

201007007A

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22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 稲垣暢也

平成23 (2011) 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22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 稲垣 暢也

平成 23 (2011) 年 4 月

目 次

I. 総括研究報告

- 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 -----7
同定に関する研究
長嶋 一昭 京都大学医学研究科糖尿病・栄養内科学 講師
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 -----12
小泉 昭夫 京都大学医学研究科環境衛生学 教授
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 京都大学医学研究科附属ゲノム医学センター 教授 -----19
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 -----23
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 -----26
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 -----29
収集に関する研究
矢野 秀樹 彦根市立病院 副院長
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 -----32
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 -----34
水野 展寿 滋賀県立成人病センター糖尿病・内分泌内科 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 -----36
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 -----38

IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----45

I. 総括研究報告

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： 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。近年の効率的な全ゲノム関連解析遂行を可能とする理論基盤が整備されてきたことを背景に、Genome-wide association study(GWAS)による解析が盛んである。しかしながら同手法により絞り込まれた候補遺伝子の生物学的妥当性は低く、最終的な疾患発症原因遺伝子が同定されるまで至ったケースは少なく、今だ発症感受性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り込みを行い、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地域と連携した複数の日本人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る糖尿病発症原因遺伝子の検索を目指した。京都大学医学部附属病院および関連病院から糖尿病家族歴濃厚家系60家系（223名）を抽出し血液検体を採取、14家系全員(96名)の全ゲノムタイピングとMODY1～6遺伝子異常の有無を解析し、先行した4家系検体を用いた全ゲノム連鎖解析等で染色体候補領域絞り込み、候補遺伝子をデータベースを用いた手法で解析優先順位付けし、最終的に糖尿病発症原因遺伝子としてGCKR遺伝子を同定した。

分担研究者

| | | | |
|-------|-----------------------------|--------|------------------------------|
| 長嶋 一昭 | 京都大学医学研究科 講師 | 矢野 秀樹 | 彦根市立病院 副院長 |
| 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・内分泌内科 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

糖尿病の激増は全世界的な問題であり、本邦でも 1997 年調査時の糖尿病有病者数約 690 万人が、2007 年では約 890 万人（厚生労働省国民健康・栄養調査）と 10 年間で約 3 割の著しい罹患者の増加が報告されている。

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みであり、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、日本人における検討は重要な意味をもつ。

従来の疾患候補遺伝子探索手法として、疾患との関連性が想定される遺伝子に絞りを、遺伝子変異の検索を行う候補遺伝子アプローチが行われてきたが、原因遺伝子同定頻度（確率）は低頻度であり、最近、多くの Genome-wide association study (GWAS) の報告がなされている SNPs を用いた関連解析による Case-Control 研究手法では、疾患との相関が示されるのみで、ほとんどが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、従来手法よりも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 22 年度研究計画に沿って、研究初年度から継続して糖尿病家族歴濃厚家系の集積を継続する一方、糖尿病家族歴濃厚家系からのデータ抽出と連鎖解析およびハプロタイプ解析による糖尿病発症原因遺伝子の絞り込みを行った。更に、データ整理・データベース構築を進めてきた各種日本人コホートを用いて、絞り込まれた候補遺伝子に関する検証作業を行い、最終的に日本人糖尿病患者家系から疾患発症原因遺伝子を同定した。

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、研究分担者所属病院および関連病院にて 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集積し、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（長嶋、池田、岡本、矢野、山本、水野、安田、稲垣）。

遺伝解析

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。

家系解析にあたり、罹患者は、(1)糖尿病の診断歴、(2)75gOGTT で境界型もしくは糖尿病型、(3)HbA1c(国際標準値)が 6.0%以上、のいずれかに該当する者と定義した。また、非罹患者のうち 55 歳未満の者は、将来発症する可能性が存在するため、形質は不知(Unknown)として解析することとした。

これらの定義に基づき、3 世代家系 10 家系の発端者に協力を得た。まず、既知の糖尿病原因遺伝子変異を除外すべく、家系発端者について MODY1-MODY6 遺伝子の配列決定を行い、既知の糖尿病発症原因である MODY3 遺伝子変異 HNF1A R583G を 1 名に同定した。このため、当該家系を除外した他の 9 家系のうち、家族にも協力を依頼し、連鎖解析に十分な人数の家族に同意を得られた 4 家系を連鎖解析の対象とした。3 世代にわたる糖尿病家系では、一般的に常染色体優性遺伝形式が仮定できる。そこで、4 家系について、常染色体優性遺伝形式にて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 マーカーでタイピングを行い、有意連鎖が認められる領域では約 2cM の fine mapping を行った。連鎖解析は Genehunter 2 を用いて行った（小泉、長嶋）。

3. 候補遺伝子の検証

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

a) 日本人ゲノムコホートデータを用いた一般人口での検証

これまでに、1 万人規模の日本人ゲノム疫学コホート事業である長浜 0 次コホートをはじめ、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（現高山市）のコホート（約 970 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てきた。その中で本年度、検証作業には高山コホートを用いて検証を行った（小泉、松田、長嶋、稲垣）。

（倫理面への配慮）

本研究は、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-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おり、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。全ての研究はヘルシンキ宣言に基づき行われている。

