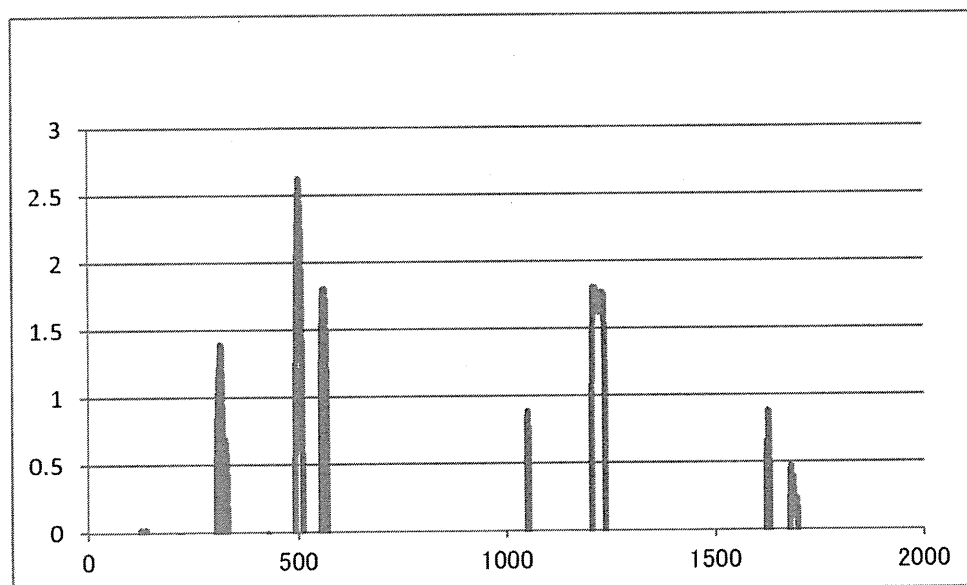


Score1.80 の連鎖領域をハプロタイプ解析により確定することができた(図 2)。

## 図 2: 全ゲノム連鎖解析結果

常染色体優性モデル (Gene Frequency 0.0001, Penetrance 0.9999, Phenocopy 0.0001)



染色体	LODスコア (Fine Mapping後)	ハプロタイプ解析結果 (Mb)
4	1.80	175.7-181.9
5	1.80	58-76.2
12	1.80	31-100

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(表1)。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、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% (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(表2)。

## 表 1: 全エクソンシーケンス結果

Nonsense/ Missense, not in dbSNP131, in linkage regions  
consensus quality >40

染色体 4: なし

染色体 5

Gene	AA Change	Sanger	Segregation (6 Affected)
CENPH	A80T	Validated	+
TMEM174	F120L	Validated	+
SREK1IP1	R29C	Validated	+

染色体 12

Gene	AA Change	Sanger	Segregation
NACA	P1818L	Validated	+
EEA1	N1072K	Validated	+
LRRIQ1	E361G	Validated	+
TMEM19	P253L	Validated	-
LRIG3	R567W	Validated	-
KRT78	M424I	Validated	-
SMAGP	S33G	Validated	+

## 表 2: SNV タイピング

タイピング: 正常対照者(Normal) 105 名 糖尿病(DM)130 名

Alleles	Normal Minor	Normal Major	Normal MAF	DM Minor	DM Major	DM MAF
CENPH A80T	2	208	0.009	2	258	0.007
TMEM174 F120L	0	210	0.000	0	260	0.000
SREK1IP1 R29C	10	200	0.047	15	245	0.057

Alleles	Normal Minor	Normal Major	Normal MAF	DM Minor	DM Major	DM MAF
NACA P1818L	6	204	0.029	1	259	0.003
EEA1 N1072K	0	210	0.000	5	255	0.019
LRRIQ1 E361G	1	209	0.004	2	258	0.007
SMAGP S33G	2	208	0.009	0	260	0.000

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(表2)。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(表3)

**表 3: SNV タイピングの再検討**

Alleles	Normal Minor	Normal Major	Normal MAF		DM Minor	DM Major	DM MAF	p (Exact)
EEA1 N1072K	0	210	0.000	DM	5	255	0.019	p=0.068
				DM BMI<25	4	130	0.029	p=0.022
				DM 家族歴あり	5	187	0.026	p=0.024

#### 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。

#### E. 結論

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

Harashima SI, Ogura M, Tanaka D, Fukushima T, Wang Y, Koizumi T, Aono M, Murata Y, Seike M, Inagaki N. Sitagliptin add-on to low dosage sulphonylureas: efficacy and safety of combination therapy on glycaemic control and insulin secretion capacity in type 2 diabetes. *Int J Clin Pract.* 66(5):465-476, 2012

