

201107009A

厚生労働科学研究費補助金
創薬基盤推進研究事業

日本人糖尿病家族歴濃厚家系の全ゲノム
連鎖解析および全エクソンシーケンスを
併用した糖尿病関連遺伝子の同定

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 稲垣暢也

平成24 (2012) 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

日本人糖尿病家族歴濃厚家系の全ゲノム
連鎖解析および全エクソンシーケンスを
併用した糖尿病関連遺伝子の同定

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 稲垣 暢也

平成 24 (2012) 年 4 月

目 次

I. 総括研究報告

- 日本人糖尿病家族歴濃厚家系の全ゲノム連鎖解析および全エクソン
シーケンスを併用した糖尿病関連遺伝子の同定1
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、ゲノム解析および機能解析による
糖尿病感受性遺伝子の同定に関する研究10
長嶋 一昭 京都大学医学研究科糖尿病・栄養内科学 講師
2. 日本人糖尿病家族歴濃厚家系の全ゲノム連鎖解析と全エクソン
シーケンスを併用した糖尿病原因遺伝子の絞込みおよび機能検証
に関する研究14
田中 大祐 京都大学医学研究科糖尿病・栄養内科学 特定助教
3. 日本人糖尿病家族歴濃厚家系の全ゲノム連鎖解析および全エクソン
シーケンスを併用した糖尿病原因遺伝子の同定に関する研究21
小泉 昭夫 京都大学医学研究科環境衛生学 教授
4. 大規模日本人ゲノムコホートをを用いた糖尿病感受性候補遺伝子の検証
に関する研究26
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
5. 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33
池田 正毅 正名会池田病院 院長
6. 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36
岡本 元純 大津赤十字病院 副院長
7. 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39
矢野 秀樹 彦根市立病院 副院長
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42
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
臨床データ収集に関する研究44
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 -----47

Ⅳ. 研究成果の刊行物・別刷 -----61

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

日本人糖尿病家族歴濃厚家系の全ゲノム連鎖解析および全エクソン
シーケンスを併用した糖尿病関連遺伝子の同定

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：糖尿病の激増は深刻な社会問題となっている。糖尿病の発症には遺伝素因および環境要因が深く関与する。糖尿病発症原因遺伝子に関して、近年、全ゲノム関連解析（GWAS）による糖尿病発症原因候補遺伝子の絞込みの報告が数多くなされているが、原因遺伝子同定まで至った例は少なく、多くの糖尿病発症原因遺伝子は未同定のままである。我々は、これまでに糖尿病多発家系の集積と全ゲノム連鎖解析により疾患感受性遺伝子の探索を行ってきた。この解析では、糖尿病家族歴濃厚家系を解析対象に用いることにより小規模の対象者数での絞込みが可能となったが、それでも最終的に絞り込まれた候補領域には数十～数百個の候補遺伝子が残り、その後の個々の検討に膨大な労力が必要な状態であった。本研究では、より効率的な糖尿病候補遺伝子の絞込みのため、従来からの糖尿病多発家系の集積と全ゲノム連鎖解析に加え、全エクソンシーケンスを併用し、変異を同定後、対照群での変異頻度検証から common variant と mutation を選別し、上記連鎖解析結果と照合し、疾患感受性候補遺伝子の数をより少数とした上で原因遺伝子の同定を行った。その結果、解析に用いた家系における糖尿病発症原因候補として EEA1 遺伝子変異が同定され、同変異は当該家系における糖尿病罹患者のみに認められたのみならず、健常人との比較で糖尿病患者に有意に高頻度で認められることから、一般人口においても糖尿病発症感受性遺伝子となっている可能性が示唆された。現在、in vitro 解析による検証解析が進行中である。

分担研究者

小泉 昭夫 京都大学医学研究科
環境衛生学 教授

長嶋 一昭 京都大学医学研究科 講師

松田 文彦 京都大学医学研究科附属
ゲノム医学センター
ゲノム医科学 教授

田中 大祐 京都大学医学研究科
特定助教

池田 正毅 正名会池田病院 院長
岡本 元純 大津赤十字病院 副院長
矢野 秀樹 彦根市立病院病院
副院長
水野 展寿 滋賀県立成人病センター
糖尿病内分泌科 部長
安田 浩一郎 大阪府済生会野江病院
内科部長

A. 研究目的

糖尿病の激増は深刻で糖尿病対策基盤の充実は緊急課題である。日本人は糖尿病易発症素因が欧米人に比べ顕著であり、原因遺伝子の解明は日本人糖尿病の発症と進展抑制対策に重要な論拠基盤となる。既報の候補遺伝子は疾患との相関性のみで同定にまで至った例は僅かであり、遺伝子異常出現頻度は人種差があるため日本人における実態解明が急務である。

申請者らは糖尿病研究領域において、膵β細胞インスリン分泌機序の鍵分子である KATP チャンネルの分子的基盤を世界に先駆けて確立し (*Science*. 1995)、生理的条件下での意義を証明し (*Proc Natl Acad Sci USA*. 1997, 1998)、多様な活性調節機序 (*EMBO J*. 1999)、薬剤作用機序 (*DRCP*. 2007) およびインスリン分泌調節機構 (*Nature*. 2001, *Nat Med*. 2005) に関する先駆的解明を行ってきた。糖尿病発症原因解明の観点では、本邦初の Kir6.2 遺伝子異常を伴う新生児糖尿病症例、世界初の Kir6.2 遺伝子異常による成人発症糖尿病症例の MODY 家

