

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19534

研究課題名(和文)次世代シーケンスを用いた、若年発症糖尿病多発家系における発症原因遺伝子同定

研究課題名(英文)Next-generation sequencing in familial aggregated young-onset diabetes

研究代表者

田中 大祐(Tanaka, Daisuke)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：50582904

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝因子の発症への影響が特に大きいと考えられる糖尿病多発家系を用い、次世代シーケンス解析にて新規糖尿病発症原因遺伝子変異を同定することで、糖尿病の遺伝素因解明に寄与することを目的とし研究を行った。インスリン分泌不全の顕著な非肥満糖尿病罹患者4名が存在する1家系につき全エクソーム解析にて検討を行った結果、家系の4名に共通して存在し、一般糖尿病患者において一般非糖尿病患者に比して有意に高頻度で存在するADAMTSL3遺伝子A137T変異を同定でき、糖尿病発症感受性変異である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to clarify the genetic background of a family with multiple cases of diabetes accompanied by absolute insulin deficiency using whole-exome sequencing (WES). In a Japanese family, WES was performed in four affected members with absolute insulin deficiency and two unaffected members. I focused on variants that were shared by all of the four affected members. It was revealed that A137T in ADAMTSL3 (rs181914721) was observed more frequently in the subjects with diabetes than in the normoglycemic controls. We propose that A137T in ADAMTSL3 is a candidate mutation for susceptibility to diabetes in this family and in the Japanese population.

研究分野：代謝学

キーワード：糖尿病 遺伝子

1. 研究開始当初の背景

糖尿病の急増は全世界的に深刻な問題である。本邦を含む西太平洋地域の成人糖尿病患者は1億3000万人以上で増加を続けており、本邦の成人糖尿病患者は950万人と推定されている。網膜症や腎症をはじめとする糖尿病合併症に起因する患者のQOL低下や経済的損失は甚大であり、糖尿病発症の分子機構を解明し、新規診断・治療法を開発し、合併症を減少させることは急務であった。

糖尿病発症には食事・運動といった環境因子に加えて、遺伝因子が重要な役割を果たすと考えられている。糖尿病発症に関わる遺伝因子を明らかにするため広く行われているのはゲノムワイド相関解析(GWAS)であった。これは、一般2型糖尿病患者と一般対照者のDNA検体を収集し、全ゲノムの一塩基多型(SNPs)などをタイピングし、患者と対照者で頻度に差異がみられる多型を探索し、2型糖尿病発症関連遺伝子座位を同定する手法である。全世界において2型糖尿病のGWASおよびそのメタ解析研究が大規模に行われ、70以上の糖尿病発症関連遺伝子座位が同定されていた。しかし、同定された遺伝子座位の情報全てを総合して説明できるのは糖尿病発症に関わる遺伝子の5-20%にとどまると考えられており、これは2型糖尿病のGWASにおいて同定されたものが一般集団において高頻度のCommon Variantsであり、個人の糖尿病発症に与える影響が比較的小さい(Odds比<1.5)ものであることが要因とされる。この現状を開関するためには、これまで2型糖尿病のGWASでは同定困難であった、一般集団において低頻度だが疾患発症に与える影響の大きいRare variantsを同定することが不可欠と考えた。

Rare variantsの同定には、遺伝因子の寄与が特に大きいと考えられる糖尿病患者を対象とすることが有効と考えられた。研究代表者らは以前複数の糖尿病多発家系について連鎖解析を行い、GCKR遺伝子の新規変異を同定した(田中ら, Mol Genet Metab 102巻, 453-460頁, 2011年)。さらに次世代シーケンス技術により、希少な遺伝疾患における原因遺伝子変異同定を効率よく行えるようになり、研究代表者らは13名の罹患者を擁する糖尿病家系について、次世代シーケンスを用いEEA1遺伝子変異を糖尿病発症感受性遺伝子変異の候補として同定した(田中ら, Mol Genet Metab 109巻, 112-117頁, 2013年)。次世代シーケンスにて糖尿病感受性遺伝子を同定できる可能性を示した独創的な成果であり、その後も、特に隣発生異常を伴う希少な糖尿病症例における原因遺伝子同定が次世代シーケンスを用いて相次いで行われた。

糖尿病におけるRare variants研究により、糖尿病発症の遺伝因子解明の進捗が期待される状況であった。

2. 研究の目的

本研究では、遺伝因子の発症への寄与が大きいと考えられる、若年発症者を含む多数の糖尿病発症者を有する家系を集積し、次世代シーケンス技術を基盤として新規糖尿病発症原因遺伝子を同定する。同定される遺伝子変異は一般集団においては低頻度(Rare variants)のためGWASでは同定困難だが、遺伝子変異保持者の糖尿病発症に重大な影響を及ぼすと考えられる。新規糖尿病発症原因遺伝子を同定し、病態の解明、新規診断・治療法開発に寄与することが本研究の目的である。

