2. II型糖尿病ラット (OLETF) の糖尿病原因遺伝子座の 染色体マッピング (QTL) 解析

松 本 耕 三

徳島大学医学部 動物実験施設

Chromosomal Mapping of Type 2 Diabetes Using QTL Analysis in the OLETF Rat

Kozo MATSUMOTO

Institute for Animal Experimentation, University of Tokushima School of Medicine

Summary

The Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rat is the best model for human non-insulin dependent diabetes mellitus (NIDDM) with mild obese body. OLETF rats display spontaneous diabetes with polyuria, and polydipsia at the age of approx. 20 weeks. The cross between OLETF×F344 intercrosses was conducted in a SPF barrier colony. The oral glucose tolerance test (OGTT) was performed at the age of 30 weeks old. To analyze F₂ progeny, approx. 100 polymorphic microsatellite markers were used, and then DNA fragments were amplified by the PCR techniques. Linkage analysis was performed using the MAPMAKER/QTL computer program. Linkage studies have led to the localization of four loci, *Nidd/of1*, *Nidd/of2*, *Nidd/of3*, and *Nidd/of4*, that contribute significantly to blood glucose variation by OGTT in F₂ population (lod score > 3). *Nidd/of1* affected postprandial hyperglycemia, whereas *Nidd/of2*, *Nidd/of3*, and *Nidd/of4*, affected fasting hyperglycemia. Also we identify one major locus *bw/of1* affecting body weight on an autosomal chromosome. The localizations of the loci are different from those of GK rat which is well known as animal model of non-obese type NIDDM. Our study concludes that NIDDM is divided into at least two categories with the different pathogenesis controlled by two independent gene clusters. From these results, we may propose that the distinct pathogenesis of NIDDM between OLETF and GK rats reflects the presence or absence of obesity.

緒 言

ヒト成人型糖尿病 (II型糖尿病) [Non insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM)] は、世界人口の数パーセントにも達する広範囲にわたる病気である。II型糖尿病発症には環境要因 (運動や食事等) が大きいことは確かであるが、家系調査などから遺伝要因が非常に大きいことが示されていた。しかしながらいくつかのごく少数の遺伝性 II型糖尿病を除けば、大部分の II型糖尿病に関する遺伝子はまったく分かっていない。実際、糖尿病には多くの要因が関与しており、ヒトの一般的な糖尿病の原因をつきとめるのは不可能に近い。これらのことからヒトと同様の II型糖尿病を発症する近交系動物、特に糖尿病発症モデル動物

における糖尿病遺伝子の研究はヒトの糖尿病遺伝子を研究する上でかかせない手段と考えられる。本研究はこれらのことにかんがみ、ヒト肥満性糖尿病モデルとして最適と考えられている肥満型糖尿病ラット、OLETFを用い、その糖尿病原因遺伝子の染色体マッピングを全染色体にわたって調べることを目的としたものである。この解析のためにはQTL解析が必須である。本研究を通して実に5つの遺伝子がII型糖尿病発症に関与することが判明した。そのうち2つの遺伝子座 (*Nidd/of1* と *Nidd/of2*) は糖負荷後の血糖値の調節に関わっていた。他の2つの遺伝子座 (*Nidd/of3* と *Nidd/of4*) は絶食後、即ち空腹時血糖値の調節に関わっていることが判明し、それらはいず

れも異なる常染色体上にマッピングされた。さらに体重調節に関与している遺伝子座 (*bw/of1*) も見出され、この *bw/of* が OLETF ラットの肥満に関与しているものと思われた。今回見出された遺伝子座はやせ型糖尿病モデルである GK ラットで見出されているものとは全く異なる染色体分布を示しており^{1,2)}、II 型糖尿病を研究する上で新たな局面をむかえるにいった。

なお、本研究の主体は当研究室の大学院生である Daniel Moralejo, Suwen Wei, Kaichun Wei 君らによってなされたものである。また、遺伝解析用の F₂ ラットの肝臓ならびにその血糖値に関しては大塚製薬の河野、平島両氏により分与されたものである。したがって、本研究は大塚製薬との共同研究である。

実験材料

1) 動物

(OLETF×F344)F₂ ラット 30 週齢の空腹時血糖ならびに糖負荷後 30, 60, 90, 120 分の各時点における血糖値、かつ体重を測定した結果、ならびに F₂ ラットの肝臓を大塚製薬の河野、平島両氏より分与していただいた。ここに深謝する。

2) 遺伝解析の方法

今回スクリーニングした microsatellite マーカーは約 400 程度であり、染色体をまんべんなくサーチできるようスクリーニングを行った。しかしながら、OLETF と F344 間で遺伝的多型を示した microsatellite は 100 種類程度であった。それらのマーカーがどの程度染色体をカバーしているかを計算すると約 1000 cM にわたっていた。まだ不十分であるが、一応、染色体の 60%以上をカバーしているのでスクリーニングを開始した。