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(4):453-460, 2011

##### 2. 学会発表

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, 71<sup>st</sup> Scientific Sessions*, Audio Poster Tour, 2011.6.24-28, San Diego, USA

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

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

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

#### 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

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2家系を収集した。1家系につき全ゲノム連鎖解析と全ゲノムシーケンスを併用することにより、罹患者のみに集積するエクソン変異7個を絞り込んだ。7個の変異を日本人ゲノムコホートデータの一般健常対照者と糖尿病患者においてタイピングしたところ、糖尿病患者において多発する変異が1個(EEA1遺伝子のN1072K変異)見いだされた。このことから、EEA1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である可能性が示唆された。

A. 研究目的

糖尿病発症には環境因子に加え遺伝因子が重要な役割を果たしている。日本において糖尿病患者の増加は深刻な問題であり、糖尿病発症の遺伝的背景を解明し、発症予測およびテーラーメイド医療を可能にすることが急務である。現在まで、ゲノムワイド相関解析により様々な糖尿病感受性遺伝子座位が同定されたが、多数の座位の情報を集積しても糖尿病発症予測への寄与は小さいものにとどまっている。また、遺伝形式が明らかな糖尿病多発家系においても、

MODYのように原因遺伝子が同定される例はわずかである。日本人において、糖尿病の遺伝的背景は大部分が未同定であるといえる。

一方、近年急速に進歩しつつある次世代シーケンス技術により、全エクソンシーケンスが実用的となり、原因遺伝子が未同定であった数々の遺伝性疾患において原因変異が同定され、注目を集めている。本研究の目的は、日本人糖尿病多発家系の集積を基盤とし、全ゲノム連鎖解析に基づいたハプロタイプ解析により疾患原因遺伝子

の存在領域を絞り込み、全エクソンシークエンスを併用することで領域内エクソン変異を網羅的に検出することにより、日本人における新規糖尿病発症原因遺伝子を同定することである。

## 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。遺伝的負荷の濃厚な家系を収集した。家系解析および一般人口での検証にあたり、本研究では糖尿病罹患者の定義として、

- (1)糖尿病診断歴を有する
- (2)75gOGTTで糖尿病型を認める
- (3)HbA1c(NGSP)が6.5%以上のいずれかに該当する者とした。

対象となる糖尿病家族歴濃厚家系を選別し、文書による同意書崇徳の上、臨床情報の収集・整理、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(全ゲノム連鎖解析)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約2cMのファインマッピングを行った。さらに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。

一般人口での検証のため、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整備し、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、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

今回、ゲノムDNA提供を受けた2家系の構成員の内、糖尿病罹患者は21名で、そのうち11名(52.4%)は40歳未満で糖尿病を発症していた。また21名中5名がインスリン療法で、10名が経口血糖降下薬にて治療中であった。

発端者における既知糖尿病原因遺伝子のシークエンス：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。その結果、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。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 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 (図 1)。

## 図 1. 候補領域内の変異

Consensus Quality >40

染色体番号	遺伝子名	変異名	サンガー法	家計内罹患者6名における集積
5	CENPH	A80T	確認	あり
5	TMEM174	F120L	確認	あり
5	SREK1IP1	R29C	確認	あり
12	NACA	P1818L	確認	あり
12	EEA1	N1072K	確認	あり
12	LRRIQ1	E361G	確認	あり
12	TMEM19	P253L	確認	なし
12	LRIG3	R567W	確認	なし
12	KRT78	M424I	確認	なし
12	SMAGP	S33G	確認	あり

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 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。

#### D. 考察

今回同定した EEA1 遺伝子変異は、解析に用いた糖尿病家族歴濃厚家系内で糖尿病罹患者にのみ集積し、糖尿病非罹患者での集積は認められなかった、また、一般健常者と糖尿病患者における比較で糖尿病患者に変異を有する頻度が有意に大きかった。これらから、当該変異は、今回解析した糖尿病多発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に係わる遺伝的背景のひとつである可能性が示唆された。

