

201307009B

厚生労働科学研究費補助金
創薬基盤推進研究事業

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

平成 23 年度～平成 25 年度 総合研究報告書

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23年度～平成25年度 総合研究報告書

研究代表者 稲垣 暢也

平成 26 (2014) 年 4 月

目 次

I. 統括研究報告	
日本人糖尿病家族歴濃厚家系の全ゲノム連鎖解析および全エクソンシーケンスを併用した糖尿病関連遺伝子の同定 稲垣 暢也 京都大学医学研究科糖尿病・栄養内科学 教授	1
II. 分担研究報告	
1. 糖尿病多発家系データの集積、ゲノム解析および機能解析による糖尿病感受性遺伝子の同定に関する研究 長嶋 一昭 京都大学医学研究科糖尿病・栄養内科学 講師 田中 大祐 京都大学医学研究科 特定助教 (*平成 23~24 年度まで研究参画)	12
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	21
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	28
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 池田 弘毅 正名会池田病院 院長 (研究分担者 池田正毅の逝去により研究期間途中から池田弘毅に研究分担者変更)	36
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 岡本 元純 大津赤十字病院 副院長	40
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収集に関する研究 矢野 秀樹 彦根市立病院 副院長	43
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 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	46
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	48
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	51
IV. 研究成果の刊行物・別刷	59

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な社会問題であり発症予防および合併症進展抑制は喫緊の緊急課題である。糖尿病発症には遺伝素因および環境要因が深く関与する。遺伝素因解明のため、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）など多くの手法が試みられてきた。しかしながら原因遺伝子同定や得られた知見が診断・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。本年度までに継続的に家系集積を進め、3世代以上にわたる糖尿病患者を有する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。一般人口での検証頻度解析等の基盤となる日本人コホート（秋田県能代市コホート約3,500人、岐阜県高山コホート約970人、ながはま0次予防コホート事業約11,000人）の整備を進めた。上記蓄積した研究基盤を用いた解析でこれまでに糖尿病発症原因候補遺伝子として GCKR 遺伝子（*Mol Genet Metab.* 102:453-460, 2011）、EEA1 遺伝子（*Mol. Genet. Metab.*109:112-117, 2013）および GPR128 遺伝子（論文投稿準備中）を絞り込んだ。現在、別家系についても、順次、糖尿病発症原因遺伝子絞り込みが進行中である。研究過程において糖尿病発症原因遺伝子絞り込み手法に関して、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い罹患者全員に集積し非罹患者に存在しない疾患発症原因遺伝子変異を効率的に絞り込んでいく手法が有効である可能性が示唆された。糖尿病感受性遺伝子の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今後の先制医療および個別化医療推進への基盤となり極めて重要である。また、本手法の糖尿病発症原因遺伝子探索における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る可能性を有するものと考えられる。

分担研究者

- 長嶋 一昭 京都大学医学研究科 講師
- 田中 大祐 京都大学医学研究科
特定助教 (*平成 23 年度～平成 24 年度まで研究参画)
- 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 浩一朗 大阪府済生会野江病院 内
科部長

A. 研究目的

糖尿病の激増は深刻で糖尿病対策基盤の充実は緊急課題である。日本人は糖尿病発症素因が欧米人に比べ顕著であり、原因遺伝子解明は日本人糖尿病の発症と合併症進展抑制対策に重要な論拠基盤となる。患者の生活の質(QOL)改善や医療経済的にも大きな貢献が期待できる。糖尿病発症・進展に係わる遺伝素因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本邦での先制医療・個別化医療への論拠基盤構築の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であると考えられている。我々は平成20年度以降、糖尿病関連膝島自己抗体陰性であり、3世代以上にわたり糖尿病患者を有する糖尿病多発家系を関連医療機関とともに集積し、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を行った。上記、多数の患者・親族からの検体、複数の日本人コホートにより、糖尿病発症原因候補遺伝子として **glucokinase regulatory protein(GCKR)** 遺伝子を絞り込んだが、糖尿病家族歴濃厚家系を解析対象に用いてより小規模の対象者数での絞り込みが可能となったとはいえ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 (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。その研究過程で、急速に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費用的にも実用的となり、他の原因遺伝子未同定の遺伝性疾患での研究利用が報告されるに至った。これらの背景から、候補遺伝子絞り込みの過程を効率的に行うため、我々の上記従来手法に、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、候補遺伝子の個別評価（直接シーケンスによる変異同定と家系内 segregation の確認）を行う手法を提案し解析を進めた。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および各分担研究者所属機関倫理委員会の承認のもとで実施した。

