

機関番号： 32620
 研究種目： 基盤研究 (C)
 研究期間： 2009 年 ~2011 年
 課題番号： 21591039
 研究課題名 (和文) 2 型糖尿病腎症モデルマウス (KK-A^y/Ta マウス) における QTL 解析による腎症疾患感受性遺伝子座の検討
 研究課題名 (英文) Identification of quantitative trait loci for diabetic nephropathy in KK-A^y/Ta mice
 研究代表者
 富野 康日己 (TOMINO YASUHIKO)
 順天堂大学・医学部・教授
 研究者番号： 60130077

研究成果の概要 (和文)： 今回の研究では、KK-A^yマウスを用いて QTL 解析を行い、2 型糖尿病関連疾患感受性遺伝子座を同定することを目的とした。(KK-A^y×BALB/c) F2 intercross マウスを 270 匹作製しマイクロサテライトマーカーを用いて遺伝子型を決定し、QTL 解析を行った。20 週齢の ACR に関連した遺伝子座は染色体 9 番にみられ、suggestive な連鎖が認められた。8・20 週齢の HbA1c に関連した遺伝子座は染色体 7 番に significant な連鎖を認めた。ACR に関与する遺伝子座と HbA1c を規定する遺伝子座は異なった染色体にあるが、両者は相補的に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要 (英文)： We studied candidate gene loci for diabetic nephropathy using quantitative trait locus (QTL) analysis of KK-A^y/Ta × BALB/cA F2 intercross mice. We examined 270 (KK-A^y/Ta × BALB/cA) F2 intercross mice. Genotypes were investigated using microsatellite markers with QTL analysis. ACR in mice at 20 weeks and ACR gain showed a suggestive linkage to chromosome 9. Gene loci contributing to HbA1c indicated a significant linkage to chromosome 7 at 8 and 12 weeks (designed Fbw-1). QTL analysis of KK-A^y/Ta mice revealed several new loci contributing to diabetic nephropathy and related phenotypes. Thus, it appears that type 2 diabetes and nephropathy of KK-A^y/Ta mice have different genetic factors.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野:医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：糖尿病腎症、KK-A^y/Ta マウス、QTL、ACR、HbA1c

1. 研究開始当初の背景

現在世界の糖尿病人口は 2 億 5000 万人に及び、2025 年には 3 億 8000 万人に達するといわれており、その半数近くがアジアに集中している。日本の糖尿病患者数は現在増加傾向

(約 800 万人) にあり、成人の 10 人に 1 人が糖尿病に罹患しているといわれている。また、糖尿病予備群を含めるとその数は 1400 万人にも及ぶ。これら患者が大血管障害 (脳梗塞、心筋梗塞) や細小血管障害 (腎症、神

経症、網膜症)など糖尿病関連疾患を併発する可能性がある。糖尿病関連疾患は、多様な対症療法が必要となるため医療費を増大させる原因にもなっている。生活習慣や食習慣が欧米化している現在では、その患者数は更に増加すると予想される。2型糖尿病に対する予防は勧められているが、糖尿病関連疾患患者の治療の確立も急務である。そのなかでも糖尿病腎症は、1998年より透析導入原因疾患の第1位となっており、その数は増加の一途を辿り2006年では43%が糖尿病性腎症による透析導入であった。慢性糸球体腎炎が減少傾向を示しているのに対し、糖尿病腎症は年々増加している。透析患者の予後や医療費負担を考えると、透析への移行を遅らせることは重要な課題といえる。一般に2型糖尿病の発症には、環境因子に加え遺伝的因子の関与も重要であると考えられている。近年、アジア人の糖尿病患者数が急増しており、これには遺伝的要因も起因している。アジア人は欧米人に比べ痩せており、遺伝的に2型糖尿病を発症しやすいと言われている。また腎症発症や重症度は、黒人の方が白人より約3~6倍高いとされており(Lancet 52:213-219,1998)、男性の方が女性より罹患しやすいという報告も多くされている(Kidney Int 55:1582-1596,1999)。さらに疫学的な知見より、遺伝素因が糖尿病腎症の病因において重要な役割を果たすため、腎症の発症と進展に関係する遺伝子を特定するために様々な研究が行われている。しかし、その詳細な機構は十分には解明されておらず、ヒト糖尿病腎症に対する疾患感受性遺伝子の同定には至っていない。ヒトは遺伝的に不均一であるため、その責任遺伝子座の同定は困難である。一方、動物モデルは短期間に多量のサンプルを収集でき、遺伝的にも均一であるため多因子疾患の遺伝的解析には極めて有用である。

