

令和 3 年 6 月 24 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08509

研究課題名(和文) 次世代シーケンス技術を用いた、若年発症糖尿病の新規原因遺伝子解明

研究課題名(英文) Investigation of novel causative mutations for young-onset diabetes using next-generation sequencing

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) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：35歳未満での若年発症糖尿病患者で、膵島関連自己抗体が陰性である者とその血縁者を対象とし、既知若年発症成人型糖尿病(MODY)原因遺伝子に関してゲノムDNAをシーケンスし、糖尿病発症原因と考えられる変異の存在しなかった29名とその血縁者につき全エクソンシーケンスを行った。結果、PTF1A遺伝子変異(NC_000010.11:g.23192583C>T)や、GATA6遺伝子変異(NC_000018.10:g.22171347A>T)が、糖尿病発症原因候補変異として同定された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

1型糖尿病や2型糖尿病は多因子遺伝疾患であるが、単一遺伝子異常により発症する糖尿病が知られており、これまでに30以上の原因遺伝子が明らかとなっている。一方、若年発症で、単一遺伝子異常による糖尿病が疑われるが、いまだ原因遺伝子変異が同定されない症例は多い。新規原因遺伝子変異の同定により、各症例の病態解明のみならず、糖尿病発症の分子機序に迫ることができると考える。

研究成果の概要(英文)：The subjects of our study were patients diagnosed with antibody-negative diabetes before the age of 35 and their relatives. We selected 29 probands that were negative for known mutations in genes linked to maturity-onset diabetes of the young(MODY) and exome sequencing of their genome DNA was performed.

As a result, mutations in PTF1A gene(NC_000010.11:g.23192583C>T) and GATA6 gene (NC_000018.10:g.22171347A>T) were identified as candidates for novel causative mutations for young-onset diabetes.

研究分野：糖尿病

キーワード：若年発症成人型糖尿病 次世代シーケンス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

糖尿病発症には食事・運動といった環境素因に加えて、遺伝素因が重要な役割を果たす。遺伝素因を明らかにするため、ゲノムワイド関連解析(GWAS)が行われた。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、疾患感受性遺伝子座を同定する手法である。GWASにより2017年までに150以上の遺伝子座が同定されたが、その全情報を総合して説明できるのは2型糖尿病の遺伝素因の一部にとどまると考えられており、これは、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)のものであったことが要因とされた。2017年になって新規に同定された2型糖尿病関連遺伝子座に存在したのはやはりodds比1.1程度の common variants であり、GWASのみで糖尿病遺伝素因の全容解明を行うことが困難である状況は不変であった。これを打開するためには、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られた。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罹患者を対象とした検討を行うことが有効である。実際に、若年発症糖尿病例や、家族内集積の非常に強い糖尿病例において、次世代シーケンスを用い、原因遺伝子変異を同定することが可能であったとする報告が複数なされた。すなわち、糖尿病における rare variants 研究により、糖尿病遺伝素因解明のさらなる進展が期待される状況にあった。

2. 研究の目的

Rare variant を発症原因とする糖尿病、すなわち単一遺伝子異常による糖尿病の可能性が考えられる35歳未満の若年発症者につき、次世代シーケンスを用いて新規糖尿病発症原因遺伝子変異を同定することを目的とした。

3. 研究の方法

倫理委員会にて承認された研究計画のもと、糖尿病患者およびその血縁者につき、同意のもと臨床情報および末梢血由来DNAを収集した。このうち、発症原因が明らかでない35歳未満の若年発症者およびその血縁者を解析対象とした。

さらに、[A]診断年齢が25歳未満と特に若年である、[B]家系内にも糖尿病罹患者が多数存在する、[C]インスリン分泌不全が著明であり肥満歴がない、[D]特徴的な合併症を有する、といった顕著な臨床的特徴を一つもしくは複数有する例については、単一遺伝子異常による糖尿病の可能性が特に高いと考え、優先的解析対象とした。

若年発症糖尿病患者および、血縁者のDNA提供がある場合家系構成員全員のDNAにつき、Agilent SureSelect Human All Exon V6またはV7、Illumina HiSeq 2000を用い、全エクソンシーケンスを行い、解析(Mapping, Variant Calling, Annotation)を行った。

解析により約20,000/人の、タンパクのアミノ酸配列変化を引き起こす non-synonymous variant が検出されるが、糖尿病発症原因候補の絞り込み方法を以下A)-C)の順で行った。

A)大規模データベースに基づく機能予測(Polyphen 2, SIFT; ホモログ間の配列保存性・アミノ酸の化学的性質・タンパク質構造情報・ドメイン情報をはじめとするデータに基づき予測)を行い、Non-synonymous variant のうち遺伝子産物の機能に重大な影響を及ぼす可能性が低いものは除外した。

B)若年発症糖尿病患者の発症原因は、non-synonymous な rare variant であることが推定されるため、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、加えて日本人ゲノムデータベースである Human Genetic Variation Database を用い、一般人口における対立遺伝子頻度が1%以上のものを除外し候補を絞り込んだ。

C)家系構成員DNAをシーケンスした場合は罹患者に存在し、血縁非罹患者に存在しないものを抽出した。そのような variant が多数存在する場合や、家系に罹患者のいない場合は、ホモ接合性変異や、タンパク機能への影響が極めて重大と考えられる未成熟終止コドン優先して抽出し、さらに、膵発生や膵細胞機能との関連が示唆される遺伝子や、インスリン抵抗性との関連が示唆される遺伝子に存在する variant についても優先的に抽出した。

そして、絞り込まれた変異に関して、サンガー法にて確認後、本学疾患ゲノム疫学講座と共同研究を行っている(研究計画は倫理委員会において承認済み)、5年間の追跡が完了した10000名以上の検診受診者につき頻度検討を、DNAアレイや次世代シーケンスによりすでに得られたデータ