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、田中、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研究分担医療機関で、3世代以上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、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) 全エクソン解析による遺伝子変異の検索（長嶋、田中、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、田中、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

機能変化を齧歯類腭ラ氏島あるいは膵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、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（なごはま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検証解析を行い、同遺伝子異常の糖尿病発症との関連に関する日本人一般人口における糖尿病発症寄与率等を検討する（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」および各研究分担者所属医療機関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「なごはま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

研究計画に沿って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 $< 100\text{mg/dl}$ 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（なごはま0次予防コホート事業）では、長浜市民約1万1千人の登録が完了し、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(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(Mol Genet Metab 109: 112-117, 2013)。また、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可能性が示唆された。集積された多数の糖尿病多発家系を用いて、順次、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、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

研究経緯で、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可能性が示唆された。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可能性があり、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、これまでにGCKR遺伝子、EEA1遺伝子および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 Ca²⁺-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 Ca²⁺ influx and subsequent Ca²⁺ 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 switching 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
- 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.* 586 :4076-4081, 2012
- Flamein F, Riffault L, Muselet-Charlier C, Pernelle J, Feldmann D, Jonald L, Durand-Schneider AM, Coulomb A, Maurice M, Noguee LM, Inagaki N, Amselem S, Dubus 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
- 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.* 84:362-370, 2013
- 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
- Toyama K, Yonezawa A, Masuda S, Ogawa R, Hosokawa M, Fujimoto S, Inagaki N, Inui K-I, Katsura T. Loss of multidrug and toxin extrusion (MATE 1) is associated with metformin-induced lactic acidosis. *Br. J. Pharmacol.*, 166:1183-1191, 2012
- Mitsui R, Fukushima M, Taniguchi A, Nakai Y, Aoyama S, Takahashi Y, Tsuji H, Yabe D, Yasuda K, Kurose T, Kawakita T, Seino Y, Inagaki N. Insulin secretory capacity and insulin sensitivity in impaired fasting glucose in Japanese. *J. Diabetes Invest.*, 3: 377-383, 2012
- Flamein F, Riffault L, Muselet-Charlier C, Pernelle J, Feldmann D, Jonald L, Durand-Schneider AM, Coulomb A, Maurice M, Noguee LM, Inagaki N, Amselem S, Dubus J C, Rigourd V, Brémont F, Marguet C, Brouard J, de Blic J, Clement A, Epaud R, Guillot L. Molecular and cellular characteristics of ABCA3 mutation associated with diffuse parenchymal lung diseases in children. *Hum. Mol. Genet.* 21: 765-775, 2012.
- Morales CR, Ni X-Y, Smith CE, Inagaki N, Hermo L. ABCA17 mediates sterol efflux from mouse spermatozoa plasma membranes. *Histol. Histopathol.* 27: 317-328, 2012.
- Harashima S-I, Horiuchi T, Wang Y, Notkins AL, Seino Y, Inagaki N. Sortingnexin 19

