

200907014A

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21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 稲垣 暢也

平成 22 (2010) 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21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 稲垣 暢也

平成 22 (2010) 年 4 月

目 次

I. 統括研究報告

- 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1
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 京都大学医学研究科 糖尿病・栄養内科学 教授

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5
同定に関する研究
長嶋 一昭 京都大学医学研究科 助教
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用いた研究8
小泉 昭夫 京都大学医学研究科 教授
3. 1万人ゲノムコホート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 京都大学医学研究科附属 ゲノム医学センター 教授14
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18
池田 正毅 正名会池田病院 院長
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21
岡本 元純 大津赤十字病院 副院長
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23
収集に関する研究
矢野 秀樹 彦根市立病院 糖尿病・内分泌科診療局長
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25
山本 泰三 京都桂病院 内分泌・糖尿内科部長
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27
水野 展寿 滋賀県立成人病センター 糖尿病内分泌科部長
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29
臨床データ収集に関する研究
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

III. 研究成果の刊行に関する一覧表32

IV. 研究成果の刊行物・別刷37

I. 統括研究報告

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の発症には、遺伝因子と環境因子が関与する。遺伝因子に関して、これまで幾つか疾患感受性原因遺伝子が報告されているが、発症感受性遺伝子の多くは未同定のままである。また、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である。大規模ゲノム領域解析が可能となった技術的背景と大規模ゲノムデータ収集基盤を基に、糖尿病多発家系を集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、日本人糖尿病感受性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

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ため、日本人におけるその実態解明は急務である。

従来の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、多くの Genome-wide association study (GWAS) の報告がなされているが、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、ほとんどのケース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、3 世代以上にわたる糖尿病家族歴濃厚家系を集積することにより、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い、連鎖解析データに基づいたハプロタイプ解析により、効率的に糖尿病発症原因候補遺伝子を同定することを目的とする。さらに同候補遺伝子に関して日本人におけるゲノム疫学的実態解明を行うこと、さらには遺伝子変異部位に応じた薬剤反応性の変化を検証し、糖尿病治療薬 (SU 薬など) の in vitro 解析による処方前薬効評価の可能性を探り、遺伝子変異部位に応じたテーラーメイド医療への展開への可能性を開くことを目的としている。

B. 研究方法

平成 21 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

当初の計画通り本年度も、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、研究開始時から合計54家系（200名）以上の研究参加の承諾を得、採血を行った。12家系については、連鎖解析が完了した。そのうち9家系で約1cM解像度での fine-mapping を行った。残り3家系でも現在 fine-mapping を開始した。遺伝形式が明確な4家系で連鎖解析を行い、有意な遺伝子座として Ch2p25-p22 に遺伝子座を認めた。更に Fine mapping により、遺伝子座を 23Mb にまで絞り込んだところ、GCKR（glucokinase regulatory protein 遺伝子）がその領域に存在したため、promoter, 全 coding exon の配列決定を行い、稀な SNPs が一般人口に比して家系で有意に多発することを明らかにし、1家系において、GCKR の稀な SNP が疾患の有無と一致することを見いだした。各家系内発端者での検討で MODY 遺伝子（HNF4 α , GCK, HNF1 α , PDX1 および NEURO D1）変異は認めなかった。また、一般人口での相関研究のため、5年間以上にわたっての観察が終了した岐阜県旧丹生川村のコホートを用い、HbA_{1c}の上昇と GCKR の多型に有意な関連を見いだした。

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られる。

E. 結論

3 世代以上にわたる糖尿病家族歴濃厚家系の集積を行い、54 家系、200 名以上の検体収集を行った。遺伝形式が明確な 4 家系で連鎖解析 5 家系の連鎖解析が完了し、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、ゲノムコホートによる Case-Control 解析を経て、最終的に *GCKR* を糖尿病発症感受性遺伝子として絞り込んだ。現在、他の家系を用いた同様な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. Park SK, Amos L, Rao A, Quasney MW, Matsumura Y, Inagaki N, Dahmer MK. Identification and Characterization of a Novel ABCA3 Mutation. **Physiol Genomics**. 2010 (in press)
2. Fujita Y, Hosokawa M, Fujimoto S, Mukai E, Abudukadier A, Obara A, Ogura M, Nakamura Y, Toyoda K, Nagashima K, Seino Y, Inagaki N. Metformin suppresses hepatic gluconeogenesis and lowers fasting blood glucose levels through reactive nitrogen species in mice. **Diabetologia**.2010(in press)
3. Ogura M, Nakamura Y, Tanaka D, Zhuang X, Fujita Y, Obara A, Hamasaki A, Hosokawa