(OLETF×F344)F₂, 160 個体の肝臓より DNA を抽出し、それらをテンプレートとして PCR による増幅を行い、その後、Metapho-agarose gel を用い、ミューピド小型電気活動装置で 30 分泳働後、エチジウムブロマイド染色にて遺伝子型を決定した。なお、すべての結果が出た段階で、すべてのマーカーについて、double crossing-over の有無を検討し、もし、あった場合はすべての箇所について、数回に渡って再検査を行い、ミスタイピングをチェックした。解析は Quantitative trait locus (QTL) 解析によった。なぜなら、血糖値は 100~300 mg/dl と連続した値を取るものであり、たとえば 200 前後の血糖値は従来の方法であ

れば、糖尿病型かそれとも非糖尿病型かに分類せざるを得なかった。しかし、QTL 解析では得られた raw data をそのまま利用することができるのである。したがって表現型に関して微妙な値に関してどちらかに無理矢理分類する必要がないのであり、かつその分、より正確な解析が期待されるのである。

実験成績

1) 常染色体上の NIDDM 遺伝子

染色体上のマーカー約 100 種についてスクリーニングを行い、表現型として、空腹時血糖値、糖負荷後 30, 60, 90, 120 分ごとの各血糖値、それと体重をとりあげた。各表現型に関してすべてのマーカー遺伝子の遺伝型とのリンケージテストを Mapmaker/QTL プログラムを用いて QTL 解析を行った。まず Mapmaker/QTL program により、リンケージグループを検討したところ各マーカーは 15 染色体を除くいずれかのグループに分類された。さらにすべてのマーカーと糖尿病表現型とのリンケージは Mapmaker/QTL プログラムの他、ANOVA システムによっても解析された。その結果、常染色体の異なる染色体上に各 1 個ずつ計 4 カ所が糖尿病形質と lod score 3 以上の強いリンケージが認められた。同時に ANOVA での解析を行っているが、常染色体における Mapmaker/QTL プログラムにおける高い LOD score と ANOVA 解析による高い probability (*p* 値) より、その場所に糖尿病原因遺伝子は存在するのは確かであると考えられた。われわれはそれらの遺伝子座を *Nidd/of1*, *Nidd/of2*, *Nidd/of3*, *Nidd/of4* と命名した。*Nidd/of1* と *Nidd/of2* は糖負荷後のグルコース耐性に関与しており、空腹時血糖値には全く関与していなかった。前者はラット染色体 7 番上にあり、後者は染色体 8 番上に見出された。一方、*Nidd/of3* と *Nidd/of4* は逆に空腹時血糖値に関与しており、糖負荷後の血糖値には全く関与していなかった。前者はラット染色体 11 番上にあり、後者は染色体 12 番上に存在した。このことから II 型糖尿病発症には異なる遺伝子群による異なる生理学的作用の存在することが明らかとなった。各遺伝子座の糖尿病発症に寄与すると思われるパーセントを Table 1 に示した。あくまでも可能性ではあるが、空腹時血糖に関与している遺伝子は糖尿病発症に約 20%程度関与しており、一方、糖負荷後血糖に関与する遺伝子はこの II 型糖尿病発症に約 34%程度影響を与えているという結果を示す。したがって、まだ不明

Table 1 Percentage of the total phenotypic variance attributed to different QTLs

Locus	Chromosome	% variance attributed to locus and lod scores in parenthesis					
		Fasting glucose	Glucose 30 min	Glucose 60 min	Glucose 90 min	Glucose 120 min	Body weight
<i>Nidd/of1</i>	7	—	7.4%	10.8%	7.1%	6.2%	—
<i>Nidd/of2</i>	8	—	9.6%	6.6%	—	—	—
<i>bw/of1</i>	10	—	—	—	—	—	12.1%
<i>Nidd/of3</i>	11	10.8%	—	—	—	—	—
<i>Nidd/of4</i>	12	9.5%	—	—	—	—	—
Total		20.3%	17.0%	17.4%	7.1%	6.2%	12.1%

の糖尿病発症に関与する遺伝子があるものと思われる。

大変興味ある点は OLETF ラットにおけるこれら 4 つの遺伝子グループの染色体分布は、やせ型糖尿病モデルである GK ラットの糖尿病に関与する 4～6 個の遺伝子グループの染色体分布と全く異なっている点であった。すなわち GK ラットにおいて血糖値との最も強い連鎖はラット染色体 1 番にあり、その他、染色体 2, 5, 10, 17 番上にあると報告されている。これはわれわれの結果とは明らかに異なる遺伝子分布である。われわれは少なくとも、糖尿病に関わる遺伝子群のいくつかはたとえやせ型と肥満型とはいえ共通の遺伝子があるものと考えていたが、その考えは完全に否定された。すなわち、II 型糖尿病の成因は少なくとも二つの完全に異なる遺伝子群によって引き起こされることが明らかとなった。この知見は人の II 型糖尿病の原因を考える上で極めて大切な知見である。

