

201307009A

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25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 稲垣暢也

平成26 (2014) 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25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 稲垣 暢也

平成 26 (2014) 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および全エクソン-----16  
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
3. 大規模日本人ゲノムコホートを用いた糖尿病感受性候補遺伝子の検証-----21  
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
4. 糖尿病多発家系の検索および臨床データの収集に関する研究 -----26  
池田 弘毅 正名会池田病院 院長
5. 糖尿病家族歴濃厚症例の検索および臨床データの収集に関する研究 -----29  
岡本 元純 大津赤十字病院 副院長
6. 3世代以上にわたる日本人糖尿病多発家系の検索および臨床データの -----32  
収集に関する研究  
矢野 秀樹 彦根市立病院 副院長
7. 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 -----35  
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
8. 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 -----37  
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 -----39

### IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----51

## 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・内分泌・栄養内科学 教授

研究要旨：糖尿病の激増は深刻であり発症予防および合併症進展抑制は緊急課題である。糖尿病発症に深く関与する遺伝素因（糖尿病発症原因遺伝子変異）の解明のため、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、これまで多くの手法が試みられてきたが、原因遺伝子同定、さらに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。本研究では、より効率的な糖尿病候補遺伝子の絞り込みのため、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、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同定を行う手法を実施した。本年度までに糖尿病家族歴濃厚家系 70 家系、268 名のゲノム DNA を継続的に集積し、上記手法により、糖尿病発症原因遺伝子候補として **EEA1** 遺伝子を同定し、本遺伝子変異は糖尿病多発家系のみならず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を見出し欧米学会誌に報告した。また本年度は、別家系で糖尿病罹患者 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内塩基配列変化 7 個を同定し、我々が参画し整備・管理を行っている日本人コホートをを用いて検定を行った。その結果、一般健常対照者に比して糖尿病多発家系発端者に有意に多発し、タンパク質機能に変化を与える得る糖尿病発症感受性候補遺伝子変異(**GPR128** 遺伝子, **T314M** 変異) を同定した。現在、さらに別家系についても同手法による糖尿病感受性遺伝子絞り込みを行っており、家系内 **segregation** の検証、日本人コホートによる検証が進行中である。これらの経緯から、糖尿病多発大家系の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、罹患者全員に集積し非罹患者に存在しない疾患原因遺伝子変異候補を効率的に少数まで絞り込めることが示唆された。糖尿病感受性遺伝子の効率的な絞り込みにより遺伝的疾患背景を明らかにしていくことは糖尿病に関する先制医療および個別化医療の観点から極めて重要である。また、本手法の有効性が示されれば、糖尿病以外の疾患解析への応用も期待でき大きなブレイクスルーとなり得るものと考えられる。今後も継続して家系集積、遺伝子解析継続予定である。



## 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
松田 文彦	京都大学医学研究科附属 ゲノム医学センター 疾患 ゲノム疫学 センター長
池田 弘毅	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大きな社会問題となっている。糖尿病の発症抑制ならびに合併症進展抑制は患者の生活の質(QOL)のみならず医療経済的にも喫緊の重要課題である。糖尿病発症・進展には遺伝素因が深く関わり、それらには人種差も報告されており、アジア人、特に日本人を対象とした解析結果が今後の先制医療・個別化医療への道筋をつける意味でも極めて重要である。これ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) 等により解析が行われて

きたが、原因遺伝子同定、さらに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。我々はこれまで三世代にわたり糖尿病患者を有する糖尿病多発家系を集積し、全ゲノム連鎖解析に基づいたハプロタイプ解析により糖尿病発症原因遺伝子の存在領域を絞り込み、家系内 segregation、日本人コホートをを用いた検証解析から糖尿病発症原因候補遺伝子として **glucokinase regulatory protein(GCKR)** 遺伝子を絞り込んだ。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 (GCKR 遺伝子同定の際は約2cMの候補領域に約130個の遺伝子) が残り、順次、個々の候補遺伝子に関する検討を行わざるをえなかった。候補遺伝子絞り込みの過程を効率的に行うため、上記手法に、全エクソシークエンスを併用し、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、候補遺伝子の個別評価 (直接シークエンスによる変異同定と家系内 segregation の確認) を行う手法を提案し解析を進めている。本手法が代表的多因子疾患である糖尿病での解析に有効であれば、遺伝素因が関与する他の生活習慣病等の発症原因遺伝子検索にも転用可能であり意義深い。本研究は京都大学医学部医の倫理委員会の承認のもとで実施する。

### 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(長嶋、小泉、池田、岡本、矢野、水野、安田、稲垣)。

京都大学医学部附属病院および関連病院で、3世代にわたる糖尿病多発家系の集積を継続的に行っている。糖尿病罹患者の定義として、(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。糖尿病多発家系の調査・集積を行い、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ピング(約10cM間隔)し、Genhunter 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) 全エクソン解析による遺伝子変異の検索(長嶋、小泉、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。

3) 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(長嶋、小泉、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。

4) 絞り込んだ候補遺伝子に関する検証作業。

a) 糖代謝経路への関与に関する検討：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豚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、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、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（小泉、松田、長嶋、稲垣）。

（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。これまでの累

積数で糖尿病家族歴濃厚家系70家系、268名のゲノムDNAを集積し、15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た。

日本人コホート整備に関しては、秋田県能代市（秋田県能代市コホート：約3500人）および岐阜県高山市（岐阜県高山コホート：約970人）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。非肥満(BMI<25)糖尿病患者67名および、5年間にわたり空腹時血糖<100mg/dlかつHbA1c<6.0%を維持した一般健常対照者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。また、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（ながはま0次予防コホート事業）では、長浜市民約1万1千人の登録完了し、ゲノム採取、2013年度にはSNPアレイ約4000人、全エクソンシーケンス1000人、トランスクリプトーム解析約300人分が完了している。また、検診データおよび50ページに及ぶ質問紙調査により様々な健康状態・疾患と環境要因・遺伝要因との関連の研究が多方面で進んでおり、本研究での一般人口における検証解析もこれらの全エクソンシーケンスデータ約1000人分を用いて解析を行った。

上記研究基盤整備を継続しつつ、3家系の糖尿病家族歴濃厚家系に関して解析を進めた。同意取得しゲノム採取できた[家系1][家系2]の2家系21人中11名が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、HNF4A遺伝子変異を有する発端者以外の1名を全エクソンシーケンスの対象として選んだ。[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。

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。

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)。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絞り込んだ成果として論文発表を行った(Tanaka et al. Mol Genet Metab 109: 112-117, 2013)。

[家系2]の全エクソンシーケンスによる解析では、若年発症罹患者5名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1%未満の変異は14個検出され、うちキャピラリーシーケンサーにて罹患者のみへの集積が確認されたのは7個であった。7個の塩基配列変化について、105名の一般健常者における頻度を検討したところ、日本人健常対照者における頻度が1%未満のものは2個存在し、稀な変異と考えられた。このうちGPR128遺伝子T314M変異については、2世代以上の糖尿病多発家系発端者65名において、一般健常者に比して有意に高い頻度で認められた(3.8% vs. 0.0%, p=0.007 (Fisherの正確確率検定))。さらに、1型糖尿病患者4名を有する家系[家系3]についても、罹患者4名と家系内非罹患者2名について全エクソンシーケンス実験を行った。罹患者に集積する塩基配列変化を網羅的に検出し、罹患者・非罹患者との遺伝子変異比較、家系内segregation、コホートを用いた検証解析等により糖尿病発症原因候補遺伝子を絞り込む予定である。

#### D. 考察

本年度までに糖尿病家族歴濃厚家系70家系、268名のゲノムDNAを継続的に集積し、上記手法により、糖尿病発症原因遺伝子候補としてEEA1遺伝子を同定し、同遺伝子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、糖尿病多発家系のみならず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欧米学会誌に報告した。また、さらに本年度は、別家系で糖尿病患者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内塩基配列変化7個を同定し、我々が参画し整備・管理を行っている日本人コホートをを用いて検定を行った。その結果、一般健常対照者に比して糖尿病多発家系発端者に有意に多発し、タンパク質機能に変化を与える得る1変異を同定し (GPR128遺伝子, T314M変異)、本遺伝子は糖尿病発症感受性候補遺伝子であると考えられた。現在、さらに別家系についても同様に全エクソンシーケンスによる糖尿病感受性遺伝子絞り込みを行っており、家系内segregationの検証、日本人コホートによる検証が進行中である。これらの経験から、糖尿病多発大家系の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示された。糖尿病感受性遺伝子の効率的な絞り込みにより糖尿病発症の遺伝的背景を明らかにしていくことは糖尿病に関する先制医療および個別化医療の観点から極めて重要である。また、本研究で提案した手法の有効性が示されれば、糖尿病のみならず他の多遺伝子疾患（生活習慣病など）解析への応用も期待でき大きなブレイクスルーとなり得るものと考え。今後も継続して家系集積継続し、本研究を

通じて確立した上記手法による糖尿病発症原因遺伝子同定を継続する。

#### E. 結論

本年度までに糖尿病家族歴濃厚家系70家系、268名のゲノムDNAを継続的に集積し、遺伝子解析基盤として、秋田県能代市コホート約3500人、岐阜県高山コホート約970人、およびながはま0次予防コホート事業約1万1千人の日本人コホート整備を進め、これら研究基盤を用いて、糖尿病発症原因候補遺伝子としてEEA1遺伝子、GPR128遺伝子を絞り込み、現在も継続的に順次解析を進めている。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Nasteska D, Harada N, Suzuki K, Yamane S, Hamasaki A, Joo E, Iwasaki K, Shibue K, Harada T, Inagaki N. Chronic reduction of GIP secretion alleviates obesity and insulin resistance under high fat diet condition. *Diabetes*. 2014 (in press)

Béguin P, Nagashima K, Mahalakshmi RN, Vigot R, Matsunaga A, Miki T, Ng MY, Ng YJA, Lim CH, Tay HS, Hwang LA, Firsov D, Tang BL, Inagaki N, Mori Y, Seino S, Launey T, Hunziker W. BARP suppresses voltage-gated calcium channel activity and Ca<sup>2+</sup>-evoked exocytosis. *J Cell Biol*. 2013 (in press)

Tanaka T, Nagashima K, Inagaki N, Kioka H, Takashima S, Fukuoka H, Noji H, Kakizuka A, Imamura H. Glucose-stimulated single pancreatic islets sustain increased cytosolic ATP levels during initial Ca<sup>2+</sup> influx and subsequent Ca<sup>2+</sup> oscillations. *J Biol Chem*,

289(4): 2205-2216, 2014

Suzuki K, Harada N, Yamane S, Nakamura Y, Nasteska D, Sasaki K, Joo E, Shibue K, Harada T, Hamasaki A, Toyoda K, Nagashima K, Inagaki N. Transcriptional regulatory factor X 6 (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: 1929-1938, 2013.

Harashima S, Fukushima T, Sasaki M, Nishi Y, Fujimoto S, Ogura M, Yamane S, Tanaka D, Harada N, Hamasaki A, Nagashima K, Nakahigashi Y, Seino Y, Inagaki N. Self-monitoring of blood glucose (SMBG) improves glycemic control in oral hypoglycemic agents (OHA)-treated type 2 diabetes (SMBG-OHA Study). *Diabetes Metab. Res. Rev.* 29: 77-84, 2013.

Joo E, Yamane S, Hamasaki A, Harada N, Matsunaga T, Muraoka A, Suzuki K, Nasteska D, Fukushima T, Hayashi T, Tsuji H, Shide K, Tsuda K, Inagaki N. Enteral supplement enriched with glutamine, fiber, and oligosaccharide prevents development of dextran sulfate sodium (DSS)-induced experimental colitis in mice. *Nutrition* 29:549-555, 2013

Harashima SI, Tanaka D, Yamane S, Ogura M, Fujita Y, Murata Y, Seike M, Koizumi T, Aono M, Inagaki N. Efficacy and safety of awitching from basal insulin to sitagliptin in Japanese type 2 diabetes patients. *Horm. Metab. Res.* 45: 231-238, 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.* 4: 269-273, 2013

Ikeda K, Fujimoto S, Goto M, Yamada C, Hamasaki A, Ida M, Nagashima K, Shide K,

Kawamura T, Inagaki N. A new equation to estimate basal energy expenditure of patients with diabetes. *Clin. Nutr.* 32:777-782, 2013

Sasaki M, Fujimoto S, Sato Y, Nishi Y, Mukai E, Yamano G, Sato H, Tahara Y, Ogura, K, Nagashima K, Inagaki N. Reduction of reactive oxygen species ameliorates metabolism-secretion coupling in islets of diabetic GK rats by suppressing lactate overproduction. *Diabetes* 62:1996-2003, 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.* 109:112-117, 2013

Kondo Y, Harada N, Sozu T, Hamasaki A, Yamane S, Muraoka A, Hatrda T, Shibue K, Nasteska D, Joo E, Sasaki K, Inagaki N. A hospital-based cross-sectional study to develop an estimation formula for 2-hours post-challenge plasma glucose for screening impaired glucose tolerance. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 101:218-225, 2013

Abudukadier A, Fujita Y, Obara A, Ohashi A, Fukushima T, Sato Y, Ogura M, Nakamura Y, Fujimoto S, Hosokawa M, Hasegawa H, Inagaki N. Tetrahydrobiopterin has a glucose-lowering effect by suppressing hepatic gluconeogenesis in an endothelial nitric oxide synthase-dependent manner in diabetic mice. *Diabetes.* 62:3033-3043, 2013

## 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

### 【政策提言】

独立法人医療機器総合機構(PMDA)の専門委員として政策提言に関与している。また、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、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。また、ビッグアナイド薬の適正使用に関する委員会委員として同薬による重篤な副作用である乳酸アシドーシス予防のため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・内分泌・栄養内科学 講師

研究要旨：糖尿病は遺伝要因と環境要因が様々な割合で関与し発症する。糖尿病関連遺伝子の解明は、糖尿病発症および合併症進展抑制のための論拠構築のためには必須であり、慢性的高血糖を主徴とした多彩な病態を呈する糖尿病に対する将来の個別化医療を模索する上でも重要である。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多発家系の集積および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における全ゲノム連鎖解析により糖尿病発症原因候補遺伝子として、glucokinase regulatory protein (GCKR) 遺伝子を報告し、上記手法に全エクソンシーケンスを併用した本申請研究手法でearly endosome antigen 1 (EEA1) 遺伝子を絞り込み、さらに今回G-protein coupled receptor 128 (GPR128) 遺伝子を絞り込んだ。今後、同遺伝子変異による糖代謝に関連した機能解析を行い、糖尿病発症・進展への関与について検証予定である。

### A. 研究目的

糖尿病の激増は顕著で、欧米人に比べインスリン分泌能が低いとされるアジア人ではその増加が顕著で大きな社会問題となっている。2型糖尿病発症は遺伝素因に環境要因が重なり発症し多様な病態を呈する疾患である。遺伝因子だけでも発症および合併症進展に複数の遺伝子変異の関与が想定されるため、発症原因遺伝子あるいは発症感受性遺伝子の絞り込みおよび同定は困難を極める。糖代謝に関連する遺伝子に的を絞った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、これまで多くの手法が試みられてきたが、原因

遺伝子の同定に至った例は少なく、未だ多くの糖尿病発症原因遺伝子は未同定のままであり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）から継続して3世代以上にわたる糖尿病多発家系を多数集積し、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遺伝子絞り込み手法の模索と糖尿病発症原因遺伝子の同定を目的とする。

## B. 研究方法

研究計画に沿って、研究開始から一貫して京都大学医学部附属病院（糖尿病・内分泌・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の評価を行っている。収集されたゲノム DNA を用いて、分担研究者小泉昭夫教授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であり、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。上記と並行して、次世代シーケンス技術の価格低廉化に伴う全エクソンシーケンスの利用が身近になったため、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、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%未満の変異を候補遺伝子変異として選択した。

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 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、5 年間にわたり空腹時血糖<100mg/dl かつ HbA1c<6.0%を維持した一般健常対照者 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）

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、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。

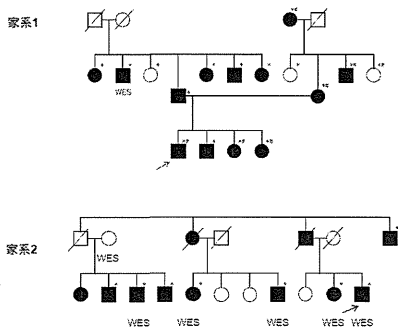
### C. 研究結果

①家系の特徴：図1に解析対象家系のうち[家系1][家系2]の家系図を示す。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ーシークエ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クエンスの対象とした。

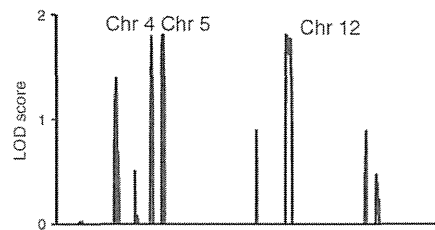
図1: 糖尿病多発家系

(\*: DNA採取, #: HNF4A遺伝子T130I変異, WES: 全エクソンシークエンス施行)



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)。

図2: 全ゲノム連鎖解析結果[家系1]



④全エクソンシークエンス：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クエ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 109: 112-117, 2013)。

表1:罹患者に集積する塩基配列変化の、日本人コホートにおける頻度検討[家系1]

Gene	Amino acid change	Detected number of alleles					
		Controls (n=105)			Diabetes (n=67)		
		Major	Minor	MAF	Major	Minor	MAF
SREK1IP1	R29C	200	10	0.047	126	8	0.059
CENPH	AB0T	208	2	0.009	132	2	0.014
TNFRM174	P120L	210	0	0.000	134	0	0.000
SMAGP	S33G	208	2	0.009	134	0	0.000
NACA	P1818L	204	6	0.029	134	0	0.000
LRRFQ1	E361G	209	1	0.004	132	2	0.014
EEA1	N1072K	210	0	0.000	130	4*	0.029

MAF= Minor Allele Frequency.  
\* Fisher's exact test, p<0.05.

[家系2]の解析では、若年発症罹患者5名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1%未満の変異は14個検出され、うちキャピラリーシーケンサーにて罹患者のみへの集積が確認されたのは7個であった。7個の塩基配列変化について、105名の一般健常者における頻度を検討したところ、日本人健常対照者における頻度が1%未満のものは2個存在し、稀な変異と考えられた(表2)。

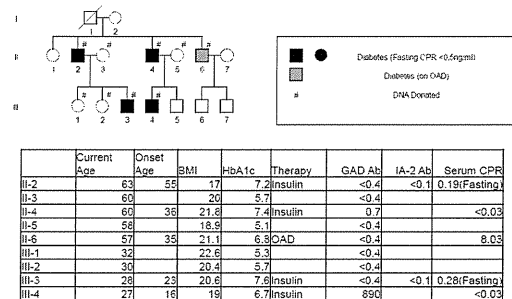
表2:全エクソンシーケンスによる、罹患者全員に集積し非罹患者に存在しない塩基配列変化の絞り込み[家系2]

Chr	dbSNP (NCBI) rs number	MAF (1000 Genomes)	Gene	AA Change	Sanger method confirmation
3	112229725	0.0035	GPR128	T314M	All young-onset members, possibly damaging with a score of 0.922
3	142173974	0.0014	CD200R1L	P146E	All young-onset members, possibly damaging with a score of 1.000
11	147819880	0.0037	AGBL2	P215E	All young-onset members, possibly damaging with a score of 0.777
11	78162878	0.0041	BTBD16	S302T	All young-onset members, benign with a score of 0.004
3	14627284	0.003	OR5H5	V289V	All young-onset members, benign with a score of 0.004
5	81744047	0.0006	DNAH5	R442S0	All young-onset members, benign with a score of 0.403
3	205469162	N/A	QTRTD1	N623S	All young-onset members, benign with a score of 0.203
6	7025697	N/A	EPOR1	L298V	VES False Positive
19	10326835	N/A	CD177	L511I	VES False Positive
19	77264953	N/A	NACCAM1	P282Q	VES False Positive
1	81534488	N/A	CRP2T	K46A1	Predicted to be present in an unaffected member >4
9	74725576	N/A	PAEP	D126K	Predicted to be present in an unaffected member >5
1	78178938	N/A	FLG	E2267D	Present in an unaffected member >2
22	114330778	N/A	NSD2	E235L	Present in an unaffected member >4

このうちGPR128 遺伝子 T314M 変異については、2世代以上の糖尿病多発家系発端者65名において、一般健常者に比して有意に高い頻度で認められた(3.8% vs. 0.0%, p=0.007 (Fisherの正確確率検定))。さらに、1型糖尿病患者4名を有する[家系3]についても、罹患者4名と家系内非罹患者2名について全エクソンシーケンス実験を現在行っており、罹患者に集積する塩

基配列変化を網羅的に検出する予定である(図3)。

図3:1型糖尿病多発家系[家系3] (全エクソンシーケンス対象: II-2, II-3, II-4, II-5, III-3, III-4)



#### D. 考察

糖尿病多発家系において、①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塩基配列変化を絞り込む方法、および②家系内の特徴的な罹患者複数名と非罹患者を選定し、全員の全エクソンシーケンスを行い罹患者に集積する塩基配列変化を絞り込む方法を用いた。いずれの方法を用いても、絞り込まれた変異の中に、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、特徴的な糖尿病患者においては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

EAA1 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。EAA1 遺伝子は初期エンドソームの機能に関与し、脂肪細胞において GLUT4 を介したブドウ糖取り込みを制御するという知見があることから、EAA1 遺伝子変異は脂肪組織におけるブドウ糖取

り込みの低下を介して糖尿病発症に関与している可能性がある。

GPR128 遺伝子に関しては、ヒトにおける RNAseq データベース (Illumina Body Map) にて肝臓での発現が示唆されているが、機能に関する知見は乏しく、糖尿病発症との関連につきさらに *in vitro* 解析にて明らかにする必要があると考えられる。

また、他の保有家系についても、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つき、日本人コホートデータでの頻度検討予定である。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Béguin P, Nagashima K, Mahalakshmi RN, Vigot R, Matsunaga A, Miki T, Ng MY, Ng YJA, Lim CH, Tay HS, Hwang LA, Firsov D, Tang BL, Inagaki N, Mori Y, Seino S, Launey T, Hunziker W. BARP suppresses voltage-gated calcium channel activity and Ca<sup>2+</sup>-evoked exocytosis. *J Cell Biol.* 2014 (in press)

Hosokawa M, Hamasaki A, Nagashima K, Harashima S, Toyoda K, Fujita Y, Harada N, Nakahigashi Y, Fujimoto S, Inagaki N. Lack of goal attainment of LDL cholesterol levels in management of type 2 diabetes mellitus. *Internal Medicine* 2014 (in press)

Tanaka T, Nagashima K, Inagaki N, Kioka H, Takashima S, Fukuoka H, Noji H, Kakizuka A, Imamura H. Glucose-stimulated single pancreatic islets sustain increased cytosolic ATP levels during initial Ca<sup>2+</sup> influx and subsequent Ca<sup>2+</sup> oscillations. *J Biol Chem.* 289:2205-2216, 2014

Sato Y, Fujimoto S, Mukai E, Sato H, Tahara Y, Ogura K, Yamano G, Ogura M, Nagashima

K, Inagaki N. Palmitate induces reactive oxygen species production and  $\beta$ -cell dysfunction by activating NADPH oxidase via cSrc signaling. submission. *J Diabetes Invest.* 5: 19-26, 2014

Liu L, Nagashima K, Yasuda T, Liu Y, Hu HR, He G, Feng B, Zhao M, Zhuang L, Zheng T, Friedman TC, Xiang K. Mutations in KCNJ11 are associated with the development of autosomal dominant, early-onset type 2 diabetes. *Diabetologia* 56:2609-2618, 2013

Sasaki M, Fujimoto S, Sato Y, Nishi Y, Mukai E, Yamano G, Sato H, Tahara Y, Ogura K, Nagashima K, Inagaki N. Reduction of reactive oxygen species ameliorates metabolism-secretion coupling in islets of diabetic GK rats by suppressing lactate overproduction. *Diabetes* 62:1996-2003, 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: 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 the Pro1198Leu ABCC8 gene mutation associated with permanent neonatal diabetes mellitus. *J Diabetes Invest.* 4: 269-273, 2013

Ikeda K, Fujimoto S, Goto M, Yamada C, Hamasaki A, Ida M, Nagashima K, Shide K, Kawamura T, Inagaki N: A new equation to estimate basal energy expenditure of patients with diabetes. *Clinical Nutrition* 32:777-782, 2013

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

factor regulatory factor X 6 (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: 1929-1938, 2013

Harashima SI, Fukushima T, Sasaki M, Nishi Y, Fujimoto S, Ogura M, Yamane S, Tanaka D, Harada N, Hamasaki A, Nagashima K, Nakahigashi Y, Seino Y, Inagaki N. Self-monitoring of blood glucose (SMBG) improves glycemic control in oral hypoglycemic agents (OHA)-treated type 2 diabetes (SMBG-OHA Study). *Diabetes Metab. Res. Rev.* 29: 77-84, 2013

### 3) 学会発表

田中 喬, 長嶋 一昭, 稲垣 暢也, 野地 博行, 垣塚 彰, 今村 博臣. 蛍光 ATP バイオセンサーを用いたインスリン分泌細胞内 ATP のダイナミクスの計測. ポスター, 第 86 回日本生化学会大会. 2013.9.11-13(発表 9/11) パシフィコ横浜 (神奈川県)

Sato Y, Fujimoto S, Mukai E, Sato H, Tahara Y, Ogura K, Yamano G, Ogura M, Nagashima K, Inagaki N. Palmitate Induces ROS Production and  $\beta$ -cell Dysfunction by Activating NADPH Oxidase via Src Signaling. The 2013 International Conference on Diabetes and Metabolism & 5th Asian Association for the Study of Diabetes (AASD). Poster Presentation, 2013.11.8 (Korea)

Ogura K, Nagashima K, Shoji T, Sato Y, Tahara Y, Yamano G, Sato H, Sugizaki K, Fujita N, Ogura M, Mukai M, Fujimoto S, Inagaki N. Chronic Administration of Apple Procyanidins Ameliorate Insulin Resistance in Diabetic ob/ob Mice. The 2013 International Conference on Diabetes and Metabolism & 5th Asian Association for the Study of Diabetes (AASD). Oral Presentation 2013.11.6-9 (Korea)

小倉かさね, 長嶋一昭, 庄司俊彦, 佐藤雄一, 田原裕美子, 山野言, 佐藤広規, 杉崎和, 小倉雅仁, 向英里, 藤本新平, 稲垣暢也. リンゴ由来プロシアニジン類による糖尿病モデルマウスにおける抗糖尿病作用の検討. 第 56 回日本糖尿病学会総会.ポスター, 2013.5.16-18, 熊本

田原裕美子, 藤本新平, 杉崎 和, 小倉かさね, 佐藤広規, 山野 言, 佐藤雄一, 向英里, 小倉雅仁, 長嶋一昭, 稲垣暢也.

Thioredoxin binding protein-2 (TBP-2)が膵 $\beta$ 細胞で果たす役割についての検討. 第 56 回日本糖尿病学会総会.口演,ポスター, 2013.5.16-18, 熊本

佐藤広規, 藤本新平, 長嶋一昭, 佐藤雄一, 向 英里, 小倉雅仁, 山野 言, 田原裕美子, 小倉かさね, 杉崎 和, 稲垣暢也. Src は INS-1 細胞のグルコキナーゼ活性を調節することによりインスリン分泌を制御する 第 56 回日本糖尿病学会総会.ポスター, 2013.5.16-18, 熊本

佐藤雄一, 藤本新平, 向 英里, 佐藤広規, 田原裕美子, 小倉かさね, 山野 言, 杉崎和, 小倉雅仁, 長嶋一昭, 稲垣暢也. パルミチン酸は Src 活性化を介して NADPH オキシダーゼ由来の ROS 産生を増加させ膵 $\beta$ 細胞機能低下をもたらす 第 56 回日本糖尿病学会総会.ポスター, 2013.5.16-18, 熊本

田中大祐, 長嶋一昭, 原島伸一, 小泉昭夫, 稲垣暢也. 日本人糖尿病多発家系における全エクソンシーケンスを用いた糖尿病発症原因遺伝子同定の試み. 第 56 回日本糖尿

病学会総会.ポスター, 2013.5.16-18, 熊本

長嶋一昭、田中大祐、東元 健、八木ひとみ、杉崎 和、田原裕美子、小倉かさね、佐藤 規、佐藤雄一、山野 言、副島英伸、稲垣暢也 新生児期低血糖合併 Beckwith-Wiedemann 症候群患者における病態形成機序の検討. 第 56 回日本糖尿病学会総会.口演, 2013.5.16-18, 熊本

Sato Y, Fujimoto S, Mukai E, Sato H, Tahara Y, Ogura K, Yamano G, Ogura M, Nagashima K, Seino Y, Inagaki N. Palmitate induces ROS production and  $\beta$ -cell dysfunction by activating NADPH oxidase via Src signaling. ADA Poster, 2013.6.21-25. 米国、シカゴ

近藤八重子、原田範雄、長嶋一昭、寒水 孝、稲垣暢也. 日本人における 75gOGTT2 時間後血糖寄与因子とその推定式の有用性. 第 110 回日本内科学会総会. 2013.4.12-14. ポスター、東京

Nagashima K, Yorifuji T, Tanaka D, Inagaki N. Genetic and functional analyses of KATP channel gene mutations in patients with neonatal diabetes in Japan. 第 90 回日本生理学会大会, Symposium, Oral presentation, 2013.3.27-29、東京 (船堀)

浅井加奈枝、濱崎暁洋、和田啓子、福島徹、矢野真理子、佐々木真弓、渋谷公尊、

長嶋一昭、幣 憲一郎、稲垣暢也. 低炭水化物食開始に伴う急速なインスリン減量によりケトアシドーシスを発症した 1 型糖尿病の一症例. 第 16 回日本病態栄養学会年次学術集会. 口演 2013.1.12-13, 京都

Sato Y, Fujimoto S, Mukai E, Sato H, Tahara Y, Ogura K, Yamano G, Ogura M, Nagashima K, Seino Y, Inagaki N. Palmitate induces ROS production and  $\beta$ -cell dysfunction by activating NADPH oxidase via Src signaling. ADA, 2013, シカゴ

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  $\beta$ -cell function.(Pancreatic  $\beta$  -cell ~ mini-Symposium ~ : 立命館シンポジウム), ポスター、2013.1.28

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



## 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関連遺伝子の同定

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である。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。この戦略に基づき、糖尿病多発家系 3 家系を解析対象とした。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し、罹患者のみに集積するエクソン内塩基配列変化 7 個を絞り込んだ。絞り込んだ塩基配列変化につき日本人コホートデータの一般健常対照者と糖尿病患者にてタイピングしたところ、糖尿病患者において有意に多発する変異が 1 個(EEA1 遺伝子の N1072K 変異)見いだされ、同変異が糖尿病多発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内塩基配列変化 7 個につきコホートを用いて検討した。結果、一般健常対照者に比して糖尿病多発家系発端者に有意に多発し、タンパク質機能に変化を与える可能性が示唆される 1 変異が存在し(GPR128 遺伝子の T314M 変異)、発症感受性遺伝子候補であると考えられた。現在、さらに新たな 1 型糖尿病多発家系につき計 6 名の全エクソンシーケンスを行っている。

### 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は多発しており、糖尿病合併症による社会的損失は深刻な問題である。このため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 60 以上の 2 型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の遺伝的背景のごく一部(20%未満)を説明できるにすぎず、糖尿病発症予測への寄与は小さ

いものとなっている。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り、日本人において糖尿病発症に影響する遺伝的背景の大部分は未知である。

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、全エクソンシーケンスを行うことで罹患者に共有されるエクソン変

異を網羅的に検出し、日本人における新規糖尿病発症関連遺伝子を同定することである。

## B. 研究方法

①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。家系発端者 66 名の協力を得、うち罹患者が特に多発する家系から順に解析を開始した。

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、マイクロサテライトマーカーを用いて家系全員の全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い、疾患と連鎖する領域を確定した。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、次世代シーケンサー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、5 年間にわたり空腹時血糖 <100mg/dl かつ HbA1c<6.0%を維持した一般健常対照者 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)

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

## C. 研究結果

研究実施は分担研究者 長嶋らと行い、以下の結果を得た。

集積された糖尿病家族歴濃厚家系のうちの