

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659439

研究課題名(和文) CNV関連糖尿病の疾患概念の構築

研究課題名(英文) New Conceptual Framework for Copy Number Variation-associated Diabetes

研究代表者

片桐 秀樹 (KATAGIRI, Hideki)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：00344664

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：2型糖尿病の発症には遺伝的因子が大きく関わる。我々はゲノムコピー数多型(CNV)に注目して検討を進め、第4染色体サブテロメア領域に、若年発症2型糖尿病に高頻度高奇与度のCNVを発見した。本研究では、全ゲノムにおけるCNV解析を進め、さらに2か所の若年発症2型糖尿病と関連するCNVを示す領域を同定(16q24、22q13)し、これら計3か所のCNVが同じ患者に集積しやすいことを証明した(PLoS One 2014)。また、CNVを簡便に解析する手法の開発に着手し、家族内解析が可能となった。以上、本萌芽研究により、「CNV関連糖尿病」とも呼ぶべき糖尿病の疾患概念を構築に向けた研究が発展した。

研究成果の概要(英文)：Genetic factors play very important roles in the onset and progression of type 2 diabetes mellitus (T2DM). We previously found that copy number losses in the subtelomeric region on chromosome 4p16.3 were detected in early-onset Japanese T2DM patients at a high frequency. Herein, we additionally found two novel copy number losses within the subtelomeric regions on chromosomes 16q24 and 22q13, which have significant associations with early-onset Japanese T2DM. Furthermore, copy number variation (CNV) analysis of the whole genome verified simultaneous copy number losses in all three subtelomeric regions in 11 of our 100 T2DM subjects, while none of 100 non-diabetic controls showed the copy number losses in all three regions. Thus, CNV within multiple subtelomeric regions are strongly associated with early-onset T2DM and examination of simultaneous CNVs in these three regions may lead to the development of an accurate and selective procedure for detecting genetic susceptibility to T2DM.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：代謝学

キーワード：2型糖尿病 ゲノム 疾患関連遺伝子

1. 研究開始当初の背景

糖尿病患者の大多数を占める2型糖尿病は食事、肥満、加齢など環境因子に加え、その発症には遺伝因子も大きく関与することが広く認められている。これまでに遺伝因子を解明するために数々の研究が行われ、近年では特に一塩基多型 (single nucleotide polymorphism: SNP) に対する全ゲノム関連解析 (genome-wide association study: GWAS) により多数の2型糖尿病関連遺伝子が報告されてきた。しかし、それら各遺伝子変異の疾患への寄与度は、オッズ比で高々1.1-1.4程度と決して高くはなく (Nat Genet 38, 320-323, 2006; Nat Genet 40, 1092-1097, 2008)、2型糖尿病発症に関する遺伝的素因は、弱い寄与度の多数の遺伝子多型の集積によるものと考えられている。一方、自閉症 (Science 316:445-9, 2007) などの疾患で、コピー数多型 (copy number variation: CNV) と疾患との強い関連が相次いで示されたが、これまでに2型糖尿病に関する有意な報告はなかった。我々はCNV解析に特化した手法を用いることにより、これまでに十分にCNV解析が行われていなかった第4番染色体短腕のサブテロメア領域に日本人2型糖尿病患者で高頻度・高寄与度のコピー数減少の存在を世界に先駆けて発見することができた (Exp Diabetes Res. 2011;2011:498460)。

具体的には、35歳未満発症の日本人2型糖尿病患者100例と日本人健常対照者100例に対して、全ゲノムCNVを対象としたスクリーニングDNAアレイ解析を行った結果、2型糖尿病群の100例中13例に第4番染色体4p16.3領域におけるコピー数の減少を認めただけに対し、健常対照者で同領域のコピー数の減少を認めたのは100例中1例のみであった ($P=0.00128$, 95%信頼区間 3.02-72.3) (図)。これは、オッズ比14.7と、これまでの糖尿病関連遺伝子に比べ、桁違いに寄与度が高いものであり、2型糖尿病の遺伝的要因として、CNVによるゲノム構造異常について、さらなる検討を行う必要があると考えた。

2. 研究の目的

上記のように我々は世界に先駆けて、サブテロメア領域である4p16.3領域のCNVが2型糖尿病と強く関連することを見出した。そこで本研究では、この「CNV関連糖尿病」とも呼ぶべき糖尿病の疾患概念を構築することを目的とする。

