

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K11723

研究課題名(和文) 2型糖尿病の高リスク疾患関連遺伝子による新しい病態と分子機構の解明

研究課題名(英文) Exploring the molecular mechanism and the clinical features of carriers with a variant of a high-risk disease-associated gene of type 2 diabetes mellitus

研究代表者

市川 弥生子 (Yaeko, Ichikawa)

杏林大学・医学部・教授

研究者番号：90341081

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：2型糖尿病の発症に強く寄与する遺伝子バリエーションが北極圏に住むイヌイットで見出された。本研究では、このTBC1D4ナンセンスバリエーションを持つ日本人がいることを見出した。調査時点では糖尿病の発症者はおらず、糖尿病との関連は現時点では明らかではなかった。TBC1D4のショウジョウバエオルソログ遺伝子であるpollux (plx) 遺伝子に着目して個体ならびに細胞レベルで遺伝子機能を解析した。その結果、plx変異は脳・神経系と骨格筋の発生には顕著な影響を与えないこと、plx遺伝子が飢餓耐性に関与する可能性があること、またplxが糖輸送体の細胞内局在と発現に影響を与える可能性があることを示唆する結果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、北極圏に住む2型糖尿病の発症に強く寄与するTBC1D4遺伝子のナンセンスバリエーションを持つ日本人がいることを見出した。食生活の変化とともに2型糖尿病の罹患率が急増しているという共通の背景を持つ両者において、今後、糖尿病を含めた代謝異常の予防や個別化医療に発展する可能性があり、社会的意義があると考えられる。また、本研究によりショウジョウバエをモデルとした解析系を確立することができたことで、北極圏におけるTBC1D4遺伝子のナンセンスバリエーションが潜在的に有する生物学的意義についても実験的に解析することが可能となった。このことは学術的意義が高いと考える。

研究成果の概要(英文)：A common nonsense variant in TBC1D4 was known to substantially increase the risk of type 2 diabetes in Greenlandic Inuit. The nonsense variant is extremely rare in the world without Inuit population. We found a Japanese family carrying this variant independently, and four heterozygous carriers among a Japanese cohort study. None of the carriers we studied had diabetes at the time of the study. We focused on the pollux (plx) gene, the Drosophila ortholog of TBC1D4, and analyzed its function at the cellular and individual levels. Our results suggest that plx mutation does not significantly affect development of brain/nervous system and skeletal muscle, that the plx gene may be related to starvation tolerance, and that plx affects the expression and subcellular localization of sugar transporters.

研究分野：Neurology

キーワード：type 2 diabetes mellitus TBC1D4 pollux drosophila

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

2型糖尿病の発症は生活習慣以外に遺伝要因も大きく寄与している。北極圏に住むイヌイットにおいて、2型糖尿病の発症リスクの高い遺伝子バリエーション: *TBC1D4* p.R684X が見出された(ホモ接合体のオッズ比 10.3)<sup>1)</sup>。p.R684X(R684X)はイヌイット以外では世界的に稀なバリエーションであり、臨床像の報告はない。また、*TBC1D4* はインスリン抵抗性に関与しているが、その分子機構の全容については明らかとなっていない。

申請者は、冬期に一過性の意識障害・行動異常で当科に入院を繰り返した患者が、両親いとこ婚で同胞 1 名が同様の症状を呈していることに着目した。遺伝子解析の結果、発症者 2 名が *TBC1D4* R684X のホモ接合体、両親および非発症の同胞 1 名がヘテロ接合体ということが明らかとなった。東北メディカル・メガバンク(ToMMo)の日本人バリエーションデータベースで *TBC1D4* の検索を行うと、複数の日本人 R684X 保有者がいることが判明した。日本人の R684X 保有者の臨床スペクトラムを明らかにすることは意義があることと考え、本研究の着想にいたった。R684X が存在する *TBC1D4* の long isoform は骨格筋と脳組織にのみ発現している<sup>1)</sup>。*TBC1D4* の機能低下が脳機能障害、認知機能低下を来す病態も考えられ、モデル生物を用いた分子病態の解析が必要と考えた。

### 2. 研究の目的

(1)日本人における *TBC1D4* R684X 保有者の臨床像を明らかにする

イヌイットの耐糖能に関する報告以外では、R684X のホモ/ヘテロ接合体ともに臨床像の報告はない。本研究は、糖尿病の発症が多いかどうかを含め、日本人 R684X 保有者の臨床像について明らかにすることを目的に行う。

(2)*TBC1D4* がもたらす分子病態についてモデル生物を用いて探求する

*TBC1D4*/AS160 がインスリン依存性の GLUT4 の膜移行を制御し、インスリン抵抗性に関与していることは知られているが、疾患に関連した分子機構の全容は解明されていない。*TBC1D4* の脳機能への関与はこれまで解析されていない。これらについての解明を推進するために、ショウジョウバエを用いたアプローチによりこれに迫る。