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は確立している。

C. 研究結果

当初の計画通り本年度も 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の調査・集積を行い、研究開始時から合計 60 家系（223 名）以上の研究参加の承諾を得、採血を行った。14 家系については、検体採取者全員（96 名）の約 10cM 間隔での全ゲノムタイピングを完了した。更に 14

家系全てで、MODY 遺伝子 (HNF4 α 、Glucokinase、HNF1 α 、IPF-1、HNF1 β 、NeuroD1 遺伝子) 異常の有無を確認し、1 家系の MODY3 遺伝子変異 (HNF1 α R583G) を見出し、以後、本家系を解析対象から除外した。遺伝形式が明確な 4 家系で連鎖解析を行った。4 家系 31 名において、19 名が糖尿病罹患、12 名が非罹患であり、罹患 19 名中 7 名がインスリン治療中、9 名が経口血糖降下薬による治療中であった。また罹患 19 名中 16 名が非肥満者 (BMI<25) であった。Genehunter 2 を用いた全ゲノムパラメトリック連鎖解析 (優性遺伝モデル、約 10cM 間隔) により連鎖候補領域を 2 番染色体 (2p24; HLOD=2.52, LOD=2.52) および 7 番染色体 (7q34; HLOD=3.72, LOD=3.72) に認め、fine mapping により 2 番染色体 (2p25-22) に、全ゲノムでの連鎖有意水準 (3.3 以上) を満たす LOD スコア=3.47 の領域を認めた (7 番染色体では fine mapping にて有意連鎖領域は認められず)。候補遺伝子塩基配列決定: 連鎖候補領域に存在する 106 遺伝子から、MODY1-MODY6 遺伝子と関連した特徴を持つ遺伝子群を、データベースを用いた方法 (Endeavour) にて順位付けし、上位 10% にあたる 11 遺伝子を選択し、糖尿病多発集積家系発端者において塩基配列決定を行った。その結果、GCKR 遺伝子変異が発端者において同定されたため、GCKR 遺伝子の塩基配列決定を、糖尿病多発集積家系 9 家系の発端者および、岐阜県旧丹生川村 (現高山市) コホートにおける 5 年間の追跡中 HbA1c<6.0% (国際標準値) 空腹時血糖 <100mg/dl であった 18 名の正常対照者について系統的に行った。検証に用いた、旧

丹生川村 (現高山市) の 970 名からなるコホートは、2004 年にデータ収集開始し (臨床データは 2002 年から利用可能)、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ているコホートである。GCKR 遺伝子において同定された 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正常対照者 105 名 210 染色体においてタイピングを行い、正常対照者における頻度を決定した。糖尿病多発集積家系発端者において有意に多数の rare SNPs が見いだされ、連鎖解析に用いた 4 家系のうちの 1 家系で見いだされた 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 (糖尿病罹患者にのみ認められ、非罹患には認められない) しており疾患発症との関連が強く示唆された。以上より、既報の MODY1~6 の遺伝子変異を認めない 3 世代以上にわたる日本人糖尿病発症多発家系を用いた全ゲノム連鎖解析により、糖尿病発症原因遺伝子として GCKR 遺伝子を同定した。以上は欧米学会誌および国内・国際学会で報告した。さらに、現在、上記以外の糖尿病家族歴濃厚 1 家系 (18 人) 検体を用いて、全ゲノム連鎖解析 (優性モデル全ゲノムパラメトリック連鎖解析) にて 3 番、4 番、5 番染色体領域に計 3 か所の連鎖領域を同定、候補領域の fine mapping、ハプロタイプ解析、エクソン領域シーケンスにて、3 番染色体および 5 番染色体領域に存在する遺伝子上にミスセンス SNP を検出している。そのうちの 4 つは、全て家系内疾患発症の有無と変異の有無が co-segregate しており、現在、日

本人コホートをを用いた一般人口（非罹患者）における SNP 頻度等を検証中である。

D. 考察

3 世代以上にわたり糖尿病に罹患する遺伝的負荷の濃厚な糖尿病多発家系について原因遺伝子の検討を行った。10 家系のうち 1 家系の原因遺伝子は既知の MODY3 遺伝子変異と考えられた。他の 9 家系のうち連鎖解析に十分な数の家族に協力が得られた 4 家系における全ゲノム連鎖解析およびハプロタイプ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、糖代謝に与するグルコキナーゼ調節蛋白をコードする GCKR 遺伝子が存在しており、GCKR 遺伝子変異が一般正常耐糖能者に比べ、糖尿病多発集積家系発端者において有意に高頻度であったこと、さらには GCKR 変異の有無と糖尿病発症の有無の完全な一致がみられた家系の存在などから、糖尿病多発集積家系の発症要因として GCKR 変異が関与する可能性が示唆された。

E. 結論

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 60 家系を集積、承諾得られた 223 名から検体採取、14 家系検体採取者全員（96 名）の全ゲノムタイピングおよび MODY1~6 遺伝子異常の有無を確認。4 家系を用いた全ゲノム連鎖解析、ハプロタイプ解析、データベースを利用した候補遺伝子絞り込み、塩基配列解析および日本人コホートをを用いた検証検討により、により、最終的に GCKR 遺伝子が糖尿病多発集積家系において発症原因遺伝子となっていることが示唆された。今後、さらなる