具体的には、(1)全ゲノムにおけるCNVのスクリーニングを行い、4p16.3領域以外の部位でのCNVが2型糖尿病と関連することはないかを検討し、糖尿病を起こしうるCNVを網羅的に解析する。(2)これまでに行った高密度カスタムオリゴヌクレオチドマイクロアレイでの個々のプローブにおける解析データに基づき、4p16.3領域のコピー数簡易判定法を開発する。これにより、さらに大きな2型糖尿病の母集団におけるスクリーニングが

可能となる。(3)糖尿病患者において、糖尿病発症年齢、病態(インスリン分泌能やインスリン感受性)、これまで行われてきた治療法とその効果、合併症の進行状態、糖尿病以外の疾患の併存有無などの臨床像を詳しく解析する。

これらの検討により、2型糖尿病に属している新規の一亜型に対し、遺伝子診断法やそれに基づくテーラーメイド医療の確立につながるものと期待される。

3. 研究の方法

(1)全ゲノムにおけるCNVのスクリーニング
100例の日本人若年発症2型糖尿病患者(35歳未満発症)と100例の日本人健常対照者(60歳以上、HbA1c 6.4%未満)を対象に、全ゲノムにおけるCNVスクリーニングを行い、4p16.3領域以外の部位でのCNVが2型糖尿病と関連することはないかを検討し、糖尿病を起こしうるCNVを網羅的に解析する。

若年発症2型糖尿病患者100例は環境因子による2型糖尿病発症の可能性を可能な限り除く目的で、高度肥満歴のある患者を除外し、既往最大BMI (body mass index) 値 35 kg/m^2 未満の患者を採択した。家系内で明らかな優性遺伝を示しMODYが疑われる患者は含まれていない。健常対照者は、過去に糖尿病の診断を受けたことのない、60歳以上、かつ、第3度近親に聴取しうる限り糖尿病の家族歴がないHbA1c 6.0%未満の正常耐糖能者を採択した。

全ゲノム領域に対して deCODE-Illumina CNV370K beadchip を用いて CNV スクリーニング解析を行った。このビーズチップアレイには全ゲノムの CNV に富む領域に対するプローブが特徴的に設定されており、これまでの SNP マーカーに加えて、メガサテライト(500b 以上の縦列反復配列) や duplicon (1kb 以上にわたり非常に相同性の高い分節重複) とそれに隣接する領域、unSNPable 領域 (HapMap 研究による SNP 地図で 15kb 以上の空白、または 2 箇所の SNP が Hardy-Weinberg 平衡になく、5-15kb の間隔が存在する領域) といった領域に対するプローブや、Database of Genomic Variants に収載されている CNV に対するプローブが含まれている。

CNV の判定は DosageMiner ソフトウェアを用いた。DosageMiner では隠れマルコフモデルのアルゴリズムによりプローブの蛍光シグナル強度の標準化、混合正規分布を用いたクラスターの判定などを経て視覚的に CNV 欠失、増幅の判定を行っている。さらに CNV 判定を正確にするため、同じく隠れマルコフモデルのアルゴリズムを用いたプログラム PennCNV での解析を行い、これらの結果を複合して CNV の判定とした。

スクリーニング CNV 解析にて 16q24.2~3、22q13.31~33 の領域で CNV が検出された若年発症 2 型糖尿病患者の DNA サンプルを用いて高密度カスタムオリゴヌクレオチドマイク

ロアレイによる解析を行った。解析方法は array comparative genomic hybridization (aCGH) 法を基礎とする。22q13.31~33 のサブテロメア領域中の 4.8Mb の範囲(Chr22.44,750,000-49,550,000【NCBI Build 36.1, hg18】), 16q24.2~3 のサブテロメア領域中の 1.75Mb の範囲(Chr16.86,950,000-88,700,000【NCBI Build 36.1, hg18】)を対象としたカスタムマイクロアレイを作成した。アレイは 50-60mer サイズのオリゴヌクレオチドプローブから構成され、これらの領域に対するプローブは約 10000-20000 個ずつ配置した。