### 3. 研究の方法

(1)日本人 *TBC1D4* R684X 保有者のデータベースの構築・臨床遺伝解析

- 1.当科の対象症例、ToMMo から分譲された R684X 保有者の DNA 試料検体 (ヘテロ接合体 5 検体分譲)について、直接塩基配列解析にて R684X バリエーションの確認を行う。
- 2.バリエーションを確認した R684X ホモ/ヘテロ接合体症例の臨床所見・経過、検査所見の抽出を行う。日本人 R684X 保有者の臨床データベースを構築し、臨床遺伝学的解析を行う。

(2)ショウジョウバエにおける *TBC1D4* オートログの機能解析

- 1.内因性の発現を観察するために Mi-RMCE という分子遺伝学的な技術を用いて、*TBC1D4* のショウジョウバエオートログである *pollux* の発現を細胞レベルで明らかにする。
- 2.誘導型 RNAi を利用して *pollux* の組織特異的なノックダウンを行い、*pollux* の組織特異的な機能を解剖学的に明らかにする。

### 4. 研究成果

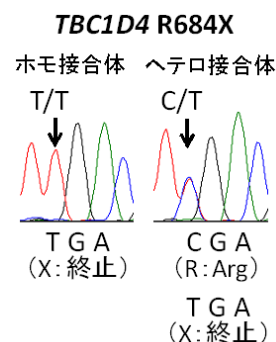
(1)日本人 *TBC1D4* R684X 保有者について

1.日本人のアレル頻度、バリエーションの確認

グリーンランドのイヌイットでは、R684X のアレル頻度は 17%と高いが<sup>1)</sup>、イヌイット以外では非常に稀なバリエーションである。世界的な遺伝子バリエーションデータベース gnomAD v3.1.2 においては<sup>2)</sup>、アレル総数 152,062 に対して、R684X のアレル数は 3 (ホモ接合なし) と少なく、アレル頻度は 0.000020 である。日本人コホートを対象とした ToMMo のバリエーションデータベース jMorP において<sup>3)</sup>、ToMMo 14KJPN ではアレル総数 28,258 に対して、該当アレル数は 25 であり、アレル頻度は 0.000885 と報告されている。

本研究では、ToMMo から分譲された 5 検体の DNA 試料について直接塩基配列解析を行ない、R684X のバリエーションを確認した。いずれもヘテロ接合体であった。

当科の日本人 1 家系については、直接塩基配列解析にて発端者が R684X バリエーションのホモ接合体であることも確認している。創始者効果が考えられるイヌイット以外の民族での R684X ホモ接合体は世界的にも貴重な症例と考えられる。



## 2.日本人 R684X 保有者の臨床像

当科の家系では、ホモ接合体、ヘテロ接合体ともに糖尿病発症者はいなかった。ToMMo から臨床情報が得られた4名(男性1名, 女性3名, 20歳代1名, 60歳代3名)については、糖尿病の発症者は調査時点ではなかった。4名のHbA1c(NGSP)は $5.15 \pm 0.13$ であった。1例のみ父親が2型糖尿病の家族歴があった。本研究で調べた範囲では、日本人の *TBC1D4* R684X 保有者と2型糖尿病との関連は明らかではなかった。今後、症例数を増やして、糖尿病を含めた代謝異常との関連について検討を行っていく。

### (2) ショウジョウバエ *TBC1D4* オースログ *pollux* (*plx*) の機能解析

#### 1. *plx* の発現

*plx* 遺伝子の予想される5つのアイソフォームにおける共通のイントロンにスプライスアクセプター配列下に2A自己切断ペプチドとGAL4が挿入された、*plx*-Trojan-GAL4を用いて、幼虫ならびに成虫における *plx* 遺伝子の発現を調べた。その結果、*plx* は骨格筋と神経細胞ならびにグリア細胞に発現していることがわかった。一方、発現が予想された、脂肪体には発現が観察されなかった。また、非常にマイナーではあるがメスの内部生殖器の一部に特異的に発現していた。