大家系のデータ収集や、全エクソンシーケンシング等による網羅的解析を加えることにより、発症原因遺伝子のさらなる詳細を明らかにする必要があると考えられる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Nishi Y, Fujimoto S, Sasaki M, Mukai E, Sato H, Sato Y, Tahara Y, Nakamura Y, Inagaki N. Role of mitochondrial phosphate carrier in metabolism-secretion coupling in rat insulinoma cell line INS-1. *Biochem. J.* 2011, in press
2. Funakoshi S, Fujimoto S, Hamasaki A, Fujiwara H, Fujita Y, Ikeda K, Takahara S, Nagashima K, Hosokawa M, Seino Y, Inagaki N. Utility of indices using C peptide levels for indication of insulin therapy to achieve good glycemic control in Japanese patients with type 2 diabetes. *J. Diabetes Invest.* 2011, in press
3. Harada N, Hamasaki A, Yamane S, Muraoka A, Joo E, Fujita K, Inagaki N. Plasma GIP and GLP-1 levels are associated with distinct factors after glucose loading in Japanese subjects. *J. Diabetes Invest.* 2011, in press
4. Yamane S, Hamamoto Y, Harashima S, Harada N, Hamasaki A, Toyoda K, Fujita K, Joo E, Inagaki N. GLP-1 receptor agonist attenuates ER stress-mediated β -cell damage in Akita mice. *J. Diabetes Invest.* 2011, in press
5. Fujimoto H, Toyoda K, Okitsu T, Liu X, Mukai E, Zhuang X-T, Uemoto S, Mochizuki N, Inagaki N. Three dimensional ex vivo imaging and analysis of intraportal islet transplants. *Transpl. Int.* 2011, in press
6. Yamada C, Fujimoto S, Ikeda K, Nomura Y, Matsubara A, Kanno M, Shide K,

- Tanaka K, Imai E, Fukuwatari T, Shibata K, Inagaki N. Relation of homocysteine and homocysteine-related vitamins to bone mineral density in Japanese patients with type 2 diabetes. *J. Diabetes Invest.* 2011, in press
7. Kuwabara A, Nakase H, Tsuji H, Shide K, Chiba T, Inagaki N, Tanaka K. Fat restriction is associated with impaired quality of life (QOL) in patients with ulcerative colitis and Crohn's disease. *Ulcers* 2011, in press
 8. Tanaka D, Nagashima K, Sasaki M, Yamada C, Funakoshi S, Akitomo K, Takenaka K, Harada K, Koizumi A, M, Inagaki N. *GCKR* mutations in Japanese families with clustered type 2 diabetes. *Mol. Genet. Metab.* 102(4):453-460, 2011
 9. Ogawa E, Hosokawa M, Harada N, Yamane S, Hamasaki A, Toyoda K, Fujimoto S, Fujita Y, Fukuda K, Tsukiyama K, Yamada Y, Seino Y, Inagaki N. The effect of gastric inhibitory polypeptide on intestinal glucose absorption and intestinal motility in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 404(1):115-120, 2011
 10. Yoshihara E, Fujimoto S, Inagaki N, Ogawa K, Masaki S, Yodoi J, Masutani H. Disruption of TBP-2/Txnip ameliorates insulin sensitivity and secretion without affecting obesity. *Nature Communications* 1:127, 2010
 11. Uonaga T, Toyoda K, Okitsu T, Zhuang X, Yamane S, Uemoto S, Inagaki N. FGF-21 enhances islet engraftment in mouse syngeneic islet transplantation model. *Islets* 2(4):247-251, 2010
 12. Mukai E, Fujimoto S, Sato H, Oneyama C, Kominato R, Sato Y, Sasaki M, Nishi Y, Okada M, Inagaki N. Exendin-4 suppresses Src activation and reactive oxygen species production in diabetic GK rat islets in an Epac-dependent manner. *Diabetes* 60(1):218-226, 2011
 13. 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* 53(7):1472-1481, 2010
 14. Kawasaki Y, Harashima S, Sasaki M, Mukai E, Nakamura Y, Harada N, Toyoda K, Hamasaki A, Yamane S, Yamada C, Yamada Y, Seino Y, Inagaki N. Exendin-4 protects pancreatic beta cells from the cytotoxic effect of rapamycin by inhibiting JNK and p38 phosphorylation. *Horm. Metab. Res.* 42(5):311-317, 2010
 15. Sato S, Ishida-Nakajima W, Ishida A, Kawamura M, Miura S, Ono K, Inagaki N, Takada G, Takahashi T. Assessment of a new piezoelectric transducer sensor for noninvasive cardiorespiratory monitoring of newborn infants in the NICU. *Neonatology* 98:179-190, 2010
 16. Yoneda K, Demitsu T, Manabe M, Igarashi J, Kosaka H, Inagaki N, Takahashi H, Kon A, Kakurai M, Kubota Y. Expression of wild-type, but not mutant, loricrin causes programmed cell death in HaCaT keratinocytes. *J. Dermatol.* 37:956-964, 2010
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・栄養内科学講師

