

特集：糖尿病性腎症

糖尿病性腎症疾患感受性遺伝子はどこまで 解明されたか

前田 士郎

はじめに

1型糖尿病患者における疫学研究では、ほとんどすべての糖尿病患者がいずれ網膜症を発症するのに対し、腎症が進行するのは全糖尿病患者の30~40%程度にとどまるとされている¹⁾。また、糖尿病性腎症の家族内集積が1型糖尿病²⁾、2型糖尿病³⁾いずれにおいても認められることから、糖尿病性腎症の発症進展には遺伝因子の関与が強く示唆されている。すでに知られている病因論に基づく候補遺伝子解析により、いくつかの遺伝子が糖尿病性腎症の疾患感受性に関わることが報告されているが、個々の候補遺伝子に注目すると結果は必ずしも一定ではない。一方、ヒトゲノム研究の進歩は目覚ましく、配列⁴⁾、1塩基多型(single nucleotide polymorphisms: SNPs)⁵⁾、ハプロタイプ地図⁶⁾の情報が次々と整備され、全ゲノムを標的とした網羅的疾患関連遺伝子研究に現在注目が集まっている。実際に最近、欧米の複数の施設から2型糖尿病に関する大規模な全ゲノム解析の結果が発表され⁷⁻¹¹⁾、疾患関連遺伝子研究は大きな転機を迎えたと言える。糖尿病性腎症に関して、大規模な研究によりいずれ確定的な結論が得られるものと考えられるが、本稿では、糖尿病性腎症疾患感受性遺伝子研究の現状をわれわれの行っているゲノムワイドアプローチを中心に概説するとともに、前述の欧米から発信された2型糖尿病に関する全ゲノム解析の結果についても簡単に紹介する。

糖尿病性腎症疾患感受性遺伝子の現状

現在までに多くの施設で候補遺伝子解析、連鎖解析が行われている。主なものを図に列挙するが、数千人の規模で評価できているのはACE遺伝子多型のみであり、その他については大規模な解析により結論を得ることが必要である。

1. ACE 遺伝子多型と糖尿病性腎症

ACE 遺伝子のイントロン16に存在する挿入欠失(insertion/deletion: I/D)多型は血中ACE活性¹²⁾や組織内ACE発現と関連すると報告されており¹³⁾、これらの報告では、D対立遺伝子をもつ症例でACEの発現や血中ACE活性が高いとされている。糖尿病性腎症(以下、腎症)に関しても、1型糖尿病患者^{14,15)}、2型糖尿病患者ともにD対立遺伝子と腎症の発症進展との関連が報告されている¹⁶⁾。ACE 遺伝子多型に関するメタアナリシスの結果では、I対立遺伝子ホモ接合体症例は1型、2型いずれにおいても疾患感受性が有意に低く、その傾向は特にアジア人での2型糖尿病で顕著であるとされている¹⁷⁾。われわれは、このI/D多型と完全な連鎖不平衡状態にある複数のSNPを同定し、日本人での大規模なケース・コントロール関連解析を行った。その結果、各SNPのDに相当する対立遺伝子頻度がやはり腎症症例で有意に多く認められた¹⁸⁾。したがってD対立遺伝子を持つ症例では、腎組織内ACE発現量が多く腎症疾患感受性に寄与しているものと考えられる。一方、このACE I/D遺伝子多型とACE阻害薬やARBの感受性との関連も検討されている。現時点では、どちらの対立遺伝子を受容性とするかについては一定の見解は得られていないが、D対立遺伝子のホモ接合体症例はACE阻害薬やARBの効果弱いとの報告がある^{19,20)}。また、このI/D多型とアンジオテンシノーゲン、アンジオテンシン1型受容体遺伝子多型を組み合わせる

