

氏 名	わた なべ たけし 渡 邊 武
学位(専攻分野)	博 士 (薬 学)
学 位 記 番 号	論 薬 博 第 615 号
学位授与の日付	平成 11 年 7 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学位論文題目	インスリン非依存型糖尿病 OLETF ラットのゲノム解析木造建物の耐震性能評価に関する研究

論文調査委員 (主 査) 教授 河 合 明 彦 教授 川 崎 敏 祐 教授 伊 藤 信 行

論 文 内 容 の 要 旨

インスリン非依存型糖尿病 (non insulin-dependent diabetes mellitus, NIDDM) は、人口の数%にも達する高い罹患率と、糖尿病性腎症、神経症、網膜症等に代表される重篤な合併症を伴うことなどにより、医療上大きな問題となっている疾患である。NIDDM は、遺伝因子と環境因子の相互作用により成立する疾患であるが、遺伝因子の関与が強いことが明らかにされている。しかしながらヒトにおいては、複数の遺伝因子と環境因子が複雑に関連し、疾患関連遺伝子の同定は非常に困難である。実際ヒトにおいては特殊な家系例を説明可能な遺伝子が同定されたのみで、一般に見られる「common NIDDM」と呼ばれる病態を説明可能な遺伝子は未だ同定されていない。

実験動物を用いた解析は、遺伝因子、環境因子ともにコントロールできることから、これら複雑な病態の原因遺伝子検索が可能な手法のひとつである。Otsuka-Long Evans-Tokushima Fatty (OLETF) ラットは、河野ら (大塚製薬株式会社徳島研究所, 1991 年) により開発された肥満を伴う NIDDM モデルであり、ヒト肥満型 NIDDM の病態をよく反映していると考えられている。OLETF 系統雄ラットは 25 ~ 30 週令ではほぼ 100% 糖尿病を発症し、30 週令ではコントロール系統に比して約 1.8 倍程度の過体重を示す。OLETF 系統においては、体重と糖尿病発症との関連は強く、雄 OLETF 個体の体重を正常化すると糖尿病の発症は遅延または減少することが知られている。すなわち OLETF 系統においては糖、脂肪代謝における異常が相互に関連していると考えられる。これら複雑な糖ならびに脂肪の恒常性維持機構に関連する遺伝子を明らかにすることは NIDDM に対する有効な治療法を考えていく上で非常に重要である。

本研究では、OLETF の遺伝解析を行うに先立ち、ゲノム解析基盤の整備を行った。そのゲノム解析システムをもとに、肥満型 NIDDM のモデルである OLETF ラットを用いての遺伝解析を行い、各形質を規定する遺伝子座を明らかにした。さらに、位置的情報にもとづいて原因遺伝子の同定を目指した。

(第 1 章) ラットゲノム解析基盤の整備

ラット遺伝解析の基礎となる 8,189 個におよぶ simple sequence length polymorphism (SSLP) マーカーを樹立した。4,700 個の SSLP マーカーをラットゲノム上に radiation hybrid (RH) 法を用いてマップした。SSLP マーカー間の平均間隔は遺伝学的距離で 0.51 cent iMorgan (cM)、物理的距離で 640 kilobase (kb) であり詳細な遺伝解析に十分であった。さらに、同ラット RH 地図上にヒト、マウスですでに染色体位置情報が得られている 503 個のラット相同遺伝子をマップした。その結果、ラット、マウス間で保存されている 44 個のセグメント及びラット、ヒト間で保存されている 104 個のセグメントを明らかにした。ラット全ゲノムをカバーする最初の包括的な比較地図を作成し、ヒト、マウスゲノムプロジェクトで明らかにされた多くの遺伝子情報をラットゲノムに外挿することが可能になった。

(第 2 章) バッククロス群の作成と解析

肥満糖尿病モデルである OLETF 系統と非肥満で糖尿病を発症しない Brown Norway (BN) 系統を用いて、359 匹の (OLETFxBN) xOLETF バッククロス群を作成した。30 週令時において、肥満の指標として体重、内臓脂肪重量、空腹時トリグリセライド値、NIDDM の指標として、空腹時及び oral glucose tolerance test (OGTT) 時における血糖値、インスリ