研究要旨： 2型糖尿病発症要因となる候補遺伝子の絞り込み・同定のため、3世代以上にわたり糖尿病家族歴を有する家系・患者検体を分担研究者・研究協力者とともに累計60家系223名以上の収集し、全ゲノム連鎖解析・ハプロタイプ解析を行い、疾患発症と有意連鎖認める染色体領域を同定。有意連鎖染色体領域に含まれる遺伝子をリストアップし、データベースを用いた手法により候補遺伝子を優先順位付けし、塩基配列決定を行い、疾患発症の有無と当該遺伝子変異の有無が一致する遺伝子を同定した。一般人口を用いての検証解析により当該変異が希少変異であることを確認し、最終的に糖尿病発症に関与が推測される遺伝子として *GCKR* を絞り込んだ。

A. 研究目的

本邦における糖尿病罹患者数は激増の一途をたどり、医療費の増大と患者自身の生活の質の低下等から、大きな社会問題となっている。2型糖尿病発症は環境因子と遺伝因子（おそらく複数の遺伝子要因）との相互作用に起因し、発症感受性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、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を用いた関連解析によるCase-Control研究手法が頻用され、2型糖尿病におけるGWASの報告が多数なされている。しかしながら殆どのケースで、疾患との関連が示されたのみであり、疾患原因遺伝子の同定までは至っていない。本研究は、同手法の方法論的限界を鑑み、研究代表者、分担研

究者および研究協力者等とともに研究初年度以降、継続して集積してきた糖尿病多発家系検体を基に、疾患発症に係る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

京都大学医学部附属病院（糖尿病・栄養内科）および関連病院の外来通院中または入院中で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取得。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）らとともに全ゲノム連鎖解析およびハプロタイプ解析により疾患（糖尿病）発症に連鎖する染色体領域の絞り込みをおこなった。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間隔でマイクロサテライトマーカーを用い、合計382マーカーでのタイピングを行った。遺伝解析にはGenehunter 2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（約2cM間隔）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、かねてから整備を進めてきた日本人コホートを用いたCase-Control解析により糖尿病発症原因遺伝子を絞り込んだ。

（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-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と「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に関する承諾書を取得し、現時点までの累計で 60 家系、223 名から血液検体を採取した。そのうち 14 家系については、検体採取者全員（96 名）の全ゲノムタイピング（10cM 間隔）を完了した。また 14 家系 96 名全員にて MODY1~6（HNF-4 α 、Glucokinase、HNF-1 α 、IPF1、HNF-1 β 、NeuroD1）遺伝子異常の有無を確認し、既知の糖尿病発症原因である MODY3 遺伝子変異 HNF-1 α 遺伝子 R583G 変異を 1 名に同定した。この家系を除外して解析を行った。一般的に 3 世代以上にわたる疾患発症家系では常染色体優性遺伝形式が仮定できるため、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を行った。高い LOD スコアを示した 2 領域（第 2 および第 7 染色体候補領域）に対して約 2cM 間隔でのファインマッピングを行ったところ、1 領域（第 2 染色体候補領域）の LOD スコアが有意水準（3.3 以上）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。

現在、上記以外の糖尿病家族歴濃厚1家系(18人)検体を用いて、全ゲノム連鎖解析(優性モデル全ゲノムパラメトリック連鎖解析)にて3番、4番、5番染色体領域に計3か所の連鎖領域を同定、候補領域の fine mapping(2cM 間隔)、ハプロタイプ解析、エクソン領域シークエンスにより、3番染色体領域内に1個、5番染色体領域に3個の計4個の遺伝子上に各々1つずつミスセンス SNP を検出している。これらは全て家系内疾患発症の有無と変異の有無が co-segregate しており、現在、日本人コホートをを用いた一般人口(非罹患者)における SNP 頻度等を検証中である。

D. 考察

近年多くの報告がなされている GWAS による糖尿病発症原因遺伝子の絞り込みでは相関は示せるものの、最終的に原因遺伝子同定まで到達できるケースはまれであり、生物学的妥当性および創薬等への発展性は低い。また従来から行われている、ある特定の遺伝子に的を絞って解析する候補遺伝子アプローチで同定された候補遺伝子は、生物学的妥当性は高く創薬への発展性も期待できるが、直接的に遺伝子変異が確認さ

れる確率自体が低い。これらの従来候補遺伝子絞り込み手法の限界を鑑み、本研究では、解析対象を糖尿病発症濃厚家系を用いることで遺伝的に濃縮された条件下で連鎖解析を行うことで、強い生物学的妥当性をもった候補遺伝子が絞り込まれてくることを期して本研究を進めてきた。

その結果、空腹時血糖や2型糖尿病リスクとの関連が既報され、糖代謝に関するグルコキナーゼ調節蛋白をコードする *GCKR* 遺伝子が候補遺伝子の1つとして絞り込まれ、その遺伝子変異が一般正常耐糖能者に比べ、糖尿病多発集積家系発端者において有意に高頻度であり、変異の有無と糖尿病発症の有無の完全な一致(家系内での糖尿病発症との co-segregation) が認められ、高い生物学的妥当性が認められた。

今回、本手法の有効性が示されたことから、これまで多くの労力を費やして蓄積した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家系(60家系、223名)と検証解析で用いた日本人コホート(現在3つのコホート;ながはま0次コホート、

