

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 15 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591319

研究課題名(和文) エキソーム解析による MODY の原因遺伝子解明

研究課題名(英文) Search for novel MODY genes with exome sequencing

研究代表者

古田 浩人 (Furuta, Hiroto)

和歌山県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90238684

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000 円、(間接経費) 1,110,000 円

研究成果の概要(和文)：Maturity-onset diabetes of the young (MODY)は、糖尿病が常染色体優性遺伝形式で若年から発症している家系に与えられる臨床診断名である。MODYの原因遺伝子のいくつかはすでに明らかとなっているが、日本人MODYの主要な原因遺伝子はいまだ不明である。今回、8家系の原因遺伝子を同定するとともに、ヒトのゲノムからエキソン領域のみを濃縮しその配列を解析するエキソーム解析を利用して未知のMODY遺伝子の解明を試み、可能性の高い遺伝子を数個までに絞り込んだ。

研究成果の概要(英文)：Maturity-onset diabetes of the young (MODY) is a diabetes characterized by an autosomal-dominant mode of inheritance and an onset before the age of 25 years. Although thirteen MODY genes have been reported, a major susceptibility gene in Japanese MODY families has not been identified. In this study, we determined susceptibility genes in 8 Japanese MODY families (p.T228M, p.G246R, p.C371Y and p.G446D in glucokinase, p.E274K in HNF-1A, p.R276H and p.S461I in HNF-1B, p.P1198L in ABCC8) with Sanger sequencing. Furthermore, we carried out whole-exome sequencing which is the targeted sequencing of the human genome region that is protein coding to identify a new susceptibility gene for MODY. We obtained 50 X median coverage of the entire targeted exome and found several rare non-synonymous variants co-segregated with diabetes in a MODY family.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：糖尿病 遺伝因子 MODY

1. 研究開始当初の背景

欧米型の生活習慣が浸透するのにもない、我が国においても糖尿病、特に2型糖尿病が激増している。2型糖尿病はインスリン分泌不全に末梢組織におけるインスリン抵抗性が重なることで持続的な高血糖をきたす疾患で、その病因には過食や運動不足といった環境因子に加え遺伝因子が深く関係すると考えられている。近年、ゲノムワイドで多数(数十万個)の一塩基多型(single nucleotide polymorphism: SNP)をタイピングし患者・非糖尿病者間で頻度を比較、患者群においてより頻度の高いSNPを探索するゲノムワイド患者・対照相関解析研究(Genome wide association study: GWAS)が精力的に行われ、60個を超える遺伝子の多型が「一般的な」2型糖尿病の発症に関係することが明らかとなっている。しかしながら、個々の多型の糖尿病発症リスクに対するオッズ比は1.05から1.5程度とそれほど高くなく、当初の予想に反し、それらを用いても糖尿病の遺伝因子の全体像を説明するには程遠いことから、GWASで同定できないより頻度の低い遺伝子変異が糖尿病の発症に関係しているのではないかと考えられている。

「一般的な」2型糖尿病は発症への寄与の程度が低い遺伝因子が複数個関係している多遺伝子疾患であるが、日々の臨床において糖尿病が家系内の複数のメンバーに発症していることから強い遺伝因子の関与が考えられる家系にしばしば遭遇する。その中で、若年(おおむね25歳以下)発症の糖尿病が常染色体優性遺伝形式で遺伝している家系は、特に、maturity-onset diabetes of the young (MODY)と呼ばれている。MODYは、その遺伝形式から単一遺伝子の異常が原因と考えられること、また、発症が若年であることから、祖父母、場合によっては曾祖父母の代も生存しており家系解析にとって有利であるなど、原因遺伝子解析を行う上で様々

な利点を有している。当然、その原因遺伝子はひとつではなく、これまでに解糖系の律速酵素のひとつであるグルコキナーゼや転写因子である *hepatocyte nuclear factor (HNF)-4 α* , *HNF-1 α* , *HNF-1 β* , *insulin promoter factor (IPF)-1*, *neurogenic differentiation (NEUROD)-1* さらにはインスリンなどの遺伝子の異常がMODYの原因遺伝子であることが明らかとなっている。しかしながら、本邦においてはこれらの遺伝子のいずれかに異常を認める家系は30%程度に過ぎず日本人MODY家系の主要な原因遺伝子はいまだ不明である。

2. 研究の目的

近年、次世代シーケンサーの登場により個人の全ゲノム配列を解析することも現実味を帯びてきている。しかしながら、30億塩基対に及ぶヒトの全ゲノムをシーケンスするには巨額の費用と多大な労力を要する。一方、これまで同定されているMODYの遺伝子変異のほとんどが、エキソン領域に認められていることから、ゲノムの約1%しかないこれらの領域を選択的に濃縮し解析することができれば、費用・労力を大幅に節約できる。最近、ヒトのゲノムからエキソン領域のみ濃縮し次世代シーケンサーを用いてその配列を解析するエキソーム解析が、単一遺伝子病の原因遺伝子解析の新たな手法として用いられるようになってきている。本研究では、新しい手法であるエキソーム解析なども活用し、日本人MODYの原因遺伝子解明に取り組んだ。