3. 研究の方法

1) 3名以上の糖尿病患者を有する109家系303名のうち、30歳以下での若年発症者を有し既知遺伝子変異のない36家系を解析する。このうち、インスリン分泌能低下が著明な家系や、若年発症者を複数有する家系については、遺伝因子の関与が特に強いものと考え優先的な解析対象とする。

2) 家系構成員のDNAにつき、断片化し、エクソン濃縮を行い、次世代シーケンサーにて全エクソンシーケンスを行う。メンデル遺伝疾患においては80%程度がエクソン領域の遺伝子変異が原因であり、全エクソンシーケンスにより原因遺伝子が検出できる可能性は高い。シーケンス結果解析にて1人あたり約20,000の、タンパクのアミノ酸配列変化を引き起こすエクソン内塩基配列変化、すなわちNon-synonymous variantが検出される。若年発症者を有する糖尿病多発家系における糖尿病発症原因は、Non-synonymous variantであり、かつ一般集団において低頻度のRare variantsである可能性が高いと考えられる。このため、家系内の罹患者に共通し、非罹患者に存在しないNon-synonymous variantを抽出し、さらに、全世界の1000人の一般人口につき全ゲノムシーケンスを行ったデータベースである1000 genomes project、加えて本邦の全ゲノムデータベースであるHuman Genetic Variation Databaseのデータを用い、対立遺伝子頻度が1%以上のものを除外し、糖尿病発症原因候補を絞り込む。

3) 全エクソンシーケンスにて同定された糖尿病発症原因変異候補について、タンパク機能変化予測ツール(PolyPhen-2 HumDiv, SnpEff)を用い、Non-synonymous variantのうちタンパク機能に重大な影響を及ぼす可能性が低いものは除外し、Sanger法にて変異の確認を行う。

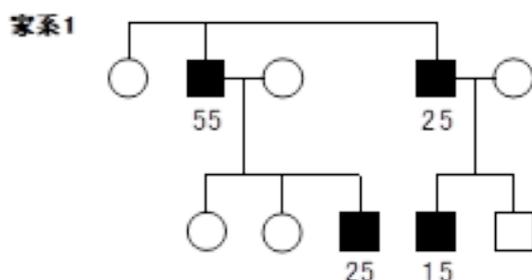
そして、DNA取得済みの一般正常耐糖能者および一般2型糖尿病患者における遺伝子変異頻度検討をTaqman法にて行う。研究代表者

らは京都大学大学院医学研究科環境衛生学講座 小泉昭夫教授との共同研究において3000名以上の検診受診者のDNA検体(高山コホート、能代コホート)を得ており、このうち55歳以上で空腹時血糖<100mg/dlの正常耐糖能者105名を選ぶことに成功している。さらに、119名の一般2型糖尿病患者についても変異候補のタイピングを行い、同一変異をもつ発症者の有無を検討する。一般正常耐糖能者および一般2型糖尿病患者における頻度検討の結果、一般正常耐糖能者にはほとんどみられず(105人の検討で対立遺伝子頻度1%未満)、一般2型糖尿病患者においてみられる変異、あるいは一般正常耐糖能者にも一般2型糖尿病患者にもほとんどみられない変異を家系の発症原因候補とする。この条件をみたし、さらに、一般2型糖尿病患者に同一変異を持つ者がおり、その患者家系において疾患と変異の分布が一致している場合、糖尿病発症原因である可能性が高まる。さらに、研究開始後ながはま0次コホートとも共同研究を開始し、同コホートの正常耐糖能者におけるデータを用いた検証も可能となった。

4. 研究成果

対象家系を図に示す。家系1においては4名につきインスリン分泌能がほぼ枯渇(空腹時血清C-ペプチド<0.5ng/ml)しており特徴的な家系と考えた[図1]。

【図1】糖尿病家系(数字は発症年齢)



家系1において、4名の罹患者と2名の非罹患者につき全エクソンシーケンスを行い、罹患者に共通し、非罹患者に存在しないVariantを選択した。このうち蛋白機能に変化を与える可能性が高いもの(Non-synonymous Variantのうち、[1]機能予測ツール SnpEffにおいて、SPLICE_SITE_ACCEPTOR, SPLICE_SITE_DONOR, START_LOST, STOP_GAINED, STOP_LOSTであるもの、[2] SnpEffの予測がNON_SYNONYMOUS_CODINGであり、PolyPhen-2 HumDivの予測がprobably damagingであるもの)を選択すると105個のVariantが選択された。そして、1000 genomes projectおよびHuman Genetic Variation Databaseを用

い対立遺伝子頻度が1%以上のものを除外し、候補となる Rare non-synonymous variantsを18個に絞り込んだ。そして、Sanger法にてすべてヘテロ接合のVariantであることを確認した。

この18個につき、実際に正常耐糖能者105名(高山コホート)についてタイピングを行った結果、2個は対立遺伝子頻度が1%以上であり候補から除外した。

候補として残った16個のVariantにつき、119名の一般2型糖尿病患者についてタイピングを行った結果、一般正常耐糖能者に比して一般2型糖尿病患者において唯一高頻度であった変異はADAMTSL3遺伝子A137T変異(rs181914721)であった。

