

201207008A

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24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 稲垣暢也

平成25（2013）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24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 稲垣 暢也

平成 25 (2013) 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	1
シーケンスを併用した糖尿病関連遺伝子の同定	
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	9
糖尿病感受性遺伝子の同定に関する研究	
長嶋 一昭 京都大学医学研究科糖尿病・栄養内科学 講師	
2. 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	14
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	
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	21
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	
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	25
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 センター長・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	32
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	35
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	37
収集に関する研究	
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	39
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	41
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 -----44

Ⅳ. 研究成果の刊行物・別刷 -----54

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：本邦における糖尿病の激増は深刻で糖尿病発症予防および発症後の合併症進展抑制が喫緊の課題となって久しい。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同定のため、これまで候補遺伝子アプローチ、連鎖解析および全ゲノム関連解析（GWAS）などの報告が数多くなされているが、原因遺伝子同定あるいはそれらの知見が診断・治療にまで貢献するに至った例は少なく、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り込みが可能であったが、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を要した。

より効率的な糖尿病関連遺伝子絞り込みのため、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、連鎖領域内の変異を同定後、対照群での変異頻度検証から **common variant** と **mutation** を選別し、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同定を行う手法を本研究では考案・実施した。その結果、解析に用いた家系における糖尿病発症原因として **EEA1** 遺伝子変異を同定し、同変異が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、論文発表を行った。さらに糖尿病家族歴濃厚な別家系を用いて罹患者 5 名および非罹患者 1 名につき全エクソンシーケンスを行い、罹患者のみに集積するエクソン変異 18 個を絞り込んだ。現在、18 個の変異につき日本人ゲノムコホートデータを用いた検討を進行中である。

分担研究者

長嶋 一昭 京都大学医学研究科 講師	小泉 昭夫 京都大学医学研究科 環境衛生学 教授
田中 大祐 京都大学医学研究科 特定助教	松田 文彦 京都大学医学研究科附属 ゲノム医学センター センター長・教授

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
副院長
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
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

A. 研究目的

糖尿病の激増、特にアジアでの激増は深刻であり大き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・進展に係る遺伝因子は人種差も報告されており、日本人症例を用いた検討が重要である。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への道を開くことが急務とされている。

現在まで多くの研究者により、候補遺伝子アプローチ、連鎖解析あるいは全ゲノム関連解析（GWAS）等により糖尿病関連遺伝子の同定および絞り込みが試みられてきた。特に、近年ではGWASにより多くの糖尿病感受性遺伝子座位が報告されたが、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く、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

ることから、糖尿病の遺伝的背景の大部分は未同定であるといえる。

一方、近年急速に進歩しつつある解析技術基盤を背景として、次世代シーケンス技術による全エクソンシーケンスが技術的にも解析経費的にも実用的となり、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、全エクソンシーケ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し、継続的に整備している複数の大規模コホートデータを用いた Case-Control 解析等により、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にある。

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）。

連鎖解析等による疾患関連遺伝子解析の成果は、いかに解析に適した家族歴濃厚な大家系を集積できるかに大きく左右される。糖尿病関連遺伝子探索の基盤とするため我々は平成 20 年度から糖尿病家族歴濃厚家系の集積を継続的に進めている。糖尿病罹患者を、(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、患者集積を行った。平成 24 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、承諾得られた患者・親族末梢血からの DNA サンプルおよび臨床データを収集した。

集積した家系を複数家系および単家系で連鎖解析を行った。全ゲノムを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（約 10cM 間隔）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 間隔）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した。

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。

4) 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込み（田中、小泉、長嶋、稲垣）。

これら解析結果から、連鎖領域に含まれる塩基配列変化のうち、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み、家系内 segregation の確認を行ない、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、糖尿病発症原因遺伝子を絞り込んだ。

5) 絞り込んだ候補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暁ラ氏島および膵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：以前から継続的に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い、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 24 年は平成 23 年度同様、1), 2) を実施するとともに、適時 3) , 4) , 5) 実施を予定した。

（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・医学部及び医学部附属病院「医の倫理委員会」に申請書提出・承認（承認番号 G-267）を受けており、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。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。本年度も累計集積家系数増加し、これまでの累積数で 69 家系 264 名の糖尿病患者および親族から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、約 10cM 間隔での全ゲノムタイピングを完了している。