糖尿病モデルとして日本で確立された近交系マウスであるKKマウスは、インスリンに対する末梢組織の非感受性の影響により、軽度の肥満やNIDDMを呈することが知られている。これまでに我々は、KKマウスとコントロールマウスであるBALB/cマウスを用いて、糖尿病関連疾患感受性遺伝子座をQTL解析によって明らかにした。その結果、尿中アルブミン値を量的形質とした場合に染色体2番のテロメア側に責任遺伝子座を同定しUA-1領域と命名した(LOD 3.5)。

2. 研究の目的

今回の研究では、KKマウスに黄色肥満遺伝子であるAy遺伝子を導入した2型糖尿病モデルマウスであるKK-Ayマウスを用いた。KK-Ayマウスは、KKマウスに比べより重度の糖尿病を呈し、組織学的にもヒト2型糖尿

病腎症モデルとして有用であることを報告した。このようにKK-Ayマウスは他の2型糖尿病モデルマウスと比較し糖尿病や糖尿病腎症の病態を顕著に発現するので、表現型の差が生じやすいと考えられる。Sutoらの方法を応用し、KK-AyマウスとBALB/cマウスを交配させF2 intercrossを作成し量的形質座位(QTL) mappingを行うことで、腎症の候補遺伝子座について正確なmapping結果が得られることが予想される。現在、ヒトではSNPを用いたゲノムワイドな遺伝子解析が行われているが、マウスではすでに全ゲノムにわたり、遺伝解析が行われているため、データが蓄積されている多型の高いマイクロサテライトマーカーを用いSNPと比較することにより、安価で簡易に同様の結果を得ることが可能となる。

3. 研究の方法

近交系マウスであるKK-Ayマウスの雄性とBALB/cマウスの雌性を日本クレア(東京)から購入した。田辺三菱製薬の動物施設で、BALB/cマウスの雌性とKK-Ayマウスの雄性を交配しF1マウスを作製した。体毛色によりA:wild, Ay:yellow, B:black, C:albinoと分類するとKK-Ayマウスの遺伝子型はAyaBBCc、BALB/cマウスの遺伝子型はAAbbcc、F1マウスの遺伝子型はAyABbCcとなる。cc遺伝子をもつマウスは体毛が白色を呈し、Ay遺伝子をもつマウスは黄色となる。体毛色が黄色のF1(AyaBBCc)マウス同士を交配し、F2マウスを作製した。毛色がalbinoのマウスはAyアレルをもつか否か判らないので、albinoのF2マウスは除外した。最終的にF2マウスは、F2 aaマウス(黒い毛色)とF2 Ayaマウス(黄色い毛色)に分類された。170匹のF2 aaマウス(70匹の雄性と100匹の雌性)と100匹のF2 Ayaマウス(50匹の雄性と50匹の雌性)を解析した。全てのマウスは出生後4週齢で親と引き離し、個別のケージで飼育した。マウスは、温度と湿度が制御され12時間毎のライトによる規則的な日中・夜間の調整を行った特定病原体未感染(SPF)施設で管理した。さらにマウスは、餌[マウス用固形食CE-2(342.2kcal/100g、4.4%粗脂肪を含む)、日本クレア]と水を自由に摂取できる環境で飼育した。

生後8・12・16・20週齢に尿中アルブミン/クレアチニン比(ACR)、ヘモグロビンA1c(HbA1c)、空腹時体重、血圧を測定した。血圧はマウスを38°C、10分間保温した後、午前11時00分にマウスの尾部より非観血的な方法で行った(Ueda fac, UR-5000, Narita, Japan)。1度の血圧測定に際し、3~6回の記録をとり平均化したものを用いた。ACRは免疫比濁法を用いて測定した(DCA 2000 system, Bayer Diagnostics, USA)。HbA1cは、マウス

後眼窩静脈叢より採取した血液を DCA 2000 system を用いたイムノアッセイにより測定した。

ゲノム DNA は、フェノール/クロロホルム抽出法を用いた標準プロトコールに従ってマウス尾部から分離され、性染色体と染色体 2 番を除いた合計 86 個のマイクロサテライトマーカーを用いて、全ての F2 マウスでの遺伝子型を決定した。2 番染色体は、Ay 遺伝子が染色体 2 番上に存在し、分離比のゆがみを生じさせるため除外した。PCR 用プライマーは、Research Genetics (Huntsville, AL) から購入し、マイクロサテライト配列長多型を、PCR 後の電気泳動によって確認した。増幅は 3 種の温度 (94°C、58°C、72°C) 下で、PTC-200 DNA Engine Cycler (Bio-Rad Laboratories, California, USA) を使用し 45 サイクル行った。PCR 産物は約 240 分かけて 12% ポリアクリルアミドゲル上で電気泳動し、臭化エチジウム染色によって視覚化した。