M, Inagaki N. Overexpression of SIRT5 confirms its involvement in deacetylation and activation of carbamoyl phosphate synthetase 1. **Biochem Biophys Res Commun**. 393(1):73-8, 2010

4. Toyama K, Yonezawa A, Tsuda M, Masuda S, Yano I, Terada T, Osawa R, Katsura T, Hosokawa M, Fujimoto S, Inagaki N, Inui K. Heterozygous variants of multidrug and toxin extrusions (MATE1 and MATE2-K) have little influence on the disposition of metformin in diabetic patients. **Pharmacogenet Genomics**. 20(2):135-8, 2010
 5. Shimodahira M, Fujimoto S, Mukai E, Nakamura Y, Nishi Y, Sasaki M, Sato Y, Sato H, Hosokawa M, Nagashima K, Seino Y, Inagaki N. Rapamycin impairs metabolism-secretion coupling in rat pancreatic islets by suppressing carbohydrate metabolism. **J Endocrinol**. 204(1):37-46, 2010
 6. Mukai E, Toyoda K, Kimura H, Kawashima H, Fujimoto H, Ueda M, Temma T, Hirao K, Nagakawa K, Saji H, Inagaki N. GLP-1 receptor antagonist as a potential probe for pancreatic beta-cell imaging. **Biochem Biophys Res Commun**. 389(3):523-6, 2009
 7. Liu X, Harada N, Yamane S, Kitajima L, Uchida S, Hamasaki A, Mukai E, Toyoda K, Yamada C, Yamada Y, Seino Y, Inagaki N. Effects of long-term dipeptidyl peptidase-IV inhibition on body composition and glucose tolerance in high fat diet-fed mice. **Life Sci**. 84(25-26):876-81, 2009
- ##### 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

II. 分担研究報告

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。Genome-wide association study (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、多くの糖尿病感受性遺伝子は未同定であると考えられる。GWAS の方法論的限界を鑑み、昨年度に引き続き糖尿病多発家系を集積することによる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、分担研究者・研究協力者とともに累計 54 家系 200 名以上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絞り込み、最終的に糖尿病発症に関与が推測される候補遺伝子として GCKR を絞り込んだ。同定された GCKR 上の遺伝子変異による機能障害の機序に関して現在検討中である。

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人種差が報告されており、近年の糖尿病の激増する現状から、日本人における糖尿病感受性遺伝子の実態解明は急務である。糖尿病感受性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 GWAS の報告が多数なされたが、いずれも疾患との相関が示されたのみで、ほとんどの場合、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、分担研究者・研究協力者等とともに昨年度から継続して糖

糖尿病多発家系を集積し、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、効率的に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。収集されたゲノムDNAを用いて、分担研究者小泉昭夫教授、研究協力者（田中、穂友）ら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。絞り込まれた候補領域内に存在する遺伝子群に関して、データベースを用いた手法(Endeavour)にて順位付けし、順位の高い遺伝子から優先的に塩基配列決定することで、糖尿病発症原因と考えられる変異を検索した。候補遺伝子に関して、順次、プロモーターおよびエクソンの塩基配列決定を行った。最終的にコホートを用いたCase-Control解析により、同遺伝子を糖尿病感受性遺伝子として絞り込んだ。

(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、累計54家系、約200名以上に「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て、血液検体を採取し12家系については、連鎖解析が完了した。