そのうち、昨年度から解析を進めている 2 家系に関して集中的に解析を進め、以下のように糖尿病発症関連遺伝子 EEA1 遺伝子を同定し論文発表を行った（Mol. Genet. Metab. 109(1):112-7, 2013）。これにより本集積家系検体を用いて行われた糖尿病関連遺伝子同定は、以前に報告した GCKR 遺伝子（Mol. Genet. Metab. 102(4):453-60, 2011）に続いて 2 つ目の成果である。

以下、EEA1 遺伝子同定経緯[家系 1]および他家系[家系 2]使用による糖尿病関連遺伝子絞り込みに関して記載する。

①家系の特徴：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つた。

②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) のエクソンシークエンスをキャピラリシークエンサーにて行ったところ、同家系発端者に既知糖尿病感受性変異である HNF4A 遺伝子の T130I 変異が見いだされた。同家系全員につき T130I 変異のタイピングを行った結果をもとに、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50歳未満発症の5名および80歳で正常の1名の計6名を全エクソンシーケンスの対象とした。

③連鎖解析：[家系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。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 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。

④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名および非肥満(BMI<25)糖尿病患者67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BMI25未満の糖尿病患者67名におけるアレル頻度が優位に高かった(2.9%, 4/134)(表1)。この結果は、全エクソンシーケンスを用いて新規糖尿病原因遺伝子候補を同定する世界に先駆けた成果として論文発表を行った(Tanaka et al. Mol Genet Metab 2013)。

[家系2]の解析では、罹患者全員に集積し非罹患者に存在しない塩基配列変化のうち、Non-synonymousであり1000 genome projectで未検出あるいは頻度5%未満の変異は18個存在した(表2)。これらの変異に

ついて、日本人コホートデータを用いた検討を進行中である。

D. 考察

本研究経過で、糖尿病多発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て検出された変異の中に、特定の糖尿病家族歴濃厚家系内で罹患者にのみ集積を認めるのみならず、その変異が健常者では認められず、かつ糖尿病患者一般で相当頻度で認められるものが存在することが示され、少なくとも上記EEA1変異は解析に用いた当該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。また、家系内の特徴的な罹患者および非罹患者を複数名選定し、全員の全エクソンシーケンスを行う方法を用いても、罹患者に全員に集積し非罹患者に存在しない疾患原因変異候補を効率的に少数まで絞り込める可能性が示唆された。これらの研究経過から、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り今後も継続して家系集積予定である。

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の調査・集積を継続的に行い、累積数で69家系264名の糖尿病患者および親族から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、全ゲノムタイピングを完了した。

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、論文発表を行った。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乏しい。今後さらに同遺伝子変異による糖代謝への関与機序検討を進める予定である。また、他の家系について、全エクソン解析にて絞り込んだ糖尿病発症感受性遺伝子候補に関して、日本人コホートデータでの頻度を検討し、一般人口における糖尿病発症の遺伝的背景に寄与する因子を明らかにする。検証解析に必須である日本人コホート（ながはま0次予防コホート事業、秋田県能代市コホートおよび岐阜県高山市コホート）の整備を継続する予定である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

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

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

Nakamura Y, Ogura M, Ogura K, Tanaka D, Inagaki N. SIRT5 deacetylates and activates urate oxidase in liver mitochondria of mice. *FEBS Lett.* 30; 586 (23):4076-4081, 2012

Flamein F, Riffault L, Muselet-Charlier C, Pernelle J, Feldmann D, Jonald L, Durand-Schneider AM, Coulomb A, Maurice M, Nogee LM, Inagaki N, Amsellem S, Dubus JC, 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

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

Suzuki K, Harada N, Yamane S, Nakamura Y, Sasaki K, Nasteska D, Joo E, Shibue K, Harada T, Hamasaki A, Toyoda K, Nagashima K, Inagaki N. Transcriptional regulatory factor X6 (Rfx6) increases gastric inhibitory polypeptide (GIP) expression in enteroendocrine K-cells and is involved in GIP hypersecretion in high fat diet-induced obesity. *J. Biol. Chem.* 288(3): 1929-1938, 2013

Tanaka D, Nagashima K, Sasaki M, Funakoshi S, Kondo Y, Yasuda K, Koizumi A. Inagaki N. Exome sequencing identifies a new candidate mutation for susceptibility to diabetes in a family with highly aggregated type 2 diabetes. *Mol. Genet. Metab.* 109(1):112-117, 2013