Recent advances in studies on susceptibility genes in diabetic nephropathy

独立行政法人理化学研究所遺伝子多型研究センター 糖尿病性腎症関連遺伝子研究チーム

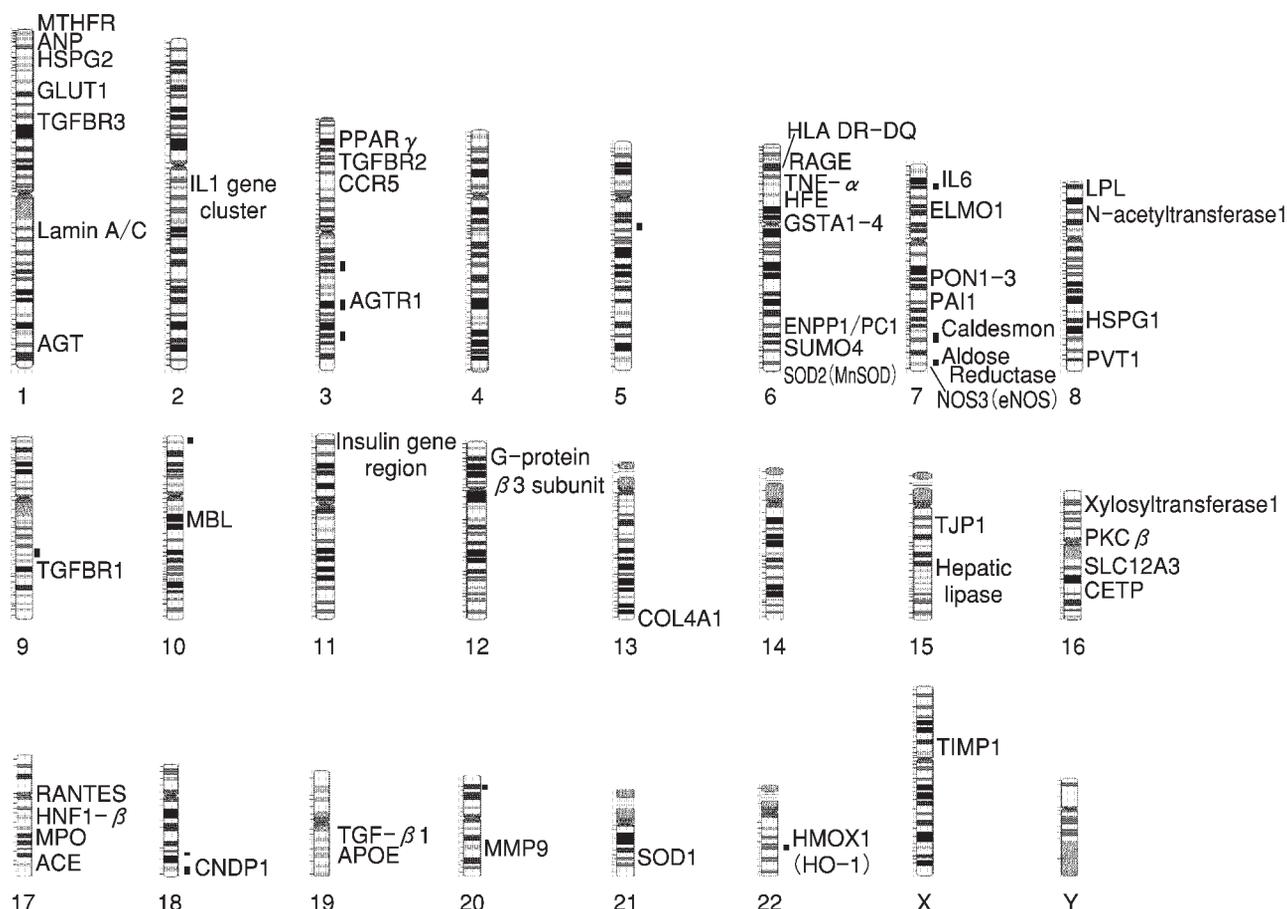


図 糖尿病性腎症疾患感受性候補遺伝子および候補領域 (■連鎖解析により同定されている候補領域)