#### E. 結論

日本人糖尿病家族歴濃厚家系による全ゲノム連鎖解析、ハプロタイプ解析、および全エクソンシーケンス併用により、糖尿病発症原因候補遺伝子として EEA1 遺伝子を絞り込み、EEA1 遺伝子変異が当該糖尿病多発家系および一般人口において糖尿病発症に関与する可能性が示唆された。EEA1 遺伝子に関して、糖代謝に及ぼす機能に関する知見は報告されておらず、今後 in vitro 実験等による検証が必要であると考えられる。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Ikeda Y, Ohta Y, Kobayashi K, Okamoto

M, Takamatsu T, Oota T, Manabe Y, Okamoto K, Koizumi A, Abe K. Clinical features of SCA36: a novel hereditary dominant spinocerebellar ataxia with motor neuron involvement (Asidan). *Neurology* in press

Abe K, Ikeda Y, Kurata T, Ohta Y, Manabe Y, Okamoto M, Takamatsu K, Ohta T, Takao Y, Shiro Y, Shoji M, Kamiya T, Kobayashi H, Koizumi A. Cognitive and affective impairments of a novel SCA/MND crossroad mutation *Asidan*. *Eur J Neurol*. In press

Liu W, Hitomi T, Kobayashi H, Harada K, Koizumi A. Distribution of Moyamoya Disease Susceptibility Polymorphism p.R4810K in RNF213 in East and Southeast Asian Populations. *Neurologia medico-chirurgica*, 35(5): 1-4, 2012

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

Liu W, Morito D, Takashima S, Mineharu Y, Kobayashi H, Hitomi T, Hashikata H, Matsuura N, Yamazaki S, Toyoda A, Kikuta K, Takagi Y, Harada KH, Fujiyama A, Herzig R, Kirschek B, Zou L, Kim JE, Kitakaze M, Miyamoto S, Nagata K, Hashimoto N, Koizumi A. Identification of RNF213 as a



susceptibility gene for moyamoya disease and its possible role in vascular development. *PLoS One*. 6(7): e22542, 2011

Kobayashi H, Abe K, Matsuura T, Ikeda Y, Hitomi T, Akechi Y, Habu T, Liu W, Okuda H, Koizumi A. Expansion of intronic GGCCTG hexanucleotide repeat in NOP56 causes SCA36, a type of spinocerebellar ataxia accompanied by motor neuron involvement. *Am J Hum Genet*. 89(1):121-130, 2011

#### 1. 学会発表

Searching a causative gene by next-generation sequencing in familial moyamoya cases. 小泉昭夫. 招待口演, **Asian Neurosurgical Conference on Moyamoya Disease**. 2011年6月2日, 京都

劉万洋、小林果、人見敏明、原田浩二、小泉昭夫. もやもや病に対する感受性遺伝子として Mysterin の同定. 口演, 第 82 回日本衛生学会総, 2012年3月24-26日, 京都

もやもや病感受性遺伝子である ATPase/ユビキチンリガーゼ Mysterin の生化学的検討. 人見敏明、森戸大介、劉万洋、小林果、原田浩二、永田和宏、小泉昭夫 口演, 第 82 回日本衛生学会総, 2012年3月24-26日, 京都

ゼブラフィッシュモデルによるもやもや病感受性遺伝子 mysterin の機能解析. 小林果、山崎悟、高島成二、人見敏明、劉万洋、

原田浩二、小泉昭夫 口演, 第 82 回日本衛生学会総, 2012年3月24-26日, 京都

NOP56 遺伝子イントロンにおける 6 塩基リピート拡張は脊髄小脳変性症 36 型を引き起こす. 小林果、阿部康二、松浦徹、池田佳生、人見敏明、土生敏行、劉万洋、奥田裕子、原田浩二、小泉昭夫 口演, 第 82 回日本衛生学会総, 2012年3月24-26日, 京都

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, 菱澤方洋, 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. 口演, 第 54 回日本糖尿病学会年次学術集会. 2011年5月19-21日, 札幌

天野雅子、青木茂行、牧田幸三、井上純子、小泉昭夫. 肺動静脈瘻で発見され、遺伝子診断にて診断した孤発性 Osler-Weber-Rendu 病 (オスラー病) の一例. 口演, 第 51 回日本呼吸器学会学術講演会, 2011年4月22-23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

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

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

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  
ゲノム医科学 教授

京都大学は2005年12月に滋賀県長浜市と「ながはま0次予防コホート事業」の協定を締結以降、現在、登録者数1万人を超え、日本人ゲノムコホートデータ基盤を整備中である。本分担研究目的は、本研究全体目標である糖尿病家族歴濃厚家系を用いた連鎖解析、ハプロタイプ解析ならびに全エクソンシーケンスを併用して絞り込んだ糖尿病発症原因遺伝子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とにある。本年度も継続的にゲノムコホートデータベースの整備を進め臨床情報を集積した。参加者の検査値プロフィールの解析も開始し、耐糖能に関するデータスクリーニングを行い、今後の糖尿病発症原因候補遺伝子に関する遺伝統計的検証作業のための基盤を整備した。