先行解析した4家系を用いた全ゲノムパラメトリック連鎖解析において、高いLODスコアを示した2領域に対してファインマッピングを行ったところ、1領域のLODスコアが有意水準に達する3.47に上昇した。同領域に関してハプロタイプ解析を行い、25Mbにわたる領域を糖尿病感受性遺伝子が存在する候補領域として絞り込んだ。候補領域中の遺伝子群について、既知の糖尿病発症原因遺伝子群と機能や発現様式について関連が深いものをEndeavourにて順位付けした結果、*GCKR*が最も強い関連を示した。同遺伝子について各家系患者においてプロモーターおよびエクソンの塩基配列決定を行った結果、集積家系中の最大家系（患者9名）において、糖尿病発症の有無と一致する変異が*GCKR*エクソン領域に見いだされた。変異を正常対照者50名において調べたところ検出されず、本遺伝子変異は稀な変異であることが確認された。最終的にコホートを用いたCase-Control解析により、同遺伝子を糖尿病感受性遺伝子として絞り込んだ。今後、本遺伝子変異により何らかの蛋白機能異常が惹起されるか否かを検証予定である。

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、54 家系、約 200 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絞り込み、Endeavor を用いて優先順位を決定し、最終的に *GCKR* を絞り込んだ。今後、*in vitro* での機能解析行う予定である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Fujita Y, Hosokawa M, Fujimoto S, Mukai E, Abudukadier A, Obara A, Ogura M, Nakamura Y, Toyoda K, Nagashima K, Seino Y, Inagaki N. Metformin suppresses hepatic gluconeogenesis and lowers fasting blood glucose levels through reactive

nitrogen species in mice. **Diabetologia**. 2010 (in press)

2. Shimodahira M, Fujimoto S, Mukai E, Nakamura Y, Nishi Y, Sasaki M, Sato Y, Sato H, Hosokawa M, Nagashima K, Seino Y, Inagaki N. Rapamycin impairs metabolism-secretion coupling in rat pancreatic islets by suppressing carbohydrate metabolism. **J Endocrinol**. 204(1):37-46, 2010

2. 学会発表

1. Takagi T, Furuta H, Miyawaki M, Nagashima K, Nishi M, Sasaki H, Inagaki N, Yoshikawa N, Nanjo K. A P1198L mutation in *ABCC8* gene decreases ATP sensitivity of the K_{ATP} channel and causes permanent neonatal diabetes. The 11th Symposium on Molecular Diabetology in Asia. 2009.12.19. Taipei, TAIWAN.
2. 渋谷由紀、木戸良明、浅原俊一郎、松田友和、竹田章彦、井上 妙、小柳真希、長嶋一昭、清野 進、春日雅人 「2 型糖尿病候補遺伝子 *KCNQ1* の膵 β 細胞に及ぼす役割の検討」 第 52 回日本糖尿病学会総年次学術集会, 2009 年 5 月 21-24 日, 大阪
3. 長嶋一昭, Pascal Beguin, Walter Hunziker, 稲垣暢也. 「新規電位依存性 Ca^{2+} チャネル調節因子の同定および膵 β 細胞インスリン分泌調節への影響に関する検討」 第 52 回日本糖尿病学会総年次学術集会, 2009 年 5 月 21-24 日, 大阪

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

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。そのうち遺伝形式が明確な4家系で連鎖解析を行い、有意な遺伝子座として **Ch2p25-p22** に遺伝子座を認めた。**Fine mapping** を行い、遺伝子座を **23Mb** にまで絞り込んだところ、**GCKR** がその領域に存在したため、**promoter**, 全 **coding exon** の配列決定を行い、稀な **SNPs** が一般人口に比して家系で有意に多発することを明らかにし、1家系において、**GCKR** の稀な **SNP** が疾患の有無と一致することを見いだした。また、一般人口での相関研究のため、5年間以上にわたっての観察が終了した岐阜県旧丹生川村のコホートをを用い、**HbA1C** の上昇と **GCKR** の多型に有意な関連を見いだした。以上の結果から、集団および家系において糖尿病感受性遺伝子として作用する **GCKR** の役割が示唆された。

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つい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、相関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。

表1. 家系の特徴

		発症者	非発症者
	人数	8	3
男性	年齢 (mean ± SD)	61.6 ± 14.7	46.0 ± 21.0
	発症年齢(mean ± SD)	49.4 ± 12.4	
	BMI (mean ± SD)	21.7 ± 3.4	20.2 ± 0.4
	HbA1c (%: mean±SD)	6.14 ± 1.10	5.20 ± 0.00
	人数	15	9
女性	年齢 (mean ± SD)	62.1 ± 6.5	62.1 ± 17.0
	発症年齢(mean ± SD)	55.6 ± 14.6	
	BMI (mean ± SD)	22.3 ± 3.2	19.7 ± 1.8
	HbA1c (%: mean±SD)	8.05 ± 1.71	5.06 ± 0.37