- regulates the number of dense core vesicles in pancreatic β -cells. *J. Diabetes Invest.* 3: 52-61, 2012.
- Yabe D, Watanabe K, Sugawara K, Kuwata H, Kitamoto Y, Sugizaki K, Fujiwara S, Hishizawa M, Hyo T, Kuwabara K, Yokota K, Iwasaki M, Kitatani N, Kurose T, Inagaki N, Seino Y. Comparison of incretin immunoassays with or without plasma extraction: correlation of clinical characteristics and incretin secretion in Japanese patients with type 2 diabetes. *J. Diabetes Invest.*, 3: 70-79, 2012.
- Yamane S, Harada N, Hamasaki A, Muraoka A, Joo E, Suzuki K, Nasteska D, Tanaka D, Ogura M, Harashima S-I, Inagaki N. The effects of glucose and meal ingestion on incretin secretion in Japanese subjects with normal glucose tolerance. *J. Diabetes Invest.* 3: 80-85, 2012.
- Kawamori R, Inagaki N, Araki E, Watada H, Hayashi N, Horie Y, Sarashina A, Gong Y, von Eynatten M, Woerle HJ, Dugi K. A. Linagliptin monotherapy provides superior glycaemic control versus placebo or voglibose with comparable safety in Japanese patients with type 2 diabetes: a randomized, placebo and active comparator-controlled, double-blind study. *Diabetes Obes. Metab.* 14: 348-357, 2012.
- Harashima S, Ogura M, Tanaka D, Fukushima T, Wang Y, Koizumi T, Aono M, Murata Y, Seike M, Inagaki N. Sitagliptin add-on to low dosage sulfonylureas: efficacy and safety of combination therapy on glycemic control and insulin secretion capacity in type 2 diabetes. *Int. J. Clin. Pract.* 66: 465-476, 2012.
- Mukai E, Fujimoto S, Sato H, Oneyama C, Kominato R, Sato Y, Sasaki M, Nishi Y, Okada M, Inagaki N. Exendin-4 suppresses Src activation and reactive oxygen species production in diabetic GK rat islets in an Epac-dependent manner. *Diabetes* 60:218-226, 2011
- Ogawa E, Hosokawa M, Harada N, Yamane S, Hamasaki A, Toyoda K, Fujimoto S, Fujita Y, Fukuda K, Tsukiyama K, Yamada Y, Seino Y, Inagaki N. The effect of gastric inhibitory polypeptide on intestinal glucose absorption and intestinal motility in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 404: 115-120, 2011.
- Tanaka, D., Nagashima, K., Sasaki, M., Yamada, C., Funakoshi, S., Akitomo, K., Takenaka, K., Harada, K., Koizumi, A., Inagaki N. GCKR mutations in Japanese families with clustered type 2 diabetes. *Mol. Genet. Metab.* 102: 453-460, 2011.
- Yamane S, Hamamoto Y, Harashima S, Harada N, Hamasaki A, Toyoda K, Fujita Y, Joo E, Inagaki N. GLP-1 receptor agonist attenuates ER stress-mediated β -cell damage in Akita mice. *J. Diabetes Invest.* 2: 104-110, 2011.
- Harada N, Hamasaki A, Yamane S, Muraoka A, Joo E, Fujita K, Inagaki N. Plasma gastric inhibitory polypeptide and glucagon-like peptide-1 levels after glucose loading are associated with different factors in Japanese subjects. *J. Diabetes Invest.* 2: 193-199, 2011.
- Yamada C, Fujimoto S, Ikeda K, Nomura Y, Matsubara A, Kanno M, Shide K, Tanaka K, Imai E, Fukuwatari T, Shibata K, Inagaki N. Relation of homocysteine and homocysteine-related vitamins to bone mineral density in Japanese patients with type 2 diabetes. *J. Diabetes Invest.* 2: 233-239, 2011.
- Nishi Y, Fujimoto S, Sasaki M, Mukai E, Sato H, Sato Y, Tahara Y, Nakamura Y, Inagaki N. Role of mitochondrial phosphate carrier in metabolism-secretion coupling in rat insulinoma cell line INS-1. *Biochem. J.* 435: 421-430, 2011.

Fujimoto H, Toyoda K, Okitsu T, Liu X, Mukai E, Zhuang X-T, Uemoto S, Mochizuki N, Inagaki N. Three dimensional ex vivo imaging and analysis of intraportal islet transplants. *Transpl. Int.* 24: 839-844, 2011.

Cha C-Y, Nakamura Y, Himeno Y, Wang J, Fujimoto S, Inagaki N, Earm YE, Noma A. Ionic mechanisms and Ca^{2+} dynamics underlying the glucose response of pancreatic β -cells: A simulation study. *J. Gen. Physiol.* 138: 21-37, 2011.

Funakoshi S, Fujimoto S, Hamasaki A, Fujiwara H, Fujita Y, Ikeda K, Takahara S, Hosokawa M, Seino Y, Inagaki N. Utility of indices using C peptide levels for indication of insulin therapy to achieve good glycemic control in Japanese patients with type 2 diabetes. *J. Diabetes Invest.*, 2: 297-303, 2011.