系を報告し (*J Clin Endocrinol Metab*. 2005)、上記厚労省研究により糖尿病感受性遺伝子として GCKR 遺伝子を同定した (*Mol. Genet. Metab.*, 2011.)。糖尿病多発家系を解析対象に用いた全ゲノム連鎖解析は、適合家系集積の困難さなどから報告例は希少であり、同手法により小規模の対象者数での絞り込みが可能とはなかったが、それでも最終的に絞り込まれた候補領域には数十～数百の候補遺伝子が残った。絞り込まれた複数の候補領域 (有意連鎖領域) 内に存在する遺伝子で、なおかつエクソンシーケンスによる変異 (common variant または mutation) が確認された遺伝子のみを候補遺伝子とすることで、以後の同定作業を効率化・高精度化できると考え本研究を立案した。

本申請研究は、平成 20～22 年度厚労省科学研究 (創薬基盤推進研究事業) での糖尿病家族歴濃厚家系の集積を基盤とした連鎖解析・ハプロタイプ解析による糖尿病感受性染色体領域絞り込みに加え、全エクソンシーケンスを用いた遺伝子変異検索を併用し、高い生物学的妥当性と精度で糖尿病感受性遺伝子を同定すること、さらには検証解析により日本人糖尿病患者における同遺伝子異常に関するゲノム疫学的検討を行うことを目的とする。

B. 研究方法

1) 糖尿病家族歴濃厚家系の集積とゲノム解析による糖尿病感受性遺伝子の絞り込み (田中、小泉、長嶋、池田、岡本、矢野、水野、安田、稲垣)
平成 20 年度から糖尿病家族歴濃厚家系の集積と連鎖解析およびハプロタイプ解析等のゲノム解析を推進し、糖尿病感受性染色

体領域の絞り込みを進めている。平成 23 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 世代以上にわたり糖尿病患者を有する家系の調査・集積を継続し、承諾得られた親族末梢血からの DNA サンプルおよび臨床データを収集する。集積した家系を複数家系および単家系で連鎖解析を行う。全ゲノムを約 10cM 間隔でカバーするマイクロサテライトマーカーを用いジェノタイプングし、Genehunter 2 を用いてパラメトリック連鎖解析およびノンパラメトリック連鎖解析を行い、糖尿病発症との連鎖を認めた染色体領域について、fine mapping (約 1~2cM) を行ない、有意連鎖染色体領域に関してハプロタイプ解析を行ない候補領域に存在する遺伝子を同定する。

2) データベースを用いた候補遺伝子の評価 (田中、小泉、長嶋、稲垣)

順位候補領域に含まれる遺伝子群を、既報論文等のデータマイニング等により順位付けを行い、以後の解析 (塩基配列決定など) 順番等で参考とする。

3) 全エクソン解析による遺伝子変異の検索 (田中、小泉、長嶋、稲垣)

全ゲノム連鎖解析終了し、幾つかの有意連鎖領域認めた家系に関して、発端者から全エクソンシーケンスを行う。検体ゲノム DNA を断片化し、Genome Analyzer IIx システム (イルミナ社) 解析用ライブラリーを作成、SureSelect Human All Exon(50Mb) キット (Agilent Technologies 社) にて対象領域ゲノム DNA 断片を濃縮し、Genome Analyzer IIx システムにてシーケンスを行う。得られた塩基配列を参照ゲノム配列に対しマッピングし変異解析を実施する。シーケンスおよび変異解析はタカラバイ

オ株式会社に委託する。得られた変異に関して、日本人ゲノムコホート (対照群) での変異頻度検証から得られた変異を common variant と mutation に評価・選別する。

4) 上記、連鎖解析・ハプロタイプ解析と全エクソン解析による候補遺伝子の絞り込み (田中、小泉、長嶋、稲垣)

糖尿病発症との有意連鎖領域に存在し、かつエクソンシーケンスによる変異 (common variant または mutation) を認める遺伝子を選出し、データベースを用いた解析優先順位づけ等を参考にして、選出候補遺伝子の個別評価 (直接シーケンスによる変異同定と家系内 segregation の確認) を行う。さらに患者臨床所見や既報データ等と比較・検討し、糖尿病発症原因遺伝子としての妥当性を評価し、最終的に遺伝子同定する。

5) 同定遺伝子に関する検証作業

a) in vitro 解析: 候補遺伝子が関与する糖代謝機序に関連する機能変化を齧歯類豚ラ氏島および膵 β 細胞株を用いた分泌機能評価、および哺乳動物細胞による該当遺伝子発現系を用いての機能変容を検証する (長嶋、田中、稲垣)。

b) in vitro 再構成系による遺伝子変異による機能異常の検討: 同定した遺伝子とその変異部位に関して、site-directed mutagenesis により遺伝子変異を導入した変異遺伝子を発現ベクターに組み込み哺乳動物培養細胞に導入 (Lipofection 法) し、機能蛋白の特性変化を評価し、同蛋白が薬剤作用機序に関連する場合、薬剤反応性変化を検討し、臨床上の薬効変化を検討する (長嶋、田中、稲垣)。

c) 大規模コホートデータを用いた

Case-Control 解析：現在、整備を進めている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、秋田県能代市および岐阜県高山市コホート）データを基に、絞り込まれた糖尿病感受性遺伝子に関して日本人糖尿病患者群および非糖尿病群の Case-Control 解析を行い、同遺伝子異常の糖尿病発症との関連に関して検証作業を行う。さらに日本人糖尿病発症における同遺伝子異常に関するゲノム疫学的実態を検討する（田中、小泉、松田、長嶋、稲垣）。平成 23 年度は 1), 2) を進め、平成 24 年以降は 1), 2) と並行して 3), 4), 5) を実施する予定としている。

