



Quantitative trait locus analysis for chronic pancreatitis and diabetes mellitus in the WBN/Kob rat

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-31 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 辻, 厚至 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1625

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博論第 348号	学位授与年月日	平成13年 9月 7日
氏 名	辻 厚 至		
論文題目	Quantitative trait locus analysis for chronic pancreatitis and diabetes mellitus in the WBN/Kob rat (WBN/Kob ラットにおける慢性膵炎と糖尿病の量的形質遺伝子座解析)		

博士(医学) 辻 厚 至

論文題目

Quantitative trait locus analysis for chronic pancreatitis and diabetes mellitus in the WBN/Kob rat
(WBN/Kob ラットにおける慢性膵炎と糖尿病の量的形質遺伝子座解析)

論文の内容の要旨

〔はじめに〕

慢性膵炎は膵臓において炎症の持続、繰り返しがある疾患で、膵外分泌細胞、内分泌細胞の形態学的、機能的損失を引き起こす。先進工業国では慢性膵炎の患者数と医療費の増加が大きな医療上の問題となっている。しかし、未だ発症機序は明らかとなっておらず、早期診断、治療法の向上、新たな薬剤の開発のためには慢性膵炎発症の分子メカニズムの解明が重要である。最近、遺伝性膵炎の病因遺伝子として3つの遺伝子が相次いで同定された。しかし、未だ多くの慢性膵炎患者では遺伝因子が不明のままである。そのため新たな病因遺伝子の同定が求められているが、多因子疾患である慢性膵炎や糖尿病のヒト自身での病因遺伝子同定研究は難航している。ゲノムプロジェクトの急速な進展により、ヒト多因子疾患の適切なモデル動物における遺伝解析が、ヒト病因遺伝子の同定への有効なアプローチのひとつとなっている。WBN/Kob(WBN)ラットは、慢性膵炎モデルラットとして医学、薬理学研究に広く利用されている。また、高血糖、低インシュリン血症、尿糖排泄などを特徴とする非肥満型自然発症糖尿病モデルラットでもある。WBN ラットの遺伝解析からのアプローチによるヒト慢性膵炎と糖尿病の病因遺伝子の同定を目指し、本研究では、WBN ラットにおける量的形質遺伝子座解析による病因遺伝子の染色体上の位置の決定を目的とした。

〔材料ならびに方法〕

WBN ラットとコントロールとして BN ラットの慢性膵炎の発症率を3、4、5ヶ月齢で調査した。WBN ラットと BN ラットを交配し、第一世代ラット、第二世代ラット(149頭)を作出した。尚、以下の解析には全て雄を使用した。各ラットを4ヶ月齢で、9時間絶食させた後に、体重を測定し、グルコース(2g/kg 体重)を経口投与し耐糖能試験を行い、血清中の血糖値、インシュリン値を測定した。試験後、膵臓を摘出し、膵臓標本の作成と観察を行った。ラットの全染色体をカバーするように DNA マーカーを設定し、膵炎を発症した第二世代ラットの内の30頭について遺伝子型判定を行った。有意差($P < 0.01$)のあった領域では残りの全ラットの遺伝子型判定を行い、量的形質遺伝子座解析を行った。有意差が $P < 0.001$ の染色体領域を病因遺伝子の存在する遺伝子座(病因遺伝子座)とした。

〔結果〕

形質解析：

WBN、BN ラットの慢性膵炎の発症率の調査により、WBN ラットの発症率は3ヶ月齢で69%、4ヶ月齢以降では100%であった。BN ラットは発症しなかった。WBN、BN、第一世代、第二世代ラットの4ヶ月齢における慢性膵炎の判定、耐糖能試験(血糖値、インシュリン値測定)、体重測定を行った。第一世代ラットは慢性膵炎を発症せず、第二世代ラットは32%発症した。空腹時の血糖値及びインシュリン

