

厚生労働科学研究費補助金
創薬基盤推進研究事業

疾患多発家系集積データと
大規模ジェノタイピングを併用した
新規糖尿病発症原因遺伝子の同定と
テーラーメイド医療への応用

平成20年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 稲垣暢也

平成21（2009）年4月

厚生労働科学研究費補助金
創薬基盤推進研究事業

疾患多発家系集積データと
大規模ジェノタイピングを併用した
新規糖尿病発症原因遺伝子の同定と
テーラーメイド医療への応用

平成 20 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 稲垣暢也

平成 21(2009)年 4 月

目 次

I. 総括研究報告	1
疾患多発家系集積データと大規模ジェノタイピングを併用した 新規糖尿病発症原因遺伝子の同定とテーラーメイド医療への応用 稲垣 暢也	
II. 分担研究報告	
1. 糖尿病多発家系データの集積およびゲノム解析 による糖尿病感受性遺伝子の同定に関する研究 長嶋 一昭	6
2. 糖尿病の家系を用いたゲノム解析および 住民コホートをを用いた研究 小泉 昭夫	9
3. 1万人ゲノムコホートをを用いた日本人糖尿病 感受性候補遺伝子の検証に関する研究 松田 文彦	16
4. 糖尿病多発家系の検索および臨床データの 収集に関する研究 池田 正毅	20
5. 糖尿病家族歴濃厚症例の検索および臨床データ の収集に関する研究 岡本 元純	23
6. 3世代以上にわたる日本人糖尿病多発家系の 検索および臨床データの収集に関する研究 矢野 秀樹	26
7. 糖尿病家族歴濃厚家系の検索と臨床データの 集積に関する研究 山本 泰三	29
8. 日本人糖尿病多発家系の検索およびデータ 収集に関する研究 水野 展寿	31
9. 新規糖尿病感受性遺伝子同定のための日本人 糖尿病多発家系検索および臨床データ収集に関する研究 安田 浩一朗	33
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	35
IV. 研究成果の刊行物・別刷	43

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
総括研究報告書

疾患多発家系集積データと大規模ジェノタイピングを併用した
新規糖尿病発症原因遺伝子の同定とテーラーメイド医療への応用

研究代表者 稲垣 暢也 京都大学医学研究科 糖尿病・栄養内科学教授

研究要旨： 代表的な生活習慣病である糖尿病について幾つか疾患発症原因遺伝子が報告されている。しかしながら発症原因遺伝子の多くは未同定のままである。大規模ゲノム領域解析が可能となった背景と大規模ゲノムデータ収集基盤を基に、糖尿病多発家系を多数蓄積した上で連鎖解析およびハプロタイプ解析により候補遺伝子の絞込みを行い、より効率的に糖尿病発症原因候補遺伝子を同定し、その上で該当遺伝子異常に関する機能解析および地域と連携した複数のコホートデータベースをもとにCase-Control解析を行うことにより、日本人糖尿病発症原因遺伝子の同定と病態形成メカニズムの解明を行う。

分担研究者

長嶋 一昭	京都大学医学研究科 助教	矢野 秀樹	彦根市立病院 糖尿病・内分泌科診療局長
小泉 昭夫	京都大学医学研究科 教授	山本 泰三	京都桂病院 内分泌・糖尿内科部長
松田 文彦	京都大学医学研究科附属 ゲノム医学センター 教授	水野 展寿	滋賀県立成人病センター 糖尿病内分泌科部長
池田 正毅	正名会池田病院 院長	安田 浩一朗	大阪府済生会野江病院 内科(糖尿病・内分泌)部長
岡本 元純	大津赤十字病院 副院長		

A. 研究目的

近年の糖尿病の激増は深刻な社会問題である。2007年国民健康・栄養調査では、本邦における糖尿病および予備軍は推計2210万人に達し、1997年調査時から10年間で約1.6倍に急増している。2型糖尿病発症は環境因子と複数の遺伝的変異との相互作用に起因し、発症原因遺伝子の多くは未同定であり、同定された原因遺伝子に関しても異常を有する頻度に人種差が報告されているため、日本人におけるその実態解明は急務である。従来は疾患候補遺伝子探索手法として主に、頻度の高いSNPsを用いた相関解析によるCase-Control研究手法が用いられてきており、最近、英国、米国、フィンランド、アイスランド、フランスなどで2型糖尿病におけるゲノムワイドアソシエーションスタディの報告がなされた（Science 2007, Nature 2007, Nat. Genet. 2007）。しかしながら、いずれの報告においても、疾患との相関が示されたのみで、疾患原因遺伝子の同定までは至っていないのが現状である。これら解析手法の方法論的限界を鑑み、本研究では、疾患（糖尿病）多発家系を集積し、検体収集することにより、糖尿病発症の遺伝子要因の濃縮された条件下での遺伝学的解析を行うことにより、最終的に日本人における糖尿病発症関連遺伝子同定に貢献することを目的とする。

B. 研究方法

平成20年度研究計画に沿って、糖尿病家族歴濃厚家系の集積と連鎖解析を推進し、候補遺伝子の絞り込みを行った。本研究における新規糖尿病発症原因遺伝子を同定す

るための手順は、大別して1. 糖尿病家族歴濃厚家系の収集、2. ゲノム解析、3. 候補遺伝子の検証の3段階に分けられ、各々以下の手法を用いた。

1. 糖尿病家族歴濃厚家系の収集

京都大学医学部附属病院（長嶋、稲垣）および研究分担者所属病院（池田、岡本、矢野、山本、水野、安田）の外来通院中または入院中の3世代以上にわたり糖尿病患者を有する糖尿病家族歴濃厚家系を問診等の聞き取り調査により抽出し、本人および親族への、本研究参加・協力に関する意志の確認を行い、京都大学大学院医学研究科・医学部医の倫理委員会および各医療機関の倫理委員会で承認された「ヒト遺伝子研究への協力についての意志の確認書」を用いた文書による研究参加の承諾を得た。承諾を得られた患者および親族に関して一般臨床所見の収集およびゲノムDNA抽出のための採血を行い、医療機関に通院していない親族等に対しては、ゲノムDNA抽出用採血とともに糖尿病関連検査を含む一般採血検査を行い耐糖能を評価した。

2. ゲノム解析

上記収集検体から抽出したゲノムDNAを用いて連鎖解析を行い、糖尿病感受性遺伝子群の絞り込みを行った。連鎖解析は、各単一家系内検体のみでの解析と多家系集積検体を用いた解析を行い、各々で、「常染色体優性」、「locus heterogeneity」を仮定した解析」および「遺伝様式を仮定しないnonparametric解析」の3様式で解析を行った（小泉、長嶋）。全ゲノムの連鎖解析が終了した家系で、有意な連鎖が認められた領域に関して、fine mappingを行い領域の絞り込みを行った。