ン値の測定を行った。全体の遺伝傾向として、肥満形質に関しては OLETF アレルの優性傾向を、NIDDM 形質に関しては OLETF アレルの劣性傾向を示した。同バッククロス 359 個体について、第 1 章で得られた情報をもとに合計 219 個の SSLP マーカーで遺伝子型判定を行った。解析した領域はラットゲノム全長に等しい 1795 cM に渡り、平均マーカー間隔は 8.05 cM であった。

(第 3 章) 肥満, NIDM 関連遺伝子座の同定

第 2 章で得られた情報を基に quantitative traits loci (QTL) 解析を行い、表現型と遺伝子型の連関を評価した。インターバル解析による QTL 解析法を適用し、統計学的に有意である logarithm of the likelihood ratio (LOD) スコアが 3.3 を超える QTL を 9 ヶ所同定した。ラット 1 番染色体長腕末端 D1 Rat 90 SSLP マーカー近傍に、体重に LOD スコア 13.99 ($p = 1.26 \times 10^{-15}$) の統計学的有意性を示す主要な肥満関連遺伝子座 (*diabetes mellitus OLETF tipe1*, *Dmo 1* と命名) を同定した。*Dmo 1* は OLETF 由来の 1 アレルで体重を平均 45 g 増加させる効果があった。*Dmo 1* はほぼ相加的な体重増加効果を持つ事が知られており、OLETF アレルの *Dmo 1* ホモ接合体、BN アレルのホモ接合体間では平均体重で約 103 g (体重の約 17.5%) 以上の差があると想定された。さらに、糖負荷後血糖値に非常に強く関連する 2 つの QTL (*Dmo 4*, *Dmo 11*) を同定した。*Dmo 4* は *Dmo 1* と同じくラット 1 番染色体上に存在し、糖負荷後血糖値に対し LOD スコア = 7.31 を示し、*Dmo 4* 領域の OLETF 1 アレルの効果は約 40 mg/dl と計算された。*Dmo 11* は X 染色体上に同定され、糖負荷後血糖に LOD スコア = 8.12 を示した。血糖値への効果は 44 mg/dl であった。同定された各遺伝子座について第 1 章で得られた比較地図を参考に肥満、糖尿病候補遺伝子の検索を行い、原因遺伝子としての可能性を評価した。

本研究では、遺伝解析に必須の大量の SSLP マーカーを樹立し、ラット RH 地図を作成した。さらに RH 地図をもとにラット-マウス-ヒトの 3 生物種に渡る比較地図を作成した。作成したラットゲノム情報をもとにして、肥満、糖尿病に関連した複数の遺伝子座を明らかにすることができた。これらのゲノム情報は、候補遺伝子の検索ならびにコンジュニク ラットの作成等にも有効であると考えられる。

論文審査の結果の要旨

インスリン非依存型の糖尿病 (non insulin-dependent diabetes mellitus, MDDM) は人口の数%にも達する高い罹患率、および糖尿病性腎症、神経症、網膜症などに代表される重篤な合併症を伴うことにより、医療上大きな問題となっている。NIDDM は遺伝因子と環境因子の相互作用により成立する疾患であり、遺伝因子の関与が強いことが知られているが、複数の遺伝因子と環境因子が複雑に関連しあい、疾患関連遺伝子の同定は非常に困難である。現在、特殊な家系例を説明する遺伝子が同定されているだけで、一般に見られる「common NIDDM」と呼ばれる病態を説明できる遺伝子は未だ同定されていない。

実験動物を用いた解析は遺伝因子、環境因子の両者を制御できるので、複雑な病態の原因遺伝子の検索が可能になる。Otuka-Long Evans-Tokushima Fatty (OLETF) ラットは河野 (1991 年) により開発された肥満を伴う MDDM モデルで、ヒト肥満型 NIDDM の病態を良く反映している。例えば、OLETF 系統雄ラットは 25 ~ 30 週令でほぼ 100% 糖尿病を発症し、30 週令では対照系統に比して約 1.8 倍程度の過体重を示し、また給餌制限により体重を正常化すると糖尿病の発症は遅延または減少する。このように OLETF 系統ラットの糖尿病発症と関連する遺伝子解析は NIDDM の有効な治療法を見出す上で非常有用である。本研究では、まずラットのゲノム解析の基盤を整備し、そのゲノム解析システムを用いて OLETF 系統ラットの遺伝解析を行い、各形質を規定する遺伝子座を明らかにし、遺伝子座の情報からいくつかの原因遺伝子としての解析を行った。