値は、WBN ラットと BN ラットとの間で有意差はなく、耐糖能試験中の血糖値、インシュリン値ともに WBN ラットは BN ラットに比べ有意($P < 0.01$ or < 0.05)に高かった。第二世代ラットと BN ラットとの間に血糖値とインシュリン値に有意差はなかった。体重は、WBN、第二世代ラットともに BN ラットより有意($P < 0.01$)に重かった。

量的形質遺伝子座解析：

慢性膵炎を発症した30頭の第二世代ラットにおける連鎖解析により、3つの遺伝子座で有意な連鎖が認められた：*D7Rat97*($P=0.008$)；*DXRat103*($P=0.001$)；*DXRat2*($P=0.003$)。次にこれらの領域について新たな DNA マーカーを追加して、全ての第二世代ラットで遺伝子型判定を行い、量的形質遺伝子座解析を行った。その結果、*D7Rat97*と*D7Rat4*の間の領域で慢性膵炎に関する病因遺伝子座を、また、*DXRat103*(*GXGot62*)で慢性膵炎と糖負荷後30分のインシュリン値に関する病因遺伝子座を同定した。

〔考察〕

慢性膵炎の発症率の調査より、WBN ラットにおける発症は月齢に依存しており、病変は4ヶ月齢において最大面積であることが明らかとなった。また WBN ラットの4ヶ月齢での耐糖能試験中の血糖値、インシュリン値が BN ラットに比べ有意に高かったことから、4ヶ月齢の第二世代ラットでの解析が適切であることが示された。第二世代ラットでの量的形質遺伝子座解析により、第7染色体とX染色体に2つの病因遺伝子座を同定した。X染色体の病因遺伝子座は、慢性膵炎と糖負荷後のインシュリン値の両方に関与していることが示唆された。第二世代ラットでの各遺伝子型における慢性膵炎の発症率は、第7染色体の病因遺伝子座では、遺伝子型がWBN/WBNは51%、BN/BNは9%、X染色体の病因遺伝子座においては、遺伝子型が X^{WBN}/Y は46%、 X^{BN}/Y は16%であることから、これら遺伝子座におけるWBN ラットタイプの対立遺伝子は慢性膵炎の発症率を上昇させることが明らかとなった。ラットーヒト比較遺伝地図での検討により、本研究で同定した病因遺伝子座はヒトで同定された3つの病因遺伝子座とは異なることが明らかとなった。このことより、新たな遺伝子がこのラットの慢性膵炎発症に関与していることが明らかとなった。その候補遺伝子として、上皮細胞の構成成分のひとつであるケラチン8とケラチン18、膵消化酵素のひとつであるエラスターゼ1遺伝子などが挙げられた。

〔結論〕

WBN ラットの量的形質遺伝子座解析より、慢性膵炎と糖尿病発症に関連した2つの病因遺伝子座を同定した。これら遺伝子型はヒト慢性膵炎病因遺伝子とは異なる染色体領域に存在することから、WBN ラットの慢性膵炎には新規遺伝子に関与していることが明らかとなった。WBN ラットにおける解析は、新たなヒト慢性膵炎病因遺伝子を同定するのに有効であることが示された。

論文審査の結果の要旨

ヒト多因子疾患の病因遺伝子の同定は困難を伴う。これに対し、比較遺伝子地図を用いた、疾患モデル動物の遺伝子解析からのアプローチはヒト病因遺伝子の同定に有効な手段の1つと考えられる。WBN/Kob(WBN)ラットは高血糖、低インスリン血症、尿糖排泄などを特徴とする非肥満型自然発症糖尿病モデルラットである。このラットは糖尿病発症に先立ち、その主原因と考えられる慢性膵炎を発症する。