3. 候補遺伝子の検証

候補遺伝子の検証方法として、「in vitro 解析」と「日本人ゲノムコホートデータを用いた Case-Control 解析」を行う。

a) in vitro 解析

上記ゲノム解析にて絞り込まれた候補遺伝子異常に関して、培養細胞などを用いて機能修飾（変化）を検討予定である（長嶋、稲垣）。

b) 日本人ゲノムコホートデータを用いた Case-Control 解析

今後の日本人ゲノムコホートデータを用いた検証のため、長浜0次コホート(1万人を対象にしたゲノム疫学コホート事業)、秋田県能代市のコホート(3500名の地域住民のコホート)および岐阜県旧丹生川村のコホート(約950名の地域住民のコホート)のデータを収集・整理し、ゲノムデータ集積基盤を固める。今後、候補遺伝子に関して糖尿病患者および非糖尿病患者各々約500名による Case-Control 解析を行う予定である(小泉、松田、長嶋、稲垣)。

(倫理面への配慮)

本研究はヘルシンキ宣言に基づき行われている。京都大学大学院医学研究科・医学部医の倫理委員会において承認を受けており(承認番号G-149およびG-267)、分担研究者所属の各医療機関における倫理委員会での承認も受けている。検体は匿名化(記号化)により個人情報保守の厳守を徹底している。また、京都大学医学部附属病院遺伝子診療部における遺伝子カウンセリングを含む患者フォローアップ体制を確立している。

C. 研究結果

当初の計画通り平成20年度は、京都大学医学部附属病院および関連病院において、3世代にわたる糖尿病患者を有する家系の調査を行い、30家系(100名)以上の研究参加の承諾を得、採血を行った。5家系については、連鎖解析が完了した。5家系での連鎖解析の結果、染色体1番に有意な連鎖を認めた(LOD Score 2.19, NPL Score 4.66; $p < 0.0004$)。さらに同領域に関して、1cMの解像度で fine-mapping を行い連鎖領域を絞り込み、連鎖領域を marker D1S238-marker D1S425 までの 23Mb に絞りこんだ。現在、絞り込まれた候補領域中に存在する遺伝子群から、候補遺伝子を選択し、両端 100bp をふくむ全エクソンの配列の決定が順次進行中である。

一方、コホートのデータベース整理に関しては、従来から進めている1万人を対象にしたゲノム疫学コホート事業(ながはま0次予防コホート事業)に加えて、すでにコホートが進行している秋田県能代市(能代コホート)および岐阜県高山市(丹生川村コホート)の協力を受け、ゲノムデータ集積基盤を固めている。秋田県能代市では、1998年にコホートがスタートし、10年間におよび約3500人の健診データおよび血液検体が、岐阜県高山市では2004年にコホートがスタートし、約1000名の臨床情報および血液検体が保存・管理されている。既に京都大学での倫理委員会での承認は完了し、市長との懇談で、新たに「体質予防プロジェクト」として我々と共同して取り組むよう要請を受けている。今後、住民への研究協力および検体使用の承諾書の取得作業を進めていく予定である。丹生川村コホートでは2002年からの追跡が完了し、現在、デ

一タの入力作業を行っている。既に入力の完了している 2002~2004 年のデータを用いた解析では、年齢、体重増加が糖尿病発症リスク要因であることが見いだされ、経年的に大きく HbA_{1c} が増加する感受性の高い個体が見いだされ、これらの高感受性者は遺伝子解析の候補と考えられた。

また、候補遺伝子に関する検証作業は、今後の遺伝子絞り込み後、順次施行予定である。先行研究の新生児および成人発症糖尿病の原因遺伝子であることが判明した K_{ATP} チャネル (Kir6.2 および SUR1) 遺伝子異常に関して、同遺伝子上の未報告の変異部位を同定し、*in vitro* 機能解析により、同遺伝子異常により ATP 感受性の減弱、チャネル活性上昇、細胞膜面へのチャネル発現量低下など遺伝子変異によるチャネル機能異常を明らかにした (長嶋、稲垣)。

D. 考察

3 世代以上にわたる糖尿病家族歴を有する遺伝的負荷濃厚症例の解析により、従来から行われている GWAS での解析に比べ、小規模の検体数で、より効率的な疾患発症原因遺伝子の絞り込みができるものと思われる。また単一家系内検体のみでの解析と多家系集積検体を用いた解析を各々行うことにより、前者はより MODY 様の単一遺伝子異常による糖尿病発症原因遺伝子を、後者はより多因子異常による糖尿病発症感受性遺伝子を絞り込むことができるものと考えている。

E. 結論

3 世代以上にわたる糖尿病家族歴濃厚家系の調査を行い、9 家系、100 名以上の研究参加の承諾を得た。5 家系については、連

鎖解析が完了し、連鎖解析の結果、染色体 1 番に有意な連鎖を認めた。fine-mapping を行い連鎖領域を絞り込み、現在、絞り込まれた候補領域中に存在する遺伝子群における解析を進行中である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Funakoshi S, Fujimoto S, Hamasaki A, Fujiwara H, Fujita Y, Ikeda K, Hamamoto Y, Hosokawa M, Seino Y, Inagaki N. Analysis of factors influencing pancreatic beta-cell function in Japanese patients with type 2 diabetes: association with body mass index and duration of diabetic exposure. **Diabetes Res Clin Pract.** 82(3):353-8, 2008

2. Naitoh R, Miyawaki K, Harada N, Mizunoya W, Toyoda K, Fushiki T, Yamada Y, Seino Y, Inagaki N. Inhibition of GIP signaling modulates adiponectin levels under high-fat diet in mice. **Biochem Biophys Res Commun.** 376(1):21-5, 2008

3. Matsumura Y, Ban N, Inagaki N. Aberrant catalytic cycle and impaired lipid transport into intracellular vesicles in ABCA3 mutants associated with nonfatal pediatric interstitial lung disease. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.** 295(4):L698-707, 2008

4. Harada N, Fukushima M, Toyoda K, Mitsui R, Izuka T, Taniguchi A, Nakai Y, Yamada Y, Seino Y, Inagaki N. Factors responsible for elevation of 1-h postchallenge plasma glucose levels in Japanese men. **Diabetes Res Clin Pract.** 81(3):284-9, 2008

5. Sassa M, Yamada Y, Hosokawa M, Fukuda K, Fujimoto S, Toyoda K, Tsukiyama K, Seino Y, Inagaki N. Glycemic instability in type 1 diabetic patients: Possible role of ketosis or ketoacidosis at onset of diabetes. **Diabetes Res Clin Pract.** 81(2):190-5, 2008