第 1 章 ラットゲノム解析基盤の整備

ラット遺伝解析の基盤となる 8,189 個に及ぶ simple sequence length polymorphism (SSLP) マーカーを樹立した。このうちの 4,700 個の SSLP マーカーを radiation hybrid (RH) 法を用いてラットのゲノム上にマップした。マーカー間の平均の遺伝学的距離は 0.51 centiMorgan (cM)、物理的距離で 640 kilobase (kb) であり、詳細な遺伝解析に十分であった。さらに、ヒトおよびマウスの染色体上に既にマップされている 503 個の相同遺伝子をラットの RH 地図上にマップした。その結果、ラットおよびマウス間で保存されている 44 個のセグメントおよびラット、ヒト間で保存されている 104 個のセグメントを明らかにした。このことにより、ラット全ゲノムをカバーする最初の包括的な比較地図が作成され、ヒト、マウスゲ

ノムプロジェクトで明らかにされた多くの遺伝子情報をラットのゲノムに外挿することができた。

第2章 バッククロス群の作成と解析

肥満型糖尿病のモデルである OLETF 系統と非肥満で糖尿病を発症しない Brown Norway (BN) 系統のラットを用いて、359 匹の (OLETF×BN) ×OLETF バッククロス群を作成し、まず各世代の 30 週令時において、肥満の指標として体重、内臓脂肪重量、空腹時トリグリセリド値、NIDDM の指標として、空腹時および oral glucose tolerance test (OGTT) 時における血糖値、インスリン値の測定を行った。その結果、肥満形質に関しては OLETF アレルの優性傾向が見られ、MDDM 形質に関しては OLETF アレルの劣性傾向が見られた。次に、このバッククロス 359 個体について、第1章で得られた遺伝子地図上の 219 個の SSLP マーカーを用いて遺伝子型判定を行ったところ、解析した領域はラットゲノム全長に等しい 1795 cM に亘り、平均マーカー間隔は 8.05 cM であった。

第3章 肥満、MDDM 関連遺伝子座の同定

第2章で得られた情報をもとに、形質の変化をもたらす遺伝子座の同定を目標として、表現型と遺伝子型の関連性を調べた。即ち、インターバル解析による quantitative traits loci (QTL) 解析を行い、統計学的に有意な logarithm of the likelihood ratio (LOD) スコアが 3.3 を越える QTL を 9 ヶ所同定した。その一つはラット第1番染色体の長腕末端の *D1 Rat 90* SSLP マーカーの近傍に体重について LODD スコア 13.99 ($p = 1.26 \times 10^{-15}$) の値を示す主要な肥満関連遺伝子座で (diabetes mellitus OLETFtype1, *Dmo 1* と命名)、OLETF 由来の 1 アレルで体重を平均 45 g 増加させる効果があった。*Dmo 1* はほぼ相加的な体重増加効果をもたらす、OLETF の *Dmo 1* のホモ接合体と BN アレルのホモ接合体間では平均体重で約 103 g (体重の約 17.5%) 以上の差をもたらす。また、糖負荷後血糖値に非常に強く関連する 2 つの QTL (*Dmo 4* および *Dmo 11* と命名) があり、*Dmo 4* は *Dmo 1* と同じラット 1 番染色体上に存在し、糖負荷後血糖値に対して LOD スコア = 7.31 を示し、*Dmo 4* 斜領域の OLETF 1 アレルの血糖値上昇効果は約 40 mg/dl と計算された。*Dmo 11* については X 染色体上に同定され、LOD スコア = 8.12 で、血糖値への効果は 44 mg/dl であった。

以上、本論文では遺伝解析に必須の大量の SSLP マーカーを樹立し、ラット RH 地図を作成し、この RH 地図をもとにラットマウスヒトの 3 生物種に亘る比較ゲノム地図を作成した。このラットの SSLP マーカーおよび比較ゲノム情報をもとにして、肥満・糖尿病に関連する複数の遺伝子座を同定した。このような比較ゲノム情報は他の候補遺伝子の検索やコンジェニック動物の作成などにも有効であると考えられる。

よって、本論文は博士(薬学)の論文として価値あるものと認める。さらに、平成 11 年 7 月 5 日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果合格と認めた。