と、腎症疾患感受性の判定により有用であることが示唆されており^{18,21)}、疾患感受性遺伝子型の保有数が多いほど腎症の危険率が増すとされている¹⁸⁾。

2. ゲノムワイドアプローチによる糖尿病性腎症疾患感受性遺伝子研究

従来行われてきた病因論に基づく候補遺伝子解析では未知の遺伝因子同定は不可能であることから、大規模な網羅的解析を行うことが必要と考えられるようになってきた。

ヒトゲノム配列は1990年頃より開始されたヒトゲノムプロジェクトの完了によりその全容がほぼ明らかとなった⁴⁾。ヒトゲノム上には種々の個人差が存在しており、特に最も多く認められるSNPについて、その情報整備が進められた。SNPは数百塩基対に1カ所認められる。そのため、従来の遺伝マーカーよりも詳細なマッピングが可能であり、真の疾患関連座位に効率良くたどりつくことが可能とされている。わが国においては日本人における遺伝子領域のSNPデータベースの構築が行われ(JSNPデータベース)、約20万カ所のSNP情報が公開されている²²⁾。

高速解析技術の開発も理化学研究所遺伝子多型研究センタータイピング研究支援チームで行われ、インバーダー法という遺伝子型解析技術をマルチプレックスPCR法と組み合わせることに成功し²³⁾、1日55万SNP genotyping以上の解析が可能となっている。現在ではさらに安価な高速タイピング技術が複数開発されているが、われわれは腎症に関して、全世界に先駆けて約8万カ所のSNP座をマルチプレックスPCR-インバーダー法で解析し²⁴⁾、そのなかから、*SLC12A3*²⁵⁾ および *ELMO1*²⁶⁾ 遺伝子を新規の腎症関連遺伝子として同定した。

3. *SLC12A3* (Solute Carrier Family 12 (sodium/chloride) member 3, Thiazide-sensitive sodium-chloride co-transporter)

SLC12A3 遺伝子は腎臓の遠位尿細管に特異的に発現しているサイアザイド感受性Na-Cl共輸送体をコードしており、Gitelman症候群の原因遺伝子として知られている。われわれは、この遺伝子内にアミノ酸置換を伴い腎症との強い関連を認めるSNPを同定した。このアミノ酸置換

表 欧米人における2型糖尿病に関するゲノムワイドケースコントロール相関解析

Population	Subject number (case : control)	SNP number	Replication (case : control)	Identified T2 DM genes
1. French ⁷⁾	694 : 669	392,935	2,617 : 2,894	TCF7L2, SLC30A8, HHEX, LOC387761, EXT2
2. Finish & Swedish ⁸⁾	1,464 : 1,467	386,731	5,065 : 5,785	TCF7L2, CDKN2B, IGF2BP2, KCNJ11, CDKAL1, HHEX
3. UK ⁹⁾	1,924 : 2,938	393,453	3,757 : 5,346	TCF7L2, FTO, CDKAL1, HHEX, CDKN2B, IGF2BP2, SLC30A8
4. Finish ¹⁰⁾ 2-4 combined	1,161 : 1,174	315,635	1,215 : 1,258	TCF7L2, rs9300039, SLC30A8, IGF2BP2 TCF7L2, IGF2BP2, CDKN2A/B, FTO, KCNJ11, CDKAL1, HHEX, SLC30A8, rs9300039, PPARG
5. Iceland ¹¹⁾	1,399 : 5,275	313,179	2437 : 7287 1,457 : 986 (Chinese) 865 : 1,106 (African)	TCF7L2, CDKAL1, SLC30A8