6. Kominato R, Fujimoto S, Mukai E, Nakamura Y, Nabe K, Shimodaira M, Nishi Y, Funakoshi S, Seino Y, Inagaki N. Src activation

generates reactive oxygen species and impairs metabolism-secretion coupling in diabetic Goto-Kakizaki and ouabain-treated rat pancreatic islets. **Diabetologia**. 51(7):1226-35, 2008

7. Yamada K, Hosokawa M, Yamada C, Watanabe R, Fujimoto S, Fujiwara H, Kunitomo M, Miura T, Kaneko T, Tsuda K, Seino Y, Inagaki N. Dietary corosolic acid ameliorates obesity and hepatic steatosis in KK-Ay mice. **Biol Pharm Bull**. 31(4):651-5, 2008

8. Aramaki Y, Mitsuoka H, Toyohara M, Jinnai T, Kanatani K, Nakajima K, Mukai E, Yamada Y, Kita T, Inagaki N, Kume N. Lectin-like oxidized LDL receptor-1 (LOX-1) acts as a receptor for remnant-like lipoprotein particles (RLPs) and mediates RLP-induced migration of vascular smooth muscle cells. **Atherosclerosis**. 198(2):272-9, 2008

9. Fujita Y, Fukushima M, Suzuki H, Taniguchi A, Nakai Y, Kuroe A, Yasuda K, Hosokawa M, Yamada Y, Inagaki N, Seino Y. Short-term intensive glycemic control improves vibratory sensation in type 2 diabetes. **Diabetes Res Clin Pract**. 80(1):e16-9, 2008

10. Fujiwara H, Hosokawa M, Zhou X,

Fujimoto S, Fukuda K, Toyoda K, Nishi Y, Fujita Y, Yamada K, Yamada Y, Seino Y, Inagaki N. Curcumin inhibits glucose production in isolated mice hepatocytes. **Diabetes Res Clin Pract**. 80(2):185-91, 2008

11. Toyoda K, Okitsu T, Yamane S, Uonaga T, Liu X, Harada N, Uemoto S, Seino Y, Inagaki N. GLP-1 receptor signaling protects pancreatic beta cells in intraportal islet transplant by inhibiting apoptosis. **Biochem Biophys Res Commun**. 367(4):793-8, 2008

12. Yamada K, Hosokawa M, Fujimoto S, Fujiwara H, Fujita Y, Harada N, Yamada C, Fukushima M, Ueda N, Kaneko T, Matsuyama F, Yamada Y, Seino Y, Inagaki N. Effect of corosolic acid on gluconeogenesis in rat liver. **Diabetes Res Clin Pract**. 80(1):48-55, 2008

2. 学会発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
分担研究報告書

糖尿病多発家系データの集積およびゲノム解析による糖尿病感受性遺伝子の同定
に関する研究

研究分担者 長嶋 一昭 京都大学医学研究科糖尿病・栄養内科学助教

研究要旨： 2型糖尿病発症は環境因子と複数の遺伝的変異との相互作用に起因し、疾患家族集積性が強いことから生活習慣病のなかでも遺伝的負荷が高い疾患であると考えられる。ゲノムワイドアソシエーションスタディ（GWAS）による2型糖尿病感受性遺伝子に関する報告がなされてきたがいずれも疾患との相関が示されたのみで、糖尿病感受性遺伝子の多くは未同定であると考えられる。GWASの方法論的限界を鑑み、糖尿病多発家系を集積することにより疾患発症遺伝子要因が濃縮された条件下での遺伝学的解析を行った。3世代以上にわたり糖尿病患者を有する糖尿病家族歴濃厚家系、8家系の検体収集をおこない、連鎖解析により相関する遺伝子領域を23Mbまで絞り込み、その領域に属する遺伝子群について糖尿病発症との関連性を検討中である。

A. 研究目的

2型糖尿病発症は環境因子と複数の遺伝的変異との相互作用に起因し、発症原因遺伝子の多くは未同定である。同定された原因遺伝子に関しても異常を有する頻度に入種差が報告されており、日本人における実態解明は急務である。糖尿病発症原因遺伝子の同定に関して、頻度の高いSNPsを用いた相関解析によるCase-Control研究手法が頻用され、最近、海外でも2型糖尿病におけるゲノムワイドアソシエーションスタディの報告（Science 2007, Nature 2007, Nat. Genet. 2007等）がなされたが、いずれも疾患との相関が示されたのみで、疾患原因遺伝子の同定までは至っていない。同手法の方法論的限界を鑑み、今回、疾患（糖尿病）多発家系を集積し、検体収集することにより、疾患発症の遺伝子要因の濃縮された条件下での遺伝学的解析を行い、新規

糖尿病発症原因遺伝子を同定することを目的とする。

B. 研究方法

京都大学糖尿病・栄養内科外来通院中または入院中の糖尿病関連自己抗体陰性の糖尿病患者の中で、3世代以上にわたり糖尿病患者を有する糖尿病家族歴濃厚家系を問診等の聞き取り調査により抽出し、本人および親族への、本研究参加・協力に関する意志の確認を行い、京都大学大学院医学研究科・医学部医の倫理委員会で承認された「ヒト遺伝子研究への協力についての意志の確認書」を用いた文書による研究参加の承諾を得た。承諾を得られた患者および親族に関して一般臨床所見の収集およびゲノムDNA抽出のための採血を行い、医療機関に通院していない親族等に対しては、ゲノムDNA抽出用採血とともに糖尿病関連検査

を含む一般採血検査を行い耐糖能を評価した。収集された検体を用いて、小泉昭夫教授（分担研究者）とともに連鎖解析をおこなった。常染色体およびX染色体にわたる全ゲノムワイドの連鎖解析は、平均10cM間隔でMicrosatellite markers を用い、合計で340markersでtyping を行った。遺伝解析はGenehunterを用いて行った。有意な連鎖が認められた領域に関しては更なるfine-mappingにより候補領域の絞り込みを行った。絞り込まれた領域内に存在する遺伝子群に関して配列決定を行い変異を検索した。

（倫理面への配慮）

本申請研究は、ヘルシンキ宣言に基づき行われている。京都大学大学院医学研究科・医学部医の倫理委員会に解析申請書提出・承認を受けており（承認番号G-149、G-267）、検体は匿名化（記号化）により個人情報保守の厳守を徹底している。遺伝子カウンセリングを含む患者フォローアップ体制を確立している。