A. 研究目的

糖尿病発症に関わる糖尿病発症原因遺伝子および糖尿病感受性遺伝子の多くは未同定であると考えられている。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、日本人における検討は本邦およびアジアでの糖尿病患者の激増を検討する上で重要である。本研究は、昨年度（平成22年度）までの厚労省科学研究（創薬基盤推進事業）から継続して、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うことで新たな糖尿病発症関連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集積された、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連鎖解析、ハプロタイプ解析および全エクソンシーケンス等により絞り込まれた糖尿病発症関連候補遺伝子に関して、本分担研究により一般人口における検証作業を行う。日本人コホートデータベース作成のため、京都大学医学研究科は滋賀県長浜市との協力で登録者数1万人を目標に進めており（ながはま0次予防コホート事業）、その整備を継続する。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。データ管理と解析には、従来通り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は、京都大学医学研究科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。

（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。

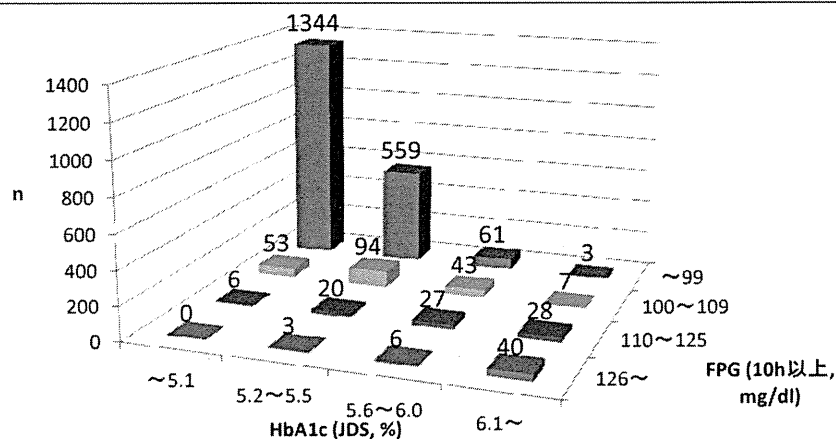
### C. 研究結果

2008 年 11 月下旬より国民健康保険加入者を対象に健診事業を行い、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てきた。現時点（2012 年 4 月）でのコホートデータ集積状況は、長浜市人口 12 万人、対象年齢 30～74 才は 6 万人のうち、本スタディー参加登録者 1 万人（対象人口の約 15%）となっている。当初予定されていた 1 万名以上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。これらのゲノム疫学的データベースをもとに、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 解析等の検証解析のデータ基盤データとした。参加者臨床・検査情報の整理も進行中であり、空腹時血漿血糖値 (FPG) および血糖平均値 HbA1c 値により参加者耐糖能の状態に関して検討を行った（下図）。

## 耐糖能の分布 ながはまデータ

食後10時間以上採血者2294名/4638名(50%)  
 糖尿病診断可能者40名(2%)  
 (糖尿病が強く疑われる者(HbA1c6.1%以上)78/2294名(3%) 151/4638名(3%))  
 (糖尿病の可能性が否定できない者(HbA1c5.6%~6.0%)137/2294名(6%) 289/4638名(6%))  
 IFG者(FPG110mg/dl以上でHbA1c6.1%未満)62名(3%)



### D. 考察

本研究(ながはま0次予防コホート事業)は、糖尿病をはじめとする様々な疾患解析の研究基盤とすることを目的に2008年から開始され継続的に進められている日本人を対象にした大規模ゲノムコホートデータ構築事業である。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日本人糖尿病家族歴濃厚家系検体による遺伝学的解析報告は乏しく、本申請研究全体では、上記長浜0次コホート(1万人)に加え、岐阜県高山コホート(約970人)および秋田県能代市コホート(約3500人)の日本人コホートのデータ蓄積・整備が行われ、今後も上記豊富な日本人でのデータ基盤をもとに、様々な疾患発症原因解析に係る検証解析が可能となる基盤が整いつつある。in vitro 解析による検証と連動して、新規糖尿病関連遺伝子の同定に寄与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、日本人ゲノムコホートデータベースの整備を進め、コホートデータを集積し、ゲノム検体および臨床情報を集積した。参加者の検査値プロフィールの解析も開始されており、今年度は耐糖能に関するデータスクリーニングを行った。日本人コホートデータ整備により、糖尿病家族歴濃厚検体による全ゲノムワイド連鎖解析および全エクソシークエンスを併用して絞り込まれる本厚労省研究の候補遺伝子の遺伝統計的検証のための基盤を整備した。