次いで、われわれは OLETF ラットの体重に関与する遺伝子、*bw/of1* を同定した。おもしろいことに、この体重に関与する遺伝子の染色体分布も OLETF と GK ラットでは異なっていた。すなわち、OLETF ラットでは染色体 10 番に体重に関与する遺伝子があり、GK ラットのように染色体 7 番は存在しない。OLETF ラットは少しの食事制限や、運動をすることにより体重減少を伴い、糖尿病の発症が押さえられることが知られている。すなわち、OLETF ラットにおける糖尿病は体重との微妙なバランスの上にあるといっても良い。したがって *bw/of1* は糖/インスリン制御に関連する *Nidd/of1-4* の遺伝子と密接な関連のあることが考えられる。したがって、今回われわれの見出した、II 型

糖尿病の異なる成因というのは実は、肥満の存在の有無と密接に関連する可能性を示したといえる。

2) X 染色体の糖尿病への影響および suggestive regions

ヒトの糖尿病において母性遺伝 (maternal inheritance) の可能性が示唆されている。一口に母性遺伝といっても、ミトコンドリアを介するもの、X 染色体を介するもの、あるいはインプリンティングによるものと、さまざまなケースがある。それらのことから、われわれは OLETF ラット F₂ の X 染色体の遺伝解析を行った。X 染色体に関しては Mapmaker/QTL program を利用することができないため、われわれはそれら X 染色体の遺伝解析として ANOVA 解析を導入した。その結果、最大でプロバビリティーが 0.0016 ($p=0.0016$) という値が得られた (Table 2)。この値は正式に遺伝子名を宣言するのには足りないので糖尿病遺伝子としての命名はまだできないが、いわゆる suggestive region としては十分な値であった。したがって弱いながらも、X 染色体上には糖尿病発症に関与する遺伝子の存在が明らかとなった。このほか、常染色体にも Lod score 2.5～3.0 の範囲で少なくとも 3 カ所、suggestive region が見出された。

総 括

以上、述べてきたように、LOD score 3 以上を示す 4 カ所の糖尿病に関わる領域が染色体上にマッピングされた。今回の研究で明らかとなった点は、絶食時に、2 つの常染色体性の遺伝子 (*Nidd/of3*, *Nidd/of4*) が NIDDM に関与しているということ、さらに、異なる別の常染色体性の遺伝子 (*Nidd/of1*, *Nidd/of2*) が糖負荷後に関与しているという点である。さらに体

Table 2 ANOVA tests of X-chromosome markers in suggestive regions of linkage for seven phenotypes in the (OLETF×F344)F₂

Chr	Marker	cM	N	Fasting glucose	Glucose at 30 min	Glucose at 60 min	Glucose at 90 min	Glucose at 120 min	Total glucose	Body weight
X	<i>DXMit4</i>	17	146	—	—	—	—	0.0467	—	—
	<i>PRPSII</i>	4	160	0.026	—	—	—	0.0029	—	0.026
	<i>D15Mgh8</i>	5	160	0.023	—	—	—	0.0042	0.043	0.018
	<i>DXMgh4</i>		147	0.010	—	—	—	0.0016	—	—

p value are reported when <0.05 for markers with phenotypes on chromosome X.

重と関与している遺伝子 (*bw/of1*) も明らかとした。Suggestive regionを加えればまだ5カ所程度、NIDDMに関与する遺伝子が存在する。その中にはX染色体関連の遺伝子が関与している点で興味深い。

さて、すでに発表されたII型糖尿病モデルラットのGKラットとの関連であるが、GKラットの糖尿病を引き起こす原因遺伝子は染色体1, 2番にメジャーな遺伝子が存在する。しかし、OLETFラットでは染色体1, 2番には糖尿病に関する遺伝子は存在しない。すなわち、OLETFの示す糖尿病遺伝子とGKラットとのそれは全く異なる遺伝子が関与していると結論される。GKラットはやせ型糖尿病であり、OLETFラットは肥満型糖尿病であり、そのような差がこのような遺

伝子の差をもたらしたのかもしれない。もしそうであるのであれば、肥満型II型糖尿病モデルとしてOLETFはヒトの肥満型糖尿病の有効なモデル動物といえる。いずれにせよ、本研究においてII型糖尿病は見た目は同じ糖尿病であっても、成因の全く異なる型に分類されたことにより、ヒト糖尿病のもつ複雑な成因を解明する上での大きな第一歩を示したといえる。

文 献

- 1) Galli, J. et al.: *Nature Genet.*, **12**, 31 (1996)
- 2) Gauguier, D. et al.: *Nature Genet.*, **12**, 38 (1996)