#### 2. *plx* ノックダウンの解析

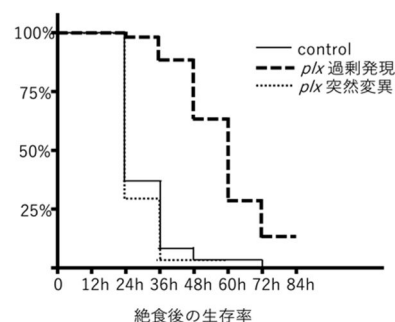
*plx* の hypomorph 変異体を用いて脳神経系の全体構造や筋組織について形態的な解析を行った。*plx* hypomorph 変異をホモに持つ個体は、成虫まで育つもののメスは妊性を持たなかった。このことは、メスの内部生殖器における *plx* の発現と関連している可能性がある。一方で、*plx* hypomorph 変異のホモ個体は、筋肉ならびに脳神経系に顕著な構造的な異常影は見られず、極端な寿命への影響もなかった。さらに、脳神経および骨格筋において、グリコーゲンの蓄積や脂肪の蓄積についての解析を行ったが、野生型との顕著な違いが見られなかった。

#### 3. トランスポーターの解析

哺乳動物においては、グルコース輸送体を含むベシクルの細胞膜への移行は Rab の活性型により行われる。一方で、*TBC1D4* は Rab の GAP として働くことでこのベシクルの膜移行を抑制している。インスリンシグナルは、*TBC1D4* をリン酸化により不活化することで、グルコース輸送体の膜移行を促進すると考えられている。ショウジョウバエ *Plx* が *TBC1D4* と同等の機能を有するか否かを明らかにするために、ショウジョウバエのグルコース輸送体(*Glut1*)と昆虫血糖であるトレハロースの輸送体(*Tret*)に注目して、これらの細胞膜への移行と *Plx* の関連を調べた。そのために、*Glut1*-GFP および、*Tret1*-GFP という融合分子ならびに、野生型 *Plx*、*TBC1D4* R684X と同等の効果があると考えられる C 末端の GAP ドメインを欠損した変異 *Plx*、*Plx*- $\Delta$ C を発現誘導することができるトランスジェニックショウジョウバエを作成し、これらを脂肪体ならびに唾液腺にてそれぞれを発現させた。唾液腺において *Glut1*-GFP を発現させると唾液腺細胞の apical 側へ *Glut1*-GFP 強く集積するが、これに *Plx* を同時に発現させると全体として *Glut1*-GFP の発現が失われ、また *Plx*- $\Delta$ C を同時に発現させると、*Glut1*-GFP の発現ならびに局在が非常に弱くなった。また、脂肪体において *Tret1*-GFP を発現させ、そこに同時に *Plx* ならびに *Plx*- $\Delta$ C を発現させると、*Plx* の場合は発生異常を伴う脂肪体の萎縮が生じ、*Plx*- $\Delta$ C の場合は致死となった。以上の結果は、*Plx* は *Glut1* ならびに *Tret1* の発現もしくは局在に影響を与えることを示唆した。一方で、*Plx* と *Plx*- $\Delta$ C がどのようにして異なる影響を生じているかについては、結論することができなかった。

#### 4. 飢餓耐性に関する解析

*plx* と飢餓耐性の関係を知るために、*plx* 突然変異体と *plx* 過剰発現個体において絶食後の生存期間を調べた。その結果、飢餓後の生存時間はコントロールと *plx* 突然変異体でほとんど変わらなかったが、*plx* 過剰発現個体はそれらに比して絶食後の生存時間が長いという結果を得た。この実験は、使用した系統の遺伝的背景や飼育環境など考慮し、再検討することが必要であるが、本結果は、*plx* の過剰発現が飢餓耐性を高める可能性があることを示唆した。



#### < 引用文献・引用サイト >

- 1) Moltke et al., A common Greenlandic *TBC1D4* variant confers muscle insulin resistance and type 2 diabetes. Nature. 512:190-3, 2014
- 2) gnomAD: <https://gnomad.broadinstitute.org/>
- 3) jMorp: <https://jmorp.megabank.tohoku.ac.jp/>

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yaeko Ichikawa, Masaki Tanaka, Eriko Kurita, Masanori Nakajima, Masaki Tanaka, Chizuko Oishi, Jun Goto, Shoji Tsuji, Atsuro Chiba	4. 巻 6
2. 論文標題 Novel SLC20A2 variant in a Japanese patient with idiopathic basal ganglia calcification-1 (IBGC1) associated with dopa-responsive parkinsonism	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Human Genome Variation	6. 最初と最後の頁 44
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41439-019-0073-7	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 0件）

1. 発表者名 市川弥生子, 宮崎泰, 炭谷由計, 茂呂直紀, 渋谷裕彦, 永井健太郎, 石本麻衣, 徳重真一, 内堀歩, 石浦浩之, 三井純, 辻省次, 戸田達史, 安田和基, 千葉厚郎
2. 発表標題 2型糖尿病発症の高リスク疾患関連遺伝子バリエーションを有する日本人の臨床像
3. 学会等名 日本人類遺伝学会第65回大会
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
研究分担者	粟崎 健 (Awasaki Takeshi) (60359669)	杏林大学・医学部・教授  (32610)	

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
---------	---------