### F. 健康危険情報

特になし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

Yoshimura K, Nakayama T, Sekine A,

Matsuda F, Kosugi S, Yamada R, Shimizu Y, Kanematsu A, Yoshimura K, Ogawa O; the Nagahama Cohort Research Group. B-type natriuretic peptide as an independent correlate of nocturnal voiding in Japanese women. *Neurorol Urodyn*. 2012 in press

Okada Y, Terao C, Ikari K, Kochi Y, Ohmura K, Suzuki A, Kawaguchi T, Stahl EA, Kurreeman FA, Nishida N, Ohmiya H, Myouzen K, Takahashi M, Sawada T, Nishioka Y, Yukioka M, Matsubara T, Wakitani S, Teshima R, Tohma S, Takasugi K, Shimada K, Murasawa A, Honjo S, Matsuo K, Tanaka H, Tajima K, Suzuki T, Iwamoto T, Kawamura Y, Tanii H, Okazaki Y, Sasaki T, Gregersen PK, Padyukov L, Worthington J, Siminovitch KA, Lathrop M, Taniguchi A, Takahashi A, Tokunaga K, Kubo M, Nakamura Y, Kamatani N, Mimori T, Plenge RM, Yamanaka H, Momohara S, Yamada R, Matsuda F, Yamamoto K. Meta-analysis identifies nine new loci associated with rheumatoid arthritis in the Japanese population. *Nat Genet*. 44(5):511-516, 2012

Akagi-Kurashige Y, Kumagai K, Yamashiro K, Nakanishi H, Nakata I, Miyake M, Tsujikawa A, Moriyama M, Ohno-Matsui K, Mochizuki M, Yamada R, Matsuda F, Yoshimura N. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and choroidal

neovascularization in highly myopic eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 53(4):2349-2353., 2012

Kato L, Begum NA, Burroughs AM, Doi T, Kawai J, Daub CO, Kawaguchi T, Matsuda F, Hayashizaki Y, Honjo T. Nonimmunoglobulin target loci of activation-induced cytidine deaminase (AID) share unique features with immunoglobulin genes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 109(7):2479-2484, 2012

Okada Y, Shimane K, Kochi Y, Tahira T, Suzuki A, Higasa K, Takahashi A, Horita T, Atsumi T, Ishii T, Okamoto A, Fujio K, Hirakata M, Amano H, Kondo Y, Ito S, Takada K, Mimori A, Saito K, Kamachi M, Kawaguchi Y, Ikari K, Mohammed OW, Matsuda K, Terao C, Ohmura K, Myouzen K, Hosono N, Tsunoda T, Nishimoto N, Mimori T, Matsuda F, Tanaka Y, Sumida T, Yamanaka H, Takasaki Y, Koike T, Horiuchi T, Hayashi K, Kubo M, Kamatani N, Yamada R, Nakamura Y, Yamamoto K. A genome-wide association study identified AFF1 as a susceptibility locus for systemic lupus erythematosus in Japanese. *PLoS Genet*. 8(1):e1002455, 2012

Terao C, Ikari K, Ohmura K, Suzuki T, Iwamoto T, Takasugi K, Saji H, Taniguchi A, Momohara S, Yamanaka H, Matsuda F, Mimori T. Quantitative effect of

HLA-DRB1 alleles to ACPA levels in Japanese rheumatoid arthritis: no strong genetic impact of shared epitope to ACPA levels after stratification of HLA-DRB1\*09:01. *Ann Rheum Dis.* 71(6):1095-1097, 2012

Nakata I, Yamashiro K, Yamada R, Gotoh N, Nakanishi H, Hayashi H, Akagi-Kurashige Y, Tsujikawa A, Otani A, Saito M, Iida T, Oishi A, Matsuo K, Tajima K, Matsuda F, Yoshimura N. Significance of C2/CFB variants in age-related macular degeneration and polypoidal choroidal vasculopathy in a Japanese population. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 53(2):794-798, 2012