（倫理面への配慮）

本研究に係わるヒト遺伝子解析研究に関して、京都大学大学院医学研究科・医学部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）、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。本ゲノム疫学コホートに関しては、2005 年 12 月、滋賀県長浜市と「ながはま 0 次予防コホート事業」の協定を締結。2006 年 7 月に事業計画策定委員会を設立。個人情報保護等の倫理的側面の検討とプロジェクト推進のための指針作成に向け、本研究科の研究者、長浜市、長浜市民の代表と第三者で構成される長浜ルール策定委員会が 2006 年度に発足し、個人情報保護に努めている。秋田県能代市および岐阜県高山市の日本人コホートに関しては、両市の協力の元、市住民への研究協力承諾書の取得作業を進めている。動物実験に関しては、京都大学動物実験委員会・動物実験指針に則り遂行する。

C. 研究結果

当初の計画通り 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・集積を継続的に行った。これまでの累積数で 67 家系、243 名以上の研究参加の承諾を得て採血を行い、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。

今回の新規の連鎖解析対象 2 家系の特徴に関して、ゲノム DNA 提供を受けた罹

患者 2 家系 21 名のうち、11 名は 40 歳未満で糖尿病を発症しており、5 名がインスリン治療中、10 名が経口薬治療中であった。各家系発端者について、1 型糖尿病を除外するため GAD 抗体陰性を確認した上で、既知糖尿病原因遺伝子である MODY1-6 (HNF4A 遺伝子・GCK 遺伝子・HNF1A 遺伝子・PDX1 遺伝子・HNF1B 遺伝子・NEUROD1 遺伝子) のエクソンシーケンスをキャピラリーシーケンサーにて施行した。一家系（家系 1）の発端者に既知糖尿病感受性変異である HNF4A 遺伝子の T117I 変異が見いだされた。同家系全員につき T117I 変異のタイピングを行い、変異 (HNF4A T117I) 保持者は連鎖解析から除外または表現型を不知(Unknown)とした。全エクソンシーケンスの対象として発端者以外の変異 (HNF4A T117I) 非保持者 1 名を選出、家系 2 については発端者からの検体を用いて全エクソンシーケンスを行った。

連鎖解析：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。家系 1 での連鎖解析の結果、染色体 4 番・5 番・12 番に LOD Score の高い領域を認め、これらの領域で fine-mapping を行い、連鎖領域

を絞り込んだ。その結果、染色体 4 番・5 番・12 番それぞれに LOD Score 1.80 の連鎖領域をハプロタイプ解析により確定した。

全エクソンシーケンス：全エクソンシーケンスの結果、家系 1 の解析では連鎖領域内の Non-synonymous かつ dbSNP131 に未登録なエクソン変異は 10 個存在した。そのうち罹患者のみに集積する変異は 7 個であった。7 個の変異について一般健常対照者 105 名および糖尿病患者 130 名において頻度を検討したところ、EEA1 遺伝子の N1072K 変異に関して一般健常者におけるアレル頻度が 0.0% (0/210) であったのに対し糖尿病患者において 1.9% (5/260) と、糖尿病患者における頻度が高い傾向を認めた。さらに、同変異については、105 名のうち遺伝的負荷が大きいと推定される BMI 25 未満の糖尿病患者 67 名におけるアレル頻度が高く (2.9%, 4/134)、また家族歴を有する糖尿病患者 96 名 (コホートデータと家系データを合算) におけるアレル頻度が高い (2.6%, 5/192) ことが示され、いずれもフィッシャーの正確確率検定にて一般健常者に比して有意であった (各々、 $p=0.022$ および $p=0.024$)。

さらに、EEA1 の糖尿病発症に関する生理学的意義を検証するため、siRNA による膵 β 細胞株 (MIN6 細胞) および前駆脂肪細胞株 (3T3-L1 細胞) を用いた検討を進めている。EEA1 の siRNA による発現抑制および細胞株調達、3T3-L1 細胞の成熟脂肪細胞への分化誘導も手技確認終了し、今後、機能解析予定である。また、昨年度までに糖尿病家族歴濃厚家系を用いた全ゲノム連鎖解析およびハプロタイプ解析で絞り込んだ糖尿病発症原因候補遺伝子 *GCKR* に関する

siRNA を用いた機能解析も並行して進行中である。

D. 考察

糖尿病多発家系において、全ゲノム連鎖解析および全エクソンシーケンスを併用して検出された変異の中に、家系内で罹患者にのみ集積し、一般健常者にて認められず糖尿病患者において相当な頻度にて認められるものが存在した。当該変異は家系における糖尿病発症原因であり、かつ一般人口における糖尿病発症の遺伝的背景のひとつである可能性が示唆された。疾患多発家系を用いた全ゲノム連鎖解析と全エクソンシーケンス併用による原因遺伝子絞込手法は、糖尿病発症原因遺伝子の効率的な絞込に有効であると考えられた。絞込精度を上げるためにはより明瞭な疾患発症家族歴を有する大家系の探索が極めて重要であると思われた。