Overbeck TR, Hupfeld T, Krause D, Baldmann-Beushausen R, Chapuy B, Gülden-zoph B, Inagaki N, Schöndube FA, Danner B, Truemper L, Wulf GG. Intracellular ABC transporter A3 (ABCA3) is expressed in lung cancer cells and modulates susceptibility to cisplatin and paclitaxel. *J. Thorac. Oncol.* in press 2013

Takagi T, Furuta H, Miyawaki M, Nagashima K, Shimada T, Doi A, Matsuno S, Tanaka D, Nishi M, Sasaki H, Inagaki N, Yoshikawa N, Nanjo K, Akamizu T. Clinical and functional characterization of a novel ABCC8 gene mutation associated with permanent neonatal diabetes mellitus. *J. Diabetes Invest.* in press 2013

2. 学会発表

田中大祐、長嶋一昭、佐々木真弓、船越生吾、小泉昭夫、稲垣暢也。日本人糖尿病多発家系における、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発症原因遺伝子の同定。第55回日本糖尿病学会年次学術集会(口演, パシフィコ横浜, 2012/5/17)

長嶋一昭、佐々木真弓、田中大祐、稲垣暢也。日本人新生児糖尿病の発症頻度、発症原因遺伝子および遺伝子変異部位による薬効変化に関する検討。第55回日本糖尿病学会年次学術集会(シンポジウム, パシフィコ横浜, 2012/5/18)

稲垣暢也。カナグリフロジン。第55回日本糖尿病学会年次学術集会(シンポジウム, パシフィコ横浜, 2012/5/18)

原島伸一、田中大祐、長嶋一昭、佐々木真弓、王宇、稲垣暢也。DPP-4阻害薬シタグリブチンが有効であったMODY3一家系。第55回日本糖尿病学会年次学術集会(Poster, パシフィコ横浜, 2012/5/17)

佐々木香月、原田範雄、鈴木和代、濱崎暁洋、山根俊介、Nasteska Daniela、城尾恵里奈、渋江公尊、原田貴成、菱澤方洋、近藤八重子、中村靖彦、稲垣暢也。腸管内分泌K細胞における発現遺伝子の検討。第55回日本糖尿病学会年次学術集会(一般口演, パシフィコ横浜, 2012/5/19)

中村靖彦、小倉雅仁、小倉かさね、田中大祐、稲垣暢也。マウス肝ミトコンドリアにおけるSirt5におけるurate oxidaseの脱アセチル化と活性化。第55回日本糖尿病学会年次学術集会(Poster, パシフィコ横浜, 2012/5/19)

Tanaka D, Nagashima K, Sasaki M, Funakoshi S, Koizumi A, Inagaki N. Exome sequencing identifies a new diabetes susceptibility mutation in a Japanese family with highly aggregated type 2 diabetes. American Diabetes Association 72nd Scientific Sessions(Oral, Philadelphia, PA, 2012/6/9)

Tanaka D, Nagashima K, Sasaki M, Funakoshi S, Kondo Y, Koizumi A, Inagaki N. Exome sequencing identifies a susceptibility mutation in a Japanese family with highly aggregated type 2 diabetes. KYOTO UNIVERSITY Global COE "Center for Frontier Medicine" International (Symposium, Oral, Hyogo, Japan, 2012/10/5-6)

稲垣 暢也。糖尿病コホート研究・介入研究。第49回日本糖尿病学会近畿地方会(シンポジウム, 国立京都国際会館, 2012/11/17)

Wang Y, Harashima SI, Yamane S, Inagaki N. SKIP Inhibits Glucose-Stimulated and Incretin-Enhanced Insulin Secretion 9th International Diabetes Federation Western Pacific Region Congress / 4th Scientific Meeting of the Asian Association for the Study of Diabetes(Oral, Kyoto, Japan, 2012/11/25)

Sato Y, Fujimoto S, Mukai E, Sato H, Tahara Y, Ogura K, Yamano G, Ogura M, Nagashima K, Inagaki N. Palmitate induces beta-cell dysfunction by activating NADPH oxidase through via the Src kinase signaling. 9th International Diabetes Federation Western Pacific Region Congress / 4th Scientific Meeting of the Asian Association for the Study of Diabetes (Poster, Kyoto, Japan, 2012/11/26)