3. 研究の方法

(1) 既報のMODY遺伝子解析

収集したMODY家系に関し、既報のMODY遺伝子であるグルコキナーゼ、*HNF-4 α* , *HNF-1 α* , *HNF-1 β* , *IPF-1*, *NEUROD 1*, インスリン遺伝子、および、新生児糖尿病の原因遺伝子である *KCNJ11*,

ABCC8 遺伝子の全エキソン領域を PCR-direct sequence 法を行い遺伝子変異の検索を行った。さらに、変異が同定されなかった MODY 家系に関しては、multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) 法を用い個々の遺伝子の欠失や重複などの構造異常の有無を検討した。

(2) エキソーム解析

まず、SuperSelect Human ALL Exon kit (Agilent Technologies 社)を用い ヒトゲノムからターゲットである全エキソン領域の濃縮を行った。具体的には、consensus coding sequence (CCDS) database に登録されている遺伝子のエキソン領域の 99%、約 700 個の miRNA、約 300 個の non-coding RNA をカバーするように合成された多数の 120mer のオリゴ DNA を鋳型に逆転写によりピオチン化された cRNA ベイトライブラリを作成、次世代シーケンサーでの解析に最適な長さに断片化されたゲノム DNA と RNA-DNA ハイブリダイゼーションを行い、ストレプトアビジンで標識された磁気ビーズでキャプチャすることで、ターゲット領域の濃縮を行った。次に、濃縮された DNA を次世代シーケンサーである HiSeq 2000 システム (Illumina 社)を用い paired end 法によりシーケンスを行い配列を決定後、NCBI のデータベース (dbSNP140 および 1000 ゲノムプロジェクト) や日本人の遺伝子変異データベース (The Human Genetic Variation Database) に登録がないか MAF < 0.2% の稀な変異であり、家系内で糖尿病と連鎖している変異を探索した。さらに、SIFT や PolyPhen-2 などの in silico での機能障害予測解析ソフトを用いて変異が機能に与える影響の検討を行った。

4. 研究成果

(1) 既報の MODY 遺伝子解析

グルコキナーゼ遺伝子に変異を有する MODY2 家系を 4 家系 (p. T228M、p. G246R、p. C371Y、p. G446D)、HNF-1 α 遺伝子に変異を有する MODY3 家系を 1 家系 (p. E274K)、HNF-1 β 遺伝子に変異を有する MODY5 家系を 2 家系 (p. R276H、p. S461I) を新たに同定した。グルコキナーゼ遺伝子の p. T228M 変異以外はこれまで報告のない変異であった。グルコキナーゼ遺伝子変異の 4 家系の発端者はいずれも学校検尿が診断の契機であり、これまでの報告と同様、食事療法のみで血糖コントロールは良好であった。HNF-1 α 遺伝子変異による MODY では経口血糖降下薬のひとつであるスルホニル尿素薬が有効であることが報告されているが、今回の症例においても、診断時より 1 型糖尿病を疑われインスリン治療が行われていたが、遺伝子解析の情報を基にスルホニル尿素薬への変更が行われインスリン治療から離脱した。また、HNF-1 β 遺伝子変異では高率に腎機能障害を伴うことが知られているが、今回の 2 症例も血液透析治療中であった。

さらに、ABCC8 遺伝子変異 (p. P1198L) により、発端者が新生児糖尿病、発端者の父親および父方祖父が比較的若年発症の糖尿病を発症している 1 家系を同定した。ABCC8 遺伝子変異による新生児糖尿病では、経口血糖降下薬であるスルホニル尿素薬が有効であることが報告されているが、同家系の発端者においてもスルホニル尿素薬が著効した。さらに、発端者の父親および父方祖父も同様にスルホニル尿素薬が有効であり、父方祖父は、長年に渡り「2 型糖尿病」の診断の下、スルホニル尿素薬を含む経口血糖降下薬で治療されていた。さらに、10 歳発症でスルホニル尿素薬にて長期間血糖コントロールが良好である 27 歳の女性においても ABCC8 遺伝子変異 (p. F1496L) を同定しており、比較的若年発症で「2 型糖尿病」と診断されている集団において ABCC8 遺伝子変異が原因の

ケースが少なからず存在しているものと考えられた。前述のごとく、*ABCC8* 遺伝子変異が原因の場合はスルホニル尿素薬が著効することから、正確な診断は治療法の選択を考える上できわめて重要であり、今後、さらに症例を蓄積し臨床的特長の解析を行いたいと考えている。