E. 結論

本年度の解析により同定した EEA1 遺伝子変異が糖尿病多発家系および一般人口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。EEA1 遺伝子は初期エンドソームの機能にかかわっているとされるが、糖代謝に及ぼす機能に関する知見は存在せず、*in vitro* 解析により糖尿病発症と EEA1 遺伝子の関わりにつき今後明らかとする必要がある。また、他の家系についても全ゲノムシーケンスを行い、糖尿病多発家系の発症原因をさらに詳細に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

Toyama K, Yonezawa A, Masuda S, Ogawa R, Hosokawa M, Fujimoto S, Inagaki N, Inui K-I, Katsura T. Loss of multidrug and toxin extrusion (MATE 1) is associated with metformin-induced lactic acidosis. *Br. J. Pharmacol.*, in press.

Sakamoto E, Seino Y, Fukami A, Mizutani N, Tsunekawa S, Ishikawa K, Ogata H, Uenishi E, Kamiya H, Hamada Y, Sato H, Harada N, Toyoda Y, Miwa I, Nakamura J, Inagaki N, Oiso Y, Ozaki N. Ingestion of a moderate high-sucrose diet results in glucose intolerance with reduced liver glucokinase activity and impaired glucagon-like peptide-1 secretion. *J. Diabetes Invest.*, in press.

Mitsui R, Fukushima M, Taniguchi A, Nakai Y, Aoyama S, Takahashi Y, Tsuji H, Yabe D, Yasuda K, Kurose T, Kawakita T, Seino Y, Inagaki N. Insulin secretory capacity and insulin sensitivity in impaired fasting glucose in Japanese. *J. Diabetes Invest.*, in press.

Flamein F, Riffault L, Muselet-Charlier C, Pernelle J, Feldmann D, Jonald L, Durand-Schneider AM, Coulomb A, Maurice M, Noguee LM, Inagaki N, Amselem S, Dubus J C, Rigourd V, Brémont F, Marguet C, Brouard J, de Blic J, Clement A, Epaud R, Guillot L. Molecular and cellular characteristics of ABCA3 mutation associated with diffuse parenchymal lung diseases in children. *Hum. Mol. Genet.* 21: 765-775, 2012.

Morales CR, Ni X-Y, Smith CE, Inagaki N, Hermo L. ABCA17 mediates sterol efflux from mouse spermatozoa plasma membranes. *Histol. Histopathol.* 27: 317-328, 2012.

Harashima S-I, Horiuchi T, Wang Y, Notkins, AL, Seino Y, Inagaki N. Sortingnexin 19 regulates the number of dense core vesicles in pancreatic β -cells. *J. Diabetes Invest.* 3: 52-61, 2012.

Yabe D, Watanabe K, Sugawara K, Kuwata H, Kitamoto Y, Sugizaki K, Fujiwara S, Hishizawa M, Hyo T, Kuwabara K, Yokota K, Iwasaki M, Kitatani N, Kurose T, Inagaki N, Seino Y. Comparison of incretin immunoassays with or without plasma extraction: correlation of clinical characteristics and incretin secretion in Japanese patients with type 2 diabetes. *J. Diabetes Invest.*, 3: 70-79, 2012.

Yamane S, Harada N, Hamasaki A, Muraoka A, Joo E, Suzuki K, Nasteska D, Tanaka D, Ogura M, Harashima S-I, Inagaki N. The effects of glucose and meal ingestion on incretin secretion in Japanese subjects with normal glucose tolerance. *J. Diabetes Invest.* 3: 80-85, 2012.

Yamane S, Harada N, Hamasaki A, Muraoka A, Joo E, Suzuki K, Nasteska D, Tanaka D, Ogura M, Harashima S-I, Inagaki N. The effects of glucose and meal ingestion on incretin secretion in Japanese subjects with normal glucose tolerance. *J. Diabetes Invest.*, in press.

Kawamori R, Inagaki N, Araki E, Watada H, Hayashi N, Horie Y, Sarashina A, Gong Y, von Eynatten M, Woerle HJ, Dugi K. A. Linagliptin monotherapy provides superior glycaemic control versus placebo or voglibose with comparable safety in Japanese patients with type 2 diabetes: a randomized, placebo and active comparator-controlled, double-blind study. *Diabetes Obes. Metab.* 14: 348-357, 2012.

Harashima S, Ogura M, Tanaka D, Fukushima T, Wang Y, Koizumi T, Aono M, Murata Y, Seike M, Inagaki N. Sitagliptin add-on to low dosage sulfonylureas: efficacy and safety of combination therapy on glycemic control and insulin secretion capacity in type 2 diabetes. *Int. J. Clin. Pract.* 66: 465-476, 2012.

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*, Article ID 594532, doi:10.1155/2011/594532, 2011

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* 60:218-226, 2011

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: 115-120, 2011.