岐阜県高山コホート、秋田県能代市コホートの整備続けている)の貴重な研究基盤のもと、今回解析済みの4家系以外での解析の継続、更なる糖尿病濃厚家系の集積、それらを用いた日本人糖尿病発症原因遺伝子同定作業の継続が、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、家族歴濃厚家系を累計60家系(223名)から血液検体を採取した。全ゲノム連鎖解析、ハプロタイプ解析等で候補領域絞り込み、家系内での糖尿病発症と遺伝子変異との

co-segregation および日本人コホート用いた
検証解析から、糖尿病発症原因遺伝子とし
て最終的に *GCKR* を同定した。

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, Takahara S, Nagashima K, Hosokawa M, Seino Y, Inagaki N. Utility of indices using C peptide levels for indication of insulin therapy to achieve good glycemic control in Japanese patients with type 2 diabetes. *J. Diabetes Invest.* (2011) in press

2. Tanaka D, Nagashima K, Sasaki M, Yamada C, Funakoshi S, Akitomo K, Takenaka K, Harada K, Koizumi A, M, Inagaki N. *GCKR* mutations in Japanese families with clustered type 2 diabetes. *Mol. Genet. Metab.* 102(4):453-60, 2011

3. 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* 53(7):1472-1481, 2010

2. 学会発表

1. Tanaka D, Nagashima K, Sasaki M, Yamada C, Funakoshi S, Akitomo K, Hishizawa M, Koizumi A, Inagaki N. Pedigree Analysis of Highly Aggregated Japanese Families with Diabetes Mellitus. *Kick-off Workshop Strategic Japanese-Danish Cooperative Program on "Molecular Diabetology" -Roles of Pancreatic Beta-cells in the Pathogenesis and Pathophysiology of Diabetes-*. 2011年3月8日, Kobe, Japan

2. 田中大祐、長嶋一昭、佐々木真弓、山田千積、船越生吾、穉友絹美代、小泉昭夫、稲垣暢也。糖尿病多発家系を対象とした全ゲノム連鎖解析による疾患感受性遺

伝子の検索。第22回分子糖尿病学シンポジウム、口演、2010年12月4日、品川

4. Takagi T, Miyawaki M, Nagashima K, Nishi M, Sasaki H, Inagaki N, Yoshikawa N, Nanjo K, Furuta H. A P1198L mutation in *ABCC8* gene decreases ATP sensitivity of the K_{ATP} channel and causes permanent neonatal diabetes. *8th International Diabetes Federation Western Pacific Region Congress*. 2010年10月17-20日, Busan, Korea

5. Tanaka D, Nagashima K, Sasaki M, Yamada C, Funakoshi S, Akitomo K, Takenaka K, Harada K, Koizumi A, Inagaki N. Pedigree analysis of highly aggregated Japanese families with diabetes mellitus. *8th International Diabetes Federation Western Pacific Region Congress*. 2010年10月17-20日, Busan, Korea

6. Hosokawa M, Hamasaki A, Fujita Y, Fujimoto S, Nagashima K, Toyoda K, Harashima S, Yamada C, Harada N, Sasaki M, Inagaki N. Investigation of rate of achievement of LDL-C goals in patients with type 2 diabetes mellitus. *The 2nd Scientific Meeting of the Asian Association for the Study of Diabetes*, 2010年5月28日, Okayama

7. 高木伴幸、古田浩人、宮脇正和、長嶋一昭、西理宏、佐々木秀行、稲垣暢也、吉川徳茂、南條輝志男 *ABCC8* 遺伝子のPro1198Leu変異は K_{ATP} チャネルのATP感受性を低下させ永続型新生児糖尿病の原因となる。第53回日本糖尿病学会年次学術集会。2010年5月27日、岡山

8. 山野言、藤本新平、長嶋一昭、中西広樹、田島陽子、田口良、稲垣暢也。糖尿病モデル動物におけるメタボローム解析を用いた組織リン脂質組成の検討。糖尿病モデル動物におけるメタボローム解析を用いた組織リン脂質組成の検討。第53回日本糖尿病学会年次学術集会 2010年5月29日、岡山

9. 長嶋一昭、依藤亨、佐々木真弓、田中大祐、山田千積、船越生吾、稲垣暢也。本邦における新生児糖尿病発症頻

度に関する全国アンケート調査. **第53回日本糖尿病学会年次学術集会** 2010年5月27日、岡山

10. 田中大祐、長嶋一昭、佐々木真弓、山田千積、船越生吾、穂友絹美代、小泉昭夫、稲垣暢也. 糖尿病多発家系を対象とした全ゲノム連鎖解析による疾患感受性遺伝子の検索. **第53回日本糖尿病学会年次学術集会**. 2010年5月27日、岡山

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遺伝的要因が強いと考えられる家系に連鎖解析を行い、発症感受性遺伝子を見出し、②同定された遺伝子について、コホートでの検証とともに Population attributable risk を求め、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、3世代にわたり糖尿病に罹患している10家系を収集した。10家系発端者について既知の MODY1-MODY6 遺伝子の配列決定を行い、既知の糖尿病発症原因である MODY3 遺伝子変異 *HNF1A* R583G を1名に同定した。当該家系を除外した9家系のうち、連鎖解析に十分な人数の家族に同意を得られた4家系にて連鎖解析を行い、染色体領域 2p25-p22 の 23.6Mb に発症と有意な連鎖を示す候補領域を同定した。候補領域内の遺伝子群のうち、既知の MODY1-MODY6 遺伝子と関連の深い遺伝子を、データベースを用い選出し、8遺伝子の翻訳領域の塩基配列決定を行った。その結果、GCKR 遺伝子について、家系発端者において稀な変異が一般対照者に比して有意に多発することを明らかにし、同一家系内で、GCKR 遺伝子変異が罹患状態の有無と分離することを見いだした。このことから、糖尿病多発集積家系において GCKR 遺伝子が、発症感受性遺伝子である可能性が示唆された。

