

論文の内容の要旨

論文題目 Identification of *KCNQ1* as a susceptibility gene for type 2 diabetes mellitus

(2型糖尿病感受性遺伝子としての *KCNQ1* の同定)

氏名 安田 和基

<背景>

糖尿病の大部分を占める 2 型糖尿病患者は、世界中で増加しているが、特にアジア・アフリカで急増している。日本では糖尿病患者数は 1000 万人前後、疑い患者も入れるとその約 2 倍と推定されており、40 才以上の人口の約 10% が 2 型糖尿病に罹患している。欧米の 2 型糖尿病の最も大きな特徴は肥満であるが、日本では、糖尿病発症前からインスリン分泌障害が認められ、欧米に比べると肥満度が大きくなっても糖尿病を発症する。

2 型糖尿病は多因子遺伝病であり、遺伝因子の研究は、インスリン分泌や作用、糖・エネルギー代謝に関与する分子を対象とした「候補遺伝子アプローチ」が中心であった。これまで多くの報告がなされたが、確立した遺伝因子は *PPARG* など、ごくわずかであり、「候補遺伝子アプローチ」の限界が指摘されつつあった。

ゲノム上に近接する SNP 同士の「連鎖不平衡 (LD)」という性質を利用して、ゲノム全体にわたり「十分な数の」マーカー SNP と疾患の関係を患者群と対照群で比較検討し、疾患遺伝因子をとらえる方法を「ゲノムワイド関連 (相関) 解析 (略称 GWAS)」と呼ぶ。科学と技術の進歩にともない、2007 年ころから本格的に GWAS が行われたが、さまざまな疾患の先陣を切って、2 型糖尿病で白人を対象に複数の研究の成果が報告され、それまで予想されていなかった遺伝因子が一気に複数同定された。しかし日本人・アジア人での 2 型糖尿病の GWAS の報告はなかった。

わが国で 2000 年に開始したミレニアムゲノム・プロジェクトの一環として、5 つの生活習慣病に関する日本人遺伝因子の探索が企画されたが、私は 2 型糖尿病を対象とした GWAS の研究デザイン構築からサンプル収集、及び、データ取得・解析を行った。

<方法>

1. JSNP データベースの 10 万 SNP を用いた全ゲノム関連解析

日本人一般集団から主に遺伝子周辺領域をシーケンスして得られ、JSNP データベースに登録された約 10 万 SNP を用い、図 1 に示す多段階スクリーニングを行った。

対象は、臨床的に 2 型糖尿病の診断のついた日本人患者である。まず第 1 段階では糖尿病 188 人を対象に、Invader 法でタイピング方法が確立できた 82,343 SNP (全て常染色体) について、multiplex かつ PCR-based の Invader 法を用いタイピングした。

コントロールとしては、上記 JSNP データベースの一般日本人集団 (JDC: JSNP database control) でのアリル頻度情報 (「標準 SNP 頻度」と呼ばれる) と、同時に行われていた 4 疾患 (がん、認知症、喘息、高血圧) の JGS のサンプルデータ (各 188×4=752 名) の SNP

頻度も比較対照とした。それぞれに対して関連を検討し、 $p < 0.05$ を目安として有意差の順

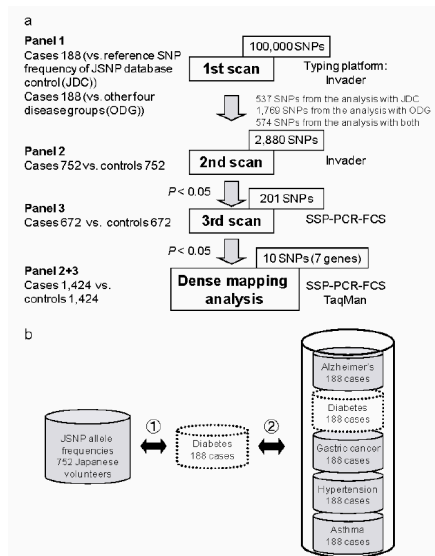


図1 多段階スクリーニングによる全ゲノム関連解析(GWAS)戦略。JSNPデータベースに登録されている日本人の10万SNPを用いた。第一パネルは、5疾患共同で行い各疾患188人と小規模だが、多段階にすることで、効率的に陽性SNPを拾い上げた。

に 2,880 SNP を選択した。第2段階としては、独立した case-control パネル (パネル 2: 疾患 752 名、対照 752 名) について、上記 SNP のタイピングを行った。これにより得られた有意差の上位 201 SNP を第3段階として、さらに独立のパネル (パネル 3: 患者 672 名、対照 672 名) で関連を解析した。最終的にパネル 2 とパネル 3 を合わせたデータ (パネル 2+3) により、統計的有意性を P 値で判定した。

