

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461390

研究課題名(和文)ゲノムワイド関連解析で同定された新規2型糖尿病関連領域の疾患感受性機序の検討

研究課題名(英文)Functional analysis of GWAS-derived type 2 diabetes susceptibility genes

研究代表者

今村 美菜子 (IMAMURA, Minako)

琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：00596124

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：C2CD4A-C2CD4B領域の疾患感受性機序を解明するため、同領域の詳細な多型検索および関連解析を行い機能性多型候補の探索を行った。最も疾患との関連が強い一塩基多型は両遺伝子の間(intergenic region)に位置しており、疾患感受性機序はC2CD4A、C2CD4Bいずれかの発現量の変化を介している可能性が考えられた。さらに、ヒト、マウスにおける両遺伝子の発現パターンの検討から、両遺伝子は膵細胞において重要な役割を持つことが示唆された。そこで、膵細胞におけるC2cd4aおよびC2cd4bの役割を明らかにするために、膵細胞特異的トランスジェニックマウスを作成し、耐糖能を評価した。

研究成果の概要(英文)：We have performed a fine-mapping within the C2CD4A-C2CD4B locus to identify causal variants for type 2 diabetes susceptibility. The most significant association was observed in intergenic region which indicates the causal variant may affect the expression of either C2CD4A or C2CD4B. We also found that these genes dominantly expressed in human pancreas and mouse pancreatic beta cell line. Motivated by the results of fine mapping and expression analysis, we have generated beta-cell specific transgenic mice for C2cd4a and C2cd4b respectively to evaluate the role of these genes in vivo.

研究分野：内科系臨床医学 内分泌学 ゲノム医学

キーワード：2型糖尿病 遺伝要因

1. 研究開始当初の背景

我が国における糖尿病患者数は増加の一途をたどっている。糖尿病患者の90%以上を占める2型糖尿病の成因には、骨格筋、肝臓、脂肪など末梢でのインスリン抵抗性と膵β細胞からのインスリン分泌不全が関与するがその正確な分子メカニズムの全容は未だ明らかではない。近年、遺伝統計学に基づく疾患関連遺伝子探索法であるゲノムワイド関連解析(GWAS)が広く行われ、2014年までに国内外の研究機関から60以上の2型糖尿病疾患感受性領域が報告されている。GWASは従来の既知の分子機能に基づいた2型糖尿病研究とは異なり、仮説に基づかない統計学的アプローチであることから新規標的の同定に適していると考えられる。*C2CD4A-C2CD4B*領域は2010年に研究分担者らの研究グループにより日本人集団を用いたGWASで同定された2型糖尿病の疾患感受性遺伝子領域であるが(Yamauchi T, Hara K, Maeda S et al. *Nat Genet* 42: 864-868, 2010)、この領域が疾患にかかわる分子機序は未だ明らかではない。GWASで同定された疾患と関連する遺伝子多型は単なるマーカーであり、疾患感受性を直接規定していないことも多い。従って、*C2CD4A-C2CD4B*領域の疾患感受性の機序を明らかにするためには、まず当該遺伝子領域の詳細な解析を行い、疾患感受性を直接規定する機能性遺伝子多型(以下機能性多型と略す)および、この機能性多型により調節を受ける遺伝子(疾患感受性遺伝子)を明らかにし、その疾患感受性遺伝子の分子機能を解明する必要がある。

2. 研究の目的

本研究では上記の背景に基づき、新規2型糖尿病疾患感受性遺伝子領域として同定された*C2CD4A-C2CD4B*領域内の機能性多型の検索を行うと共に、その機能性多型により領域内の遺伝子の機能にどのような変化がもたらされるかを明らかにすることで*C2CD4A-C2CD4B*領域による2型糖尿病疾患感受性機序を分子レベルで解明する。また、この新規2型糖尿病関連遺伝子候補である*C2CD4A*あるいは*C2CD4B*をそれぞれ膵β細胞において過剰発現させた遺伝子改変マウスを作成し、*C2cd4a*および*C2cd4b*の膵β細胞での生理的役割、特にインスリン分泌における作用を明らかにする。さらに、これらの解析により*C2CD4A/C2CD4B*の新規糖尿病治療標的としての可能性を検証する。