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関しても異常を有する頻度に入種差が報告されている。本研究は、多数の糖尿病多発集積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、糖尿病集積家系において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世代にわたる糖尿病多発集積家系を見出し、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高山コホート(以下コホート)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、罹患者は、(1)糖尿病の診断歴、(2)75gOGTTで境界型もしくは糖尿病型、(3)HbA1c(国際標準値)が6.0%以上、のいずれかに該当する者と定義した。また、非罹患者のうち55歳未満の者は、将来発症する可能性が存在するため、形質は不知(Unknown)として解析することとした。

これらの定義に基づき、3世代家系10家系の発端者に協力を得た。まず、既知の糖尿病原因遺伝子変異を除外すべく、家系発端者についてMODY1-MODY6遺伝子の配列決定を行い、既知の糖尿病発症原因であるMODY3遺伝子変異HNF1 α R583Gを1名に同定した。このため、当該家系を除外した他の9家系のうち、家族にも協力を依頼し、連鎖解析に十分な人数の家族に同意を得られた4家系を連鎖解析の対象とした。

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、4家系について、常染色体優性遺伝形式にて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マーカーでタイピングを行った。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

家系の特徴：表1に連鎖解析対象4家系および、残り6家系発端者の情報(年齢、BMI、HbA1c、発症年齢、治療法)を示した。Additional Index cases中にID6として示された発端者が、MODY3遺伝子変異保有者であった。4家系において40歳未満の若年発症が4名にみられ、16名の糖尿病罹患者のうち3名が非肥満(BMI25未満)であった。

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。

表 1 家系の特徴

| | ID | 年齢 | 性別 | BMI | HbA1c(%) | 診断時年齢 | 治療法 |
|------------------------|--------|----|----|------|----------|----------|---------------|
| Pedigree 1 | II-4 | 70 | F | 16.2 | 5.0 | | |
| | II-5 | 71 | F | 22.5 | 10.6 | 60 (DM) | Insulin 66U/d |
| | III-1 | 40 | F | 21.9 | 5.4 | | |
| | III-2 | 37 | M | 26.0 | 6.9 | 20 (DM) | Insulin |
| Pedigree 2 | II-1 | 79 | M | 19.2 | 7.5 | 50 (DM) | Insulin 25U/d |
| | II-2 | 77 | F | 18.6 | 5.6 | | |
| | II-3 | 76 | M | 17.9 | 7.2 | 45 (DM) | Insulin |
| | II-5 | 74 | M | 18.2 | 6.0 | 64 (IGT) | Diet |
| | II-6 | 71 | F | 18.4 | 6.6 | N/A (DM) | Oral drug |
| | II-7 | 68 | F | 19.9 | 5.9 | | |
| | III-1 | 53 | M | 24.2 | 6.0 | 53 (IGT) | Diet |
| | III-3 | 51 | M | 20.4 | 5.6 | | |
| | III-4 | 47 | F | 19.3 | 5.2 | | |
| | III-5 | 46 | F | 19.6 | 4.9 | | |
| | IV-1 | 23 | M | 19.9 | 5.6 | | |
| Pedigree 3 | II-7 | 92 | F | 22.3 | 5.9 | | |
| | III-2 | 77 | F | 23.9 | 9.3 | 30 (DM) | Oral drug |
| | III-5 | 72 | F | 22.0 | 8.1 | 60 (DM) | Insulin 16U/d |
| | III-6 | 69 | F | 19.8 | 8.0 | 65 (DM) | Insulin 16U/d |
| | III-8 | 66 | F | 19.1 | 6.5 | 64 (IGT) | Diet |
| | III-10 | 59 | F | 19.3 | 10.2 | 57 (DM) | Oral drug |
| | III-11 | 67 | F | 20.4 | 6.9 | 62 (DM) | Oral drug |
| | III-12 | 66 | M | 21.1 | N/A | 57 (DM) | Oral drug |
| | III-13 | 64 | F | 20.0 | 6.6 | 25 (DM) | Insulin |
| | III-14 | 62 | M | 20.2 | 10.3 | 50 (DM) | Oral drug |
| Pedigree 4 | II-1 | 76 | F | 28.2 | 6.7 | 60 (DM) | Oral drug |
| | II-2 | 73 | F | 25.1 | 6.4 | 50 (DM) | Oral drug |
| | II-3 | 67 | F | 19.0 | 5.5 | | |
| | II-4 | 64 | M | N/A | 5.4 | | |
| | III-1 | 52 | F | 20.4 | 5.3 | | |
| | III-2 | 50 | M | 20.8 | 6.2 | 35 (DM) | Oral drug |
| Additional Index Cases | 1 | 57 | M | 25.7 | 7.1 | 30 (DM) | Oral drug |
| | 2 | 47 | F | 22.9 | 10.0 | 36 (DM) | Insulin 20U/d |
| | 3 | 68 | F | 19.7 | 7.1 | 45 (DM) | Insulin 19U/d |
| | 4 | 60 | F | 24.7 | 10.4 | 40 (DM) | Insulin 51U/d |
| | 5 | 60 | F | 28.0 | 9.7 | 50 (DM) | Insulin 8U/d |
| | 6 | 54 | F | 34.5 | 9.1 | 40 (DM) | Insulin |