さらに、同変異について別の日本人コホート研究の正常耐糖能者(ながはま0次コホート2,102名、HbA1c<6.5%)につきタイピングを行った結果、この正常耐糖能者に比してさきほどの一般2型糖尿病患者119名において有意に変異の頻度が高かった[表1]。さらに、同変異がみられた一般2型糖尿病患者3名のうち1名については家系が存在し、家系の罹患者9名中6名が同変異を有していた。

以上のことから、ADAMTSL3遺伝子A137T変異(rs181914721)は糖尿病発症感受性変異である可能性が高く、家系1においてインスリン分泌能枯渇に関連していることから、何らかの機序にて細胞の脆弱性に関与している可能性が示唆された。

以上につき論文報告を行うとともに、利用したながはま0次コホートのホームページにおいて広報を行った[雑誌論文4]。

[表 1]

rs181914721 (A137T in *ADAMTSL3*) アレル頻度の一般人口サンプルおよび糖尿病患者における比較

(M; major allele, m; minor allele, *: Fisher's exact test)

	MM	Mm	P vs. ながはま [*]
ながはま 非糖尿病 (HbA1c < 6.5%)	2091	11	
高山 非糖尿病 (HbA1c < 6.0%)	105	0	
糖尿病 (病院群にてリクルート)	116	3	0.0354

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計6件)

1. Dietary habits associated with reduced insulin resistance: The Nagahama study. Ikeda K, Sato T, Nakayama T, Tanaka D, Nagashima K, Mano F, Joo E, Fujimoto S, Takahashi Y, Kosugi S, Sekine A, Tabara Y, Matsuda F, Inagaki N; Nagahama Study Group. *Diabetes Res Clin Pract.* 2018 Apr 19;141:26-34. doi:10.1016/j.diabres.2018.04.006.

2. A Novel p.L145Q Mutation in the HNF1B Gene in a Case of Maturity-onset Diabetes of the Young Type 5 (MODY5). Kato T, Tanaka D, Muro S, Jambaljav B, Mori E, Yonemitsu S, Oki S, Inagaki N. *Intern Med.* 2018 Feb 28. doi:10.2169/internalmedicine.9692-17. [Epub ahead of print]

3.

-cell-specific overexpression of adiponectin receptor 1 does not improve diabetes mellitus in Akita mice. Choi J, Kobayashi H, Okuda H, Harada KH, Takeda M, Fujimoto H, Yamane S, Tanaka D, Youssefian S, Inagaki N, Koizumi A. *PLoS One.* 2018 Jan 5;13(1):e0190863. doi:10.1371/journal.pone.0190863. eCollection 2018.

4. Whole-exome sequencing in a Japanese family with highly aggregated diabetes identifies a candidate susceptibility mutation in *ADAMTSL3*.

Jambaljav B, Tanaka D, Nagashima K, Harashima SI, Harada N, Harada T, Fujiwara Y, Wang Y, Liu Y, Tabara Y, Matsuda F, Koizumi A, Inagaki N. *Diabetes Res Clin Pract.* 2018 Jan;135:143-149. doi: 10.1016/j.diabres.2017.11.012.

5. Epidemiology, clinical characteristics, and genetic etiology of neonatal diabetes in Japan. Nagashima K, Tanaka D, Inagaki N. *Pediatr Int.* 2017 Feb;59(2):129-133. doi: 10.1111/ped.13199.

6. Effects of structured testing versus routine testing of blood glucose in diabetes self-management: A randomized controlled trial. Nishimura A, Harashima SI, Fujita Y, Tanaka D, Wang Y, Liu Y, Inagaki N. *J Diabetes Complications.* 2017 Jan;31(1):228-233. doi:10.1016/j.jdiacomp.2016.08.019.

[学会発表](計3件)

1. 田中大祐 Jambaljav Byambatseren 稲垣暢也
日本人の若年発症非肥満糖尿病患者における網羅的次世代シーケンスの試み
第61回日本糖尿病学会年次学術集会
2018年

2. Jambaljav Byambatseren, Tanaka Daisuke, Inagaki Nobuya
Exome Sequencing in a Family with Multiple Cases of Type 1 Diabetes Reveals Candidate Susceptibility Mutations
第59回日本糖尿病学会年次学術集会
2016年

3.

田中大祐 Jambaljav Byambatseren 長嶋一昭 藤田直尚 稲垣暢也

30歳以下発症の日本人糖尿病患者における、
家族性若年糖尿病原因遺伝子(MODY1~6)変異の検討

第59回日本糖尿病学会年次学術集会
2016年

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

ながはま0次コホート研究成果

<http://zeroji-cohort.com/articles/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

田中 大祐(Daisuke Tanaka)

京都大学大学院医学研究科・

糖尿病・内分泌・栄養内科学・

助教

研究者番号：50582904