C. 研究結果

3 世代以上にわたり糖尿病患者を有する糖尿病家族歴濃厚家系を京都大学糖尿病・栄養内科外来通院中または入院中の患者から抽出し研究参加に関する説明を行い、8 家系、約 100 名に関して「ヒト遺伝子研究への協力についての意志の確認書」を用いた文書による研究参加の承諾を得た。4 家系については、連鎖解析が完了した。これら 4 家系を含む本研究組織全体で集積し得た家系群の中の 5 家系に関して、parametric および nonparametric 連鎖解析を行った。その結果、染色体 1 番に LOD Score 2.19, NPL Score 4.66 ($p < 0.0004$) の

有意な連鎖を認めた。fine-mapping を行い連鎖領域を更に絞り込み、連鎖領域を、marker D1S238-marker D1S425 までの 23Mb に絞りこんだ。この領域に存在する遺伝子群のなかにアディポネクチン受容体の 1 つであり、アディポネクチンによる脂肪燃焼や糖取り込み促進作用の伝達に関与する *ADIPOR1* が存在するため、5 家系の発端者検体での配列決定を行い、promoter 領域に未報告の SNPs を見いだした。*ADIPOR1* 以外の候補遺伝子に関する検証作業は、順次施行予定である。また、先行研究にて新生児および成人発症糖尿病の原因遺伝子であることが判明した *KATP* チャネル (*Kir6.2* および *SUR1*) 遺伝子異常に関して、同遺伝子上の未報告の変異部位を同定し、電気生理学的手法（パッチクランプ法）および共焦点レーザー顕微鏡などを用いた *in vitro* 機能解析により、同遺伝子異常により ATP 感受性の減弱、チャネル活性上昇、細胞膜面へのチャネル発現量低下など遺伝子変異によるチャネル機能・発現異常を明らかにした。

D. 考察

糖尿病発症関連遺伝子同定に関して、これまで本研究のように家族歴濃厚家系検体を基盤とした遺伝学的解析報告はなく、更に、本研究では日本人症例を対象とすることから、日本人糖尿病発症の遺伝的背景を検討する極めて有望な手法であると考えられる。今後も解析の基盤となる糖尿病家族歴濃厚家系の集積が重要と考えられる。ゲノム解析で絞り込まれた疾患感受性候補遺伝子に関して、疾患発症に関する妥当性を確立するための *in vitro* 解析等による詳細

な検証作業が、今後の課題として重要であると思われる。

E. 結論

日本人糖尿病発症原因遺伝子同定のため、家族歴濃厚家系の収集を行った。3世代にわたり糖尿病患者を有する糖尿病家族歴濃厚家系、8家系、約100名の検体収集をおこなった。連鎖解析により遺伝子領域を23Mbまで絞り込み、その領域に属する糖代謝に関わる遺伝子に関して糖尿病発症との関連を検討中である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1. 龍岡久登, 榎葉孝弘, 長嶋一昭, 野村由紀, 菅野美和子, 浜本芳之, 稲垣暢也. 入院食事管理によりインスリン1日54単位および経口血糖降下薬併用療法から離脱できた2型糖尿病の一症例. 第12回日本病態栄養学会総会, 2009年1月10-11日, 京都

2. 井田めぐみ, 和田啓子, 池田香織, 黒田美代子, 幣憲一郎, 松原亜海, 菅野美和子, 野村由紀, 山田千積, 長嶋一昭, 藤本新平, 稲垣暢也. 糖尿病患者の身体活動量および3メッツ未満の低強度の身体活動量と身体組

成に関する検討. 第12回日本病態栄養学会総会, 2009年1月10-11日, 京都

3. 長嶋一昭, 佐々木真弓, 中村靖彦, 桑村尚充, 河崎祐貴子, 稲垣暢也. Kir6.2 遺伝子異常糖尿病の遺伝子変異部位による薬剤反応性変化に関する検討. 第3回トランスポーター研究会年会, 2008年6月8日, 京都

4. 長嶋一昭, 佐々木真弓, 中村靖彦, 桑村尚充, 河崎祐貴子, 稲垣暢也. Kir6.2 遺伝子異常糖尿病での遺伝子変異部位の違いによる薬剤反応性変化についての比較検討. 第51回日本糖尿病学会, 2008年5月22-24日, 東京

5. 河崎祐貴子, 山田祐一郎, 向英里, 中村靖彦, 長嶋一昭, 原田範雄, 豊田健太郎, 清野裕, 稲垣暢也. ラバマイシンによる膵β細胞のアポトーシスは Exendin-4 により抑制される. 第51回日本糖尿病学会, 2008年5月22-24日, 東京

6. 長嶋一昭. インスリン分泌と栄養シグナルに関する検討. シンポジウム糖尿病, 2008年4月19日, 東京

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

糖尿病の家系を用いたゲノム解析および住民コホートをを用いた研究

研究分担者 小泉 昭夫 京都大学医学研究科環境衛生学教授

研究要旨： 糖尿病は、家族集積性が知られており、遺伝的負荷が高い疾患と考えられる。我々は、①遺伝的感受性要因の同定のため遺伝的要因が強いと考えられる家系に連鎖解析を行い感受性遺伝子を見出し、②この同定された感受性遺伝子について、コホートでの検証とともに Population attributable risk をもとめ、今後の糖尿病の予防あるいは創薬に資する知見を得る戦略を採用する。我々は、上記戦略に基づき、遺伝的負荷の高い 3 世代にわたり糖尿病に罹患している 9 家系を収集した。その内既に 5 家系で連鎖解析は終了し、有意な遺伝子座として Ch1q24-q42 に遺伝子座を認めた。Fine mapping を行い、23Mb にまで絞り込んだところ、ADIPOR1 がその領域に存在したため promoter, 全 coding exon の配列決定を行い未報告の SNPs を promoter 領域に認めた。今後の機能解析を行うとともにコホートでの関連研究を通じ検証を行う。

一般人口での関連研究のため 2 つのコホートを追跡しているが、その内既に 8 年間の観察が終了した岐阜県旧丹生川村のコホートで、HbA_{1c} が著しく経年的に増加する感受性の高い集団を見出した。これらの感受性個体は今後の nested case-control 遺伝子解析の候補になると考えられる。

A. 研究目的

糖尿病の激増は深刻な社会問題である。2型糖尿病発症は環境因子と複数の遺伝的変異との相互作用に起因する。発症原因遺伝子の多くは未同定のままであり、同定された原因遺伝子に関しても異常を有する頻度に人種差が報告されている。本研究は、多数の家族歴濃厚家系を用いて連鎖解析を行い、糖尿病感受性遺伝子群を同定し、住民コホートをを用いて人口寄与率を評価し、介入予防に有効な遺伝子を見出すことを目的とする。