(913Gln)の頻度が腎症症例では少なくなっており、このアミノ酸置換をもつ症例では輸送体機能が低下することにより腎症の発症進展に防御的に作用しているものと推察される^{25,27)}。したがって913Arg保有者では、サイアザイド利尿薬によりこの遺伝子産物の機能を調節することで腎症の発症進展を抑制しうる可能性が考えられる。従来、サイアザイド利尿薬は代謝面への悪影響を懸念して糖尿病症例では敬遠されてきたが、少量をACEIやARBに追加することも推奨されてきている。また最近のALLHATスタディでは、サイアザイド利尿薬のchlorthalidoneが腎症症例などで、腎機能悪化抑制に関してACEIと同等の効果を持つことが示されている²⁸⁾。

4. *ELMO1* (genes involved in engulfment and cell motility 1)

一方、*ELMO1*は第7染色体短腕(7p14.1)に存在し、線虫でアポトーシスに陥った細胞を貪食する際のシグナルを伝えるced-12の哺乳類相同体として同定された遺伝子である。現在まで腎症との関わりは全く報告されていなかったが、われわれはこの*ELMO1*遺伝子内の第18イントロンに存在するSNPと腎症との強い相関を見出した。さらにこの*ELMO1*遺伝子は腎臓では糸球体上皮細胞に比較的特異的に発現しており、糖尿病状態あるいは高糖濃度刺激によりその発現が上昇することを報告した²⁶⁾。同様の*ELMO1*遺伝子発現の上昇は慢性糸球体腎炎モデルラット腎でも認められたことから²⁹⁾、*ELMO1*遺伝子は糖尿病性腎症のみならず、広く腎疾患の病因に関わることが推察された。培養細胞を用いた検討では、*ELMO1*遺伝子が過剰になると1型コラーゲン、フィブロネクチンなどの細胞外基質蛋白遺伝子の発現は増加し、逆に*ELMO1*遺伝子が減少すると、細胞外基質蛋白遺伝子の発現は低下したこと

から、糸球体における*ELMO1*遺伝子の増加は細胞外基質過剰蓄積の一因となることが示唆された。さらに興味深いことに、*ELMO1*過剰発現細胞では細胞接着能が著明に低下しており、*ELMO1*の糸球体上皮細胞での増加はその糸球体係蹄からの脱落、いわゆるpodocyte lossの誘因となり、蛋白尿出現など腎症の発症進展に関与することが示唆された²⁹⁾。遺伝子型による*ELMO1*遺伝子の発現あるいは機能との関連ははまだ明らかではないが、疾患感受性対立遺伝子をもつ症例では*ELMO1*遺伝子の発現が増加している、あるいは作用が増強しているものと推察され、その作用を抑制するような薬剤探索により、腎症の新たな治療法の開発に結びつくものと考えられる。

2型糖尿病に関する全ゲノム解析研究

最近、欧米の複数のグループにより2型糖尿病に関する全ゲノム解析の結果が報告された(表)⁷⁻¹¹⁾。いずれも1,000~2,000人ずつの2型糖尿病症例とコントロール症例で30万カ所以上のSNP座を解析するという、過去には考えられないスケールの解析で、得られた結果もある程度の一致をみており示唆に富む報告と考えられる。疾患感受性遺伝子は人種により異なることが予想されるが、日本人における糖尿病あるいは糖尿病性腎症疾患感受性遺伝子同定にも同様のアプローチが有用であることは疑いがなく、また、今まで報告された候補遺伝子に関しても、われわれの報告した*SLC12A3*、*ELMO1*も含め、数千~数万人規模の解析により結論を得るべきと考えられる。

おわりに

国際ハップマッププロジェクトが2005年10月に完了し⁶⁾, その後もデータは更新され, 現時点では580万カ所以上のSNP情報が公開されている(<http://www.hapmap.org/index.html.ja>)。現在, この情報基盤を基に大規模な疾患関連遺伝子研究が開始されている。個々の遺伝因子の同定は容易ではないと考えられてきたが, ゲノムワイドなアプローチがさらに加速されることで, すべての遺伝因子同定が達成される日もそれほど遠いことではないと思われる。しかしながら, ゲノムワイドな遺伝学的アプローチといたった網羅的解析は未知の因子同定には魅力的であるが, 反面, 多くの偽陽性, 偽陰性が発生する。したがって, 一つ一つの因子に関する詳細な検証および機能解析が不可欠である。今後もこれら体系的アプローチの改良・発展により, さらに疾患感受性遺伝子研究が加速し, 新たな予防法・治療法開発への応用がなされることが期待される。