Ogura M, Nakamura Y, Tanaka D, Zhuang X, Fujita Y, Obara A, Hmasaki A, Hosokawa M, Inagaki N. SIRT5 regulates urea cycle by deacetylation and activation of carbamoyl phosphate synthetase 1. 9th International Diabetes Federation Western Pacific Region Congress / 4th Scientific Meeting of the Asian Association for the Study of Diabetes(Poster, Kyoto, Japan, 2012/11/26)

Nakamura Y, Ogura M, Ogura K, Tanaka D, Inagaki N. SIRT5 deacetylates and activates urate oxidase in mouse liver mitochondria. 9th International Diabetes Federation Western Pacific Region Congress / 4th Scientific Meeting of the Asian Association for the Study of Diabetes(Poster, Kyoto, Japan, 2012/11/26)

Tanaka D, Nagashima K, Sasaki M, Funakoshi S, Koizumi A, Inagaki N. Exome Sequencing Identifies a Susceptibility Mutation in a Japanese Family with Highly Aggregated Type 2 Diabetes. 9th International Diabetes Federation Western Pacific Region Congress / 4th Scientific Meeting of the Asian Association for the Study of Diabetes(Oral, Kyoto, Japan, 2012/11/27)

Nagashima K, Yorifuji T, Sasaki M, Tanaka D, Ogura K, Sato H, Tahara Y, Yamano G, Sato Y, Sugizaki K, Ogura M, Inagaki N. Molecular analyses of Japanese patients with neonatal diabetes. 9th International Diabetes Federation Western Pacific Region Congress / 4th

Scientific Meeting of the Asian Association for the Study of Diabetes(Oral, Kyoto, Japan, 2012/11/27)

Fukushima T, Nagano Y, Tanaka K, Reed JG, Matsuzawa S, Inagaki N. Siah1/SIP Regulates Cytoplasmic p27 Stability and Cell Migration Under Metabolic Stress. 9th International Diabetes Federation Western Pacific Region Congress / 4th Scientific Meeting of the Asian Association for the Study of Diabetes(Oral, Kyoto, Japan, 2012/11/27)

Sato H, Fujimoto S, Nagashima K, Mukai E, Ogura M, Saoto Y, Yamano G, Tahara Y, Ogura K, Sgizaki K, Inagaki N. Src regulates insulin secretion by modulating glucokinase activity in INS-1 cells. 9th International Diabetes Federation Western Pacific Region Congress / 4th Scientific Meeting of the Asian Association for the Study of Diabetes(Poster, Kyoto, Japan, 2012/11/27)

鈴木和代, 原田範雄, 山根俊介, 中村靖彦, Daniela Nasteska, 佐々木香月, 城尾恵里奈, 渋谷公尊, 原田貴成, 濱崎暁洋, 稲垣暢也. K細胞特異的に発現するRegulatory factor X 6 (Rfx6)はGIP遺伝子発現ならびに、高脂肪食肥満下のGIP分泌亢進に関与する 分子糖尿病学シンポジウム(一般口演, 品川, 2012/12/8)

Sato Y, Fujimoto S, Mukai E, Sato H, Tahara Y, Ogura K, Yamano G, Ogura M, Nagashima K, Inagaki N. Palmitate induces beta-cell dysfunction by activating NADPH oxidase through via the Src kinase signaling. Innovative Approaches to Understanding Pancreatic β -cell Function (Poster, 京都, 2013/1/28)

Suzuki, K., Harada, N., Yamane, S., Hamasaki, A., Nasteska, D., Sasaki, K., Joo, E., Shibue, K., Harada, T., Muraoka, A., Kondo, Y., Nakamura, Y., Inagaki, N. The Effect of High-Fat Diet Induced Obesity on GLP Secretion from K-Cells. Pancreatic β -cell ~Mini-Symposium~ (Poster, Shiga, Japan, 2013/1/28)

Wang Y, Harashima S, Yamane S, Suzuki K, Harada N, Inagaki N. SKIP inhibits glucose-

stimulated and incretin-enhanced insulin secretion. Pancreatic β -cell ~Mini-Symposium~ (Poster, Shiga, Japan, 2013/ 1/28)

Nagashima K, Yorifuji T, Tanaka D, Inagaki N. Genetic and functional analyses of K_{ATP} channel gene mutations in patients with neonatal diabetes in Japan. 第90回日本生理学会大会 (シンポジウム, 船堀, 2013/3/27-29)

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。さらに現在、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ている。

