

令和 6 年 6 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08527

研究課題名(和文) 単一遺伝子異常による糖尿病の新規発症原因遺伝子同定

研究課題名(英文) Identification of novel causative genes of monogenic 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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：1型糖尿病および2型糖尿病は多数の遺伝子が関与する多因子遺伝と考えられている。一方、若年診断、非肥満、家系集積といった特徴を持ち、単一遺伝子異常による糖尿病が疑われる例はしばしばみられるが、既知遺伝子で説明できる例は一部にとどまっていた。本研究では、単一遺伝子異常による糖尿病の原因となる既知11遺伝子に変異を見出すことができなかった若年診断糖尿病例につき、ゲノムDNAの全ゲノムシーケンスを用いた網羅的解析を行った。結果、1例につき膵の発生に関与するRFX6遺伝子の新規フレームシフト変異を見出した。若年診断糖尿病の遺伝的背景をより詳細に探究することができたと考える。

研究成果の学術的意義や社会的意義

若年診断糖尿病の発症に関与する遺伝的背景のひとつとしてRFX6遺伝子変異を同定したことで、若年診断糖尿病の成因の主たるものが膵機能や膵発生に関与する遺伝子の異常であることをより明確にすることができた。本研究の成果を受けて、若年診断糖尿病においてRFX6をはじめとする膵発生に関与する遺伝子の解析が進めば、個々の遺伝子異常による糖尿病の臨床像が明確となり診療に役立つ。さらに、RFX6分子等をターゲットとした創薬により、当該遺伝子に変異を持つ糖尿病および一般の糖尿病の治療につながる可能性が示唆される。

研究成果の概要(英文)：Type 1 and type 2 diabetes are thought to be polygenic disorders involving multiple genes. However, there are often cases of diabetes with characteristics such as early diagnosis, non-obesity, and familial accumulation, which suggest that diabetes is due to a mutation in a single gene, but only a few cases have been explained by known genes. In this study, we performed a comprehensive analysis using whole-genome sequencing of genomic DNA for cases of diabetes diagnosed at a young age in which mutations could not be found in the 11 known genes that cause diabetes. As a result, we found a novel frameshift mutation in the RFX6 gene, which is involved in the development of the pancreas, in one case. We believe that we have been able to explore the genetic background of young-onset diabetes in more detail.

研究分野：代謝学

キーワード：糖尿病

## 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。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、糖尿病発症に関与する分子機構を解明し、新規診断・治療法を開発し、合併症を減少させることが急務であると考えられていた。

糖尿病発症には環境素因に加えて、遺伝素因が重要な役割を果たす。遺伝素因解明のため、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 single nucleotide variants(SNV)などをタイピングし、患者と対照者で多型の頻度を比較し、2 型糖尿病発症関連遺伝子座位を同定する手法である。GWAS により 2021 年当初、200 以上の 2 型糖尿病発症関連遺伝子座位が同定されていたが、同定された遺伝子座位の情報を全て総合して説明できるのは 2 型糖尿病遺伝素因の一部にとどまると考えられていた。これは同定されたものが主に一般集団において高頻度の common variants で、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、2021 年以後になって新規に同定された 2 型糖尿病発症関連遺伝子座位に存在するのはやはり odds 比 1.1 程度の 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現在も変わっていない。

一方、50 歳以上で有病率が急増する 2 型糖尿病とは対照的な疾患群として、単一遺伝子異常による糖尿病が知られている。35 歳未満の若年で糖尿病と診断されるが、膵島自己抗体は陰性で、非肥満例が多く、ときに家系集積を伴うという特徴を持ち、家族性若年糖尿病(MODY)遺伝子として明らかになった 14 遺伝子が原因として知られる。ただ、同様の特徴が認められ単一遺伝子異常の関与が示唆されるにもかかわらず、既知の原因遺伝子で説明できない例が多く存在する。本邦における小児期発症糖尿病例を中心とした検討では、既知遺伝子で説明できない例は 60% 以上であり、成人発症例においては原因が未知である割合がさらに高いという報告が多い。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、単一遺伝子異常による糖尿病の新規発症原因遺伝子を同定し、糖尿病発症に寄与する新規分子機構を解明することである。

単一遺伝子異常による糖尿病の発症原因となる新規遺伝子変異を同定する試みは海外にて行われ、MODY 遺伝子を含め 35 遺伝子が同定されたが、海外・本邦いずれにおいても新規発症原因遺伝子の報告は近年乏しい。

また、最も若年診断の単一遺伝子異常による糖尿病である新生児糖尿病の原因が、血糖依存性インスリン分泌の鍵分子である ATP 感受性 K<sup>+</sup>チャネルを構成する遺伝子変異であったことからわかるように、単一遺伝子異常による糖尿病の原因となる新規遺伝子は、インスリンの分泌調節に関与する遺伝子や、膵細胞の発生に関与する遺伝子など、糖代謝に主要な役割を果たすものである可能性が高い。このため、単一遺伝子異常による糖尿病の新規発症原因遺伝子を同定することが、一般の 2 型糖尿病の病態解明にも直結する可能性が高い。

本研究は、単一遺伝子異常による糖尿病の患者に関する precision medicine の実現のみならず、一般の 2 型糖尿病発症に関与する新規分子機構解明にもつながるものである。

## 3. 研究の方法

### (1)解析対象

35 歳未満での若年診断糖尿病患者で、膵島関連自己抗体が陰性である者とその血縁者を解析対象とする。全血由来の DNA を用い、まず単一遺伝子異常による糖尿病の原因となる既知 11 遺伝子 (*HNF4A*, *GCK*, *HNF1A*, *PDX1*, *HNF1B*, *NEUROD1*, *INS*, *ABCC8*, *KCNJ11*, *WFS1*, *INSR* 遺伝子) につき Illumina iSeq 100 もしくは Miseq を用いターゲットシーケンスを行う。

### (2)全エクソンシーケンス

既知の糖尿病発症原因遺伝子にて説明できない例につき、Agilent SureSelect Human All Exon V7, Illumina Novaseq 6000 を用いて全エクソンシーケンスを行う。この際、[A]家系内にも糖尿病罹患者が多数存在する、[B]肥満歴がない、[C]特徴的な合併症・併存症を有する、といった顕著な臨床的特徴を有する例を優先的解析対象として進める。

### (3)発症原因変異候補の絞り込み

全エクソンシーケンスで得られた 1 人あたり約 20,000 の、タンパク質のアミノ酸配列変化を引き起こす non-synonymous variant から発症原因変異候補の絞り込みを以下 A)-C)の順に行う。

A) 若年発症糖尿病患者の発症原因は non-synonymous かつ rare variant であることが推定されるため、SNV データベース(1000 genomes, 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む。

B) *in silico* 解析:SNVの病原性につきデータベース(ClinVar)および機能予測ツール(PolyPhen-2, PROVEAN, CADD, SpliceAI)を用いて検討し、タンパク質機能に重大な影響を及ぼす可能性が低いものは除外する。

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家系内非罹患者に存在しないものを抽出する。家系に罹患者のいない孤発例の場合は、ホモ接合性変異や、タンパク質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などを考慮し優先度の高いものを抽出する。絞り込みが難しい場合、すでに存在する知見から膵発生や膵細胞機能との関連が示唆される遺伝子の変異は糖尿病発症に関与する可能性が高いため、次のステップ4)に進める。

(4)10,000人の一般人口コホートとの比較

絞り込まれた変異に関して、本学疾患ゲノム疫学講座との共同研究が承認されている10000名以上の健診受診者コホートにつき、頻度検討をDNAアレイ等(データは取得済み)で行う。本コホートにおける糖尿病有病率は約5%と他の調査に比して低く、ゲノムに加え、通常の就業者健診に比してはるかに詳細なデータを収集したものである。本コホートで全く検出されない変異や、受診者のうち糖尿病患者にのみ検出される変異を糖尿病発症原因候補とする。