3. 研究の方法

(1)ヒト*C2CD4A-C2CD4B*遺伝子領域の

新規遺伝子多型の検索および機能性多型の同定

2型糖尿病患者(n=96)の末梢血由来 genomic DNA を用いて、*C2CD4A* および *C2CD4B* 全長とその5'側10kbp および *C2CD4A - C2CD4B* 間の intergenic region を含む約100kbpのリシークエンスをサンガー法にて行った。得られたDNA配列からの遺伝子多型の検出には polyphred を用いた。同定した遺伝子多型(一塩基多型)に対して2型糖尿病患者群(n=2,994)、対照群(n=3,352)のゲノムサンプルを用いてマルチプレックスPCRインベーター法による遺伝子型タイピングを行った。それぞれの一塩基多型と2型糖尿病疾患感受性との関連を検討するために、2型糖尿病群と対照群の遺伝子型頻度を比較した。統計学的な有意差検定には Cochran-Armitage 検定を用いた。(2)*C2CD4A, C2CD4B* 遺伝子の発現パターン解析

ヒト組織における *C2CD4A, C2CD4B* の発現をクオンテック社の Human MTC Panel I を用いて定量的PCRにて検討した。*C2CD4A, C2CD4B* それぞれの遺伝子の発現量は *GAPDH* で補正した。また、マウス培養細胞: MIN-6細胞、Hepal-6細胞、C2C12細胞(myotube)、3T3-L1細胞(differentiated)における *C2cd4a, C2cd4b* の発現量を定量的PCRにて検討した。各遺伝子の発現量は *Eef1g, Hmbs, PP1a* にて補正した。

(3)遺伝子導入動物の作成および表現型解析

*C2cd4a* および *C2cd4b* の *in vivo* での糖代謝における役割を解明するために膵β細胞特異的 *C2cd4a* および *C2cd4b* トランスジェニックマウスを作成した。膵β細胞特異的プロモーター(RIP;ラットインスリン2プロモーター)はラットゲノムよりクローニングした。マウス *C2cd4a* および *C2cd4b* CDS 配列(1352bp,1267bp)は Origene の mouse cDNA クローンを用いた。RIP2-*C2cd4a*-SV40 polyA および RIP2-*C2cd4b*-SV40 polyA を持つ発現ベクターを構築し制限酵素処理した後、精製した断片を各々200個の受精卵にインジェクションした。得られたファウンダーマウス(F0)のジェノタイピングをPCRで行い *C2cd4a, C2cd4b* 遺伝子導入動物の確認を行った。PCRで目的の配列導入が確認されたFOマウスは野生型マウスと交配し、得られたF1マウスおよびFOマウスの genomic DNA をサザンブロットで解析して、導入コピー数の確認を行った。

表現型の解析は normal chow diet による飼育下での定期的な血糖値、体重の計測および20-25週令での経口糖負荷試験(1.5gD-glucose/kg body weight)にて行

った。経口糖負荷試験では負荷前(0分)と負荷後15,30,60,120分において簡易血糖測定器にて血糖値を測定した。また、0,15,30分の3点で採取した血漿を用いて血漿インスリン値(0,15,30分値)も測定した。

#### 4. 研究成果

##### (1)ヒト *C2CD4A-C2CD4B* 領域の新規遺伝子多型の検索および機能性多型の同定

2型糖尿病患者96名の genomic DNA を用いて *C2CD4A-C2CD4B* 領域およびその周辺領域計約100 kbp をサンガー法にてリシークエンスを行った結果、計223個の一塩基多型が同定された。

223個のうち170個は2014年7月の時点で SNP データベースに収載されている一塩基多型(dbSNP)との情報と一致していた。残りの53個の一塩基多型はデータベースに記載がなく、新規多型候補となった。

223個の多型のうち、98個については我々の過去の研究においてすでに2型糖尿病との関連は検討済みであったため、残りの125個の一塩基多型の遺伝子型判定を試みた。マルチプレックス PCR ベーダー法による遺伝子型判定のためのプローブ設計を試み、125個のうち、75個の設計に成功した。そこでこれらの75遺伝子多型について2型糖尿病患者2,994名、コントロール3,352名における遺伝子型の判定を行った。

すでに検討済みであった98個の遺伝子多型の情報と現在までに新たに解析した75個の遺伝子多型の情報を合わせた結果、2型糖尿病との関連解析において最も関連が有意であった遺伝子多型は *C2CD4A-C2CD4B* の intergenic region に位置しており、p値は  $1.03 \times 10^{-6}$  で1リスクアレル辺りのオッズ比は1.18(95%信頼区間1.10-1.26、対照群における危険対立遺伝子頻度は59%であった)。

この結果から、機能性多型は *C2CD4A*、*C2CD4B* 遺伝子の間の intergenic region に存在し、疾患感受性機序は *C2CD4A*、*C2CD4B* いずれかの発現量の変化を介している可能性が考えられた。