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：激増する糖尿病発症および発症後合併症進展抑制のためにはその遺伝的素因を形成する糖尿病関連遺伝子の解明は必須である。発症原因遺伝子の多くは未同定であり、同定された糖尿病発症原因遺伝子の糖尿病発症への関与程度には人種差が存在することが指摘されている。そのため日本人での検討は重要である。我々は、平成20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が、より効率の良い候補遺伝子絞り込みを行うため、全エクソンシーケンスを併用した糖尿病関連遺伝子の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遺伝子を絞り込み欧米学会誌に報告した。さらに家系内複数症例の全エクソンシーケンスを行い、全エクソンシーケンスを主にした糖尿病関連遺伝子絞り込みの実用性を検証中である。また、検証解析に必須である日本人コホート（ながはま0次予防コホート事業、秋田県能代市コホートおよび岐阜県高山市コホート）の整備を継続している。

A. 研究目的

糖尿病は、患者数の激増、医療費の増大および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にまたがる複数の因子の相互作用に起因し、発症原因遺伝子および発症感受性遺伝子の多くは未同定である。過去に同定された原因遺伝子に関しても異常を有する頻度および疾患発症に関与する程度の違いが人種間で報告されている。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い、さらには全エクソンシーケンスを主体とする様々な糖尿病関連遺伝子絞り込み手法の模索を目的とする。

B. 研究方法

平成20年度から継続して実施している

糖尿病家族歴濃厚家系・患者の集積を継続している。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・医学部及び医学部附属病院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、田中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。昨年度と手法的には同様に、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い、遺伝解析にはGeneHunter 2を用いた。有意な連鎖が認められた領域に関しては更なるfine-mapping（約1~2cM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 を用いてシーケンスを行った。連鎖領域に含まれる塩基変化のうち、アミノ酸置換が起こらず (non-synonymous)

かつ dbSNP131 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。一般人口での検証に関しては、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。糖尿病患者および一般健常対照者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・医学部及び医学部附属病院医の倫理委員会で承認を受けており（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

本年度も継続的に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・集積を行った。集積家系数増加し、これまでの累積数で69家系264名の糖尿病患者および親族から研究参加の承諾を得て採血を行った。14家系については、検体採

取者全員、約 10cM 間隔での全ゲノムタイピングを完了している。

今年度は、昨年度（平成 23 年度）から解析を進めている 2 家系に関して集中し、糖尿病発症関連遺伝子 EEA1 遺伝子を同定し欧米学会誌に掲載となった（Mol Genet Metab. 109(1):112-7, 2013）。さらに全エクソンシーケンスを主体とした糖尿病関連遺伝子絞り込み手法を模索し、解析を進めた。

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 歳未満での糖尿病発症であった。まず、発端者における既知糖尿病原因遺伝子（MODY 遺伝子）のシーケンスを行った。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、同家系発端者に既知糖尿病感受性変異である HNF4A 遺伝子の T130I 変異が見いだされた。同家系全員につき T130I 変異のタイピングを行った結果をもとに、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。

本家系での連鎖解析（遺伝子頻度 = 0.0001、phenocopy 率 = 0.0001、浸透率 = 0.9999）を行った。その結果、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することができた。

④全エクソンシーケンス：全エクソンシーケンスの結果、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、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 名および非肥満（BMI < 25）糖尿病患者 67 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 BMI 25 未満の糖尿病患者 67 名におけるアレル頻度が優位に高かった（2.9%, 4/134）。これらの成果を欧米学会誌に投稿し採択された（Tanaka et al. Mol. Genet. Metab. 2013）。

もう一方の家系に関しては、全エクソンシーケンスを主体とする解析を行った。50 歳未満発症の 5 名および 80 歳で正常の 1 名の計 6 名を全エクソンシーケンスの対象とした。その結果、罹患者全員に集積し非罹患者に存在しない塩基配列変化のうち、non-synonymous でありかつ 1000 genome project で未検出あるいは頻度 5% 未満の変異は 18 個存在した。これらの変異について、日本人コホートデータを用いた検討を進行中である。

D. 考察

これまでの研究経過から、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り込み手法は、全ゲノム連鎖解析のみでの糖尿病関連原因遺伝子絞り込みよりも効率良く新規は証言イン遺伝子を絞り込めると考えられた。絞り込み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り今後も継続して、関連病院

と連携して糖尿病家族歴濃厚家系を集積予定である。

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の調査・集積を継続的に行い、累積数で 69 家系 264 名の糖尿病患者および親族から研究参加の承諾を得て採血を行った。