を用いて行うこととした。検診受診者に全く検出されない変異や、受診者のうち糖尿病罹患者に多い変異は糖尿病発症原因候補となる。

このように同定された新規糖尿病発症原因遺伝子変異の候補につき、*in vitro*解析にて糖尿病発症原因であることを確定させることとした。

4. 研究成果

35歳未満での若年発症糖尿病患者で、膵島関連自己抗体が陰性である者とその血縁者を対象とし、既知MODY原因遺伝子(*HNF1A*, *HNF4A*, *HNF1B*, *GCK*, *PDX1*, *NEUROD1*)に関してゲノムDNAをシーケンスし、糖尿病発症原因と考えられる変異の存在しなかった29名とその血縁者につき全エクソンシーケンスを行った。

全エクソンシーケンスにて検出されたvariantについて、機能予測ツールおよび一般人口データベースを用い、遺伝子産物の機能に影響を及ぼすrare variantを絞り込んだ。

続いて、膵発生や膵細胞機能との関連が示唆される遺伝子に存在するvariantにまず着目した。

結果、*PTF1A* 遺伝子変異(NC_000010.11:g.23192583C>T)が、35歳未満で発症した非肥満糖尿病患者を3名有する家系において、3名に共通するヘテロ接合体の変異として検出され、糖尿病発症原因であることが示唆された。この変異を有するPTF1Aは、転写活性が低下していることが*in vitro*解析により示されており、変異が膵細胞の発生・機能に影響を及ぼし、糖尿病発症原因となった可能性が考えられた(論文投稿準備中)。

さらに、*GATA6* 遺伝子の同一の変異(NC_000018.10:g.22171347A>T)が、明らかな血縁関係にない2名の若年発症糖尿病患者においてヘテロ接合体で検出され、糖尿病発症への影響が示唆された。一方、インスリン抵抗性との関連が示唆される遺伝子に存在するvariantに着目すると、TBC1D4 遺伝子のミスセンス変異が、強いインスリン抵抗性を示す糖尿病患者1名においてヘテロ接合体で検出され、表現型へのvariantの関与が強く示唆された。

以上から、網羅的次世代シーケンスを若年発症糖尿病患者に行うことで、複雑な遺伝的背景の解明が可能であると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Fujita Yuki, Tanaka Daisuke, Tatsuoka Hisato, Matsubara Miho, Hyo Takanori, Hamamoto Yoshiyuki, Komiya Toshiyuki, Inagaki Nobuya, Seino Yutaka, Yamazaki Yuji	4. 巻 2020
2. 論文標題 A novel splice-site mutation of the HNF1B gene in a family with maturity onset diabetes of the young type 5 (MODY5)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Endocrinology, Diabetes & Metabolism Case Reports	6. 最初と最後の頁 20-0092
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1530/EDM-20-0092	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 田中 大祐、稲垣 暢也	4. 巻 62
2. 論文標題 7. 遺伝子解析で注意すべき倫理的な問題	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 糖尿病	6. 最初と最後の頁 474～476
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11213/tonyoby.62.474	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Liu Yanyan, Harashima Shin-ichi, Wang Yu, Suzuki Kazuyo, Tokumoto Shinsuke, Usui Ryota, Tatsuoka Hisato, Tanaka Daisuke, Yabe Daisuke, Harada Norio, Hayashi Yoshitaka, Inagaki Nobuya	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Sphingosine kinase 1 interacting protein is a dual regulator of insulin and incretin secretion	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1096/fj.201801783RR	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 MANO Fumika, IKEDA Kaori, SATO Tosiya, NAKAYAMA Takeo, TANAKA Daisuke, JOO Erina, TAKAHASHI Yoshimitsu, KOSUGI Shinji, SEKINE Akihiro, TABARA Yasuharu, MATSUDA Fumihiko, INAGAKI Nobuya, Nagahama Study Group	4. 巻 64
2. 論文標題 Reduction in Gastroesophageal Reflux Disease Symptoms Is Associated with Miso Soup Intake in a Population-Based Cross-Sectional Study: The Nagahama Study	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Nutritional Science and Vitaminology	6. 最初と最後の頁 367～373
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3177/jnsv.64.367	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ikeda Kaori, Sato Tosiya, Nakayama Takeo, Tanaka Daisuke, Nagashima Kazuaki, Mano Fumika, Joo Erina, Fujimoto Shimpei, Takahashi Yoshimitsu, Kosugi Shinji, Sekine Akihiro, Tabara Yasuharu, Matsuda Fumihiko, Inagaki Nobuya	4. 巻 141
2. 論文標題 Dietary habits associated with reduced insulin resistance: The Nagahama study	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Diabetes Research and Clinical Practice	6. 最初と最後の頁 26 ~ 34
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.diabres.2018.04.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kato Tomoko, Tanaka Daisuke, Muro Seiji, Jambaljav Byambatseren, Mori Eisaku, Yonemitsu Shin, Oki Shogo, Inagaki Nobuya	4. 巻 57
2. 論文標題 A Novel p.L145Q Mutation in the HNF1B Gene in a Case of Maturity-onset Diabetes of the Young Type 5 (MODY5)	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Internal Medicine	6. 最初と最後の頁 2035 ~ 2039
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2169/internalmedicine.9692-17	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Daisuke Tanaka, Saki Okamoto, Yanyan Liu, Katsumi Iizuka, Yoshiyuki Hamamoto, Yukio Horikawa, Daisuke Yabe, and Nobuya Inagaki
2. 発表標題 Exome sequencing in a family with multiple cases of early-onset diabetes reveals a candidate causative mutation in the PTF1A gene
3. 学会等名 ADA the 80th Scientific Sessions (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------