##### (2)*C2CD4A*, *C2CD4B* 遺伝子の発現パターン解析

図1.2に示すように、*C2CD4A*, *C2CD4B* 遺伝子はヒト膵組織、マウス膵β細胞株である MIN-6 細胞に特に強く発現しており、その発現量は肝臓、脂肪、骨格筋と比べ10倍以上であった。このことから、両遺伝子は膵β細胞において重要な役割を果たしている可能性が考えられた。

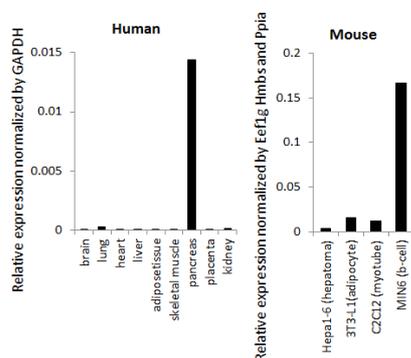


図1.ヒト *C2CD4A* およびマウス *C2cd4a* 発現パターン

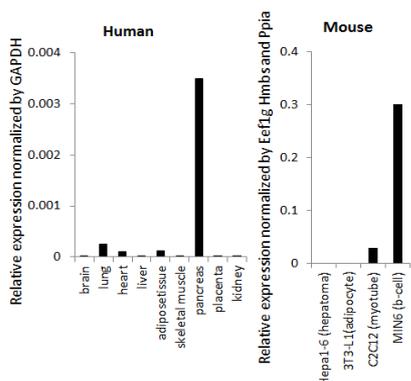


図2.ヒト *C2CD4B* およびマウス *C2cd4b* 発現パターン

##### (3)遺伝子導入動物の作成および表現型解析 膵β細胞特異的 *C2cd4a* トランスジェニックマウスの作成

研究の方法で記述した通りに膵β細胞特異的 *C2cd4a* トランスジェニックマウスを作成した。F0マウスのうち tail 由来 DNA サンプルを用いた PCR にて6匹の *C2cd4a* トランスジェン陽性雄マウスの獲得が確認された。これらのマウスを野生型マウスと交配させて F1マウスを作成した。

F1マウス TailDNA を用いたサザンブロットにてトランスジェンの導入コピー数を検証し、5系統の F1マウスのうち2系統を選択し、導入コピー数の高い(29-34コピー)ラインを  $\beta$ -*C2cd4a*-Tg-high, 導入コピー数の低い方(6-9コピー)を  $\beta$ -*C2cd4a*-Tg-low とした。

##### 膵β細胞特異的 *C2cd4b* トランスジェニックマウスの作成

膵β細胞特異的 *C2cd4b* トランスジェニックマウスを作成した。F0マウスのうち4匹の *C2cd4b* トランスジェン陽性マウス(雄1雌3)の獲得が確認された。得られた4系統の F1マウスのうち、2系統を選択し、導入コピー数が多かった(43-52コピー)ラインを  $\beta$ -*C2cd4b*-Tg-high, 導入コピー数の低いライン(2コピー)を  $\beta$ -*C2cd4b*-Tg-low とした。

*C2cd4a*, *C2cd4b* 遺伝子改変マウスの表現型解析。

まず、導入遺伝子のコピー数が異なる2系

統の *C2cd4a* トランスジェニックマウス ( $\beta$ -*C2cd4a*-Tg-high:n=6, $\beta$ -*C2cd4a*-Tg-low: n=3) とそれぞれの litter mate control (Ctl: n=7, n=4) の表現型解析を行った。Normal chow diet 飼育下で 20 週令まで観察したところ、 $\beta$ -*C2cd4a*-Tg-high は有意に低体重であり [ $\beta$ -*C2cd4a*-Tg-high 26.6 $\pm$ 0.4 vs Ctl 28.1 $\pm$ 1.3, p=0.02,  $\beta$ -*C2cd4a*-Tg-low 27.8 $\pm$ 0.9 vs Ctl 27.6 $\pm$ 2.2, p=0.89, (g)]、経口糖負荷試験では  $\beta$ -*C2cd4a*-Tg-high の耐糖能は Ctl に比して良好であった[血糖値の曲線下面積(AUC: 0,15,30,60,120 分値)  $\beta$ -*C2cd4a*-Tg-high 31476.3 $\pm$ 4550 vs Ctl 39016.1 $\pm$ 5729.3, p=0.03,  $\beta$ -*C2cd4a*-Tg-low 29312.5 $\pm$ 3059.7 vs Ctl 35851.9 $\pm$ 1571.7, p=0.07]。血中インスリン値の AUC (0,15,30 分値)は  $\beta$ -*C2cd4a*-Tg-high と  $\beta$ -*C2cd4a*-Tg-low で異なる傾向を示した ( $\beta$ -*C2cd4a*-Tg-high 57.6 $\pm$ 2.4 vs Ctl 42.4 $\pm$ 15.1, p=0.17,  $\beta$ -*C2cd4a*-Tg-low 32.5 $\pm$ 9.7 vs Ctl 49.5 $\pm$ 14.1, p=0.03)。