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、欧米学会誌に報告・受理された。

全エクソン解析主体の探索手法にて糖尿病発症感受性遺伝子候補の絞り込みを試行中である。

検証解析に必須である日本人コホート（ながはま 0 次予防コホート事業、秋田県能代市コホートおよび岐阜県高山市コホート）整備が継続進行中である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Suzuki K, Harada N, Yamane S, Nakamura Y, Sasaki K, Nasteska D, Joo E, Shibue K, Harada T, Hamasaki A, Toyoda K, Nagashima K, Inagaki N. Transcriptional Regulatory Factor X6 (Rfx6) Increases Gastric Inhibitory Polypeptide (GIP) Expression in Enteroendocrine K-cells and Is Involved in GIP Hypersecretion in High Fat Diet-induced Obesity. **J. Biol. Chem.** 288(3):1929-1938, 2013

Tanaka D, Nagashima K, Sasaki M, Funakoshi S, Kondo Y, Yasuda K, Koizumi A, Inagaki N. Exome sequencing identifies a new candidate mutation for susceptibility to diabetes in a family with highly aggregated type 2 diabetes. **Mol.**

Genet. Metab. 109(1):112-117, 2013

Takagi T, Furuta H, Miyawaki M, Nagashima K, Shimada T, Doi A, Matsuno S, Tanaka D, Nishi M, Sasaki H, Inagaki N, Yoshikawa N, Nanjo K, Akamizu T. Clinical and functional characterization of a novel ABCC8 gene mutation associated with permanent neonatal diabetes mellitus. **J. Diabetes Invest.** in press 2013

3. 学会発表

田中大祐、長嶋一昭、佐々木真弓、船越生吾、小泉昭夫、稲垣暢也. 日本人糖尿病多発家系における、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発症原因遺伝子の同定. 第55回日本糖尿病学会年次学術集会(口演, パシフィコ横浜, 2012/5/17)

長嶋一昭、佐々木真弓、田中大祐、稲垣暢也. 日本人新生児糖尿病の発症頻度、発症原因遺伝子および遺伝子変異部位による薬効変化に関する検討. 第55回日本糖尿病学会年次学術集会(シンポジウム, パシフィコ横浜, 2012/5/18)

原島伸一、田中大祐、長嶋一昭、佐々木真弓、王宇、稲垣暢也. DPP-4阻害薬シタグリプチンが有効であったMODY3一家系. 第55回日本糖尿病学会年次学術集会(Poster, パシフィコ横浜, 2012/5/17)

Tanaka D, Nagashima K, Sasaki M, Funakoshi S, Koizumi A, Inagaki N. Exome sequencing identifies a new diabetes susceptibility mutation in a Japanese family with highly aggregated type 2 diabetes. American Diabetes Association 72nd Scientific Sessions(Oral, Philadelphia, PA, 2012/6/9)

Tanaka D, Nagashima K, Sasaki M, Funakoshi S, Kondo Y, Koizumi A, Inagaki N. Exome sequencing identifies a susceptibility mutation in a Japanese family with highly aggregated type 2 diabetes. KYOTO UNIVERSITY Global COE "Center for Frontier Medicine" International (Symposium, Oral, Hyogo, Japan, 2012/10/5-6)

Sato Y, Fujimoto S, Mukai E, Sato H, Tahara Y, Ogura K, Yamano G, Ogura M, Nagashima K, Inagaki N. Palmitate induces beta-cell dysfunction by activating NADPH oxidase through via the Src kinase signaling. 9th

International Diabetes Federation Western Pacific Region Congress / 4th Scientific Meeting of the Asian Association for the Study of Diabetes (Poster, Kyoto, Japan, 2012/11/26)

Tanaka D, Nagashima K, Sasaki M, Funakoshi S, Koizumi A, Inagaki N. Exome sequencing identifies a susceptibility mutation in a Japanese family with highly aggregated type 2 diabetes. 9th International Diabetes Federation Western Pacific Region Congress / 4th Scientific Meeting of the Asian Association for the Study of Diabetes(Oral, Kyoto, Japan, 2012/11/27)