多くの国々で行われている遺伝疫学研究では、複数の共同機関が参加し多数の患者と対照を用いた、関連研究が行われているが、その理論的根拠は” Common

variant, Common disease” 仮説に基づいている。一方、MODYのような遺伝的な負荷が濃厚な家系を分析することにより、原因となる Rare variant が原因遺伝子に見いだされ、この遺伝子の多型が集団の糖尿病の感受性遺伝子となる場合も想定できる (“ Rare variants, multiple genes, common disease” 仮説)。我々は後者のアプローチにより、糖尿病の感受性遺伝子を検出することを目指す。

B. 研究方法

遺伝的負荷の濃厚な家系の収集：京都大学医学研究科・糖尿病・栄養内科学および関連共同施設で、3 世代以上にわたる糖尿病家系を見出し、患者に参加協力を依頼する。

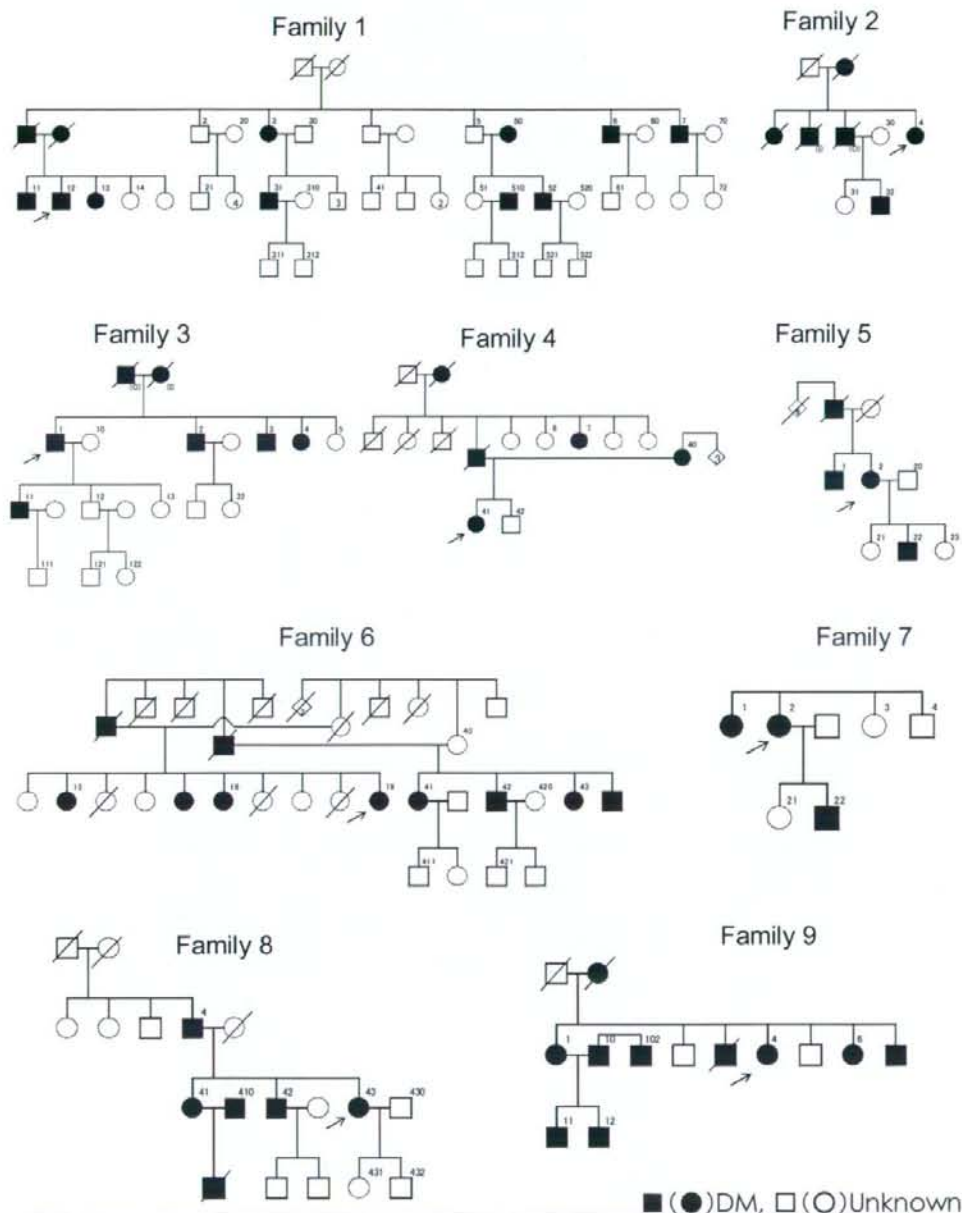


図 1. 3 世代にわたる糖尿病家系 9 家系の家系図

一般人口での検証：長浜 0 次コホートは、追跡に時間がかかるため、2 つの既に追跡を開始しているコホートで検証を予定している。第 1 のコホートは、秋田県能代市のコホートであり、1998年に3500名の地域住

民のコホート立ち上げ、現在追跡中である。このコホートの結果を2009年にまとめる。既に能代市長に面談し、市からの協力をいただいております。追跡のための事前準備は終了した。

表1. 参加9家系の特徴

		年齢	発症年齢	BMI	HbA1C(%)
全参加者	(n=90)	56.0±18.8		23.2±4.2	6.18±1.55
発症者	(n=45)	63.6±11.8	51.0±14.5	23.6±4.9	7.20±1.57
	男(n=23)	61.0±14.4	48.4±14.6	22.3±2.8	6.67±1.18
	女(n=22)	66.4±7.5	53.8±14.4	24.9±6.2	7.76±1.75
非発症者	(n=45)	48.6±21.4		22.8±3.5	5.16±0.52
	男(n=22)	43.8±22.6		23.3±2.8	5.30±0.67
	女(n=23)	53.2±19.6		22.5±4.1	5.02±0.30

(mean±SD)

LOD Score (5 pedigrees)
(Autosomal Dominant)
(Penetrance= 0.1/0.99/0.99)

NPL Score (5 pedigrees)

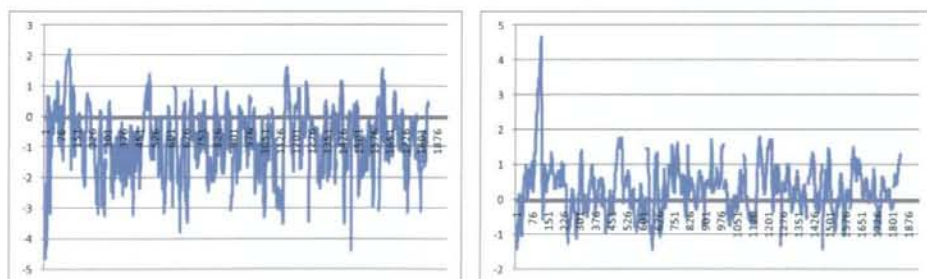


図2. 3世代家系5家系を用いた連鎖解析結果
(左：常染色体優性モデル、右：ノンパラメトリック解析)