SD: 標準偏差

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世代にわたる糖尿病家系を見出し、患者に参加協力を依頼した。

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、既に追跡を開始しているコホートで検証をした。岐阜県旧丹生川村(現高山市)の970名からなるコホートは、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、すでに5年間の追跡を終了し、身体診察および血液検査のデータ整理を完了した。

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で境界型もしくは糖尿病型、(3)HbA_{1c}が5.6%以上、のいずれかに該当する者と定義した。また、非発症者のうち55歳未満の者は、将来の発症する可能性が存在するため、形質は未知(Unknown)として解析した。これらの定義に基づき、9家系の協力を得た。3世代家系では、一般的に常染色体優性遺伝形式が仮定できる。そこで、9家系のうち、発症者を両親に持つ者を含まず、常染色体優性遺伝

形式にて明確に説明できる4家系を抽出し、パラメトリック連鎖解析を行った。

常染色体全域にわたるゲノムワイド連鎖解析は、平均10cM間隔でマイクロサテライトマーカーを用い、合計382マーカーでtypingを行った。連鎖解析は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に協力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、HbA_{1c}平均値をまとめた。

連鎖解析：常染色体優性遺伝形式が示唆された4家系(図1)の連鎖解析に際して用いたパラメータは、遺伝子頻度=0.0001、phenocopy率=0.0001、浸透率=0.9999である。4家系での連鎖解析の結果は染色体2番にLOD Score 2.52、染色体7番にLOD Score 3.72と、連鎖の示唆される領域