図1 連鎖解析対象の4家系

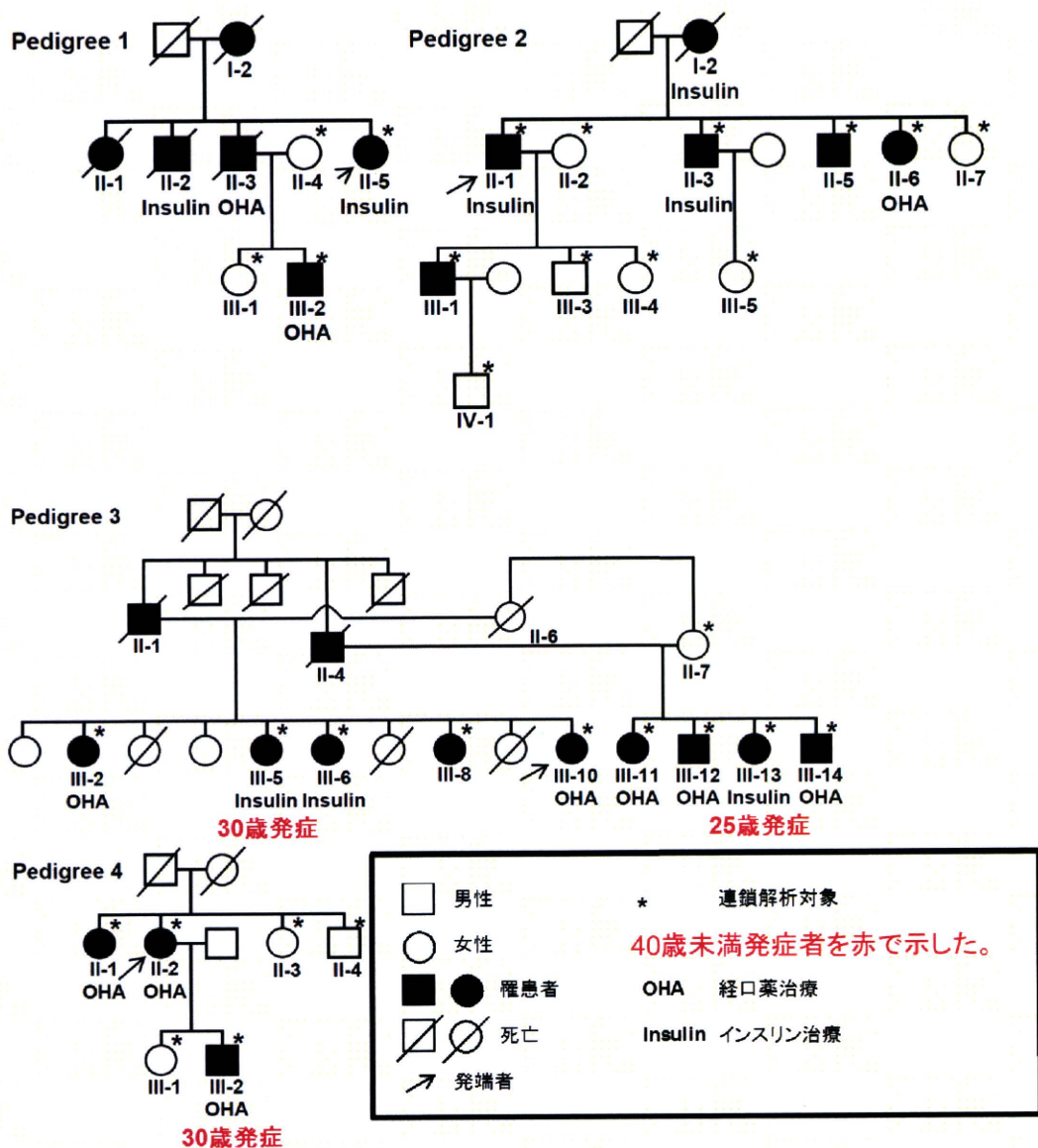
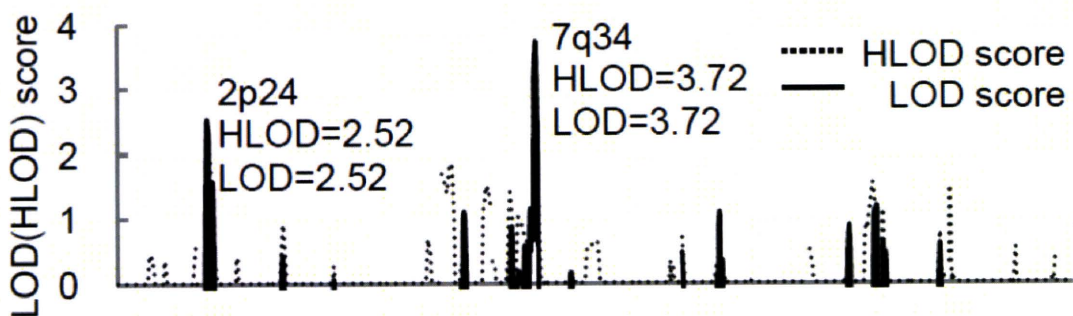