(2) エキソーム解析

まず、エキソーム解析の精度を検証するために、前述の *ABCC8* 遺伝子変異 (p.P1198L) を有する症例においてエキソーム解析を実施した。その結果、既知の遺伝子多型である *ABCC8* 遺伝子内の p.A1369S 変異や *KCNJ11* 遺伝子内の p.E23K 変異や p.V337I 変異とともに、新生児糖尿病の原因変異である p.P1198L 変異を検出することが可能であった。

次に、直接シーケンス法による遺伝子変異解析、MLPA 法による構造異常解析の両者を行うも既知 *MODY* 遺伝子に変異を認めない家系のうち 1 家系において、エキソーム解析を行った。得られたデータの averaged depth on target は約 50 回、 $>8X$ coverage は約 80% であり、約 45 万個の SNV/InDel が検出された。同定された SNV/InDelのうち、原因となる遺伝子変異である可能性が高い、ミスセンス変異、ノンセンス変異、スプライスサイト変異、挿入・欠失変異の総数は 9179 個であった。そのうち、データベースに登録がない、もしくは、MAF $<0.2\%$ の稀な変異である、家系内で糖尿病と連鎖している、SIFT や PolyPhen-2 解析で変異が機能に影響を与えると判定される、などの条件を満たす変異は 4 個 (4 遺伝子) であった。現在、最終的な原因遺伝子確定のために他の *MODY* 家系においてこれらの遺伝子の検証中である。

5 . 主な発表論文等

(雑誌論文)(計 5 件、査読あり)

Ma RC, Lee HM, Lam VK, Tam CH, Ho JS, Zhao HL, Guan J, Kong AP, Lau E, Zhang G, Luk A, Wang Y, Tsui SK, Chan TF, Hu C, Jia WP, Park KS, Lee HK, Furuta H, Nanjo K, Tai ES, Ng DP, Tang NL, Woo J, Leung PC, Xue H, Wong J, Leung PS, Lau TC, Tong PC, Xu G, Ng MC, So WY, Chan JC: Familial young-onset diabetes, pre-diabetes and cardiovascular disease are associated with genetic variants of *DACH1* in Chinese. *PLoS One* 9:e84770, 2014

Lam VK, Ma RC, Lee HM, Hu C, Park KS, Furuta H, Wang Y, Tam CH, Sim X, Ng DP, Liu J, Wong TY, Tai ES, Morris AP; DIAGRAM Consortium, Tang NL, Woo J, Leung PC, Kong AP, Ozaki R, Jia WP, Lee HK, Nanjo K, Xu G, Ng MC, So WY, Chan JC: Genetic associations of type 2 diabetes with islet amyloid polypeptide processing and degrading pathways in asian populations. *PLoS One* 8(6):e62378, 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

Shimajiri Y, Yamana A, Morita S, Furuta H, Furuta M, Sanke T: The *Kir6.2* E23K polymorphism is related to secondary failure of sulfonylureas in non-obese patients with type 2 diabetes. *J Diabetes Invest* 4(5):p445-449, 2013

Koottiwut S, Plengvidhya N, Chukijrungrat T, Sujjitjoo J, Semprasert N, Furuta H, Yenchitsomanus PT: Defective

PAX4 R192H transcriptional repressor activities associated with maturity onset diabetes of the young and early onset-age of type 2 diabete. J Diabetes Complications, 26: 343-347, 2012

〔学会発表〕(計 4 件)

古田浩人、浦木進丞、高木伴幸、土井麻子、宮脇正和、島友子、西理宏、吉川徳茂、赤水尚史：ABCC8 遺伝子変異による糖尿病の臨床的特長。第 57 回日本糖尿病学会年次学術集会 2014 年 5 月 24 日 大阪市

浦木進丞、古田浩人、飯島文憲、宮脇正和、土井麻子、有安宏之、川嶋弘道、若崎久生、西理宏、吉川徳茂、赤水尚史：遺伝子診断が治療法の決定に有用であった若年発症糖尿病の 1 例。第 50 回日本糖尿病学会近畿地方会 2013 年 11 月 23 日 京都市

浦木進丞、高木伴幸、古田浩人、島友子、川嶋弘道、宮脇正和、長嶋一昭、土井麻子、島田健、若崎久生、西理宏、中尾大成、佐々木秀行、稲垣暢也、南條輝志男、赤水尚史：遺伝子診断後にインスリンから SU 薬に治療を変更しえた ABCC8 遺伝子変異による新生児糖尿病の 2 例。第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会 2013 年 5 月 18 日 熊本市

Furuta H, Takagi T, 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.

Cell Workshop 2013 April 23-26, 2013 Kyoto, Japan

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

古田 浩人 (FURUTA, Hiroto)
和歌山県立医科大学・医学部・准教授
研究者番号：90238684

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし