

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

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

研究分担者 矢野 秀樹 彦根市立病院 副院長

研究要旨：本研究基盤となる大家系の糖尿病家族歴濃厚家系を集積することを目的とする。新規の糖尿病多発家系の探索を継続し、以前に見出した累計3家系の糖尿病家族歴濃厚家系の構成メンバーに対する研究参加に関する説明およびリクルートおよび患者フォローアップを行っている。過去に研究参加同意された患者臨床データを継続的に収集している。今後も、継続して同家系親族の研究協力者を募りデータ集積していくとともに、新規の糖尿病家族歴濃厚家系の検索を行う。

A. 研究目的

近年、全ゲノム関連解析(GWAS)により数多くの糖尿病候補染色体領域および候補遺伝子の報告がなされてきたが、これらはあくまで疾患との相関が示されたのみで、多くは疾患原因遺伝子の同定まで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、より生物学的妥当性の高い候補遺伝子を効率よく抽出するために、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る疾患感受性遺伝子の絞り込みを行ってきたが、これに加えて全エクソンシーケンスを併用してより効率的な候補遺伝子絞り込みを行おうというのが本申請研究全体の目的である。この大目的達成のための基盤とな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行うのが本分担研究の主たる目的である。

B. 研究方法

彦根市立病院外来通院中または入院中の糖尿病患者の中で、1型糖尿病除外のため糖尿病関連自己抗体陰性が確認された3世代以上にわた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彦根市立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同意を得、同意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。彦根市立病院倫理委員会および京都大学医の倫理委員会にて承認を受けて

おり（彦根市立病院倫理委員会承認番号 19-4 および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）、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（京都大学医学部附属病院遺伝子診療部）を確立している。

### C. 研究結果

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 世代にわたり多数の糖尿病患者を含む糖尿病家族歴濃厚な大家系（1 家系）を見だし、研究協力関するに同意を得、承諾書を取得、その後ゲノム DNA 抽出用採血を行い、各種臨床データを収集しており、現在、継続的に本家系構成員の更なる研究参加を募っている。また、上記以外の糖尿病家族歴濃厚大家系（2 家系）を見出しており、継続的に発端者よび親族に研究概要を含む研究説明と、研究参加の呼び掛けを行っているが現時点で正式参加となっていない。今後も研究参加症例を集積予定である。

### D. 考察

患者・家系集積に際して、遺伝子解析という心理的不安感等を少しでも払拭するため慎重、丁寧、かつ性急すぎない患者リクルートを心掛けている。それでも、研究参加者累積には困難が伴う場合が多い。しかしながら、日本人を対象とする本研究は、本邦での糖尿病発症の遺伝的背景を探る上で極めて有用である。本研究推進のために、解析基盤となる糖尿病家族歴濃厚症例の継続的集積が重要と考えられる。

### E. 結論

累計 3 家系の糖尿病家族歴濃厚家系の構成メンバーに対する研究参加に関する説明およびリクルートを行っている。過去に研究参加同意された患者臨床データを継続的に収集している。今後も、同家系親族の研究協力者を募りデータ集積していくとともに、新規の糖尿病家族歴濃厚家系の検索を継続する。

### 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

鯉江基哉、山藤知宏、森田 聖、北本友佳、矢野 剛、高橋 輝、加藤星河、矢野秀樹、安田浩一朗. 前向き介入研究－SU 剤加療中の 2 型糖尿病患者における DPP-4 阻害薬併用効果の検討。－中間報告. 第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会、口演、横浜、2012 年 5 月 17-19 日

田邊正喜、矢野秀樹、黒江 彰. 当院における高血糖（随時血糖 400mg/dl）の原因調査. 第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会、Poster、横浜、2012 年 5 月 17-19 日

### 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

日本人糖尿病多発家系の検索およびデータ収集に関する研究

研究分担者 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

研究要旨：糖尿病家族歴濃厚家系を用いた遺伝子解析を行う基盤となる糖尿病家族歴濃厚家系の検索を継続的におこなっている。患者検索のため本研究班は複数の関連病院のネットワークをつくり、患者探索のみならず、親族へのアプローチの柔軟性を目指している。当院でも糖尿病多発家系を複数見出し、京都大学糖尿病・栄養内科学と協力して研究参加に関する患者リクルートを行った。今後も研究参加者リクルートを継続予定である。

A. 研究目的

糖尿病の発症にかかわる遺伝子をより効率的に絞り込むために、我々は平成 20~22 年度までの厚労省科学研究（創薬基盤推進事業）により、糖尿病多発家系を用いた全ゲノム連鎖解析による発症原因遺伝子の絞り込みを行ってきた。今回の申請研究では、それらに加え全エクソンシーケンスを併用し、より絞り込んだ状態（候補遺伝子を少数にしたうえで）個別解析を行うことを提案している。そのためには解析基盤となる研究適合家系の集積が必須であり、本研究班も複数の関連病院のネットワークをつくり、患者探索のみならず、親族へのアプローチの柔軟性を目指している。本研究分担研究目的は、京都大学医学部附属病院と協力して、家族歴濃厚患者の探索・研究参加の呼びかけ・承認を経て検体および臨床情報収集することである。

B. 研究方法

滋賀県立成人病センター外来通院中または入院中の糖尿病関連自己抗体陰性の糖尿

病患者の中で、3 世代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滋賀県立成人病センター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）

本申請研究はヘルシンキ宣言に基づき行われている。滋賀県立成人病センター倫理委員会および京都大学医の倫理委員会で承認を受けており、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。

京都大学医学部附属病院遺伝子診療部における遺伝子カウンセリングを含む患者フォローアップ体制を確立している。

#### C. 研究結果

当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、糖尿病患者を含む糖尿病家族歴濃厚家系を3家系これまでに見だし、現在も当院外来に同家系発端者が通院中であり、発端者の臨床データのフォローアップと同発端者を通じて親族の追加研究参加者を継続的に募っている。

#### D. 考察

日本人を対象とした糖尿病発症の遺伝的背景を解析することは発症予防・合併症進展予防のためには避けては通れない検討課題である。解析には適切な症例集積が必須である。患者および親族のリクルートにあたっては十分な研究参加に関する事前説明と本人の意志の尊重が必須である。対象が本人・家族を含む親族全般にわたるため、研究参加承諾には様々な障壁が存在し、本研究過程での患者集積の大きな妨げとなっている。今後も研究条件に合致する候補家系の探索の継続が必要である。

#### E. 結論

当院で見出した複数の糖尿病多発家系患者の臨床データを継続フォローするとともに、京都大学糖尿病・栄養内科学と協力して研究参加に関する患者・親族のリクルートを継続している。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

メトホルミン内服外来患者の乳酸値異常についての検討. 水野展寿、小川栄一. 糖尿病, 55, 175-184, 2012

##### 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

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

研究分担者 安田 浩一郎 大阪府済生会野江病院内科（糖尿病・内分泌） 部長

研究要旨：全ゲノム連鎖解析の解析基盤をつくるため、糖尿病家族歴濃厚患者の探索と、研究参加への説明、参加承認の受諾、検体および臨床データ収集を行うことが本分担研究の主たる目的である。本年度も、糖尿病家族歴濃厚な大家系（2家系）の継続的な臨床データの収集と他の親族への本研究参加に関する働きかけを継続してきた。当院で見出した糖尿病大家系検体を用いて京都大学でゲノム解析を行い、糖尿病関連候補遺伝子を絞り込んだ（Mol. Genet. Metab.109(1):112-117, 2013）。今後も新規の糖尿病家族歴濃厚家系の検索を継続する。

A. 研究目的

本年度も、糖尿病家族歴濃厚患者の探索、研究参加への説明、参加承認の受諾、検体および臨床データ収集により、京都大学（研究代表者）を中心に進めているゲノム解析の解析基盤をつくるのが本分担研究の主たる目的である。本研究全体目標である日本人における効率よい糖尿病発症原因遺伝子の絞り込み、およびGWAS等と比較してより生物学的妥当性の高い糖尿病候補遺伝子の同定を進めるために、より大きく、研究参加承諾人数の多い糖尿病家系（大家系）の収集に努めている。

B. 研究方法

平成 20~22 年度厚労省科学研究（創薬基盤推進事業）と同一プロトコールにより継続して患者・家系収集を継続的に行っている。

済生会野江病院外来通院中または入院中の糖尿病関連自己抗体陰性の糖尿病患者の

中で、3 世代以上にわたり糖尿病患者を有する糖尿病家族歴濃厚家系を聞き取りにより調査。済生会野江病院倫理委員会および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」を用いて、文書による研究参加の承諾取得を行なった。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、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検査用採血も行った。併せて身体計測、既往歴、一般検査所見などの臨床所見の収集を行った。

（倫理面への配慮）

済生会野江病院倫理委員会および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、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。京都大学医学部

附属病院遺伝子診療部における遺伝子カウンセリングを含む患者フォローアップ体制を確立している。

### C. 研究結果

これまで集積した3世代にわたる糖尿病家系(大家系)2家系、累計25名(第1家系18人、第2家系7人)ゲノムDNA抽出用採血を行い、各種臨床データを収集し、本検体を京都大学で解析を行い、*MODY1-6* 遺伝子(*HNF4A* 遺伝子・*GCK* 遺伝子・*HNF1A* 遺伝子・*PDX1* 遺伝子・*HNF1B* 遺伝子・*NEUROD1* 遺伝子)異常に関するスクリーニング終了、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)、ハプロタイプ解析終了し、家系内疾患発症の有無と変異の有無が co-segregate している計4個のミスセンス SNP を検出した。全エクソンシーケンスも試行し糖尿病関連候補遺伝子を絞り込む基盤となった(Mol. Genet. Metab.109(1):112-117, 2013)。当院では、継続的に当該患者親族の他の構成メンバーの本研究参加に関するリクルートを進めている。

### D. 考察

糖尿病病態に関する人種差の報告から、発症要因である遺伝素因にも人種差が想定されている。本研究は日本人を対象とし、日本人糖尿病発症の遺伝的背景を検討する点で有意義なものである。症例集積にあたっては十分な研究参加に関する事前説明と本人の意志の尊重が必須であり、対象が本人・家族を含む親族全般にわたるため、研究参加承諾には様々な障壁が存在し、本研

究過程での患者集積の大きな妨げとなっている。しかしながら、解析基盤となる糖尿病家族歴濃厚症例の集積は必須であり、今後も家系探索を継続予定である。

### E. 結論

日本人糖尿病発症原因遺伝子同定のため、家族歴濃厚家系の収集を行い、3世代にわたり複数の糖尿病患者を含む糖尿病家族歴濃厚家系を3家系見だし、臨床データは継続的に集積中。当院で発見し研究参加承諾された糖尿病大家系検体を用いて京都大学でゲノム解析し、糖尿病関連候補遺伝子を絞り込んだ(Mol. Genet. Metab.109(1):112-117, 2013)。家系内親族の更なる研究参加を募るとともに新規適合家系の検索も進めていく予定である。

### F. 健康危険情報

特になし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

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

#### 2. 学会発表

鯉江基哉、山藤知宏、森田 聖、北本友佳、矢野 剛、高橋 輝、加藤星河、矢野秀樹、安田浩一朗。前向き介入研究—SU 剤加療中の2型糖尿病患者における DPP-4 阻害薬併用効果の検討。—中間報告。第55回日本糖尿病学会年次学術集会、口演、横浜、2012年5月17-19日

松永哲郎、安達哲也、山崎英恵、安田浩一朗、津田謹輔、近藤高史. G タンパク質  $\beta 3$  サブユニットの C825T 遺伝子多型と胃電気活動との関連解析. 第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会、Poster、横浜、2012 年 5 月 17-19 日

福島光夫、青山紗絵、谷口 中、中井義勝、森中朋子、矢部大介、安田浩一朗、黒瀬 健、稲垣暢也、清野 裕. 第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会、口演、横浜、2012 年 5 月 17-19 日

青山紗絵、福島光夫、忻 欣、谷口 中、中井義勝、矢部大介、安田浩一朗、黒瀬 健、稲垣暢也、清野 裕. 空腹時血糖値と負荷後血糖値を調節する要因の数理的解析. 第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会、口演、横浜、2012 年 5 月 17-19 日

安田浩一朗、鯉江基哉、山藤知宏、森田 聖、松永哲郎、津田謹輔、安達哲也、福島光夫. 非インスリン治療 2 型糖尿病患者におけるリラグルチド追加の 52 週間治療効果の検討. 第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会、

Poster、横浜、2012 年 5 月 17-19 日

山藤知宏、森田 聖、北本友佳、鯉江基哉、安田浩一朗. リラグルチド著効例の特徴の検討. 第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会、口演、横浜、2012 年 5 月 17-19 日

森田 聖、小林広明、鯉江基哉、山藤知宏、北本友佳、福島光夫、藤井淳子、須田尚子、藤田秀佳、村田敬也、木原徹也、安田浩一朗. GLP-1 受容体作動薬リラグルチドによる血糖改善効果、体重減少効果と栄養摂取量の検討. 第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会、口演、横浜、2012 年 5 月 17-19 日

H. 知的財産権の出願・登録状況  
(予定を含む。)

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Morales CR, Ni X, Smith CE, Inagaki N, Hermo L.	ABCA17 mediates sterol efflux from mouse spermatozoa plasma membranes.	<i>Histol. Histopathol.</i>	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.	<i>J. Diabetes Invest.</i>	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.	<i>FEBS Lett.</i>	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, Amselem 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.	<i>Hum. Mol. Genet.</i>	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 <sup>-</sup> cells.	<i>J. Diabetes Invest.</i>	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.	<i>J. Biol. Chem.</i>	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.	<i>Mol. Genet. Metab.</i>	109 (1)	112-117	2013
Overbeck TR, Hupfeld T, Krause D, Baldmann-Beushausen R, Chapuy B, Güldenzoph 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.	<i>J. Thorac. Oncol.</i>		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.	<i>J. Diabetes Invest.</i>		in press	2013

Ikeda Y, Ohta Y, Kobayashi H, Okamoto M, Takamatsu K, Ota T, Manabe Y, Okamoto K, Koizumi A, Abe K.	Clinical features of SCA36: A novel spinocerebellar ataxia with motor neuron involvement (Asidan).	<i>Neurology</i>	79 (4)	333-341	2012
Koizumi A, Kobayashi H, Liu W, Fujii Y, Senevirathna ST, Nanayakkara S, Okuda H, Hitomi T, Harada KH, Takenaka K, Watanabe T, Shimbo S.	P.R4810K, a polymorphism of RNF213, the susceptibility gene for moyamoya disease, is associated with blood pressure.	<i>Environ. Health Prev. Med.</i>	18 (2)	121-129	2013
Kobayashi H, Yamazaki S, Takashima S, Liu W, Okuda H, Yan J, Fujii Y, Hitomi T, Harada KH, Habu T, Koizumi A.	Ablation of Rnf213 retards progression of diabetes in the Akita mouse.	<i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i>	432 (3)	519-525	2013
Wakai K, Matsuo K, Matsuda F, Yamada R, Takahashi M, Kawaguchi T, Yatabe Y, Ito H, Hosono S, Tajima K, Naito M, Morita E, Yin G, Sakamoto T, Takashima N, Suzuki S, Nakahata N, Mikami H, Ohnaka K, Watanabe Y, Arisawa K, Kubo M, Hamajima N, Tanaka H; for the J-MICC Study Group.	Genome-wide association study of the genetic factors related to confectionery intake: potential roles of the ADIPOQ gene.	<i>Obesity (Silver Spring).</i>		in press	2013

Yoshimura K, Nakayama T, Sekine A, Matsuda F, Kosugi S, Sugino Y, Yoshimura K, Ogawa O; Nagahama Cohort Research Group.	Prevalence of postmicturition urinary incontinence in Japanese men: Comparison with other types of incontinence.	<i>Int. J. Urol.</i>		In press	2013
Cui J, Stahl EA, Saevarsdottir S, Miceli C, Diogo D, Trynka G, Raj T, Mirkov MU, Canhao H, Ikari K, Terao C, Okada Y, Wedrén S, Askling J, Yamanaka H, Momohara S, Taniguchi A, Ohmura K, Matsuda F, Mimori T, Gupta N, Kuchroo M, Morgan AW, Isaacs JD, Wilson AG, Hyrich KL, Herenius M, Doorenspleet ME, Tak PP, Crusius JB, van der Horst-Bruinsma IE, Wolbink GJ, van Riel PL, van de Laar M, Guchelaar HJ, Shadick NA, Allaart CF, Huizinga TW, Toes RE, Kimberly RP, Bridges SL Jr, Criswell LA, Moreland LW, Fonseca JE, de Vries N, Stranger BE, De Jager PL, Raychaudhuri S, Weinblatt ME, Gregersen PK, Mariette X, Barton A, Padyukov L, Coenen MJ, Karlson EW, Plenge RM.	Genome-Wide Association Study and Gene Expression Analysis Identifies CD84 as a Predictor of Response to Etanercept Therapy in Rheumatoid Arthritis.	<i>PLoS Genet.</i>	9	e1003394	2013

Terao C, Hashimoto M, Yamamoto K, Murakami K, Ohmura K, Nakashima R, Yamakawa N, Yoshifuji H, Yukawa N, Kawabata D, Usui T, Yoshitomi H, Furu M, Yamada R, Matsuda F, Ito H, Fujii T, Mimori T.	Three Groups in the 28 Joints for Rheumatoid Arthritis Synovitis - Analysis Using More than 17,000 Assessments in the KURAMA Database.	<i>PLoS One.</i>	8	e59341	2013
Jia WH, Zhang B, Matsuo K, Shin A, Xiang YB, Jee SH, Kim DH, Ren Z, Cai Q, Long J, Shi J, Wen W, Yang G, Delahanty RJ;	Genome-wide association analyses in East Asians identify new susceptibility loci for colorectal cancer.	<i>Nat. Genet.</i>	45	191-196	2013
Terao C, Ohmura K, Kawaguchi Y, Nishimoto T, Kawasaki A, Takehara K, Furukawa H, Kochi Y, Ota Y, Ikari K, Sato S, Tohma S, Yamada R, Yamamoto K, Kubo M, Yamanaka H, Kuwana M, Tsuchiya N, Matsuda F, Mimori T.	PLD4 as a novel susceptibility gene for systemic sclerosis in a Japanese population.	<i>Arthritis Rheum.</i>	65	472-480	2013
Nakata I, Yamashiro K, Akagi-Kurashige Y, Miyake M, Kumagai K, Tsujikawa A, Liu K, Chen LJ, Liu DT, Lai TY, Sakurada Y, Yoneyama S, Cheng CY, Cackett P, Yeo IY, Tay WT, Cornes BK, Vithana EN, Aung T, Matsuo K, Matsuda F, Wong TY, Iijima H, Pang CP, Yoshimura N.	Association of genetic variants on 8p21 and 4q12 with age-related macular degeneration in Asian populations.	<i>Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.</i>	53	6576-6581	2012

<p>Kawaguchi T, Sumida Y, Umemura A, Matsuo K, Takahashi M, Takamura T, Yasui K, Saibara T, Hashimoto E, Kawanaka M, Watanabe S, Kawata S, Imai Y, Kokubo M, Shima T, Park H, Tanaka H, Tajima K, Yamada R, Matsuda F; Takeshi Okanoue, Japan Study Group of Nonalcoholic Fatty Liver Disease.</p>	<p>Genetic polymorphisms of the human PNPLA3 gene are strongly associated with severity of non-alcoholic fatty liver disease in Japanese.</p>	<p><i>PLoS One.</i></p>	<p>7</p>	<p>e38322</p>	<p>2012</p>
<p>Fan Q, Barathi VA, Cheng CY, Zhou X, Meguro A, Nakata I, Khor CC, Goh LK, Li YJ, Lim W, Ho CE, Hawthorne F, Zheng Y, Chua D, Inoko H, Yamashiro K, Ohno-Matsui K, Matsuo K, Matsuda F, Vithana E, Seielstad M, Mizuki N, Beuerman RW, Tai ES, Yoshimura N, Aung T, Young TL, Wong TY, Teo YY, Saw SM.</p>	<p>Genetic variants on chromosome 1q41 influence ocular axial length and high myopia.</p>	<p><i>PLoS Genet.</i></p>	<p>8</p>	<p>e1002753</p>	<p>2012</p>

<p>Verhoeven VJ, Hysi PG, Saw SM, Vitart V, Mirshahi A, Guggenheim JA, Cotch MF, Yamashiro K, Baird PN, Mackey DA, Wojciechowski R, Ikram MK, Hewitt AW, Duggal P, Janmahasatian S, Khor CC, Fan Q, Zhou X, Young TL, Tai ES, Goh LK, Li YJ, Aung T, Vithana E, Teo YY, Tay W, Sim X, Rudan I, Hayward C, Wright AF, Polasek O, Campbell H, Wilson JF, Fleck BW, Nakata I, Yoshimura N, Yamada R, Matsuda F, Ohno- Matsui K, Nag A, McMahon G, St Pourcain B, Lu Y, Rahi JS, Cumberland PM, Bhattacharya S, Simpson CL, Atwood LD, Li X, Raffel LJ, Murgia F, Portas L, Despriet DD, van Koolwijk LM, Wolfram C, Lackner KJ, Tönjes A, Mägi R, Lehtimäki T, Kähönen M, Esko T, Metspalu A, Rantanen T, Pärssinen O, Klein BE, Meitinger T, Spector TD, Oostra BA, Smith AV, de Jong PT, Hofman A, Amin N, Karssen LC, Rivadeneira F, Vingerling JR, Eiríksdóttir G, Gudnason V, Döring A, Bettecken T, Uitterlinden AG, Williams C, Zeller T, Castagné R, Oexle K, van Duijn CM, Iyengar SK, Mitchell P, Wang JJ, Höhn R, Pfeiffer N, Bailey-Wilson JE, Stambolian D, Wong TY, Hammond CJ, Klaver CC.</p>	<p>Large scale international replication and meta-analysis study confirms association of the 15q14 locus with myopia. The CREAM consortium.</p>	<p><i>Hum. Genet.</i></p>	<p>131</p>	<p>1467-1480</p>	<p>2012</p>
---	---	---------------------------	------------	------------------	-------------

Yoshimura K, Nakayama T, Sekine A, Matsuda F, Kosugi S, Yamada R, Shimizu Y, Kanematsu A, Yoshimura K, Ogawa O; Nagahama Cohort Research Group.	B-type natriuretic peptide as an independent correlate of nocturnal voiding in Japanese women.	<i>Neurourol. Urodyn.</i>	31	1266-1271	2012
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.	<i>Nat. Genet.</i>	44	511-516	2012

<p>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.</p>	<p>Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and choroidal neovascularization in highly myopic eyes.</p>	<p><i>Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.</i></p>	<p>53</p>	<p>2349-2353</p>	<p>2012</p>
<p>Kato L, Begum NA, Burroughs AM, Doi T, Kawai J, Daub CO, Kawaguchi T, Matsuda F, Hayashizaki Y, Honjo T.</p>	<p>Nonimmunoglobulin target loci of activation-induced cytidine deaminase (AID) share unique features with immunoglobulin genes.</p>	<p><i>Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.</i></p>	<p>109</p>	<p>2479-2484</p>	<p>2012</p>
<p>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.</p>	<p>A genome-wide association study identified AFF1 as a susceptibility locus for systemic lupus erythematosus in Japanese.</p>	<p><i>PLoS Genet.</i></p>	<p>8</p>	<p>e1002455</p>	<p>2012</p>



Meziani R, Yamada R, Takahashi M, Ohigashi K, Morinobu A, Terao C, Hiratani H, Ohmura K, Yamaguchi M, Nomura T, Vasilescu A, Kokubo M, Renault V, Hirose K, Ratanajaraya C, Heath S, Mimori T, Sakaguchi S, Lathrop M, Melchers I, Kumagai S, Matsuda F.	A trans-ethnic genetic study of rheumatoid arthritis identified FCGR2A as a candidate common risk factor in Japanese and European populations.	<i>Mod. Rheumatol.</i>	22	52-58	2012
--	--	------------------------	----	-------	------

## **ABCA17 mediates sterol efflux from mouse spermatozoa plasma membranes**

**Carlos R. Morales<sup>1</sup>, Xiaoyan Ni<sup>1</sup>, Charles E. Smith<sup>1</sup>, Nobuya Inagaki<sup>2</sup> and Louis Hermo<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Department of Anatomy and Cell Biology, McGill University, Montreal, Quebec, Canada and <sup>2</sup>Department of Diabetes and Clinical Nutrition, Graduate School of Medicine, Kyoto University, Kyoto, Japan

**Summary.** Mammalian spermatozoa lose plasma membrane cholesterol during maturation in the epididymis and during capacitation in the female reproductive tract. While cholesterol acceptors such as high-density lipoproteins (HDL) and apolipoproteins A-I (apoA-I) and J (Apo J) have been found in male and female reproductive tracts, transporters that mediate cholesterol efflux from plasma membranes of spermatozoa to acceptors are not well defined. Candidates include members of the ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily including ABCA1, ABCA7, ABCA17, and ABCG1. In this study, we utilize immunocytochemistry on sections of adult mouse testis and epididymis and RT-PCR on isolated germ cells. The data reveal that ABCA17 is expressed by steps 12-16 elongated spermatids in the mouse in testis and by spermatozoa in the lumen of the epididymis where ABCA17 localizes to the sperm head and tail midpiece. It also localizes on these areas of mouse sperm isolated from the epididymis. Moreover, ABCA17 antibody interferes with cholesterol efflux from spermatozoa to lipid acceptors apoA-I. Taken together, these results suggest that ABCA17 plays an important role in the process of sterol efflux which renders spermatozoa capable of fertilizing an oocyte.

**Key words:** ATP-binding cassette transporters, ABCA17, Cholesterol efflux, Mouse testis, Sperm

### **Introduction**

Maturation and capacitation of mammalian sperm are required steps for fertilization. While the former entails a multitude of events that are coordinated by the epithelial cells lining the epididymis (Robaire and Hermo, 1988; Turner and Bomgardner, 2002; Robaire and Henderson, 2006; Hermo et al., 2010), the latter is a functional maturation step involving changes in both the sperm's ability to undergo the acrosome reaction and the acquisition of a hyperactivated pattern of motility occurring in the uterus and oviduct (Davis, 1981; Visconti et al., 1995). Although poorly understood, a decrease in sperm cholesterol levels is essential, and this change begins at the time of sperm maturation and culminates during capacitation (Davis, 1981; Benoff, 1993; Visconti et al., 1995; Cross, 1998; Travis and Kopf, 2002). It is mediated by lipid-binding proteins and the ATP-binding cassette (ABC) transporters present in the epididymis, uterus and oviduct (Martinez and Morros, 1996; Bortnick et al., 2000).

In the epididymis, the distribution of apolipoprotein AI (apoAI) and apolipoprotein J (apoJ), two major lipid-binding proteins and constituents of high density lipoproteins (HDL) has been defined (Argraves and Morales, 2004). Both apoAI and apoJ are secreted by the epithelial epididymal principal cells (Law et al., 1997) into the lumen of the duct where they interact with sperm plasma membranes (Hermo et al., 1991; Sylvester et al., 1991; Law et al., 1997). After a transient interaction with the sperm surface, both apoAI and apoJ dissociate and are internalized by the epididymal epithelial cells via the endocytotic receptors, megalin (low density lipoprotein 2, LRP2) and cubilin (Hermo et al., 1991; Morales et al., 1996; Van Praet et al., 2003). ApoAI and apoJ are also expressed in the female

*Offprint requests to:* Carlos R. Morales, Department of Anatomy and Cell Biology, McGill University, 3640 University Street, Montreal, Quebec, Canada. e-mail: carlos.morales@mcgill.ca

reproductive tract by the uterine and oviduct epithelial cells (Jaspard et al., 1996), and incubation of ejaculated sperm with oviductal fluid causes a transfer of cholesterol from sperm to apoAI-containing HDL present in this fluid (Martinez and Morros, 1996). Although the mechanism by which cholesterol and phospholipids efflux from the sperm plasma membrane to lipid acceptors is poorly known, ATP-binding cassette (ABC) transporters represent *bona fide* candidates in this process (Selva et al., 2004).

The ABC transporters form one of the largest protein families. Currently the human genome codes for 49 distinct ABC transporters and the mouse genome has 53. These are divided into 7 subfamilies (ABCA-ABCG) based on amino acid sequence similarities and phylogeny (Klein et al., 1999; Biemans-Oldehinkel et al., 2006; Davidson and Maloney, 2007; Dawson et al., 2007; Hollenstein et al., 2007a; Velamakanni et al., 2007). ABC transporters include the P-glycoprotein (P-gp) and multidrug resistance proteins (Klein et al., 1999; Hollenstein et al., 2007b; Potocnik et al., 2008). ABC transporters are recognized by consensus ATP-binding domains also known as nucleotide-binding domains (NBDs) which have several conserved sequence motifs all with specific functions (Jones and George, 2004; Oldham et al., 2008). NBDs contain characteristic motifs Walker A and Walker B separated by about 90-120 amino acids. ABC proteins also contain an additional element the signature C motif located just upstream of the Walker B site (Gottesman et al., 2002). In addition, ABCs contain 2 transmembrane domains (TMDs) composed of 6-11 membrane-spanning  $\alpha$ -helices. ABC transporters are involved in transport of substrates such as sugars, sterols, amino acids, bile acids, glycans, cholesterol, phospholipids, peptides, proteins, toxins, antibiotics and xenobiotics (Higgins, 1992; Váradi and Sarkadi, 2003). They bind and hydrolyze ATP and use this energy to move substrates into and out of cells and organelles, or to flip molecules from the inner to the outer leaflet of the membrane (Higgins, 1992; Dean et al., 2001). Some ABC transporters are not directly involved in moving substrates but appear to be part of regulated ion channels such as CFTR. Others function in multi-drug extrusion of toxic substances, which can lead to resistance of cancer cells against drugs used in chemotherapy (Gottesman et al., 2002). A large percentage of ABC genes cause diverse human genetic diseases and at least 17 ABC genes have been linked to disorders displaying Mendelian inheritance including some involved with cholesterol and lipid transport (Klein et al., 1999).

In the testis, ABCA1 and ABCA7 are present in Sertoli cells (Morales et al., 2008), and ABCA1-deficiency leads to a 21% reduction in the ability of mice to sire offspring (Selva et al., 2004). ABCA1 and ABCA7 also localize to the heads and tails of spermatozoa, where they play a role in cholesterol efflux (Morales et al., 2008). An *Abca3*-like gene in the sea

urchin genome, *suAbca*, is expressed in sperm and may be involved in shedding of cholesterol during sperm head maturation (Mengerink and Vacquier, 2002). ABCG1 has also been shown to be expressed on the tails of sperm and to be involved in cholesterol efflux (Morales et al., 2008). While ABCG4 has been reported to mediate cholesterol efflux (Wang et al., 2004), and to be expressed in the testis (Koshiba et al., 2008), Morales et al. (2008) did not detect ABCG4 transcript or protein in germ cells. In addition, ABCC9/SUR2 and Kir6.2 (KCNJ11) are expressed in the epididymis and luminal sperm (Lybaert et al., 2008), and Bcrp1/ABCG2 in spermatogonia and spermatids (Lasalle et al., 2004; Scharenberg et al., 2009). However, these transporters are not directly involved in cholesterol efflux.

Recent findings show that accumulation of cholesteryl esters in LXR<sup>-/-</sup> mice is associated with a specific loss of ABCA1 and an increase in apoptosis of epithelial cells of the proximal caput epididymidis (Ouvrier et al., 2009). Whether or not the described pro-apoptotic effects are directly related to ABCA1 deficiency is not known. LXR is also a positive regulator of the expression of ABCG1 (Beya et al., 2007). In addition to the above transporters that appear to play significant roles in sperm, a novel testis-specific transporter termed ABCA17 has also been cloned and it has been suggested that this protein is involved in efflux of esterified neutral lipids, such as cholesteryl esters, fatty acid esters and triacylglycerols (Ban et al., 2005).

To further unfold the specific role of ABCA17 in the testis and epididymis and characterize its cellular distribution, the present study pursued three objectives: 1) To investigate the cellular distribution of this protein both *in vivo* and in isolated sperm epididymal samples by light microscope immunocytochemistry using a novel zinc fixation method and fluorescence imaging, as well as by traditional fixatives; 2) To determine the expression of ABCA17 by northern blot analysis in the adult mouse testis and by RT-PCR on isolated germ cell populations of different postnatal ages; 3) To test the hypothesis that ABCA17 is involved in cholesterol efflux in mouse sperm. Taken together, the results reveal that germ cells express ABCA17 and that it plays a role in efflux of cholesterol from sperm.

## Materials and methods

### Antibodies

Polyclonal ABCA17 antibody was raised in rabbit against a synthetic peptide corresponding to 19 C-terminal amino acid residues (SSPTPKPLPSP-PSSPILL) of mouse ABCA17, which show no similarity to other members of the ABCA subfamily. The antibody was purified using affinity chromatography MabTrap Protein G (Amersham Biosciences). Its specificity and characterization was published previously by Ban et al. (Ban et al., 2005) Rabbit polyclonal antibody to ABCG1

## ABCA17 expression in mouse testis

was purchased from Novus Biologicals (Littleton, CO) and its specificity and characterization were published previously by Morales et al. (2008).

### Immunocytochemistry

Three retired male breeder mice (CD-1 strain, Charles River Laboratories, Montreal, QC, Canada) were anesthetised and their testis, efferent ducts and epididymis were fixed by cardiac perfusion with Bouin's solution or a zinc fixative solution (BD Biosciences, Mississauga, ON, Canada) (Herme et al., 2008). After 10 minutes of perfusion, the tissues were removed and placed in fresh fixative overnight. On the following day, the tissues were dehydrated and embedded in paraffin wax, after which they were sectioned at 5  $\mu$ m thickness. In the case of the Bouin's fixed tissues, the sections were dewaxed in Citrisov, rehydrated in a reverse ethanol gradient and washed in distilled water, followed by 50 mM Tris-buffered saline (TBS), pH 7.4. Antigen retrieval was carried out by heating sections for a total of 15 min at 85-95°C in 10 mM sodium citrate buffer (pH 6.0) containing 0.1% Tween 20 (Sigma-Aldrich Canada, Oakville, ON, Canada). Sections were then washed with 50 mM Tris, 0.3 M NaCl, 0.1% Tween 20, pH 7.4, (TBST) and incubated for 30 min at room temperature with anti-ABCA17 antibody diluted in 0.05 M Tris-HCl with 0.1% BSA, pH 7.4. Sections were washed again in TBST and incubated for 30 min with a goat anti-rabbit HRP labeled polymer (DakoCytomation, Carpinteria, CA). After washing in TBST, the slides were incubated in a DAB substrate-chromogen solution (DakoCytomation) for 30 min, rinsed in TBS and counterstained with a 0.1% methylene blue and 0.1% thionin solution. The slides were then dehydrated and mounted with Permount.

In the case of the zinc fixed tissues, sections were dewaxed with hexane, rehydrated in a reverse ethanol gradient and washed with TBS followed by TBST. The sections were blocked for 20 min with 2% skim milk in TBS and incubated for 3 hours at room temperature with the rabbit antibody diluted 1:100 in 0.05 M Tris-HCl with 0.1% BSA, pH 7.4. Sections were washed in TBST, blocked again with skim milk and incubated for 30 min with a goat anti-rabbit Alexafluor 594-labeled goat anti-rabbit IgG antibody (Invitrogen Canada) diluted 1:500 in TBST. Samples were washed in TBST followed by TBS, and counterstained for 1-3 min at room temperature with 300 nM 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI; Invitrogen Canada) in TBS. Samples were rinsed in TBS and coverslips were mounted using Prolong Gold antifade reagent (Invitrogen Canada). The tissues were examined and photographed on a Zeiss Axioskop 2 motorized light microscope equipped with variable intensity FluorArc epifluorescence mercury lighting and AxioCam HR color digital camera (Carl Zeiss Canada; Montreal, QC, Canada). Control sections consisted of elimination of the primary antibody and use of non-

immune rabbit serum.

### Spermatozoa immunostaining

Three retired male breeder mice (CD-1 strain, Charles River Laboratories, Montreal, QC, Canada) were anesthetised with sodium pentobarbital. The caput epididymidis of each animal was removed and placed in Krebs Ringer bicarbonate medium buffered with HEPES, and minced with a razor blade. The spermatozoa-containing supernatant was collected and centrifuged at 800xg, at room temperature for 5 min. The pelleted spermatozoa were resuspended in 2 ml PBS. Approximately 100  $\mu$ l of the suspension was deposited onto a glass slide and dried at room temperature. The slides were rehydrated in PBS during 5 min and fixed with 3.7% formaldehyde for 10 min at room temperature. The slides were washed three times in PBS and blocked with 3% goat serum and 2% horse serum for 30 min at room temperature. The slides were incubated with ABCA17 antibody for 60 min at room temperature and washed three times in PBS. Subsequently, the slides were incubated with FITC-conjugated secondary antibodies for 60 min at room temperature followed by three washes in PBS. The nuclei were counterstained with Hoechst 33342 (Molecular Probe, Eugene Oregon). Control slides were reacted with non-immune rabbit IgG. The slides were examined with a LSM 510 confocal microscope (Carl Zeiss, Montreal, QC).

### Germ cell preparation for RNA isolation

The separation of germ cells from the testis was done following a procedure established in our lab (Petrie and Morales, 1992). Three retired male breeder mice (CD-1 strain, Charles River Laboratories, Montreal, QC, Canada) were anesthetised with sodium pentobarbital and their testes removed by an abdominal incision. The testes were washed with Hank's Balanced Salt Solution (HBSS), decapsulated and lightly minced. The tissue was then suspended in 10 ml of HBSS containing 0.4 mg collagenase, 0.6 mg deoxyribonuclease I (DNase I), 6 mM sodium pyruvate and 0.2 mM lactate. The suspension was incubated at 30°C for 10 min followed by an additional 15 min incubation period with 18 mg trypsin, with intermittent agitation during the entire procedure. The supernatant containing the germ cells was then spun down at 700xg for 5 min and the cells resuspended in 10 ml HBSS containing 1.8 mg trypsin inhibitor and 0.6 mg DNase. The cell suspension was then spun at 700xg for 5 min, resuspended in 1% bovine serum albumin-HBSS (BSA-HBSS), and sequentially filtered through 80  $\mu$ m and 35  $\mu$ m mesh to remove cellular clumps and debris. The cell suspension was finally layered into a stapat chamber and left to sediment for 2 h in a 200 ml linear 1-4% BSA density gradient with HBSS. Twenty 10 ml fractions were collected and