#### 4. 研究成果

246例の若年診断糖尿病患者につき、既知糖尿病原因遺伝子のシーケンスを行った。結果、58例について、既知遺伝子に、糖尿病の原因となる病原性変異を見出したが、残り188例については病原性変異を見出すことはできなかった。そこで、188例のうち特に若年診断であった例(主に小児期診断例)や、特徴的な併存症を有していた例を中心とし、79例について全ゲノムシーケンス解析を行った。結果、1例については、*HNF4A* 遺伝子においてヘテロ接合の大欠失が明らかとなり、*HNF4A-MODY* と判断したほか、別の1例につき、単一遺伝子異常による糖尿病の原因遺伝子である *RFX6* 遺伝子の新規フレームシフト変異を見出した。この変異は、一般人口コホートデータベースおよび共同研究における10,000人の一般人口コホートにおいて検出されず、タンパクのアミノ酸配列変化をもたらすことから糖尿病発症原因である可能性が高いと判断した。若年診断糖尿病の発症に関与する遺伝的背景のひとつとして *RFX6* 遺伝子変異を同定したことで、若年診断糖尿病の成因の主たるものが膵機能や膵発生に関与する遺伝子の異常であることをより明確にすることができた。本研究の成果を受けて、若年診断糖尿病において *RFX6* をはじめとする膵発生に関与する遺伝子の解析が進めば、個々の遺伝子異常による糖尿病の臨床像が明確となり診療に役立つ。さらに、*RFX6* 分子等をターゲットとした創薬により、当該遺伝子に変異を持つ糖尿病および一般の糖尿病の治療につながる可能性が考えられる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hasebe Masashi, Yoshiji Satoshi, Keidai Yamato, Minamino Hiroto, Murakami Takaaki, Tanaka Daisuke, Fujita Yoshihito, Harada Norio, Hamasaki Akihiro, Inagaki Nobuya	4. 巻 22
2. 論文標題 Efficacy of antihyperglycemic therapies on cardiovascular and heart failure outcomes: an updated meta-analysis and meta-regression analysis of 35 randomized cardiovascular outcome trials	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cardiovascular Diabetology	6. 最初と最後の頁 62
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12933-023-01773-z	査読の有無 有
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 Yoshiji Satoshi, Tanaka Daisuke, Minamino Hiroto, Lu Tianyuan, Butler-Laporte Guillaume, Murakami Takaaki, Fujita Yoshihito, Richards J. Brent, Inagaki Nobuya	4. 巻 13
2. 論文標題 Causal associations between body fat accumulation and COVID-19 severity: A Mendelian randomization study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Endocrinology	6. 最初と最後の頁 899625
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fendo.2022.899625	査読の有無 有
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 該当する
1. 著者名 Yoshiji Satoshi, Minamino Hiroto, Tanaka Daisuke, Yamane Shunsuke, Harada Norio, Inagaki Nobuya	4. 巻 24
2. 論文標題 Effects of glucagon like peptide 1 receptor agonists on cardiovascular and renal outcomes: A meta analysis and meta regression analysis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Diabetes, Obesity and Metabolism	6. 最初と最後の頁 1029 ~ 1037
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/dom.14666	査読の有無 有
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 Bouchi Ryotaro, Kondo Tatsuya, Ohta Yasuharu, Goto Atsushi, Tanaka Daisuke, Satoh Hiroaki, Yabe Daisuke, Nishimura Rimei, Harada Norio, Kamiya Hideki, Suzuki Ryo, Yamauchi Toshimasa	4. 巻 14
2. 論文標題 A consensus statement from the Japan Diabetes Society (JDS): a proposed algorithm for pharmacotherapy in people with type 2 diabetes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Diabetology International	6. 最初と最後の頁 1 ~ 14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s13340-022-00605-x	査読の有無 有
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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------