Yamashiro K, Mori K, Nakata I, Tsuchihashi T, Horie-Inoue K, Nakanishi H, Tsujikawa A, Saito M, Iida T, Yamada R, Matsuda F, Inoue S, Awata T, Yoneya S, Yoshimura N. Association of elastin gene polymorphism to age-related macular degeneration and polypoidal choroidal vasculopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 52(12):8780-8784, 2011

Terao C, Ohmura K, Kochi Y, Ikari K, Maruya E, Katayama M, Shimada K, Murasawa A, Honjo S, Takasugi K, Matsuo K, Tajima K, Suzuki A, Yamamoto K, Momohara S, Yamanaka H, Yamada R, Saji H, Matsuda F, Mimori T. A large-scale association study identified

multiple HLA-DRB1 alleles associated with ACPA-negative rheumatoid arthritis in Japanese subjects. *Ann Rheum Dis.* 70(12):2134-2139, 2011

Toyoda H, Kumada T, Hayashi K, Honda T, Katano Y, Goto H, Kawaguchi T, Murakami Y, Matsuda F. Antiviral combination therapy with peginterferon and ribavirin does not induce a therapeutically resistant mutation in the HCV core region regardless of genetic polymorphism near the IL28B gene. *J Med Virol.* 83(9):1559-1564, 2011

Ratanajaraya C, Nishiyama H, Takahashi M, Kawaguchi T, Saito R, Mikami Y, Suyama M, Lathrop M, Yamada R, Ogawa O, Matsuda F. A polymorphism of the POLG2 gene is genetically associated with the invasiveness of urinary bladder cancer in Japanese males. *J Hum Genet.* 56(8):572-576, 2011

Matsuse M, Takahashi M, Mitsutake N, Nishihara E, Hirokawa M, Kawaguchi T, Rogounovitch T, Saenko V, Bychkov A, Suzuki K, Matsuo K, Tajima K, Miyauchi A, Yamada R, Matsuda F, Yamashita S. The FOXE1 and NKX2-1 loci are associated with susceptibility to papillary thyroid carcinoma in the Japanese population. *J Med Genet.* 48(9):645-648, 2011

- Terao C, Ohmura K, Katayama M, Takahashi M, Kokubo M, Diop G, Toda Y, Yamamoto N; Human Disease Genomics Working Group; Rheumatoid Arthritis (RA) Clinical and Genetic Study Consortium, Shinkura R, Shimizu M, Gut I, Heath S, Melchers I, Manabe T, Lathrop M, Mimori T, Yamada R, Matsuda F. Myelin basic protein as a novel genetic risk factor in rheumatoid arthritis--a genome-wide study combined with immunological analyses. *PLoS One*. 6(6):e2045, 2011
- Onomoto K, Morimoto S, Kawaguchi T, Toyoda H, Tanaka M, Kuroda M, Uno K, Kumada T, Matsuda F, Shimotohno K, Fujita T, Murakami Y. Dysregulation of IFN system can lead to poor response to pegylated interferon and ribavirin therapy in chronic hepatitis C. *PLoS One*. 6(5):e19799, 2011
- Toyoda H, Kumada T, Tada T, Kawaguchi T, Murakami Y, Matsuda F. Impact of genetic polymorphisms near the IL28B gene and amino acid substitutions in the hepatitis C virus core region on interferon sensitivity/resistance in patients with chronic hepatitis C. *J Med Virol*. 83(7):1203-1211, 2011
- Nakata I, Yamashiro K, Yamada R, Gotoh N, Nakanishi H, Hayashi H, Tsujikawa A, Otani A, Saito M, Iida T, Oishi A, Matsuo K, Tajima K, Matsuda F, Yoshimura N. Association between the SERPING1 gene and age-related macular degeneration and polypoidal choroidal vasculopathy in Japanese. *PLoS One*. 6(4):e19108, 2011
- Terao C, Yamada R, Ohmura K, Takahashi M, Kawaguchi T, Kochi Y; Human Disease Genomics Working Group; RA Clinical and Genetic Study Consortium, Okada Y, Nakamura Y, Yamamoto K, Melchers I, Lathrop M, Mimori T, Matsuda F. The human AIRE gene at chromosome 21q22 is a genetic determinant for the predisposition to rheumatoid arthritis in Japanese population. *Hum Mol Genet*. 20(13):2680-2685, 2011
- Nakata I, Yamashiro K, Yamada R, Gotoh N, Nakanishi H, Hayashi H, Tsujikawa A, Otani A, Ooto S, Tamura H, Saito M, Saito K, Iida T, Oishi A, Kurimoto Y, Matsuda F, Yoshimura N. Genetic variants in pigment epithelium-derived factor influence response of polypoidal choroidal vasculopathy to photodynamic therapy. *Ophthalmology*. 118(7):1408-1415, 2011
- Hayashi H, Yamashiro K, Nakanishi H, Nakata I, Kurashige Y, Tsujikawa A, Moriyama M, Ohno-Matsui K, Mochizuki M, Ozaki M, Yamada R, Matsuda F, Yoshimura N. Association of 15q14 and 15q25 with high myopia in Japanese. *Invest Ophthalmol Vis Sci*.