Tanaka, D., Nagashima, K., Sasaki, M., Yamada, C., Funakoshi, S., Akitomo, K., Takenaka, K., Harada, K., Koizumi, A., Inagaki N. GCKR mutations in Japanese families with clustered type 2 diabetes. *Mol. Genet. Metab.* 102: 453-460, 2011.

Yamane S, Hamamoto Y, Harashima S, Harada N, Hamasaki A, Toyoda K, Fujita Y, Joo E, Inagaki N. GLP-1 receptor agonist attenuates ER stress-mediated β -cell damage in Akita mice. *J. Diabetes Invest.* 2: 104-110, 2011.

Harada N, Hamasaki A, Yamane S, Muraoka A, Joo E, Fujita K, Inagaki N. Plasma gastric inhibitory polypeptide and glucagon-like peptide-1 levels after glucose loading are associated with different factors in Japanese subjects. *J. Diabetes Invest.* 2: 193-199, 2011.

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.* 2: 233-239, 2011.

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.* 435: 421-430, 2011.
- 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.* 24: 839-844, 2011.
- Harashima S-I, Wang Y, Horiuchi T, Seino Y, Inagaki N. Purkinje cell protein 4 positively regulates neurite outgrowth and neurotransmitter release. *J. Neurosci. Res.* 89: 1519-1530, 2011.
- Cha C-Y, Nakamura Y, Himeno Y, Wang J, Fujimoto S, Inagaki N, Earm YE, Noma A. Ionic mechanisms and Ca^{2+} dynamics underlying the glucose response of pancreatic β -cells: A simulation study. *J. Gen. Physiol.* 138: 21-37, 2011.
- Funakoshi S, Fujimoto S, Hamasaki A, Fujiwara H, Fujita Y, Ikeda K, Takahara S, 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.*, 2: 297-303, 2011.
- Himeno T, Kamiya H, Naruse K, Harada N, Ozaki N, Seino Y, Shibata T, Kondo M, Kato J, Okawa T, Fukami A, Hamada Y, Inagaki N, Seino Y, Drucker DJ, Oiso Y, Nakamura J. Beneficial effects of exendin-4 on experimental polyneuropathy in diabetic mice. *Diabetes* 60: 2397-2406, 2011.
- Cifuentes M, Pérez-Martín M, Grondona JM, López-Ávalos MD, Inagaki N, Granados-Durán P, Rivera P, Fernández-Llebrez PA. Comparative analysis of intraperitoneal versus intracerebroventricular administration of bromodeoxyuridine for the study of cell proliferation in the adult rat brain. *J. Neurosci. Methods*, 201: 307-314, 2011.
- Shihara N, Kitaoka M, Inagaki N, Kadowaki T, Koumoto S, Satoh J, Terauchi Y, Nunoi K, Yamada Y, Sakamaki H, Seino Y. Randomized controlled trial of single-agent glimepiride and pioglitazone in Japanese patients with type 2 diabetes: A comparative study. *J. Diabetes Invest.* 2: 391-398, 2011.
- Ikeda K, Fujimoto S, Goto M, Yamada C, Hamasaki A, Shide K, Kawamura T, Inagaki N. Impact of endogenous and exogenous insulin on basal energy expenditure in patients with type 2 diabetes under standard treatment. *Am. J. Clin. Nutr.*, 94: 1513-1518, 2011.
- Takeda Y, Amano A, Noma A, Nakamura Y, Fujimoto S, Inagaki N. Systems analysis of GLP-1 receptor signaling in pancreatic β -cells. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* 301: C792-803, 2011.
- Funakoshi S, Fujimoto S, Hamasaki A, Fujiwara H, Fujita Y, Ikeda K, Takahara S, Seino Y,

Inagaki N. Analysis of factors influencing postprandial C peptide levels in Japanese patients with type 2 diabetes: Comparison with C peptide levels after glucagon load. *J. Diabetes Invest.*, 2: 429-434, 2011

Inagaki N, Ueki K, Yamamura A, Saito H, Imaoka T. Long-term safety and efficacy of exenatide twice daily in Japanese patients with suboptimally controlled type 2 diabetes. *J. Diabetes Invest.* 2: 448-456, 2011.

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

【政策提言】

平成 22 年～24 年度 厚生労働科学研究費補助金 糖尿病戦略等研究事業「糖尿病診療均てん化のための標準的診療マニュアル作成とその有効性の検証-ガイドラインを実用化するためのシステム・体制整備の視点から」の研究分担者として政策提言に関与している。さらに、糖尿病学会高血圧学会合同委員会の委員として糖尿病患者における高血圧治療のガイドライン作成、日本糖尿病学会の糖尿病診断基準に関する調査検討委員会委員として新しい糖尿病診断基準の策定、ならびに日本糖尿病学会のインクレチン（GLP-1 受容体作動薬と DPP-4 阻害薬）の適正使用に関する委員会委員としてインクレチン関連薬の適正使用に関して提言を行った。