F2 マウスは Ay アレルの有無によって、F2 aa 群と F2 Aya 群に分類した。全てのデータは平均値±標準誤差で表現した。連鎖解析は Manly) によって報告された Map Manager QT プログラムを使用し、量的形質座位 (QTL) 解析を aa マウスと Aya マウスそれぞれで行った。また、Lander と Kruglyak) の方法を用いて、QTL の位置を推定するために尤度比統計量を Map Manager QT プログラムと LOD スコアによって計算した。LOD スコア 2.8 を suggestive linkage、4.3 と定義した。F2 aa と F2 Aya マウスで最大 LOD スコアを認めた QTL 領域に最も近いマーカーの遺伝子型に基づき、各マウスを KK-A^y アレルのホモ接合体 (KK)、BALB/c アレルのホモ接合体 (BB)、KK-A^y と BALB/c アレルのヘテロ接合体 (KB) の 3 つの群に分類した。各形質について、分散分析 (ANOVA) を行い、P<0.05 を統計学的有意差ありとした。

4. 研究成果

今回の研究で我々は KK-A^y マウスの ACR の進展の一因となる感受性遺伝子座を D9Mit66 領域に同定し、ACR-1 と名づけた。ACR-1 は、HbA1c と空腹時体重の感受性遺伝子とは異なった位置に確認された。

Aya 群でも QTL 解析を行ったが、significant linkage を呈する LOD は認められなかった。これは、Ay 遺伝子は優性遺伝子であり分離比を乱し、他の染色体への影響が強いためと思われる。

F2 マウスの結果より、ACR-1 に B アレルをホモにもつ個体は KB のヘテロ、K アレルをホモにもつ個体より有意に ACR 値が高かった。また、ACR-1 に BB アレルをもつものは他のものに比べ腎組織の GB 比が明らかに上昇していた。このことから、ACR-1 には、アルブ

ミン尿を規定する遺伝子が存在する可能性がある。△ACR においても同部位で suggestive linkage を呈したことより、この領域は腎症の発症よりむしろ進展に関与している可能性が考えられる。現在までの研究で、ヒトのアルブミン尿に関与すると考えられる遺伝子座は染色体 5q・7・8・16・17・18・19・22q 上で確認されている。しかし、いずれの結果も本研究のものとは一致しなかった。各アレル間 (KK, BB, KB) で ACR-1 領域での血圧に差はなく、体重とアルブミン尿の相関もみられなかったことから、ACR-1 は血圧や体重とは独立した糖尿病腎症疾患感受性遺伝子座である可能性が考えられる。ヒトと同様に ACR30mg/gCr を基準とすると、D9Mit66 に B アレルをホモにもつだけでは糖尿病腎症は発症せず、D7Mit100 に K アレルをホモにもつことで初めて糖尿病腎症を発症することより、HbA1c-1 は糖尿病腎症発症に関与し、ACR-1 と HbA1c-1 は相補的に働いていると考えられる。ACR-1 はヒト染色体 11q23.3 に一致し、近傍の既知遺伝子として ETS1 遺伝子 E26 transformation-specific sequence (ETS1)、Fli1 遺伝子 friend leukemia integration site 1 (Fli1) などが存在する。

ETS-1 は内皮細胞や悪性細胞の侵入および血管新生反応を制御し、胚発育において重要な役割を果たす。ETS-1 の腎臓での発現は、糸球体腎炎モデル動物の腎臓で強い発現を示し、*in vitro* でも報告がある。

Fli1 は血管形成、骨髄巨核球の分化、細胞周期とアポトーシスの調節に関与することが知られている。Fli1 は癌遺伝子としても有名で、胚発育において複数の役割がある。さらに Fli1 は自己免疫性腎疾患発症の一因となったり、腎臓での免疫複合体沈着に関与しているという報告もある。このように ETS1, Fli1 は腎臓で様々な報告があるが、糖尿病腎症での報告はない。このことから、ACR-1 はアルブミン尿規定因子であり、糖尿病腎症に特化したものではなく、腎炎などの各種腎疾患の蛋白尿出現にも関与している可能性が考えられる。糖尿病は多因子遺伝疾患であり、糖尿病腎症も同様に多因子遺伝疾患であるため複数の遺伝子が関与しており、ACR-1, HbA1c-1 などの遺伝子座はその一部と考えられる。これら複数の遺伝子が複雑に絡みあって糖尿病腎症を発症することが予想される。