2. *KCNQ1* の dense mapping と、再現性、普遍性、病態での関連の解析

スクリーニングに用いた SNP は、あくまでもマーカーであるので、最も有意性の高かった *KCNQ1* 遺伝子について、まず NCBI に登録され

た 49 SNP を選び、パネル 2 及びパネル 3 についてタイピングを行って関連を解析した。次に日本人 24 人について共同研究者とリシークエンスを行い、得られた多型について同様にタイピングを行った。

統計学的な p 値で最も関連の強かった上位 3 SNP (rs2237892、rs2237895、rs2074196) は、いずれも *KCNQ1* 遺伝子のイントロン 15 に存在し、これらを用いて次の 3 つの方法で研究を進めた。日本人の別の集団で結果が再現するかどうか (再現性)、他の人種で同様の効果がみられるかどうか (普遍性)、及び、糖尿病のどのような特徴に関係するのか (病態)、である。日本人以外については、海外の共同研究者の協力を得て、韓国人、中国人、白人でのタイピングデータを入手し比較した。

<結果>

1. 全ゲノム関連解析

3 段階のスクリーニングにより、有意な SNP を絞り込むことができた。第3段階にて、 $P < 0.05$ の有意水準を満たした 10 SNP のうち、最も p 値が低かったのは、*KCNQ1* 遺伝子のイントロン 15 に存在する rs2237895 であり、 $P = 3.4 \times 10^{-6}$ を示した。興味深いことに、rs2237895 を含む 3 つの SNP (rs151290、rs163184、rs2237895) が、*KCNQ1* 遺伝子の同じイントロン 15 に存在した。

2. *KCNQ1* の dense mapping 解析

KCNQ1 の dense mapping の結果、最も p 値が小さかったのは、やはりイントロン 15 に存在する rs2237892 であり、 $p=6.7 \times 10^{-13}$ 、オッズ比は 1.49 に達した。今回検討した限りにおいて、日本人 2 型糖尿病と最も強く関連した遺伝因子は *KCNQ1* のイントロン 15 に存在する rs2237892 であった。

最も関連の強かった rs2237892 について、まず、3,000 人規模の日本人集団を 2 つ用意して、この遺伝子の SNP と 2 型糖尿病との関係を検証し、全く同様に 2 型糖尿病のなり易さに関連した。次に、海外の共同研究者とともに、韓国人 1,390 人、中国人 (香港) 2,993 人を用いて、それぞれ検討したところ、2 型糖尿病との明らかな関連を認め、*KCNQ1* は東アジア人では、非常に重要な 2 型糖尿病関連遺伝因子であることがわかった。さらに意外なことに、やはり海外の共同研究者とともに、北欧白人 2,570 人を用いた解析を行うと、糖尿病と強い相関を認め、人種をこえた普遍的な遺伝因子であることがわかった。すべての結果を合わせると、解析した人数は合計で約 2 万人にのぼり、2 型糖尿病発症に関するオッズ比は 1.4、統計学的 p 値は 1.7×10^{-42} となった (図 3)。最後に rs2237892 リスクアレルと表現型との関係を主に日本人対照群で調べた結果、この SNP のリスクアレルをホモで持つ人は、インスリン感受性を示す HOMA-R は差を認めなかったが、 β 細胞機能を示す HOMA- β が明らかに低値であり、インスリン分泌障害を介して 2 型糖尿病のリスクを上げると考えられる。

<考察>

日本人を対象とした多段階 GWAS により、2 型糖尿病遺伝子 *KCNQ1* を同定した。*KCNQ1* の intron15 の SNP により糖尿病の疾患感受性を生じるメカニズムについては、いくつかの可能性が考えられる。

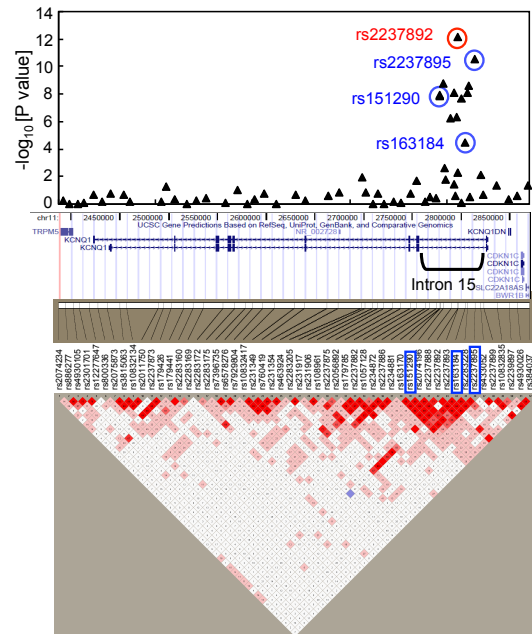


図2: *KCNQ1* 遺伝子領域における糖尿病感受性SNPの同定
 上段は、62SNPによる糖尿病との相関解析、3つの青丸のSNPが、3次スクリーニングで陽性だったもの、dense mapping により、赤丸のrs2237892がもっとも相関が強かった。中段は、*KCNQ1* 遺伝子の構造と近接遺伝子、下段は、検討したSNP同士の連鎖不平衡係数D'を視覚的に表示 (赤が強いほど連鎖不平衡が強い)。