Himeno T, Kamiya H, Naruse K, Harada N, Ozaki N, Seino Y, Shibata T, Kondo M, Kato J, Okawa T, Fukami A, Hamada Y, Inagaki N, Seino Y, Drucker DJ, Oiso Y, Nakamura J. Beneficial effects of exendin-4 on experimental polyneuropathy in diabetic mice. *Diabetes* 60: 2397-2406, 2011.

Cifuentes M, Pérez-Martín M, Grondona JM, López-Ávalos MD, Inagaki N, Granados-Durán P, Rivera P, Fernández-Llebrez PA. Comparative analysis of intraperitoneal versus intracerebroventricular administration of bromodeoxyuridine for the study of cell proliferation in the adult rat brain. *J. Neurosci. Methods*, 201: 307-314, 2011.

Shihara N, Kitaoka M, Inagaki N, Kadowaki T, Koumoto S, Satoh J, Terauchi Y, Nunoi K, Yamada Y, Sakamaki H, Seino Y. Randomized controlled trial of single-agent glimepiride and pioglitazone in Japanese patients with type 2 diabetes: A comparative study. *J. Diabetes Invest.* 2: 391-398, 2011.

Ikeda K, Fujimoto S, Goto M, Yamada C, Hamasaki A, Shide K, Kawamura T, Inagaki N. Impact of endogenous and exogenous insulin on basal energy expenditure in patients with type 2 diabetes under standard treatment. *Am. J. Clin. Nutr.*, 94: 1513-1518, 2011.

Takeda Y, Amano A, Noma A, Nakamura Y, Fujimoto S, Inagaki N. Systems analysis of GLP-1 receptor signaling in pancreatic β -cells. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* 301: C792-803, 2011.

Funakoshi S, Fujimoto S, Hamasaki A, Fujiwara H, Fujita Y, Ikeda K, Takahara S, Seino Y, Inagaki N. Analysis of factors influencing postprandial C peptide levels in Japanese patients with type 2 diabetes: Comparison with C peptide levels after glucagon load. *J. Diabetes Invest.*, 2: 429-434, 2011

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

2) 学会発表

(各研究分担者欄に記載)

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】

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、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する提言、およびビ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する提言を行っている。現在、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。

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
田中 大祐 京都大学医学研究科 特定助教（*平成23年度～平成24年度まで研究参画）

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。これまで上記解析基盤を用いた疾患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研究手法でearly endosome antigen 1 (EEA1) 遺伝子を絞り込み、主として全エクソンシーケンスによる家系内糖尿病罹患者と非罹患者比較解析でG-protein coupled receptor 128 (GPR128) 遺伝子を絞り込んだ。集積した家族歴濃厚家系を用いて、順次、糖尿病発症原因遺伝子の絞り込みを継続するとともに、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詳細を検証する。

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。日本人（アジア人）は欧米人に比べインスリン分泌能が低いとされ、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同定されておらず実態解明は急務である。我々は、平成20年から継続して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、全エクソンシーケンス

併用、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新規糖尿病発症原因遺伝子探索をおこなってきた。本研究は、新規糖尿病発症原因遺伝子探索および効率的糖尿病発症原因遺伝子絞り込み手法の確立を目的とする。

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、発症者ゲノム 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。

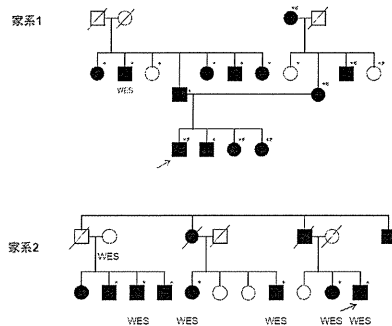
C. 研究結果

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。

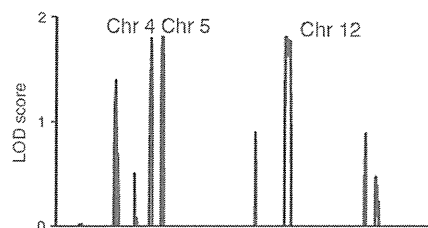
図1: 糖尿病多発家系

(*: DNA採取, #: HNF4A遺伝子T130I変異, WES: 全エクソンシーケンス施行)



