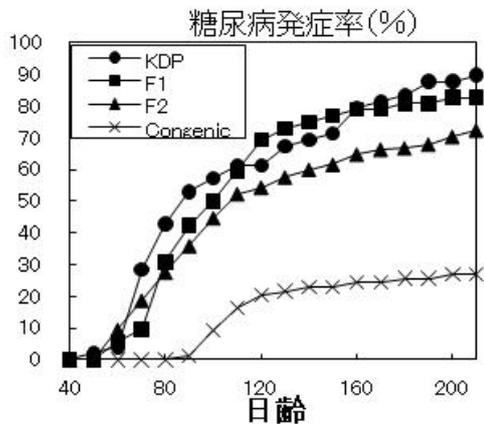


図1 F2仔の糖尿病累積発症率

(2) 戻し交雑 (N2) 仔を用いた遺伝解析

コンジェニックとKDPを交配して作出したF1にコンジェニックを戻し交配してN2仔を作出し、N2仔について糖尿病の発症について観察した(図2)。N2の糖尿病発症率は約60%であり、N2全個体について全染色体に散在するSSLPマーカーを用いてゲノム・スキャンを行った。その結果、糖尿病の発症と有意な関連が認められる複数の染色体領域が同定された。さらに、日齢特異的および性別特異的に作用する遺伝子座が存在することが示唆された。

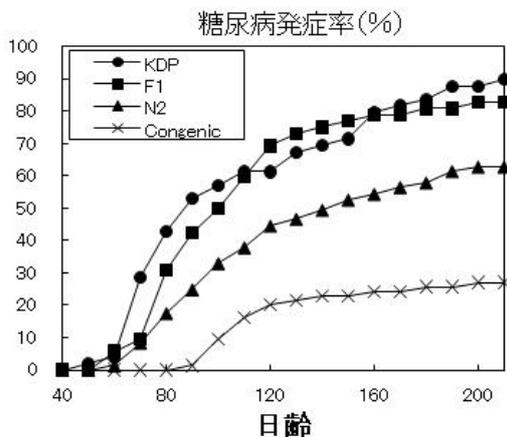


図2 N2仔の糖尿病累積発症率

また、2種類の交配系に共通する遺伝子座

においては、糖尿病感受性アレルも一致していた。

(3) 候補遺伝子解析 (位置的候補遺伝子アプローチ)

これまでに行ったF2およびN2を用いた遺伝解析から同定した修飾遺伝子座について責任遺伝子を同定するために候補遺伝子解析を行った。具体的には、ヒトやマウスにおける相同な染色体領域のゲノム情報およびヒトやマウスにおける1型糖尿病の遺伝子座の情報を活用して、免疫系の中でも特にT細胞の活性化制御や $\beta$ 細胞の抗原提示に関与すると考えられる候補遺伝子を選択した。このうち数個の遺伝子についてエクソン部分のシーケンス解析を行ったが原因と考えられる変異は認められなかった。

以上の研究によってKDPラットにおける1型糖尿病の発症に関与する遺伝子座の全体像が明らかになった。

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3件)

①横井伯英、清野進. 1型糖尿病の動物モデル. 糖尿病ナビゲーター(第2版)(門脇孝編) p114-115, 2010. メディカルレビュー社 (査読なし)

②横井伯英. 糖尿病モデル動物の遺伝子. 医学のあゆみ 232(12):1207-1208, 2010. 医歯薬出版 (査読なし)

③横井伯英、清野進. 1型糖尿病の遺伝素因. ゲノム医学 9(2):99-106, 2009. メディカルレビュー社 (査読なし)

[学会発表] (計6件)

①N. Yokoi, S. Hidaka, M. Ohya, S. Tanabe, S. Seino. Genetics of the KDP rat: Major and modifier genes for autoimmune type 1 diabetes. The 18th International

Workshop on Genetic Systems in the Rat  
(Kyoto, Japan) December 1, 2010.

②横井伯英、田辺幸子、大矢美紀、清野 進.  
1型糖尿病モデルKDPラットにおける膵島炎  
および甲状腺炎の遺伝解析. 第53回日本糖  
尿病学会(岡山)2010年5月29日

③横井伯英、田辺幸子、大矢美紀、井嶋 誠、  
高木弓枝、増井則夫、清野 進. MHC Class II  
分子と自己免疫の臓器特異性との関係ーMHC  
コンジェニック系統を用いた検討ー. 第24  
回日本糖尿病・肥満動物学会(大阪)2010年  
1月23日

④横井伯英. 1型糖尿病モデルKDPラット. 第  
24回日本糖尿病・肥満動物学会 シンポジウ  
ム 1「自然発症モデル動物を用いた糖尿病研  
究」(大阪)2010年1月22日

⑤横井伯英、田辺幸子、清野 進. F2交配系  
を用いた1型糖尿病モデルKDPラットにおけ  
る修飾遺伝子座の同定. 第56回日本実験動  
物学会(大宮)2009年5月14日

⑥横井伯英、清野 進. F2交配系を用いた1  
型糖尿病モデルKDPラットにおける修飾遺伝  
子座の解析. 第52回日本糖尿病学会(大阪)  
2009年5月24日

[その他]

ホームページ等

[http://www.med.kobe-u.ac.jp/phys1/index  
.html](http://www.med.kobe-u.ac.jp/phys1/index.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

横井 伯英 (YOKOI NORIHIDE)  
神戸大学・大学院医学研究科・特命准教授  
研究者番号: 70311610

### (2) 研究分担者

### (3) 連携研究者