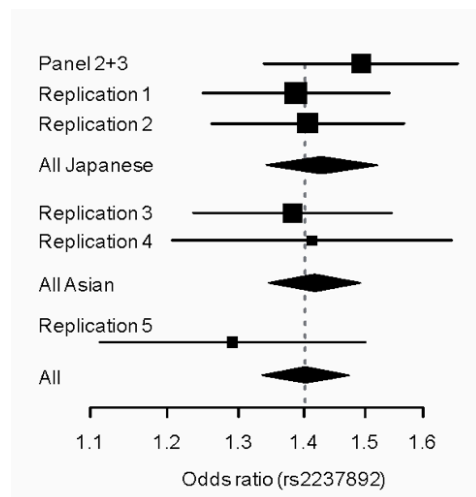


図3: *KCNQ1* SNPrs2237892と2型糖尿病の相関。日本人 (Panel2+3, Replication 1 及び2) だけでなく、韓国 (Replication 3)、中国 (Replication 4) と東アジア人で糖尿病と相関する。さらに、白人 (Replication 5) でも相関を認め、人種を超えた糖尿病感受性遺伝子である。

KCNQ1 タンパクは膵β細胞でも発現しており、イントロンの SNP 領域がその発現量の調節に関与する可能性が第一に考えられる。一方、KCNQ1 タンパク発現調節とは異なる機序で作用している可能性もある。この SNP の存在する領域が、ゲノム上の近傍にある遺伝子（例として、細胞周期に関連する *CDKN1C* など）の発現調節に関与しているのかもしれない。また SNP 近傍に、タンパクをコードしないいわゆる non-coding RNA を含む、何らかの未知の転写産物があって、その発現や機能に影響を与えるのかもしれない。*KCNQ1* を含む 11 番染色体のこの領域は、片親由来の遺伝子しか発現しない「インプリンティング（刷り込み現象）」という調節を受けており、SNP がこうした調節の変化に寄与する可能性も否定できない。いずれにしても、なぜこの SNP がインスリン分泌低下を生じるのかは、今後の研究課題であり、最終的にはヒト膵島を用いた検証が必要であろう。

遺伝学的な本研究の意義は、大きく 3 つ挙げられる。

1) まず、日本人 2 型糖尿病において、現時点で最も重要と思われる遺伝因子を明らかにした。全く独立に行われた、理化学研究所のオーダーメイド医療実現化プロジェクトでも、やはり日本人で一番強力な 2 型糖尿病関連遺伝子は *KCNQ1* であったことが同時に報告された。

2) 次に、*KCNQ1* は人種をこえてヒト 2 型糖尿病と関連する普遍的な因子であることを示した。現在までに主に GWAS により報告された 2 型糖尿病関連遺伝因の中でも、オッズ比で見ると、*KCNQ1* は 1.4 程度と *TCF7L2* と並んで高く、ヒト 2 型糖尿病の成因、病態に関わる最も重要な common variant 分子の一つを同定したことになる。

3) 3 つ目に、人種をこえた糖尿病の遺伝因子でも、人種ごとのリスクアリアル頻度には大きな差があることを示し、病態の解明には、それぞれの人種での GWAS が必要であることが示された。これは疾患の枠をこえて重要な真理である。同時に糖尿病の遺伝的素因について、人種による共通点、相違点の一端を初めて具体的に明らかにしたといえる。

本研究以降 GWAS は、より大規模な人数でより多くのマーカーを用いて行われるようになり、100 近い遺伝因子が報告されている。*KCNQ1* をはじめ、GWAS で報告された遺伝因子はきわめて再現性高く病気と関連するにもかかわらず、それらを用いた「糖尿病の発症予測モデル」の有用性もまだ限定的である。GWAS で得られる遺伝因子 (common variant) の限界は、他の疾患でも示されつつあり、より頻度は低い効果の強い遺伝因子 (rare variant) の探索が、次世代シーケンサーなどで開始されている。

いずれにしても本研究は、日本人における最も重要な 2 型糖尿病遺伝子を同定したとともに、生活習慣病一般にとって、GWAS の landmark となる成果を挙げることができたと考える。

謝辞：本研究に参加いただいた全国の患者さんに深謝いたします。また研究にご力いただいた先生方、特に本論文への共同研究の成果の使用をお許しいただいた国内、及び海外（韓国、香港、北欧）の共同研究者の方々にも、深く感謝いたします。