HbA1c-1 では D7Mit100 領域で LOD 5.8, 8.9 と高く、8・20 週で significant linkage を示し、膵島細胞のサイズの大きさにも関係していた。HbA1c-1 はヒトでは 11p15 に相当し、近傍の既知遺伝子として Phosphodiesterase 3B (PDE3B)、Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) が存在する。PDE 族の 1 つである PDE3B

は、脂肪分解やインスリン分泌調整のような種々の代謝過程に重要な影響を及ぼす。血清遊離脂肪酸(FFA)の上昇がインスリン抵抗性を生じさせることは知られているが、PDE3Bの活性化によりFFAの産生低下が確認された。PI3Kは骨格筋と脂肪組織のブドウ糖輸送を調整し、PI3KやAkt/PKB、ERKの活性は、2型糖尿病モデルであるdB/dBマウスの腎皮質で上昇するとされる。このように、HbA1c-1はPDE3B、PI3Kなどの糖代謝に関与する酵素に関連し、糖尿病を呈した可能性が考えられる。さらに、ACR-1とともに働いて糖尿病腎症発症の引き金となっている可能性も示唆される。

Fbw-1では8・12週齢でのLODがそれぞれ5.5、5.2とsignificant linkageを示した。Fbw-1はヒトでは1q25に相当し、近傍の既知遺伝子としてsterol 0-acyltransferase (acyl-CoA: cholesterol acyltransferase, ACAT) 1(Soat1)(Acat1)、LIM homeobox transcription factor 4(LHX4)がある。Soat1はコレステロールと脂肪アシルCoAからコレステロールエステルの形成を触媒する細胞内酵素である。LHX4はLIM-homeodomain (LIM-HD) 転写因子の1つであり、下垂体や神経系の発達に重要な役割を果たし、LHX4を標的突然変異させたホモ接合マウスは、出産後すぐに死亡した。近年では、LHX4遺伝子はヒト複合型下垂体機能低下症(CPHD)の原因として知られ、成長ホルモンやその他5つの下垂体前葉ホルモンの産生障害をきたし、低身長、思春期の遅延、下垂体前葉形成不全に至ることが明らかにされた。このように成長や代謝に関わるホルモンの分泌量やバランスに影響を及ぼし、体重に差がでた可能性がある。本研究から糖尿病腎症の疾患感受性遺伝子座がACR-1、HbA1c-1に存在し、空腹時体重に関与する遺伝子座がFbw-1に存在する可能性が考えられた。染色体9番上のACR-1(D9Mit100)のBBアレルはACR値を上昇させ、染色体7番上のHbA1c-1(D7Mit100)と1番上のFbw-1(D1Mit14)のKKアレルはそれぞれHbA1cと空腹時体重値を上昇させるように働くことが示された。

今後、ACR-1、HbA1c-1のコンジェニックマウスを作製しACR-1、HbA1c-1にQTLが存在するの否かを確認するとともに、QTLの染色体上の位置を正確に決定し、均一な遺伝的背景下における表現型効果を明らかにする必要がある。さらに、ヒトにおける対応した染色体領域の遺伝的解析や確認された遺伝子座に存在する候補遺伝子の検索により、ヒト糖尿病腎症に関与したより完全な遺伝要因の見解を獲得することが可能となる。このような解析を基盤として、予防や遺伝子治療などの臨床的アプローチが行われることが期待される。

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2件)

青木竜弥、富野康日己、順天堂医学、査読有、56巻、2010、107-115

青木竜弥、富野康日己、Journal of Nephrology 査読有、25巻、2011、127-136

[学会発表] (計3件)

青木竜弥、富野康日己、第53回日本腎臓学会、2型糖尿病腎症モデルマウスを用いた腎症疾患感受性遺伝子座の検討、2009年6月9日パシフィコ横浜(横浜)

青木竜弥、富野康日己、第42回米国腎臓学会議、Identification of quantitative trait loci for diabetic nephropathy in KK-Ay/Ta mice

2009年10月27日、サンディエゴ(米国)

青木竜弥、富野康日己、第12回アジア太平洋腎臓学会議、Identification of quantitative trait loci for diabetic nephropathy in KK-Ay/Ta mice、2010年6月5日、ソウル(韓国)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

富野 康日己(TOMINO YASUHIKO)

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号：60130077

(2) 研究分担者

合田 朋仁(GODA TOMOHITO)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号 20365604

谷本 光生(TSNIMOTO MITUO)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号

00420836

萩原 晋二(HAGIWARA SINJI)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号 70445568