第2のコホートは、岐阜県旧丹生川村の約950名からなるコホートであり、2004年にスタートしている（臨床データは2002年から利用できる）。このコホートでは、す

で2004年から5年後の追跡を終了し、合計で2002年から現在までのデータの入力を行っている。

表2. ADIPOR 1に見出されたSNPs

ADIPOR1	position	rs	Hapmap-JPT(AFD-Asian)	SNPs	wild	conNM	ND	KD5	KD6	KD17	KD23	wild
	53420604	16650809	CC 0.667 CT 0.311 TT 0.022	promoter	CC		CT					0.9 0.1
	53420212	new		promoter	TT	TC	TC	TC				0.8 0.2
	53420046	10920535	nd	promoter	GG			GA	GA			0.8 0.2
	53420042	new		promoter	GG			GA		GA		0.8 0.2
	53419993	2363767	nd	promoter	GG	GA			GA		GA	0.8 0.2
	53419940	4989513	AA 0.200 AG 0.444 GG 0.356	promoter	AA		GG				AG	0.7 0.3
	53419895	7523903	GG 0.841 GC 0.159 CC -	promoter	GG			GC		GC		0.8 0.2
	53419247	new		promoter	CC					CT		0.9 0.1
	53419429	new		promoter	TT		TA					0.9 0.1
	53418381	10800688	TT- TC- CC1.000	promoter	TT	CC	CC	CC	CC	CC	CC	0 1
201194130	53417861	7517286	G 0.390 A 0.610(JSA)	IVS2-22	GG	AA	GA	GA	GA	GA	GA	0.5 0.5
	53417855	7529354	A 0.100 G 0.900(JSA)	IVS2-16	AA	AG	GG	GG	GG	AG	GG	0.1 0.9
	53410658	2275738	nd	IVS4-12	AA	AG	GG	AG	AG	AG	GG	0.3 0.7
	53410654	2275737	TT - TG 0.273 GG 0.727	IVS4-8	TT	TG	GG	TG	TG	TG	GG	0.3 0.7
	53405909	new		IVS6+10	GG		GA					0.9 0.1
	53404710	1342387	AA 0.200 AG 0.467 GG 0.333	IVS7-59	AA	AG	AG	AG	AG	AG	GG	0.4 0.6
	53404304	35179235	nd	IVS8-26	TT		TA					0.9 0.1
	53404084	new		ex8 non-coding	CC		CG					0.9 0.1
	53403558	3737684	GG 0.844 AG 0.156 AA -	ex8 non-coding	GG			GA		GA	GA	0.7 0.3
	53401839	2275736	TT 0.833 AT 0.167 AA -	IVS9-137	TT			TA		TA	TA	0.7 0.3
	53401000	new		3'UTR	TT	TG						1 0
	53400672	10581	CC 0.659 CT 0.318 TT 0.023	3'UTR	CC		CT					0.9 0.1

表3. 今回の研究参加する2つのコホート

- 秋田県能代コホート
対象: 3500名
開始: 1998年
- 岐阜県旧丹生川村コホート
対象: 女560名男430名
平均BMI: 女21.8 (2.9)
男22.8 (2.9)
HbA1c 女5.29 (0.50) 男5.34 (0.57)

遺伝解析: 家系解析にあたり、発症者は、(1)糖尿病の診断歴、(2)75gOGTTで糖尿病型、(3)HbA1cが6.1%以上、のいずれかに該当する者と定義した。また、非発症者は、将来の発症する可能性が存在するため、形質は不知(Unknown)として解析した。これらの定義に基づき、9家系(図1)の協力を得た。連鎖解析では、3世代家系であることから、一般的に常染色体優性遺伝形式が仮定できる。そこで、常染色体優性、locus heterogeneityを仮定した解析、遺伝様式を仮定しないnonparametric解析の3様式で解析を行った。

常染色体およびX染色体にわたる全ゲノムワイドの連鎖解析は、平均10cM間隔でMicrosatellite markersを用い、合計で340markersでtypingを行った。遺伝解析

はGenehunterを用いて行った。
(倫理面への配慮)

本研究は京都大学医学研究科「医の倫理委員会」の承認を得ており、すべての研究はヘルシンキ宣言に基づき行われている。

C. 研究結果

3世代家系: 表1に参加9家系の平均年齢(SD)、平均発症年齢、発症者非発症者別および男女別のBMI, HbA1c平均値をまとめた。

9家系での平均発症年齢は、51.0歳である。発症者の男女比は23:22である。

連鎖解析: 上記家系の内、現在まで、5家系の連鎖解析を完了した。解析に際して用いたparametersは、遺伝子頻度=0.01、phenocopy率=0.1、浸透率=0.99である。

5家系での連鎖解析の結果は染色体1番にLOD Score 2.19, NPL Score 4.66 ($p < 0.0004$)の有意な連鎖を認めた(図2)。

有意な連鎖をparametricおよびnonparametric解析で認めたためfine-mappingを行い連鎖領域を絞り込ん

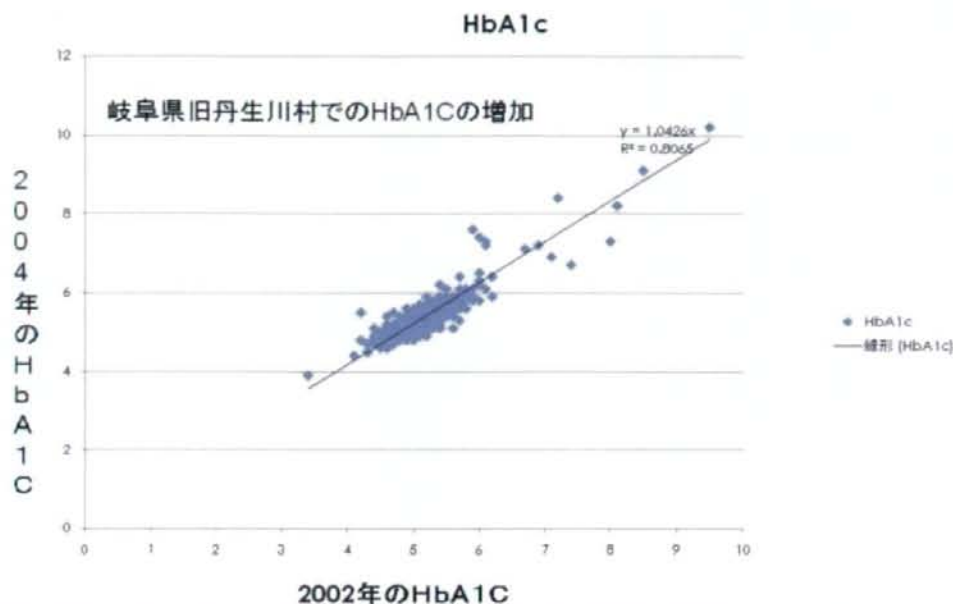


図3. 旧丹生川村コホートにおける2002年と2004年健診時のHbA_{1c}の相関関係

だ。その結果連鎖領域は、marker D1S238-marker D1S425までの23Mbに絞りこまれた。この領域にはADIPOR1が存在するため、5家系の proband の配列決定を行った。その結果、表2に示すよう promoter 領域に未報告のSNPsが見いだされ、今後の機能解析も含めてコホートの評価が必要である。

