

平成 21 年 5 月 25 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19790731

研究課題名（和文） PD-1 経路と小児 1 型糖尿病：疾患感受性と遺伝子発現解析

研究課題名（英文）

研究代表者

堤 康（TUTUMI YASUSHI）

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：80419564

研究成果の概要：

本研究は、日本人における PD-1、PD-L1、PD-L2 各遺伝子多型頻度を明らかにすること、各多型内の連鎖不均衡を検討すること、日本人 1 型糖尿病患者における PD-1、PD-L1、PD-L2 各遺伝子の遺伝子多型頻度を解析し、1 型糖尿病との疾患関連解析を行うこと、また関連性が見出されたハプロタイプについて、その機能解析を行うことを目的としている。

我々はこれまでに小児 1 型糖尿病患者集団、全身性エリテマトーデス患者集団と健常コントロール集団間で各分子の発現量を検討し、その結果、1 型糖尿病患者の末梢血 CD4 陽性 T 細胞において、他の 2 群に比べ、T 細胞活性化を抑制する補助シグナル分子である PD-1 遺伝子の発現量が有意に低下していることを報告している。

平成 19 年度は、血縁関係のない健常児 100 名を対象に、日本人集団における PD-1 遺伝子、ならびにそのリガンドである PD-L1 遺伝子と PD-L2 遺伝子の遺伝子多型をスクリーニングし、その結果以下の遺伝子多型を見出し、日本人における PD-1、PD-L1、PD-L2 各遺伝子の遺伝子多型に関して、健常児 250 名を対象として解析し、各遺伝子多型頻度を明らかにした。

そして得られた遺伝子型データを利用して、PD-1 遺伝子のハプロタイプが日本人の小児 1 型糖尿病の病態に関与していることを報告している。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	0	1,800,000
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	360,000	3,360,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：小児科

キーワード：小児内分泌学

1. 研究開始当初の背景

T細胞の増殖、各種機能細胞への分化には、T細胞レセプターを介する抗原特異的なシグナルに加え、補助シグナル分子を介する第2のシグナルが必須である。補助シグナル分子の中でもCD28ファミリー分子は特に重要で、活性化シグナルを伝達するCD28、ICOSはT細胞増殖に、抑制性シグナルを伝達するCTLA-4、PD-1、BTLAはT細胞活性化の終息に中心的な役割を担っている。

PD-1 (programmed cell death 1) はCD28ファミリーに属する補助シグナル分子で、抑制性シグナルとして免疫寛容の維持に関与しており、CTLA-4と同様にIL-2産生の減少を介しT細胞活性化を抑制する。またPD-1ノックアウトマウスでは、SLE様の関節炎、糸球体腎炎、拡張性心筋症様の疾患を呈することが報告されている。

補助シグナル分子と1型糖尿病に関連したこれまでの研究では、我々は小児1型糖尿病患者集団、全身性エリテマトーデス患者集団と健常コントロール集団間で各分子の発現量を検討し、その結果、1型糖尿病患者の末梢血CD4陽性T細胞において、他の2群に比べ、PD-1遺伝子の発現量が有意に低下していることを報告した。また、1型糖尿病モデルマウスであるNODマウスを用いた最近の報告でも、PD-1、PD-L1経路の阻害が1型糖尿病の発症を早めることが証明されている。

また欧米人集団においてヒト1型糖尿病の疾患感受性遺伝子の候補遺伝子として研究報告があり、PD-1遺伝子のintron 5の7146G/A多型のGアリル頻度が、1型糖尿病患者集団において有意に高いことや、RUNX1結合領域に存在する7146G/A多型がRUNX1の結合に影響を及ぼすこと、そして末梢血単核球中のPD-1遺伝子発現量がこの多型により違いがみられること⁴⁾等が報告されている。

日本人小児の1型糖尿病の発症率は、欧米人に比べてかなり低率であるため、1型糖尿

病の遺伝的な感受性には人種による違いがあると考えられており、人種特異的あるいは人種非特異的な感受性遺伝子の組み合わせにより遺伝的背景因子が規定されていると推定される。

我々の研究室ではCTLA-4、T-bet、Foxp3遺伝子が1型糖尿病の疾患感受性遺伝子であることを既に証明しているが、欧米人に証明された1型糖尿病の感受性遺伝子の多型 (intron 5の7146G/A多型) は、日本人を含めたアジア人では多型性がないこと (あるいは非常に低頻度) が報告されており、日本人においてもPD-1遺伝子が1型糖尿病の疾患感受性遺伝子であるかどうかは不明である。しかしながら、PD-1遺伝子の低発現量と関連する日本人特有の遺伝子多型が存在する可能性がある。