*C2cd4b* マウス 2 系統 ( $\beta$ -*C2cd4a*-Tg-high: n=3,  $\beta$ -*C2cd4a*-Tg-low: n=2) と litter mate control (Ctl n=3, n=4) を normal chow diet 飼育下で 25 週令まで観察したが、25 週令時に  $\beta$ -*C2cd4b*-Tg-high が Ctl に比して有意に低体重であった ( $\beta$ -*C2cd4b*-Tg-high 27.3 $\pm$ 0.6 vs Ctl 30 $\pm$ 0.8, p=0.008,  $\beta$ -*C2cd4b*-Tg-low 27 $\pm$ 0.8 vs Ctl 27 $\pm$ 1.4) 以外は、耐糖能を含め、トランスジェニックマウスと Ctl との差は観察されなかった。経口糖負荷試験ではトランスジェニックマウス群とコントロール群の間では有意差はなかった[血糖値 AUC ( $\beta$ -*C2cd4b*-Tg-high 48225.0 $\pm$ 13929.5 vs Control 51055.0 $\pm$ 5338.4, p>0.05,  $\beta$ -*C2cd4b*-Tg-low 45532.5 $\pm$ 5392.5 vs Control 51221.3 $\pm$ 2193.6)]。

これまでの結果では  $\beta$ -*C2cd4a*-Tg-high マウスがもっとも耐糖能が良好であることから *C2cd4a* が糖代謝に重要な役割を果たしている可能性が示唆される。今後は、解析に用いるマウスの数を増やして今回の結果が再現できるかどうか、さらには高脂肪食飼育下での *C2cd4a*, *C2cd4b* 遺伝子改変マウスの耐糖能の検討が必要である。

##### 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 3 件)

Matsuba R, Imamura M, Tanaka Y, Iwata M, Hirose H, Kaku K, Maegawa H, Watada H, Tobe K, Kashiwagi A, Kawamori R, Maeda S. Replication Study in a Japanese Population of Six Susceptibility Loci for Type 2 Diabetes Originally Identified by a Transethnic Meta-Analysis of Genome-Wide Association Studies.

*PLoS One*. 査読あり 11(4):e0154093. doi: 10.1371/journal.pone.0154093. eCollection 2016.

Matsuba R, Sakai K, Imamura M, Tanaka Y, Iwata M, Hirose H, Kaku K, Maegawa H, Watada H, Tobe K, Kashiwagi A, Kawamori R, Maeda S. Replication Study in a Japanese Population to Evaluate the Association between 10 SNP Loci, Identified in European Genome-Wide Association Studies, and Type 2 Diabetes. *PLoS One*. 査読あり 10(5):e0126363. doi: 10.1371/journal.pone.0126363. eCollection 2015.

Replication study of the association of rs7578597 in THADA, rs10886471 in GRK5, and rs7403531 in RASGRP1 with susceptibility to type 2 diabetes among a Japanese population K. Sakai · M. Imamura · Y. Tanaka · M. Iwata · H. Hirose · K. Kaku · H. Maegawa · H. Watada · K. Tobe · A. Kashiwagi · R. Kawamori · S. Maeda *Diabetology International* 査読あり Volume 6 · Number 4 · December 2015

[学会発表](計 2 件)

今村美菜子, Symposium 9 : New insights in pathogenesis of type 2 diabetes -From genetics to biology- ;2 型糖尿病の現状第 58 回日本糖尿病学会年次学術集会 下関(海峡メッセ) 平成 27 年 5 月 21 日—23 日

Minako Imamura, Bioinformatics approach to identify drug targets for the treatment of type 2 diabetes 第 59 回日本糖尿病学会年次学術集会 京都 (京都国際会議場) 平成 28 年 5 月 19 日—21 日

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]  
ホームページ等

6. 研究組織  
(1)研究代表者

今村 美菜子 (IMAMURA, Minako)  
琉球大学・大学院医学研究科・准教授 研究者  
番号：00596124

(2)研究分担者

前田 士郎 (MAEDA, Shiro)  
琉球大学・大学院医学研究科・教授 研究者  
番号：50314159

(3)連携研究者

( )

研究者番号：

(4)研究協力者

( )