能代コホートおよび丹生川村コホートのベースラインデータ：

2つのコホートの概要について表3にまとめた。

観察し得た2002-2004年におけるコホートでの2002年(X)および2004年(Y)のHbA_{1c}の相関は、 $Y=1.0426X$ ($r^2=0.8065, p<0.01$)であり(図3)年平均2%程度増加する。この集団の平均が、5.3(%)であることからおおそ年

間に0.1%程度増加することが期待される。しかし、この値は年齢に依存する可能性があるため、年齢ごとに増加を検討した。2年間のHbA_{1c}の増加を初年次参加年齢との相関で見たところ、図4の正の有意な相関を見た。注目すべきことに、3年間の観察でHbA_{1c}が0.5%以上増加した参加者が23名認められた。これらの参加者は、期待される増加に比べてほぼ4.5倍の増加を示し、感受性の高い個体といえよう。

次に体重の変化とHbA_{1c}を見たところ体重の増加率(x) (= (2004年の体重 - 2002年の体重) / 2002年の体重)とHbA_{1c}の増加(y)は弱いながらも正の相関を認めた ($y = 0.9856 X + 0.2262$, $r^2=0.00363, p<0.05$) (図5)。

上記コホートでの観察は、体重増加も糖尿病の感受性を高める要因であることを示し

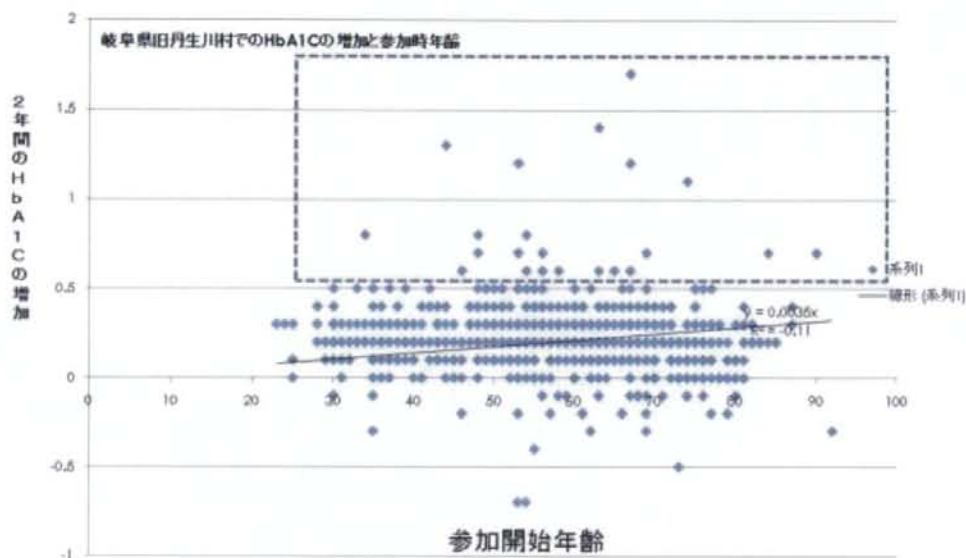
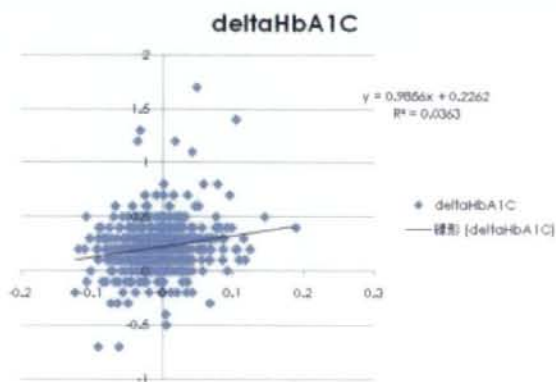


図4. 旧丹生川村コホートにおける参加時年齢と2年間のHbA_{1c}増加量との相関関係

参加時2002年の体重の増加率(X)とその後のHbA_{1c}の増加(Y)



体重の増加率 = (2004年の体重 - 2002年の体重) / 2002年の体重

図5. 旧丹生川村コホートにおける2年間のHbA_{1c}増加量と体重増加量の相関関係

ている。

以上、旧丹生川村のコホートの観察から初年次参加年齢、HbA_{1c}の増加の個体差、

体重増加など要因が明らかになった。これら要因に注目し、長期コホートでの高感受性者に注目し、Nested case-control 相関解

析を行う。

E. 結論

我々は、3世代にわたり糖尿病に罹患する遺伝的負荷の濃厚な家系に注目し遺伝子解析を行った。現在9家系の参加を得たが、全ゲノムの連鎖解析が終了したのはその内5家系であり、有意な連鎖が染色体1番に認められた。Fine mappingを行い領域を絞り込んだところ、marker D1S238-marker D1S425に絞り込まれた。この領域には、肥満の感受性要因であるADIPR1の遺伝子が存在するため、promoter, 全エクソンの配列決定を行った。その結果、promoter 領域に未報告のSNPsが乱された。

またコホートについては、岐阜県丹生川村の2002年からの追跡が完了し、現在データの入力作業を行っている。既に入力の完了している2002-2004年のデータを用いた解析では、年齢、体重増加がリスク要因であることが見いだされ、大きくHbA_{1c}が増加する感受性の高い個体が見いだされた。これら結果から、これらの高感受性者は遺伝子解析の候補と考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Huang L, Toyoshima M, Asakawa A, Inoue K, Harada K, Kinoshita T, Chen S,

Koizumi A. Levels of N-acylethanolamines in O,O,S-trimethylphosphorothioate (OOS-TMP)-treated C57BL/6J mice and potential anti-obesity, anti-diabetic effects of OOS-TMP in hyperphagia and hyperglycemia mouse models. **Pharmacol Biochem Behav.** 92(1):1-5, 2009