図1. 常染色体優性遺伝にて説明できる4家系

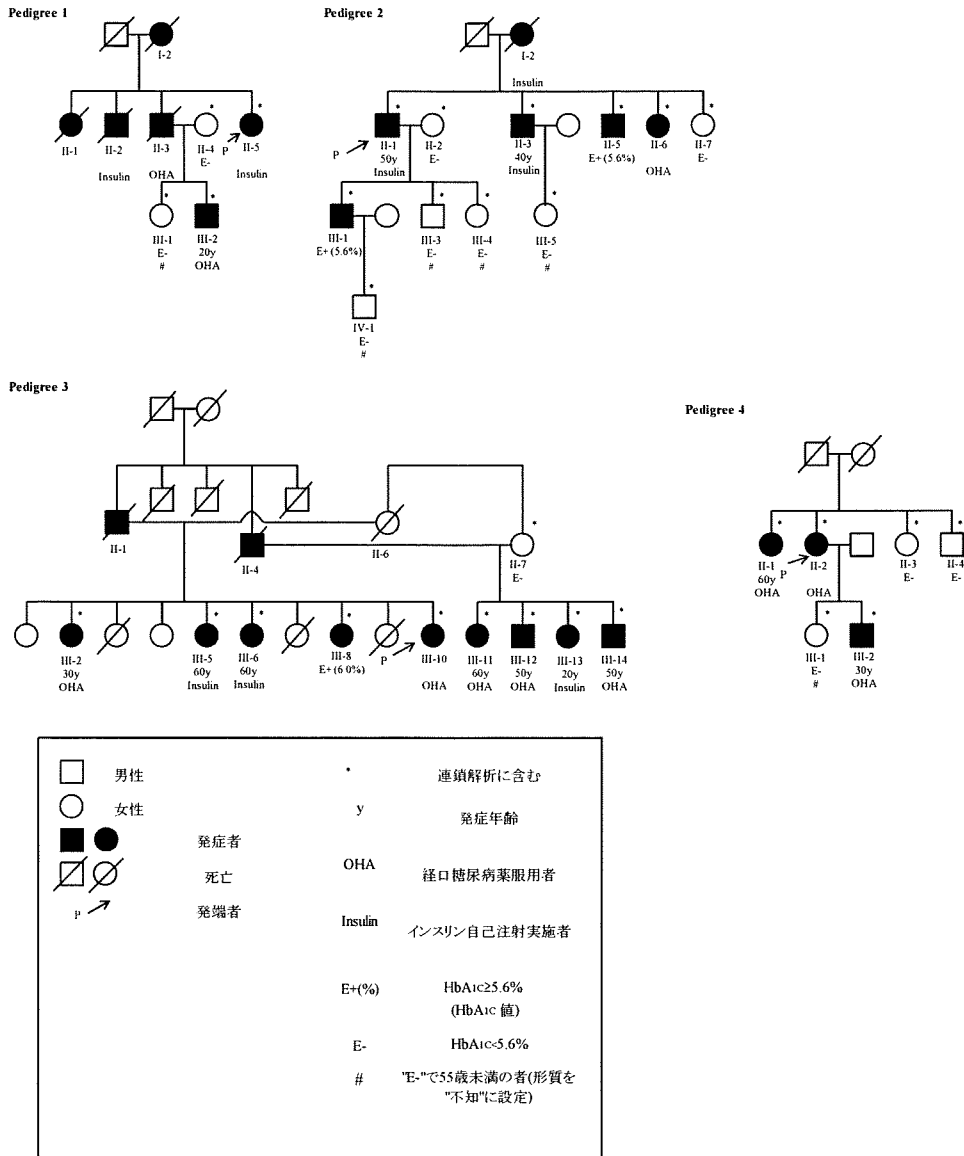


図2. 全ゲノム連鎖解析におけるLODおよびHLODスコア

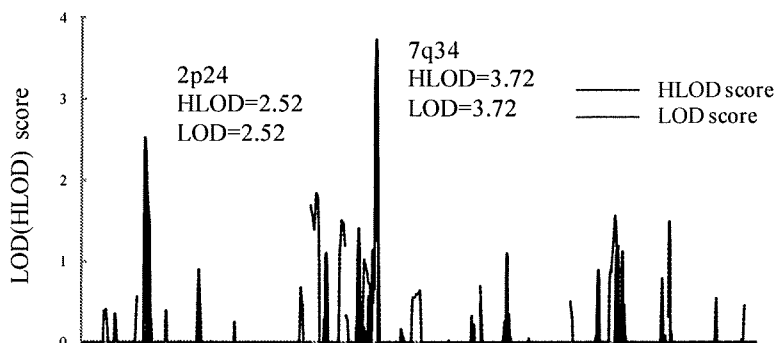


表2. 家系発端者と正常対象者における、GCKRの稀な(Rare)SNPおよびありふれた(Common)SNP

Position	Nucleotide Change	Description	Effect	Detected Number of Alleles				p*	Minor Allele Frequency
				Familial Cases(n=9)		Controls(n=18)			
				Minor	Major	Minor	Major		
Rare SNP									
Promoter	g. -689G>A			1	17	0	36	0.33	0.00†
Promoter	g. -299G>A			1	17	0	36	0.33	0.00†
Exon 9	g. 6859C>G	Noncoding exon		1	17	0	36	0.33	0.00†
Total				3	15	0	36	0.033	
Common SNP									
Promoter	g. -959 Insertion AATGTTG			2	16	3	33	1.00	N/D
Exon 2	g. 468G>A	Synonymous	E66E	1	17	1	35	1.00	N/D
Exon 3	g. 671A>G	Missense	E77G	1	17	3	33	1.00	0.024‡
Exon 10	g. 8817G>A	Missense	E252K	0	18	1	35	1.00	0.04†
Exon 11	g. 9709G>A	Noncoding exon		1	17	3	33	1.00	0.123‡
Exon 14	g. 11169T>C	Missense	L446P	10	8	11	25	0.087	0.467‡