文献

1. Krolewski AS, Warram JH, Rand LI, Kahn CR. Epidemiologic approach to the etiology of type 1 diabetes mellitus and its complications. *N Engl J Med* 1987 ; 317 : 1390-1398.
2. Quinn M, Angelico MC, Warram JH, Krolewski AS. Familial factors determine the development of diabetic nephropathy in patients with IDDM. *Diabetologia* 1996 ; 39 : 940-945.
3. Pettitt DJ, Saad MF, Bennett PH, Nelson RG, Knowler WC. Familial predisposition to renal disease in two generations of Pima Indians with type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* 1990 ; 33 : 438-443.
4. International Human Genome Sequencing Consortium. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 2004 ; 431 : 931-945.
5. The International SNP Map Working Group. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature* 2001 ; 409 : 928-933.
6. The International HapMap Consortium. A haplotype map of the human genome. *Nature* 2005 ; 437 : 1299-1320
7. Sladek R, Rocheleau G, Rung J, Dina C, Shen L, Serre D, Boutin P, Vincent D, Belisle A, Hadjadj S, Balkau B, Heude B, Charpentier G, Hudson TJ, Montpetit A, Pshzhetsky AV, Prentki M, Posner BI, Balding DJ, Meyre D, Polychronakos C, Froguel P. A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes. *Nature* 2007 22 ; 445 : 881-885.
8. Saxena R, Voight BF, Lyssenko V, Burt NP, de Bakker PI, Chen H, Roix JJ, Kathiresan S, Hirschhorn JN, Daly MJ, Hughes TE, Groop L, Altshuler D, Almgren P, Florez JC, Meyer J, Ardlie K, Bengtsson K, Isomaa B, Lettre G, Lindblad U, Lyon HN, Melander O, Newton-Cheh C, Nilsson P, Orho-Melander M, Rastam L, Sneliotes EK, Taskinen MR, Tuomi T, Guiducci C, Berglund A, Carlson J, Gianniny L, Hackett R, Hall L, Holmkvist J, Laurila E, Sjogren M, Sterner M, Surti A, Svensson M, Svensson M, Tewhey R, Blumenstiel B, Parkin M, Defelice M, Barry R, Brodeur W, Camarata J, Chia N, Fava M, Gibbons J, Handsaker B, Healy C, Nguyen K, Gates C, Sougnez C, Gage D, Nizzari M, Gabriel SB, Chirn GW, Ma Q, Parikh H, Richardson D, Ricke D, Purcell S. Genome-Wide Association Analysis Identifies Loci for Type 2 Diabetes and Triglyceride Levels. *Science* 2007 Apr 26 ; [Epub ahead of print]
9. Zeggini E, Weedon MN, Lindgren CM, Frayling TM, Elliott KS, Lango H, Timpson NJ, Perry JR, Rayner NW, Freathy RM, Barrett JC, Shields B, Morris AP, Ellard S, Groves CJ, Harries LW, Marchini JL, Owen KR, Knight B, Cardon LR, Walker M, Hitman GA, Morris AD, Doney AS, McCarthy MI, Hattersley AT. Replication of Genome-Wide Association Signals in U. K. Samples Reveals Risk Loci for Type 2 Diabetes. *Science* 2007 Apr 26 ; [Epub ahead of print]
10. Scott LJ, Mohlke KL, Bonnycastle LL, Willer CJ, Li Y, Duren WL, Erdos MR, Stringham HM, Chines PS, Jackson AU, Prokunina-Olsson L, Ding CJ, Swift AJ, Narisu N, Hu T, Pruim R, Xiao R, Li XY, Conneely KN, Riebow NL, Sprau AG, Tong M, White PP, Hetrick KN, Barnhart MW, Bark CW, Goldstein JL, Watkins L, Xiang F, Saramies J, Buchanan TA, Watanabe RM, Valle TT, Kinnunen L, Abecasis GR, Pugh EW, Doheny KF, Bergman RN, Tuomilehto J, Collins FS, Boehnke M. A Genome-Wide Association Study of Type 2 Diabetes in Finns Detects Multiple Susceptibility Variants. *Science* 2007 Apr 26 ; [Epub ahead of print]
11. Steinthorsdottir V, Thorleifsson G, Reynisdottir I, Benediktsson R, Jonsdottir T, Walters GB, Styrkarsdottir U, Gretarsdottir S, Emilsson V, Ghosh S, Baker A, Snorraddottir S, Bjarnason H, Ng MC, Hansen T, Bagger Y, Wilensky RL, Reilly MP, Adeyemo A, Chen Y, Zhou J, Gudnason V, Chen G, Huang H, Lashley K, Doumatey A, So WY, Ma RC, Andersen G, Borch-Johnsen K, Jorgensen T, van Vliet-Ostaptchouk JV, Hofker MH, Wijmenga C, Christiansen C, Rader DJ, Rotimi C, Gurney M, Chan JC, Pedersen O, Sigurdsson G, Gulcher JR, Thorsteinsdottir U, Kong A, Stefansson K. A variant in CDKAL1 influences insulin response and risk of type 2 diabetes. *Nat Genet* 2007 Apr 26 ; [Epub ahead of print]
12. Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F, Cambien F, Corvol P, Soubrier F. An insertion/deletion polymorphism in the

- angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *J Clin Invest* 1990 ; 86 : 1343-1346.
13. Mizuiri S, Hemmi H, Kumanomidou H, Iwamoto M, Miyagi M, Sakai K, Aikawa A, Ohara T, Yamada K, Shimatake H, Hasegawa A. Angiotensin-converting enzyme (ACE)I/D genotype and renal ACE gene expression. *Kidney Int* 2001 ; 60 : 1124-1130.
 14. Marre M, Jeunemaitre X, Gallois Y, Rodier M, Chatellier G, Sert C, Dusselier L, Kahal Z, Chaillous L, Halimi S, Muller A, Sackmann H, Bauduceau B, Bled F, Passa P, Alhenc-Gelas F. Contribution of genetic polymorphism in the renin-angiotensin system to the development of renal complications in insulin-dependent diabetes. *J Clin Invest* 1997 ; 99 : 1585-1595.
 15. Hadjadj S, Belloum R, Bouhanick B, Hadjadj S, Belloum R, Bouhanick B. Prognostic value of angiotensin- I converting enzyme I/D polymorphism for nephropathy in type 1 diabetes mellitus : A prospective study. *J Am Soc Nephrol* 2001 ; 12 : 541-549.
 16. Parving HH, Tarnow L, Rossing P. Genetics of diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 1996 ; 7 : 2509-2517.
 17. Ng DP, Tai BC, Koh D, Chia KS. Angiotensin- I converting enzyme insertion/deletion polymorphism and its association with diabetic nephropathy : a meta-analysis of studies reported between 1994 and 2004 and comprising 14,727 subjects. *Diabetologia* 2005 ; 48 : 1008-1016.
 18. Osawa N, Koya D, Araki S, Uzu T, Tsunoda T, Kashiwagi A, Nakamura Y, Maeda S. Combinational effect of genes for the renin-angiotensin system in conferring susceptibility to diabetic nephropathy. *J Hum Genet* 2007 ; 52 : 143-151.
 19. So WY, Ma RC, Ozaki R, Tong PC, Ng MC, Ho CS, Lam CW, Chow CC, Chan WB, Kong AP, Chan JC. Angiotensin-converting enzyme(ACE)inhibition in type 2 diabetic patients : interaction with ACE insertion/deletion polymorphism. *Kidney Int* 2006 ; 69 : 1438-1443.
 20. Jacobsen PK, Tarnow L, Parving HH. Time to consider ACE insertion/deletion genotypes and individual renoprotective treatment in diabetic nephropathy? *Kidney Int* 2006 ; 69 : 1293-1295.
 21. Jacobsen PK, Tarnow L, Carstensen B, Hovind P, Poirier O, Parving HH. Genetic variation in the renin-angiotensin system and progression of diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2003 ; 14 : 2843-2850.