Nagashima K, Yorifuji T, Sasaki M, Tanaka D, Ogura K, Sato H, Tahara Y, Yamano G, Sato Y, Sugizaki K, Ogura M, Inagaki N. Molecular analyses of Japanese patients with neonatal diabetes. 9th International Diabetes Federation Western Pacific Region Congress / 4th Scientific Meeting of the Asian Association for the Study of Diabetes(Oral, Kyoto, Japan, 2012/11/27)

Sato H, Fujimoto S, Nagashima K, Mukai E, Ogura M, Saoto Y, Yamano G, Tahara Y, Ogura K, Sgizaki K, Inagaki N. Src regulates insulin secretion by modulating glucokinase activity in INS-1 cells. 9th International Diabetes Federation Western Pacific Region Congress / 4th Scientific Meeting of the Asian

Association for the Study of Diabetes(Poster, Kyoto, Japan, 2012/11/27)

Sato Y, Fujimoto S, Mukai E, Sato H, Tahara Y, Ogura K, Yamano G, Ogura M, Nagashima K, Inagaki N. Palmitate induces beta-cell dysfunction by activating NADPH oxidase through via the Src kinase signaling. Innovative approaches to understanding pancreatic β -cell function. (Poster, 京都, 2013/1/28)

Nagashima K, Yorifuji T, Tanaka D, Inagaki N. Genetic and functional analyses of K_{ATP} channel gene mutations in patients with neonatal diabetes in Japan. 第90回日本生理学会大会(シンポジウム, 船堀, 2013/3/27-29)

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

4. 特許取得
なし

5. 実用新案登録
なし

6. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）

分担研究報告書

糖尿病多発家系データの集積、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 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を解析することにより、発症感受性遺伝子候補を見出し、②発症感受性遺伝子候補につきコホートを用いて検証し、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家系については、全ゲノム連鎖解析と全エクソン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。別の1家系については罹患者5名および非罹患者1名につき全エクソンシーケンスを行い、罹患者のみに集積するエクソン変異18個を絞り込んでおり、現在、18個の変異につき日本人ゲノムコホートデータを用いた検討を進行中である。

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、全エクソンシーケ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

①遺传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。

②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。

③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配列変化のうち、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。

④家系の複数名を用いた全エクソンシーケンスによる疾患原因候補変異の選定：研究開始後、次世代シーケンス技術の価格低廉化に伴い、複数名の全エクソンシーケンスが容易となった。このため、家系内の特徴的な罹患者および非罹患者を複数名選定し、全員の全エクソンシーケンスを行うことで、罹患者に全員に集積し非罹患者に存在しない疾患原因変異候補を選定する方法が可能となり、③を代替する手段として平成24年度より開始した。全エクソンシーケンスにて、罹患者全員に集積し非罹患者に存在しない塩基配列変化のうち、non-synonymousであり1000 genome projectで未検出あるいは頻度5%未満の変異を候補変異として選択した。

⑤一般人口での検証：秋田県能代市および岐阜県高山市において4000人以上におよぶ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。非肥満(BMI<25)糖尿病患者67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。

(倫理面への配慮)

京都大学大学院医学研究科・医学部及び医学部附属病院「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

①家系の特徴：図1に連鎖解析対象家系のうち[家系1][家系2]の家系図を示す。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。

②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 T130I 変異が見いだされた。同家系全員につき T130I 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 50 歳未満発症の 5 名および 80 歳で正常の 1 名の計 6 名を全エクソンシーケンスの対象とした。

③連鎖解析：[家系 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。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することができた(図 2)。

④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 名および非肥満

(BMI<25)糖尿病患者 67 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 BMI25 未満の糖尿病患者 67 名におけるアレル頻度が優位に高かった(2.9%, 4/134)(表 1)。この結果は家族歴濃厚症例による連鎖解析に全エクソンシーケンスを併用して新規糖尿病原因遺伝子候補を同定した世界に先駆けた成果として論文発表を行った(Tanaka et al. Mol Genet Metab 2013)。

[家系 2]の解析では、罹患者全員に集積し非罹患者に存在しない塩基配列変化のうち、Non-synonymous であり 1000 genome project で未検出あるいは頻度 5%未満の変異は 18 個存在した(表 2)。これらの変異について、日本人コホートデータを用いた検討を進行中である。

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。当該変異は本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。

また、家系内の特徴的な罹患者および非罹患者を複数名選定し、全員の全エクソンシーケンスを行う方法を用いても、罹患者に全員に集積し非罹患者に存在しない疾患原因変異候補効率的に少数まで絞り込めることが明らかとなった。