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、ゲノム解析および機能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る。平成20~22年度厚生労働省科学研究（創薬基盤推進研究事業）から継続して糖尿病発症原因遺伝子の探索を行っている。これまで糖尿病多発家系の集積と全ゲノム連鎖解析により疾患感受性遺伝子の探索を行ってきた。この解析では糖尿病家族歴濃厚家系を解析対象に用いることにより小規模の対象者数での絞り込みが可能となったが、それでも最終的に絞り込まれた候補領域には数十~数百個の候補遺伝子が残り、その後はデータベースを用いた優先順位付けにより個々の検討を行わざるをえなかったのが実情である。これらの経験を踏まえ、同手法に、全エクソンシーケンスを併用し、より効率的な原因遺伝子絞り込みを行っている。本年度は、上記手法により糖尿病発症原因候補遺伝子として EEA1 遺伝子を絞り込んだ。現在 *in vitro* 検証解析実施中である。

A. 研究目的

糖尿病の激増は著しく、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。我々は、平成20~22年度厚生労働省科学研究（創薬基盤推進研究事業）により糖尿病多発家系の集積と全ゲノム連鎖解析により疾患感受性遺伝子の探索を

行ってきた。本研究では、従来手法に、全エクソンシーケンスを併用し、より効率的な原因遺伝子絞り込みを行う糖尿病発症原因遺伝子探索のための研究戦略の構築、および新規糖尿病関連遺伝子の同定を目的とする。

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。続いて、発端者ゲノム DNA を断片化し、全エクソン領域を濃縮し、イルミナ社 GAIIX を用いてシークエンスを行った。連鎖領域に含まれる塩基変化のうち、Non-synonymous であり dbSNP131 に未登録のものを候補変異として選択した。選択された変異はキャピラリーシークエンサーにて再確認するとともに、家系内で罹患者のみにみられ非罹患者にはみられない変異を絞りこんだ。一般人口での検証に関して、秋田県能代市および岐阜県高山市において日本人ゲノムコホートデータを収集し、身体診察・既往歴・血液検査データの整理

を完了した。糖尿病患者 130 名および一般健常対照者 105 名をランダムに抽出し、候補変異についてゲノム DNA のタイピングを行った。糖尿病患者において一般対照者より多く見られる変異については、さらに京都大学医学部附属病院糖尿病・栄養内科および共同研究施設で見出された家族歴を有する糖尿病患者 64 名においてもタイピングし確認を行った。

(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-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。動物実験に関しては、京都大学動物実験委員会・動物実験指針に則り遂行する。

C. 研究結果

今回、ゲノム DNA 提供を受けた 2 家系の発端者において、既知糖尿病原因遺伝子である MODY1-6(HNF4A 遺伝子・GCK 遺伝子・HNF1A 遺伝子・PDX1 遺伝子・HNF1B 遺伝子・NEUROD1 遺伝子)のエクソンシークエンスをキャピラリーシークエンサーにて行った。その結果、一つの家系の発端者に既知糖尿病感受性変異である HNF4A 遺伝子 T117I 変異が見いだされたため、同家系全員に関して検討し、変異保持者は連鎖解析から除外するか表現型を不知(Unknown)とするとともに、全エクソンシークエンスの対象として発端者以外の 1 名を選んだ。家系 2 については発端者を全エクソンシーク

エンスの対象とした。

連鎖解析の結果、染色体 4 番・5 番・12 番に LOD Score の高い領域を認めた。これらの領域において fine-mapping を行い、染色体 4 番・5 番・12 番それぞれに LOD Score 1.80 の連鎖領域を認め、ハプロタイプ解析により確定した。

全エクソンシークエンスの結果、家系 1 の解析では連鎖領域内の Non-synonymous かつ dbSNP131 に未登録なエクソン変異は 10 個存在し、そのうち罹患者のみに集積する変異は 7 個であった。7 個の変異について一般健常対照者 105 名および糖尿病患者 130 名において頻度を検討したところ、EEA1 遺伝子の N1072K 変異に関して一般健常者におけるアレル頻度を検討し、糖尿病患者における頻度が高い傾向を認めた。さらに、同変異については、105 名のうち遺伝的負荷が大きいと推定される BMI25 未満の糖尿病患者 67 名におけるアレル頻度が高く (2.9%, 4/134)、また家族歴を有する糖尿病患者 96 名 (コホートデータと家系データを合算) におけるアレル頻度が高い (2.6%, 5/192) ことが示され、いずれも一般健常者に比して有意であった。

D. 考察

糖尿病多発家系において、全ゲノム連鎖解析および全エクソンシークエンスを併用する本申請研究での新手法によって、より候補遺伝子の数を絞り込んだ形で抽出することができた。今回絞り込まれた糖尿病発症原因候補遺伝子 EEA1 は、家系内で糖尿病罹患者にのみ集積し、日本人コホートを用いた一般健常者での解析により当該変異は糖尿病患者において有意に高頻度である

ことが判明した。従って、本変異は今回解析に用いた家系における糖尿病発症原因であるとともに、一般人口における糖尿病発症の遺伝的背景のひとつである可能性が示唆された。

E. 結論

糖尿病家族歴濃厚家系検体を用いた全ゲノム連鎖解析、ハプロタイプ解析および全エクソンシークエンス併用による糖尿病発症原因候補遺伝子の絞り込みを行った。解析の結果、EEA1 遺伝子変異が糖尿病多発家系および一般人口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。現在、siRNA 等を用いた in vitro 機能解析による糖尿病原因遺伝子としての妥当性の検証実験を行っている。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