図2 全ゲノム連鎖解析結果



候補遺伝子塩基配列決定：連鎖候補領域に存在する 106 遺伝子から、MODY1-MODY6 遺伝子と関連した特徴を持つ遺伝子群を、データベースを用いた方法(Endeavour web server)にて順位付けし、上位 10%にあたる 11 遺伝子を選択した。そのうち糖代謝以外の代謝機能が明らかな 3 遺伝子を除き 8 遺伝子の塩基配列決定を、糖尿病多発集積家系発端者において行った。その結果、GCKR 遺伝子変異が発端者において同定されたため、GCKR 遺伝子の塩基配列決定を、糖尿病多発集積家系 9 家系の発端者および、旧丹生川村コホートにおける 5 年間の追跡中 HbA1c<6.0%(国際標準値)空腹時血糖<100mg/dl であった 18 名の正常対照者について系統的に行った。この際 GCKR 遺伝子において同定された 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正常対照者 105 名 210 染色体においてタイピングを行い、正常対照者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 に示すように糖尿病多発集積家系発端者において有意に多数の rare SNPs が見いだされた(Fisher の正確確率検定にて $p=0.033$)。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。

D. 考察

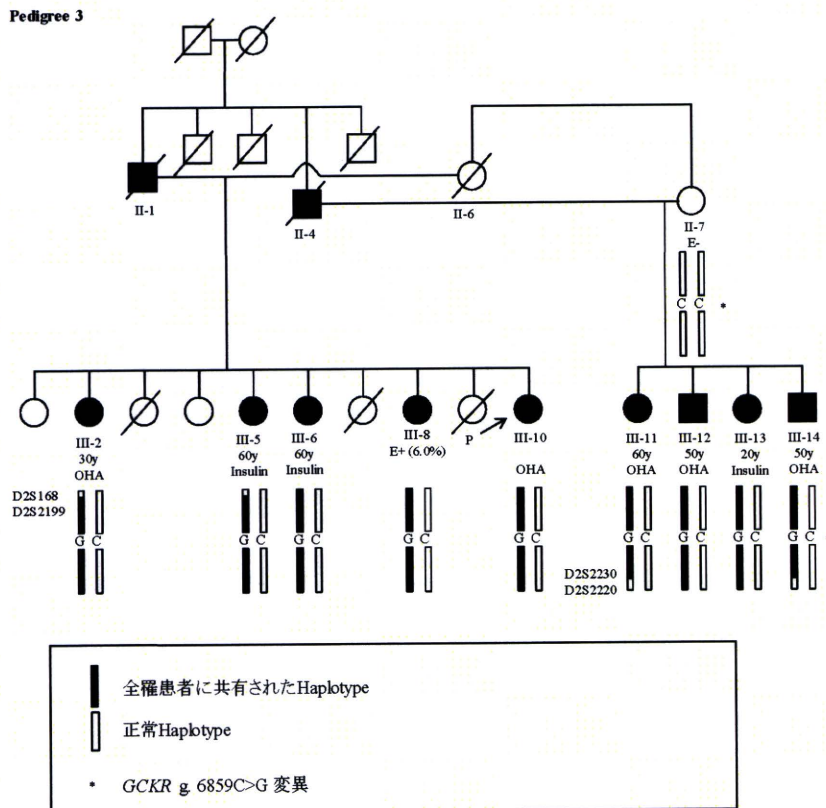
3 世代にわたり糖尿病に罹患する遺伝的負荷の濃厚な家系について原因遺伝子の検討

を行った。10 家系のうち 1 家系の原因遺伝子は既知の MODY3 遺伝子変異と考えられた。他の 9 家系のうち連鎖解析に十分な数の家族に協力が得られた 4 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 が存在しており、GCKR の配列決定にて、変異が糖尿病多発集積家系発端者において有意に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、糖尿病多発集積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。

表 2 GCKR 遺伝子変異(rare SNPs)の頻度

| 位置 | 塩基変化 | 検出アレル数 | | | | p | Minor Allele Frequency (MAF) |
|-----------------------|------------|------------|-------|----------|-------|-------|------------------------------|
| | | 家系発端者(n=9) | | 対照(n=18) | | | |
| | | Major | Minor | Major | Minor | | |
| 変異 (MAF<1%) | | | | | | | |
| プロモーター | g. -689G>A | 17 | 1 | 36 | 0 | 0.33 | 0.00 |
| プロモーター | g. -299G>A | 17 | 1 | 36 | 0 | 0.33 | 0.00 |
| エクソン9 | g. 6859C>G | 17 | 1 | 36 | 0 | 0.33 | 0.00 |
| 合計 | | 15 | 3 | 36 | 0 | 0.033 | |

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



E. 結論

以上から、GCKR 遺伝子が糖尿病多発集積家系において発症感受性遺伝子となっていることが示唆された。今後、さらなる大

家系のデータ収集や、全エクソンシーケンシングによる網羅的解析を加えることにより、糖尿病多発集積家系の発症原因のさ