52(7):4853-4858, 2011

Murakami Y, Toyoda H, Tanaka M, Kuroda M, Harada Y, Matsuda F, Tajima A, Kosaka N, Ochiya T, Shimotohno K. The progression of liver fibrosis is related with overexpression of the miR-199 and 200 families. *PLoS One*. 6(1):e16081, 2011

Li YJ, Goh L, Khor CC, Fan Q, Yu M, Han S, Sim X, Ong RT, Wong TY, Vithana EN, Yap E, Nakanishi H, Matsuda F, Ohno-Matsui K, Yoshimura N, Seielstad M, Tai ES, Young TL, Saw SM. Genome-wide association studies reveal

genetic variants in CTNND2 for high myopia in Singapore Chinese.

*Ophthalmology*. 118(2):368-375, 2011

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

糖尿病多発家系の検索および臨床データの収集に関する研究

研究分担者 医療法人社団正名会 池田病院 院長 池田 正毅

研究要旨： 糖尿病家族歴濃厚な大家系検体を用いた全ゲノム連鎖解析により新たな糖尿病感受性遺伝子を同定する目的で、解析の基盤となる糖尿病家族歴濃厚家系の検索、臨床データの収集および検体採取を行っている。3 世代にわたる糖尿病患者を有し、親族 13 人中 8 人の糖尿病患者を含む糖尿病家族歴濃厚家系を見だし、累積 5 名が研究協力承諾にて検体および臨床データ等収集した。継続して他の親族の研究参加に関する同意取得を進めるとともに新たな大家系の検索を進めている。

A. 研究目的

本邦における糖尿病患者の激増は著しい。予防医学さらには先制医療の実現には、遺伝素因、すなわち糖尿病発症原因遺伝子あるいは糖尿病感受性遺伝子を同定することが極めて有益であることは明らかである。また、本邦での糖尿病激増要因としての遺伝的背景を検討する上で、日本人糖尿病家族歴濃厚家系を集積し遺伝的要因が濃縮された条件下で発症原因遺伝子を絞り込む研究戦略は有意義なものであると考えられる。

本分担研究の目的は、昨年度（平成 20~22 年度）までの厚労省科学研究（創薬基盤推進事業）から継続して糖尿病家族歴濃厚家系を集積することにより、その後の全ゲノム連鎖解析、ハプロタイプ解析、全エクソンシーケンスによる糖尿病発症関連遺伝子絞り込みのための基盤を築くことである。当院通院患者における糖尿病家族歴濃厚家系を有する症例および血縁者の検索、臨床データの収集および検体採取を主たる目的としている。

B. 研究方法

正名会池田病院に外来通院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内容説明および参加協力に関する意向の確認を主導的に行い、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池田病院倫理委員会にて承認された「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、承諾を得られた患者および親族に関してゲノム DNA 抽出用に採血を行い、医療機関に通院していない親族等に対しては、同様に書面での承諾取得後、ゲノム DNA 抽出用採血とともに、身体計測、既往歴、一般検査所見などの臨床所見の収集および糖尿病関連検査を含む一般検査用採血を行った。

（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（承認番号 G-267）および池田病院倫理委員会に申請書提出・承認を受けている。全ての検体は匿名化（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

糖尿病家族歴濃厚患者家系の集積を進めてきた。これまでに当院内科外来通院中の2型糖尿病として加療されている患者で、3世代にわたり親族13人中8人の糖尿病患者を含む糖尿病家族歴濃厚家系を見だし、発端者を含め親族あわせて5名の研究参加の承諾を得、ゲノムDNA抽出用採血を行い、各種臨床データを収集している。本年度も候補患者のスクリーニングを行い複数名、研究参加に関する説明および同意書取得を試みたが、正式エントリーには至らなかった。今後も継続して患者集積を行う予定である。