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、

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 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 (*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	5	0.059
CENPH	A89T	208	2	0.009	132	2	0.014
TMEM174	F120L	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
LRN1Q1	E361G	209	1	0.004	132	2	0.014
EAA1	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)。

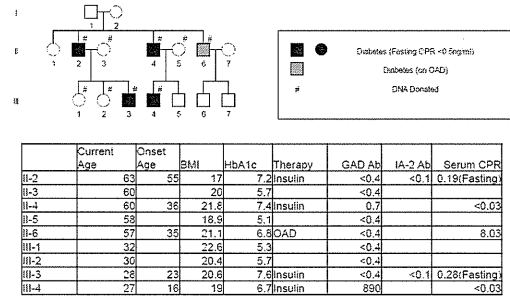
表2:全エクソンシーケンスによる、罹患者全員に集積し非罹患者に存在しない塩基配列変化の絞り込み [家系2]

Chr	dbSNP (NCBI) rs number	MAF (1000 Genomes)	Gene	AA Change	Sanger method confirmation
3	116552748	0.0058	CPR128	T314I	All young-onset members, possibly damaging with a score of 0.623
3	14212974	0.0014	CD209RL	P149S	All young-onset members, possibly damaging with a score of 1.006
11	147618889	0.0037	AGBL2	F215S	All young-onset members, possibly damaging with a score of 0.777
11	78162878	0.0041	BTBD18	S302T	All young-onset members, benign with a score of 0.004
3	148979964	0.009	OR3H15	I285V	All young-onset members, benign with a score of 0.028
5	61744257	0.0068	DNAH5	R442Q	All young-onset members, benign with a score of 0.403
5	200489168	N/A	QTRTD1	N383S	All young-onset members, benign with a score of 0.203
8	7028687	N/A	EPPK1	L2298V	WES False Positive
10	10429585	N/A	COX17	L251I	WES False Positive
10	77284553	N/A	MADCAM1	P252D	WES False Positive
1	61834498	N/A	CHST27	K45M	Predicted to be present in an unaffected member i-6
6	72762876	N/A	PABP	C128K	Predicted to be present in an unaffected member i-4
1	73178935	N/A	FLG	E227D	Present in an unaffected member i-2
22	114526778	N/A	XPR3	F289L	Present in an unaffected member i-2

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症者 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, III-5, III-3, III-4)



D. 考察

これまで集積した糖尿病多発家系検体を、①主に全ゲノム連鎖解析により糖尿病発症原因遺伝子を絞り込む方法、②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③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て新規糖尿病発症原因遺伝子絞り込みを進めてきた。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

平成 20 年度から継続的に 3 世代以上にわたる糖尿病患者を有する糖尿病家族歴濃厚家系を探索し、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。これらのゲノム検体を用いた解析により GCKR 遺伝子 (*Mol Genet Metab.* 102:453-460, 2011)、EEA1 遺伝子 (*Mol. Genet. Metab.*109:112-117, 2013) および GPR128 遺伝子 (論文投稿準備中) を絞り込んだ。この中で EEA1 遺伝子変異に関して、糖尿病多発家系および一般糖尿病患者において発症感受性遺伝子となっている可能性が示唆された。EEA1 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、EEA1 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 *in vitro* 解析を進めていく予定である。同時に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していく予定である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

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 Ca²⁺-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 Ca²⁺ influx and subsequent Ca²⁺ 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 β -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

Funakoshi S, Fujimoto S, Hamasaki A, Fujiwara H, Fujita Y, Ikeda K, Takahara S, Nagashima K, Hosokawa M, Seino Y, Inagaki N. Utility of indices using C peptide levels for indication of insulin therapy to achieve good glycemic control in Japanese patients with type 2 diabetes. *J Diabetes Invest.* 2(4):297-303, 2011

Tanaka D, Nagashima K, Sasaki M, Yamada C, Funakoshi S, Akitomo K, Takenaka K, Harada K, Koizumi A, M, Inagaki N. GCKR mutations in Japanese families with clustered type 2 diabetes. *Mol Genet Metab.* 102(4):453-60, 2011

2. 学会発表

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)

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 β -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