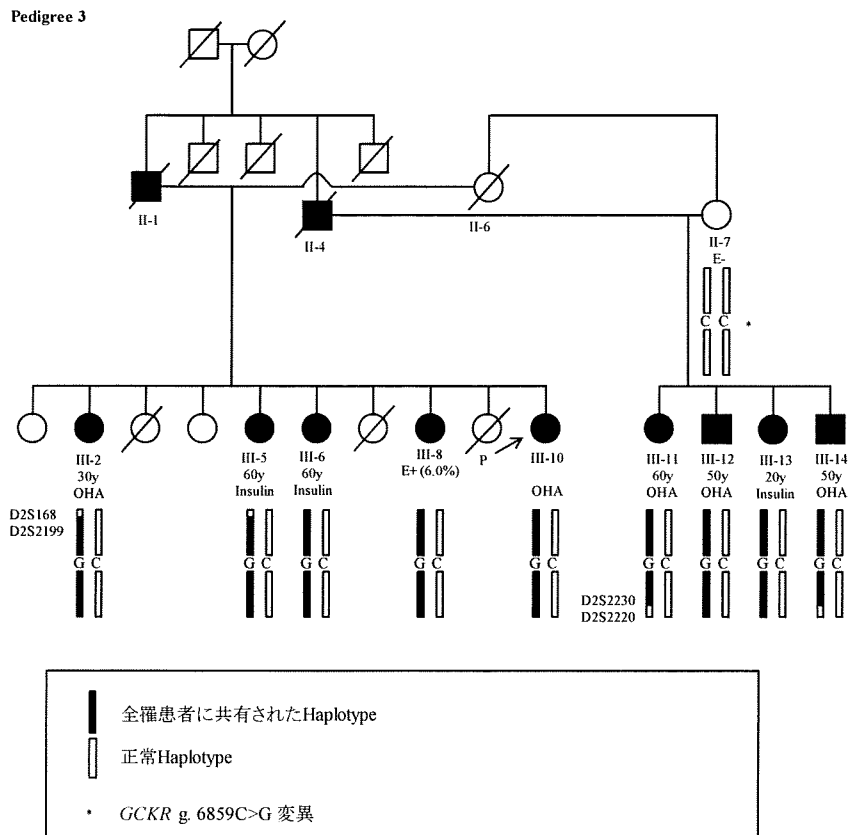
GenBank Accession No. NT_022184.15

* Fisher exact test.

† Frequency in 50 controls.

‡ Frequency in HapMap-JPT.

図3. 1家系における、候補領域(2p25-22)のハプロタイプ解析およびGCKR g. 6859C>G変異



を認めた(図 2)。これらの領域において fine-mapping を行い、連鎖領域を絞り込んだ。その結果、染色体 2 番に関して LOD Score は全ゲノムレベルの有意水準(3.3)を超える 3.47 に上昇した一方、染色体 7 番に関しては LOD Score が低下し、連鎖領域は染色体 2 番に絞り込まれた。家系ごとに疾患原因遺伝子座が異なる可能性 (locus heterogeneity) を考慮し、HLOD score が正である marker D2S2199-marker D2S2230 までの 23Mb を候補領域とした。

候補遺伝子配列決定：連鎖候補領域には *GCKR* が存在しており、家族歴濃厚 9 家系の proband および、旧丹生川村コホートにおける 5 年間の追跡中 HbA_{1c}<5.6% 空腹時血糖<100mg/dl であった 18 名の control について *GCKR* の配列決定を行った。見いだされた SNPs のうち、既存データベースに未報告の SNPs については、旧丹生川村コホートの control 50 名において typing を行い、control における頻度を決定した。頻度の低い(1%以下)SNPs を rare、そうでないものを common と定義した。その結果、表 2 に示すように 3 世代家系の proband において有意に多数の rare SNPs が見いだされた。また、連鎖解析に用いた 4 家系のうちの 1 家系である pedigree 3 において見いだされた rare なエクソン変異 g. 6859C>G は、当該家系内で疾患の有無と完全に co-segregate しており(図 3)、疾患との関連が強く示唆された。

旧丹生川村コホートのベースラインデータおよび *GCKR* 多型の検討：コホートから、5 年間の追跡中 HbA_{1c}<5.6% 空腹時血糖<100mg/dl を保った者で 55 歳以上の者を control、HbA_{1c}>5.6% となった者を case と

して表 3 にまとめた。*GCKR* 多型と空腹時血糖、2 型糖尿病リスクとの関係が近年の大規模関連研究にて明らかとなっており、東アジア人のコホートにて関連が再現できるか、旧丹生川村コホートにて検討した。この結果、表 4 に示すように、男性において、*GCKR* 多型 L446P と発症との有意な関連が明らかとなり、BMI 及び年齢の影響を補正したロジスティック回帰分析においても劣性モデルにて有意な関連が得られた。