2. 研究の目的

日本人の1型糖尿病感受性遺伝子については未知な部分が多い。我々は、感受性遺伝子としてPD-1に注目し、PD-1発現量の比較を行うことにより、機能的多型の臨床的意義を見出すべく解析を重ね、日本人における1型糖尿病発症におけるPD-1ファミリーの意義を明らかにすることで1型糖尿病の発症メカニズムの一端を明らかにし、早期診断や発症予防等に応用をおこなうことを目的とした。

これまでに既に、血縁関係のない健常児100名を対象に、日本人集団におけるPD-1遺伝子、ならびにそのリガンドであるPD-L1遺伝子とPD-L2遺伝子の遺伝子多型をスクリーニングし、その結果以下の遺伝子多型を見出している。これらの結果を元に、我々は本研究期間内に以下のことについて解析を行った。

日本人におけるPD-1、PD-L1、PD-L2各遺伝子の遺伝子多型に関して、健常児250名を対象として解析し、各遺伝子多型頻

度を明らかにする。

各多型内の連鎖不均衡を検討する。

日本人1型糖尿病患者220名において、PD-1、PD-L1、PD-L2各遺伝子の遺伝子多型頻度を解析する。そして1型糖尿病との疾患関連解析を行う。

関連性が見出されたハプロタイプについて、その機能解析を行う。

3. 研究の方法

日本人健常人集団における、PD-1、PD-L1、PD-L2遺伝子多型頻度の調査した。

手順は以下のとおり。

(1) これまでに見出したminor allele頻度5%以上のPD-1、PD-L1、PD-L2遺伝子多型について、日本人健常人集団250名において解析する。各多型のタイピングは以下の方法により行う。

(2) TaqMan® SNP ジェノタイピングアッセイを用いたTaqMan法による遺伝子解析をABI PRISM 7700シーケンスディテクターシステムで行う。insertion/non insertionの多型解析はABI PRISM 310 ジェネティックアナライザー(アプライド・バイオシステムズ)のGeneScanを使用する。

(3) 多型同士が近接しTaqMan® SNP ジェノタイピングアッセイで解析困難な多型に関してはRestriction site-generated-PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP) を行う。

(4) 同様の解析を1型糖尿病集団250名にお

いて行い、各遺伝子多型頻度を明らかにする。なお、日本人健常人集団250名と1型糖尿病集団250名のDNA採取に関しては、九州大学遺伝子解析倫理委員会の承認を受けた後、すでに採取を終了しており、当教室の他の遺伝子解析に使用し、結果は複数の欧文論文で報告している。

その後日本人健常人ならびに1型糖尿病集団から得られた遺伝子型データを利用して、PD-1、PD-L1、PD-L2各遺伝子における多型部位のハプロタイプ頻度を推定した。

対立遺伝子の組み合わせは haplotype frequencies (EH) ソフトウェアプログラムを使って推定した。連鎖不平衡(LD)係数、 $D=D/D_{max}$ (またはD値が陰性なら D/D_{min}) に関しては、各2箇所の多型間に存在する対立遺伝子頻度を算出し、集団遺伝学的手法を用いて明らかとなった遺伝子多型から構成される疾患感受性ハプロタイプについて、その機能的意義を解析した。

4. 研究成果

日本人集団におけるPD-1遺伝子、ならびにそのリガンドであるPD-L1遺伝子とPD-L2遺伝子の遺伝子多型をスクリーニングし、その結果以下の遺伝子多型を見出し、日本人におけるPD-1、PD-L1、PD-L2各遺伝子の遺伝子多型に関して、健常児250名を対象として解析し、各遺伝子多型頻度を明らかにした。現在、疾患感受性ハプロタイプについて、その機能的意義を解析中である。

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)

Tsutsumi Y, et al.

Phenotypic and genetic analyses of T cell-mediated immunoregulation in

patients with type 1 diabetes. Diabetic
Medicine 2006, 23,1145-1150

Ni.R et al .
PD-1 gene haplotype is associated with
the development of type 1 diabetes
mellitus in Japanese children.
Human genetics 121,2007,223-232

6 . 研究組織

(1)研究代表者

堤 康 (TUTUMI YASUSHI)
九州大学・大学病院・助教
研究者番号 : 80419564

(2)研究分担者

なし ()

研究者番号 :

(3)連携研究者

なし ()

研究者番号 :