2. Hirosawa M, Minata M, Harada KH, Hitomi T, Krust A, Koizumi A. Ablation of estrogen receptor alpha (ER α) prevents upregulation of POMC by leptin and insulin. **Biochem Biophys Res Commun.** 371(2), 320-3, 2008

2. 学会発表

1. 廣澤 倫, 皆田 睦子, 原田 浩二, 人見 敏明, 小泉 昭夫, エストロゲン受容体 α の leptin-POMC 摂食制御機構への関与, 第45回日本糖尿病学会近畿地方会, 2008年11月22日, 神戸

2. 皆田睦子, 原田浩二, 人見敏明, 小泉昭夫, Perfluorooctanoic Acid (PFOA)の胆汁排泄における Mdr2 と PPAR alpha の働き, 第3回トランスポーター研究会, 2008年6月7-8日, 京都

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
分担研究報告書

1万人ゲノムコホートをを用いた日本人糖尿病感受性候補遺伝子の検証に関する研究

研究分担者 松田 文彦 京都大学医学研究科附属ゲノム医学センター
ゲノム情報疫学教授

研究要旨： 京都大学は滋賀県長浜市と協力して1万人規模の日本人ゲノムコホート事業（ながはま0次予防コホート事業）を推進している。本研究では、同ゲノムコホートデータ基盤を背景として、糖尿病家族歴濃厚家系検体を用いた全ゲノムワイドの連鎖解析により絞り込まれた疾患感受性候補遺伝子に関して、日本人における糖尿病発症と各候補遺伝子との関連性に関するゲノム疫学的妥当性に関して検証作業を行う。これにより日本人における糖尿病の遺伝的背景の解明に寄与することを目的としている。

A. 研究目的

糖尿病発症に関わる糖尿病感受性遺伝子の多くは未同定である。また、同定された原因遺伝子に関しても異常を有する頻度には人種差が報告されている。本研究は、最近報告の多いゲノムワイドアソシエーションスタディとは異なり、3世代以上にわたり糖尿病患者を有する日本人糖尿病家族歴濃厚症例を用いた全ゲノムワイドの連鎖解析を用いて絞り込んだ糖尿病感受性候補遺伝子に関して、Case-Control解析を行い、日本人における糖尿病発症との関連性に関して検証を行い、新たな糖尿病感受性遺伝子を同定することを目的とする。

B. 研究方法

京都大学医学部附属病院および研究分担者所属施設で加療中の糖尿病患者で、3世代以上にわたり糖尿病患者を有する糖尿病家族歴濃厚患者（発端者）およびその親族からの提供検体を用いた全ゲノムワイドの連

鎖解析により絞り込まれた糖尿病感受性候補遺伝子に関して、検証作業を行う。検証作業を進めるにあたって、京都大学医学研究科が滋賀県長浜市との協力で進めている、1万人を対象にした日本人ゲノム疫学コホート（ながはま0次予防コホート事業）を整備する。そのデータ基盤をもとに、絞り込まれた糖尿病候補遺伝子に関して、日本人糖尿病患者群および非糖尿病群（各々500名程度）のCase-Control解析を行い、日本人における同遺伝子異常による糖尿病の頻度に関するゲノム疫学的検討を行う。本解析にはTiling arrayを用いる。膨大なデータ管理と解析には、ゲノム医学センター遺伝解析専用データベースを用いる。

（ながはま0次予防コホート事業の概要）

ながはま0次予防コホート事業は、京都大学医学研究科（以下「医学研究科」という）と滋賀県長浜市の協定に基づき、医学研究科長と市長を事業実施者として、

約1万人の長浜市民の協力を得て行う共同事業である。本事業は、生活習慣・環境質問票、血液・尿検査、関連検査などにより得られた情報をベースラインとし、疾病罹患・死亡の追跡調査を行って、遺伝子を含む多様な健康危険因子の影響やそれらの相互作用の解明を目指している。このコホート事業は、特定の疾患に限定したものではなく、参加者の健康情報やゲノムワイド解析を中心とした遺伝子解析により得られる遺伝情報を完備したバイオバンク的な性格を持たせ、出来る限り多くの疾患の解析に利用できること、またゲノムコホート研究の標準的モデルを提供し、将来的に国内外で同様のコホート研究を立ち上げることで、より大規模で質の高いゲノム疫学研究を行うためのモデルケースと位置付けている。本事業の特色は、個別同意を得た地域住民を対象としたコホートとして追跡調査を視野に入れ、各種試料（電子データ、血液・尿検体、質問票含む紙などの媒体）を連結可能匿名化として扱うこと、参加者の健康情報の返却に基づく地域健康づくり活動との連携を調和させることにある。如何なる場合でも「個人情報の保護」を最優先し、長浜市民が社会的な不利益を受けないことを必須と認識して事業を運営する。

現行の「ヒトゲノム遺伝子解析研究に関する倫理指針」では、本事業で取り組む諸課題を明確な形では包含していないため、医学研究科と長浜市は研究倫理に関する独自のルール作りを進めてきた。このルールを「ながはまルール」と呼称し、本事業に携わるすべての者が遵守す

べき事項及び事業の基本的な仕組みを定める「ながはま0次予防コホート事業における試料等の蓄積及び管理運用に関する条例」としてまとめ、2008年6月、長浜市議会で成立した。

（倫理面への配慮）

本申請研究は、ヘルシンキ宣言に基づき行われている。京都大学大学院医学研究科・医学部医の倫理委員会にて承認を受けており、検体は匿名化により個人情報保守の厳守を徹底している。

C. 研究結果

2008年11月下旬より、2009年2月上旬までの期間に国民健康保険加入者を対象に健診事業を行い、約1,200名の参加者の健康情報、血液・尿サンプルの取得による各種バイオマーカーの測定をおこなった。得られた検体と情報は、二重匿名化の後、京都大学医学研究科附属ゲノム医学センターの検体保管庫および専用データベースに蓄積した。これらのゲノム疫学的データベースをもとに、現在、京都大学糖尿病・栄養内科学を中心に進めている糖尿病家族歴濃厚家系を用いた糖尿病感受性遺伝子検索により絞り込まれた候補遺伝子に対する日本人糖尿病患者および非糖尿病患者によるCase-Control解析を施行予定である。

D. 考察

本研究は、対象を糖尿病家族歴濃厚家系に絞ること、日本人を対象にすること、大規模ゲノムコホートデータを用いて検証を行うことに特徴がある。糖尿病発症関連遺伝子同定に関して、これまで本研究のように糖尿病家族歴濃厚家系検体を基盤とした