D. 考察

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。常染色体優性遺伝が示唆される家系における全ゲノム連鎖解析によって絞り込んだ有意な候補領域において、空腹時血糖や 2 型糖尿病リスクとの関連が既報されている *GCKR* が存在していた。*GCKR* の配列決定にて、変異が家族歴濃厚糖尿病家系において高頻度であったことや、*GCKR* 変異と一致した発症がみられた家系の存在から、家族歴濃厚糖尿病家系の発症要因として *GCKR* 変異が影響を及ぼしていることが示唆された。また、旧丹生川村コホートにおいて *GCKR* 多型 L446P と発症との有意な関連が明らかとなり、ロジスティック回帰分析において劣性モデルで関連していたという結果は既報の中国人における横断研究の結果と一致するものであった。以上 *GCKR* の複数の変異が相関することから、本遺伝子は糖尿病の原因の一つと考えられる。

表3. 丹生川村コホートにおける罹患者と対照者

		罹患者 (HbA1c \geq 5.6%)	対照者 (HbA1c $<$ 5.6%)	<i>p</i> *
人数		98	81	
男性 (n=179)	年齢(mean \pm SD)	67.1 \pm 7.2	68.1 \pm 8.4	0.38
	BMI (mean \pm SD)	23.8 \pm 3.2	22.4 \pm 2.6	0.002
人数		117	125	
女性 (n=242)	年齢 (y: mean \pm SD)	66.7 \pm 6.5	65.5 \pm 7.7	0.23
	BMI (mean \pm SD)	22.4 \pm 3.1	21.7 \pm 2.7	0.07

SD: 標準偏差
*: Student's t-test.

表4. GCKR L446P 多型と発症との関連解析

Sex	Number	Genotype (No of Subjects)			Minor Allele Frequency	HWE, <i>p</i> *	Allelic Association† OR (95% CI) / <i>p</i>	Genotypic Association‡			
		TT	TC	CC				Additive OR (95% CI) / <i>p</i>	Dominant OR (95% CI) / <i>p</i>	Recessive OR (95% CI) / <i>p</i>	
Men	Case	98	29	44	25	0.47	0.32	1.57 (1.02-2.40)	1.50 (0.97-2.31)	1.39 (0.73-2.65)	2.42 (1.06-5.52)
	Control	81	31	40	10	0.37	0.60	0.04	0.06	0.31	0.03
Women	Case	117	55	50	12	0.32	0.90	0.75 (0.52-1.10)	0.77 (0.53-1.12)	0.79 (0.47-1.33)	0.57 (0.26-1.22)
	Control	125	51	53	21	0.38	0.26	0.15	0.17	0.38	0.13

* *p*, HWE, 2-sided probability value from test for deviation from Hardy-Weinberg equilibrium.
OR (95% CI) indicates Odds Ratio with its 95% CI (confidence interval).

† Without adjustment for covariates

‡ With adjustment for age and BMI.

E. 結論

以上から、GCKR 遺伝子が家族歴濃厚糖尿病の発症原因となっていることが示唆された。今後、機能解析やさらなる家系データ収集により、GCKR 変異と発症の関係を機能からより詳細に検討する必要がある

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Lei X, Zhang S, Barbour SE, Bohrer A, Ford EL, Koizumi A, Papa FR, Ramanadham S. Spontaneous development of ER stress that can lead to diabetes mellitus is associated with higher calcium-independent phospholipase A2 (iPLA2beta) expression: A role for regulation by SREBP-1. **J Biol Chem.** 285(9):6693-705, 2010
2. Huang L, Toyoshima M, Asakawa A, Inoue K, Harada K, Kinoshita T, Chen S, Koizumi A. Levels of N-acyl ethanolamines 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. 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, 神戸国際会議場

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特許出願: 小泉昭夫、永田和宏、森戸大介、高島成二、山崎悟、橋本信夫、松浦範夫、人見敏行。出願番号: 特願 2009-244938
発明の名称: モヤモヤ病関連遺伝子及びその利用

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。現在までに同コホートでは、約 6000 人分のデータ集積がなされた。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、最近報告の多い Genome-wide association study 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が示唆される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と非糖尿病群の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。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。毎年、データ蓄積続けており、集積データは着実に増加している。

（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。それ以降も、コホートデータ集積し、現時点（平成22年4月時点）で、約6000名のコホートデータが集積されており、今後もデータ収集継続予定である。