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.* 2(4):297-303, 2011

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

2. 学会発表

Nagashima K, Tohru Yorifuji T, Sasaki M, Tanaka D, Inagaki N. Functional analysis of *KCNJ11* mutation in neonatal diabetes. **3th Asian Association for the Study of Diabetes (AASD)**. Oral presentation, 2011.7.22-24, 北京, 中国

Tanaka D, Nagashima K, Sasaki M, Yamada C, Funakoshi S, Akitomo K, Koizumi A, Inagaki N. Pedigree analysis of a highly aggregated Japanese families with diabetes mellitus. **American Diabetes Association, 71st Scientific Sessions**, Audio Poster Tour, 2011.6.24-28, San Diego, USA

長嶋一昭、依藤 亨、佐々木真弓、田中大祐、船越生吾、菱澤方洋、穂友絹美代、稲垣暢也。本邦における新生児糖尿病発症頻度および発症原因遺伝子に関する検討。第54回日本糖尿病学会総会，口演，2011.5.19-21，札幌

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、菱澤方洋、小泉昭夫、稲垣暢也。日本人糖尿病多発家系を用いた全ゲノム連鎖解析と疾患感受性遺伝子の同定。第54回日本糖尿病学会総会，口演，2011.5.19-21，札幌

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

日本人糖尿病家族歴濃厚家系の全ゲノム連鎖解析と全エクソンシーケンスを併用した糖尿病原因遺伝子の絞込みおよび機能検証に関する研究

研究分担者 田中 大祐

京都大学医学研究科糖尿病・栄養内科学 特定助教

研究要旨： 糖尿病発症原因遺伝子同定のため、日本人糖尿病発症多発家系（3世代以上にわたる糖尿病患者を認める家系）を集積し、全ゲノム連鎖解析、ハプロタイプ解析等により糖尿病発症原因遺伝子の絞込みを行い *GCKR* 等の候補遺伝子を同定してきた。今回、従来のアプローチに全エクソンシーケンスを併用し解析を行い、糖尿病発症原因遺伝子として *EAA1* 遺伝子を絞り込んだ。*EAA1* 遺伝子変異は当該家系内で糖尿病罹患者にのみ集積し、一般健常者にて認められなかった。また、一般健常対照者 105 名および糖尿病患者 130 名において頻度を検討したところ、*EAA1* 遺伝子の N1072K 変異に関して一般健常者におけるアレル頻度が 0.0%であったのに対し糖尿病患者において 1.9%と、糖尿病患者における頻度が高い傾向を認め、*EAA1* 遺伝子変異は当該糖尿病家族歴濃厚家系における糖尿病発症原因であり、かつ一般人口における糖尿病発症の遺伝的背景のひとつである可能性が示唆され、現在 *in vitro* 機能解析による検証実験施行中である。

A. 研究目的

近年、全ゲノム関連解析 (GWAS) による糖尿病発症原因候補遺伝子の絞込みの報告が数多くなされているが、原因遺伝子同定まで至った例は少なく、糖尿病発症原因遺伝子の多くは未同定のままである。我々は、糖尿病多発家系の集積と全ゲノム連鎖解析により疾患感受性遺伝子の探索を行ってきた。この解析では、糖尿病家族歴濃厚家系を解析対象に用いることにより小規模の対象者数での絞込みが可能となったが、それでも最終的に絞り込まれた候補領域には数十～数百個の候補遺伝子（実際に我々が絞り

こんだ糖尿病発症原因遺伝子 *GCKR* の場合では約 2cM の候補領域に約 130 個の遺伝子) が残り、その後は論文データマイニング等を用いた優先順位付けにより個々の検討を行わざるをえない状態であった。より効率的な候補遺伝子の絞込みのため、全エクソンシーケンスを併用し、変異を同定後、対照群での変異頻度検証から common variant と mutation を選別し、上記連鎖解析結果と照合し、疾患感受性候補遺伝子の数をより少数とした上で原因遺伝子の同定を行うことを目的とした。

B. 研究方法

遺伝的負荷の濃厚な家系の収集：京都大

学医学部附属病院糖尿病・栄養内科および共同研究施設で、3 世代にわたる糖尿病多発家系を見出し、患者に参加協力を依頼した。

罹患者の定義：家系解析および一般人口での検証にあたり、罹患者は(1)糖尿病診断歴、(2)75gOGTT で糖尿病型(3)HbA1c (NGSP) が 6.5%以上のいずれかに該当する者と定義した。

全ゲノム連鎖解析と全エクソンシーケンスを併用した疾患原因候補変異の選定：糖尿病多発家系の臨床情報を収集し、発端者および親族の末梢血検体からゲノム DNA を抽出した。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、全ゲノムを約 10cM 間隔で網羅するマイクロサテライトマーカーを用いて家系全員のゲノムをタイピングし、常染色体優性モデルにてパラメトリック連鎖解析を行った。連鎖が認められた候補領域に対してはマイクロサテライトマーカーを追加してファインマッピングを行い、ハプロタイプ解析を行い疾患原因遺伝子の存在領域を確定させた。続いて、発端者ゲノム DNA を断片化し、全エクソン領域を濃縮し、イルミナ社 GAIIX を用いてシーケンスを行った。連鎖領域に含まれる塩基変化のうち、Non-synonymous であり dbSNP131 に未登録のものを候補変異として選択した。選択された変異はキャピラリーシーケンサーにて再確認するとともに、家系内で罹患者のみにもみられ非罹患者にはみられない変異を絞りこんだ。