そこで、申請者らは WBN ラットにおける慢性膵炎／糖尿病の病因遺伝子のマッピングを量的形質遺伝子座(QTL)解析により行った。

申請者らは、WBN ラットとコントロールラットである BN ラットを交配し F1 および F2 ラット(149頭) を作出した。F2 雄ラットにグルコース負荷試験を行い、血糖値およびインスリン値を測定した。また、膵臓組織の病理所見を検討した。膵炎を発症した F2 ラット30頭について、全染色体上に15-20 cM 間隔でマイクロサテライトマーカーを設定し、遺伝子型判定を行った。更に、有意差($p < 0.01$)のあった領域では全ラット(149頭)の遺伝子型判定を、新たなマイクロサテライトマーカーを加えて行った。QTL 解析には Map Manager QTX を用いた。得られた主な結果は以下の通りである。

- (1) WBN 雄ラットは、3ヶ月齢で69%、4ヶ月齢以降では100%に膵炎が認められた。BN ラットでは5ヶ月齢まで膵炎は発症しなかった。
- (2) (BN×WBN)F1 ラットは膵炎を発症しなかったが、F2 ラットは32%に発症を認めた。
- (3) グルコース負荷試験で、WBN ラットは BN ラットに比し有意に血糖値($p < 0.01$)、インスリン値($p < 0.05$)とも高かった。しかし、F2 ラットと BN ラット間に有意差を認めなかった。
- (4) 体重は WBN、F2 ラットともに BN ラットより有意に重かった($p < 0.01$)。
- (5) 連鎖解析により、3つの遺伝子座で慢性膵炎と有意な連鎖を認めた：*D7Rat97* ($p = 0.008$)、*DXRat103* ($p = 0.001$)、*DXRat2* ($p = 0.003$)。
- (6) これらの染色体領域で更に詳細に QTL 解析を行った結果、申請者らが *Pdwl1*、*Pdwl2* と名付けた2つの病因遺伝子座を同定した。*Pdwl1*：*D7Rat97*と*D7Rat4*の間に存在し、慢性膵炎に関与することが示唆される。*Pdwl2*：*DXRat103*(*GXGot62*)に認められ、慢性膵炎とグルコース負荷後30分のインスリン値と連鎖することが示唆される。
- (7) *Pdwl1* と *Pdwl2* の遺伝子型と慢性膵炎の発症率を検討したところ、*Pdwl1* 遺伝子型が WBN/WBN では51%、WBN/BN では31%、BN/BN では9%に発症が認められ、*Pdwl2* 遺伝子型が X^{WBN}/Y では46%に、 X^{BN}/Y では16%に膵炎の発症が認められた。

以上より、申請者らは第7染色体とX染色体に存在する2つの病因遺伝子座を同定した。第7染色体上の *Pdwl1* は慢性膵炎に関与し、X染色体上の *Pdwl2* は慢性膵炎とグルコース負荷後30分のインスリン値に関与することを示唆した。また、ラットーヒト間の比較遺伝子地図での検討により、本研究で同定した病因遺伝子座は既にヒトで同定された3つの病因遺伝子座とは異なることが判明した。すなわち、新たな遺伝子がこのラット慢性膵炎発症に関与していることを明らかにした。

審査委員会では、疾患モデルラットを用い慢性膵炎と糖尿病に関与する病因遺伝子座を同定した点、および比較遺伝子地図でこれら病因遺伝子座が既知のヒト慢性膵炎病因遺伝子とは異なることから、新たなヒト慢性膵炎病因遺伝子が同定される可能性を示した点を高く評価した。

以上の研究に対し、審査委員会では以下の質疑を行った。

1. WBN ラットでの膵内分泌、外分泌機能低下の時期について
2. WBN ラットにおけるインスリン抵抗性の機序について
3. WBN ラットにおける高インスリン血症の時期は
4. WBN ラットでの糖尿病発症に慢性膵炎以外の因子は関与しないか
5. WBN ラットにおいてグルカゴン値は低下するか
6. WBN ラットの脂質、アミラーゼ値に異常はないか