 22. Haga H, Yamada R, Ohnishi Y, Nakamura Y, Tanaka T. Gene-based SNP discovery as part of the Japanese Millennium Genome Project : identification of 190,562 genetic variations in the human genome. *J Hum Genet* 2002 ; 47 : 605-610.
 23. Ohnishi Y, Tanaka T, Ozaki K, Yamada R, Suzuki H, Nakamura Y. A high-throughput SNP typing system for genome-wide association studies. *J Hum Genet* 2001 ; 46 : 471-477.
 24. Maeda S. Genome-wide search for susceptibility gene to diabetic nephropathy by gene-based SNP. *Diabetes Res Clin Pract* 2004 ; 66(Suppl 1) : S45-S47.
 25. Tanaka N, Babazono T, Saito S, Sekine A, Tsunoda T, Haneda M, Tanaka Y, Fujioka T, Kaku K, Kawamori R, Kikkawa R, Iwamoto Y, Nakamura Y, Maeda S. Association of solute carrier family 12(sodium/chloride)member 3 with diabetic nephropathy, identified by genome-wide analyses of single nucleotide polymorphisms. *Diabetes* 2003 ; 52 : 2848-2853.
 26. Shimazaki A, Kawamura Y, Kanazawa A, Sekine A, Saito S, Tsunoda T, Koya D, Babazono T, Tanaka Y, Matsuda M, Kawai K, Iizumi T, Imanishi M, Shinosaki T, Yanagimoto T, Ikeda M, Omachi S, Kashiwagi A, Kaku K, Iwamoto Y, Kawamori R, Kikkawa R, Nakajima M, Nakamura Y, Maeda S. Genetic variations in the gene encoding engulfment and cell motility 1(ELMO1)are associated with susceptibility to diabetic nephropathy. *Diabetes* 2005 ; 54 : 1171-1178.
 27. Nishiyama K, Tanaka Y, Nakajima K, Mokubo A, Atsumi Y, Matsuoka K, Watada H, Hirose T, Nomiyama T, Maeda S, Kawamori R. Solute carrier family 12(sodium/chloride transporters)member 3, SLC12A3, is associated with diabetic nephropathy in Japanese patients with type 2 diabetes : A 10-year longitudinal study. *Diabetologia* 2005 ; 48 : 1335-1338.
 28. Rahman M, Pressel S, Davis BR, Nwachuku C, Wright JT Jr, Whelton PK, Barzilay J, Batuman V, Eckfeldt JH, Farber M, Henriquez M, Kopyt N, Louis GT, Saklayen M, Stanford C, Walworth C, Ward H, Wiegmann T. Renal outcomes in high-risk hypertensive patients with an angiotensin-converting enzyme inhibitor or a calcium channel blocker vs a diuretic : a report from the antihypertensive and lipid-lowering treatment to prevent heart attack trial(ALLHAT). *Arch Intern Med* 2005 ; 165 : 936-946.
 29. Shimazaki A, Tanaka Y, Shinosaki T, Ikeda M, Watada H, Hirose T, Kawamori R, Maeda S. ELMO1 increases expression of extracellular matrix(ECM)proteins and inhibits cell adhesion to ECMS. *Kidney Int* 2006 ; 70 : 1769-1776.