一般人口での検証：秋田県能代市および岐阜県高山市において日本人ゲノムコホー

トデータを収集し、身体診察・既往歴・血液検査データの整理を完了した。糖尿病患者 130 名および一般健常対照者 105 名をランダムに抽出し、候補変異についてゲノム DNA のタイピングを行った。糖尿病患者において一般対照者より多く見られる変異については、さらに京都大学医学部附属病院糖尿病・栄養内科および共同研究施設で見出された家族歴を有する糖尿病患者 64 名においてもタイピングし確認を行った。

(倫理面への配慮)

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

本ゲノム疫学コホートに関しては、2005 年 12 月、滋賀県長浜市と「ながはま 0 次予防コホート事業」の協定を締結。2006 年 7 月に事業計画策定委員会を設立。個人情報保護等の倫理的側面の検討とプロジェクト推進のための指針作成に向け、本研究科の研究者、長浜市、長浜市民の代表と第三者で構成される長浜ルール策定委員会が 2006 年度に発足し、個人情報保護に努めている。秋田県能代市および岐阜県高山市の日本人コホートに関しては、両市の協力の元、市住民への研究協力承諾書の取得作業を進めている。

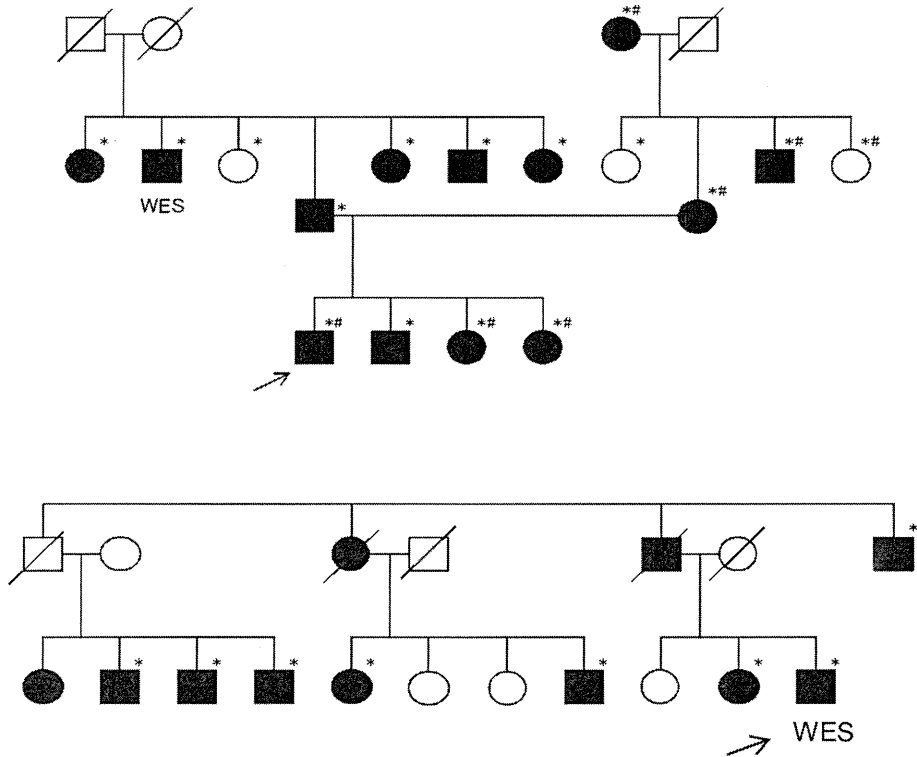
動物実験に関しては、京都大学動物実験委員会・動物実験指針に則り遂行する。

C. 研究結果

家系の特徴：図 1 に連鎖解析対象 2 家系の家系図を示す。

図 1: 糖尿病多発家系の家系図

(*: DNA 採取, #: HNF4A 遺伝子 T117I 変異, WES: 全エクソンシーケンス施行)



ゲノム DNA 提供を受けた罹患者 2 家系 21 名のうち、11 名は 40 歳未満で糖尿病を発症しており、5 名がインスリン治療中、10 名が経口薬治療中であった。

発端者における既知糖尿病原因遺伝子のシーケンス：各家系発端者につき、既知糖尿病原因遺伝子である MODY1-6(HNF4A 遺伝子・GCK 遺伝子・HNF1A 遺伝子・PDX1 遺伝子・HNF1B 遺伝子・NEUROD1 遺伝子) のエクソンシーケンスをキャピラリーシーケンサーにて行ったところ、家系 1 の発端者に既知糖尿病感受性変異である HNF4A 遺伝子の T117I 変異が見いだされた。同家系全員につき T117I 変異のタイピング

を行った結果(図 1)をもとに、変異保持者は連鎖解析から除外するか表現型を不知(Unknown)とするとともに、全エクソンシーケンスの対象として発端者以外の 1 名を選んだ。家系 2 については発端者を全エクソンシーケンスの対象とした。

連鎖解析：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。家系 1 での連鎖解析の結果、染色体 4 番・5 番・12 番に LOD Score の高い領域を認めた(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 4 番・5 番・12 番それぞれに LOD