### D. 考察

糖尿病家族歴濃厚患者について、潜在的に条件該当症例の存在がスクリーニング調査により確認できたが、本研究対象に適合すると思われる患者であっても、遺伝子解析に対する不安・一部思い込み等から、研究参加承諾が思ったほど得られず、対象家系、特に大家系内で統計解析可能な数の研究参加同意者を得ることの困難さが浮き彫りになっている。しかしながら、これまで本研究のように日本人において家族歴濃厚家系検体を基盤とした大規模な遺伝学的解析報告はなく、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ため、今後も解析の基盤となる糖尿病家族歴濃厚症例の集積の継続が重要と考えられる。

### 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継続的に行っている。本年度も3世代にわたる糖尿病家族歴濃厚家系患者に関するスクリーニングを行い複数名、研究参加に関する説明および同意書取得を試みたが、正式エントリーには至らなかった。今後も継続して患者集積を行う予定である。

### F. 健康危険情報

特になし

### G. 研究発表

1. 論文発表  
なし

#### 2. 学会発表

清水祐介、宇佐見 勝、井田健一、池田弘毅、池田正毅、ミグリトールの体重と血糖コントロールに対する効果。口演、第53回日本糖尿病学会年次学術集会、2011年5月19-21日、札幌

宇佐見 勝、清水祐介、今井晴恵、佐久間智子、井田健一、池田弘毅、木村祐子、小松隆之、児玉光顕、吉崎祐子、池田正毅、各種経口血糖降下薬の作用特性と体重に与える影響—未治療糖尿病患者を対象として—。口演、第53回日本糖尿病学会年次学術集会、2011年5月19-21日、札幌

池田弘毅、井田健一、宇佐見 勝、木村祐

子、小松隆之、児玉光顕、吉崎祐子、池田正毅。シタグリプチンの血糖降下作用に関する検討。口演、第53回日本糖尿病学会年次学術集会、2011年5月19-21日、札幌

佐久間智子、今井晴恵、宇佐見 勝、井田健一、池田正毅。糖尿病性腎症患者の経口血糖降下薬の適正使用に向けての取り組み。口演、第53回日本糖尿病学会年次学術集会、2011年5月19-21日、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

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

研究分担者

大津赤十字病院 副院長 岡本 元純

研究要旨：新たな糖尿病感受性遺伝子同定目的として、日本人糖尿病家族歴濃厚家系を用いた全ゲノムワイドの連鎖解析を行うための基盤づくりのため、糖尿病家族歴濃厚家系の検索、臨床データの収集および検体採取を行う。3世代にわたる糖尿病患者を含む糖尿病家族歴濃厚家系を見だし研究参加の承諾可能な複数の候補患者をリストアップした。また、過去に研究参加の承諾得られ、検体採血行った親族の追加の参加者の呼びかけを行っている。今後も継続して糖尿病家族歴濃厚家系を検索し、データを集積していく予定である。

A. 研究目的

本分担研究の目的は、平成 20~22 年度までの厚生省科学研究（創薬基盤推進事業）に継続して糖尿病家族歴濃厚家系を集積し、本申請研究で掲げ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ケンス併用による糖尿病発症関連遺伝子絞込みのための基盤を築くことである。糖尿病の発症には環境因子と複数の遺伝要因が関与するとされ、発症の家族集積性が知られているが、同定された糖尿病発症原因遺伝子は僅かであり、それら遺伝子異常に起因する糖尿病患者数と現在の激増している糖尿病患者数を比べても、未だ、日本人糖尿病発症原因遺伝子の多くは未同定であると考えられる。明らかになっている糖尿病原因遺伝子に関しても異常頻度に人種差が報告されるため、海外報告結果を鵜呑みにするのではなく日本人における実態解明が必要である。

本研究は遺伝解析の基盤となる糖尿病多発家系の探索と研究参加の呼びかけ、検体

集積することを主たる目的としている。

B. 研究方法

大津赤十字病院外来通院中または入院中の糖尿病患者で、糖尿病関連自己抗体陰性であり、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を抽出し、本人および親族への、本研究内容説明および参加協力に関する意向の確認を行い、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大津赤十字病院の倫理委員会にて承認された「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る。承諾を得られた患者および親族に関してゲノム DNA 抽出用に採血を行い、医療機関に通院していない親族等に対しては、同様に書面での承諾取得後、ゲノム DNA 抽出用採血とともに、身体計測、既往歴、一般検査所見などの臨床所見の収集および糖尿病関連検査を含む一般検査用採血を行う。

（倫理面への配慮）