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。今後、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た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、*in vitro* 解析による検証と連動して、新規糖尿病感受性遺伝子を同定していく予定である。

E. 結論

糖尿病感受性候補遺伝子の検証のために、1万人規模の日本人ゲノムコホートデータベースの整備を進めている。現時点（平成22年4月時点）で、約6000名のコホートデータが集積されており、今後もデータ収集継続予定である。今後糖尿病家族歴濃厚検体による全ゲノムワイドの連鎖解析により絞り込まれる候補遺伝子に関して、日本人における新規糖尿病感受性遺伝子の検証・同定を目指す。

F. 健康危険情報 特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yamaguchi H, Fujimoto T, Nakamura S, Ohmura K, Mimori T, Matsuda F, Nagata S. Aberrant splicing of the milk fat globule-EGF factor 8 (MFG-E8) gene in human systemic lupus erythematosus. **Eur J Immunol.** 2010 (in press)
2. Nakanishi H, Gotoh N, Yamada R, Yamashiro K, Otani A, Hayashi H, Tsujikawa A, Shimada N, Ohno-Matsui K, Mochizuki M, Saito M, Saito K, Iida T, Matsuda F, Yoshimura N. ARMS2/HTRA1 and CFH polymorphisms are not associated with choroidal neovascularization in highly myopic eyes of the elderly Japanese

population. **Eye (Lond)** 2009 (in press)

3. Le Clerc S, Limou S, Coulonges C, Carpentier W, Dina C, Taing L, Delaneau O, Labib T, Sladek R; ANRS Genomic Group, Deveau C, Guillemain H, Ratsimandresy R, Montes M, Spadoni JL, Therwath A, Schächter F, Matsuda F, Gut I, Lelièvre JD, Lévy Y, Froguel P, Delfraissy JF, Hercberg S, Zagury JF. Genomewide association study of a rapid progression cohort identifies new susceptibility alleles for AIDS (ANRS Genomewide Association Study 03). **J Infect Dis.** 200(8):1194-201, 2010
4. Wahlberg K, Jiang J, Rooks H, Jawaid K, Matsuda F, Yamaguchi M, Lathrop M, Thein SL, Best S. The HBS1L-MYB intergenic interval associated with elevated HbF levels shows characteristics of a distal regulatory region in erythroid cells. **Blood.** 114(6):1254-62, 2009
5. Kyogoku C, Morinobu A, Nishimura K, Sugiyama D, Hashimoto H, Tokano Y, Mimori T, Terao C, Matsuda F, Kuno T, Kumagai S. Lack of association between tyrosine kinase 2 (TYK2) gene polymorphisms and susceptibility to SLE in a Japanese population. **Mod Rheumatol.** 19(4):401-6, 2009
6. Nakanishi H, Yamada R, Gotoh N, Hayashi H, Yamashiro K, Shimada N, Ohno-Matsui K, Mochizuki M, Saito M, Iida T, Matsuo K, Tajima K, Yoshimura N, Matsuda F. A genome-wide association analysis identified a novel susceptible locus for pathological myopia at 11q24.1. **PLoS Genet.** 5:e1000660, 2009
7. Gotoh N, Nakanishi H, Hayashi H, Yamada R, Otani A, Tsujikawa A, Yamashiro K, Tamura H, Saito M, Saito K, Iida T, Matsuda F, Yoshimura N. ARMS2 (LOC387715) variants in Japanese patients with exudative age-related macular degeneration and polypoidal choroidal vasculopathy. **Am J Ophthalmol.** 147:1037-41, 1041.e1-2, 2009
8. Wada M, Marusawa H, Yamada R, Nasu A, Osaki Y, Kudo M, Nabeshima M, Fukuda Y, Chiba T, Matsuda F. Association of genetic polymorphisms with interferon-induced

haematologic adverse effects in chronic hepatitis C patients. **J Viral Hepat.** 16:388 -96, 2009

9. Nakanishi H, Yamada R, Gotoh N, Hayashi H, Otani A, Tsujikawa A, Yamashiro K, Shimada N, Ohno-Matsui K, Mochizuki M, Saito M, Saito K, Iida T, Matsuda F, Yoshimura N. Absence of Association between COL1A1 Polymorphisms and High Myopia in the Japanese Population. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, 50:544-550, 2009

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