(2)4p16.3 領域のコピー数簡易判定法の開発
これまでに行った 4p16.3 領域における高密度カスタムオリゴヌクレオチドマイクロアレイでの個々のプローブにおける解析データに基づき、定量 PCR (taqman PCR) や Mass Array による定量法を行い、コピー数簡易判定法を開発に向けた検討を行う。

(3)コピー数多型糖尿病患者の臨床的特徴の検討

(1)の検討において、今回新たに若年 2 型糖尿病患者において関連が見出された 16q24.2~3 領域と 22q13.31~33 領域および以前に報告した 4p16.3 領域の計 3 箇所のコピー数多型を認めた糖尿病患者において、それを認めなかった糖尿病患者と比較して、糖尿病発症年齢、病態(インスリン分泌能やインスリン感受性)、これまで行われてきた治療法とその効果、合併症の進行状態、糖尿病以外の疾患の併存有無などの臨床像を詳しく解析する。

なお、本研究の実施要項については東北大学大学院医学系研究科倫理委員会の承認を得たうえで施行した(受付番号 2010-68 研究課題名: CNV 解析による 2 型糖尿病発症関連遺伝子の解析研究)。また、全ての参加者に対して、書面でのインフォームドコンセントを得たうえで採血、遺伝子解析を行った。

4. 研究成果

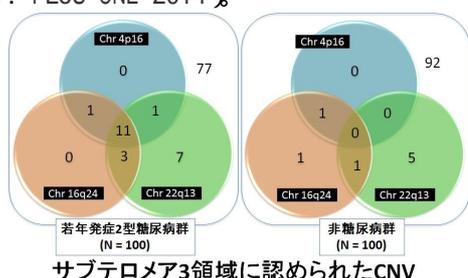
(1)全ゲノムにおける CNV のスクリーニング
若年発症 2 型糖尿病患者 100 例と健常対照者 100 例に対し、deCODE-Illumina CNV370K beadchip を使用し、全ゲノム CNV に対するスクリーニング解析を行った。全ゲノム上に配置されたプローブのアレイデータの DosageMiner, PennCNV プログラムでの解析から、一個人あたりでは若年発症 2 型糖尿病群では平均 61 箇所、健常対照群では平均 39 箇所の CNV 領域の判定が得られた。このうち、特に若年発症 2 型糖尿病群においては、健常対照者と比較して、既に報告した 4p16 領域に加えて、22q13 領域と 16q24 領域に有意に高頻度のコピー数欠失が認められた。

まず、16q24.2~3 領域のサブテロメア領域中に関しては、スクリーニング解析を行った若年発症 2 型糖尿病患者 100 例のうち 15 例、

健常者では 100 例中 3 例にコピー数欠失を分節的に認めた($P=0.00519$, Fisher's exact test, オッズ比=5.7, 95%信頼区間 1.6-20.4)。また 22q13.31~33 領域では、若年発症 2 型糖尿病患者 100 例のうち 22 例のコピー数欠失を認め、健常者では 100 例中 6 例であった($P=0.00181$, Fisher's exact test, オッズ比=4.4, 95%信頼区間 1.7-11.4)。

次に、CNV beadchip によるコピー数欠失の有無の検証のため、16q24 サブテロメア領域上の 1.75Mb の範囲と 22q13 サブテロメア領域上の gap 領域を挟む 4.8Mb の範囲に対し、高密度カスタムオリゴヌクレオチドマイクロアレイを用いて CNV 解析を行い、CNV beadchip によるコピー数欠失を認めた患者においては検討したすべての患者で高密度カスタムオリゴヌクレオチドマイクロアレイ法においても、コピー数の減少を確認した。これらの検討を進めるうち、非常に興味深いことに、同一の若年発症糖尿病の患者が複数のサブテロメア領域のコピー数欠失を有している傾向を見出した。そこで、既に報告した 4p16.3 領域と、今回新たに若年 2 型糖尿病患者において関連が見出された 16q24.2~3 領域と 22q13.31~33 領域におけるコピー数欠失に関し、deCODE-Illumina CNV370K beadchip を使用したスクリーニング解析に基づいて、各人ごとにどのコピー数欠失を有しているかについて検討を行った。その結果、非常に興味深いことに、この 3 領域におけるコピー数欠失は、複数の同じ若年 2 型糖尿病患者に集中して認められていることが明らかとなった。まず、若年 2 型糖尿病患者群の 100 人中 77 人はこの 3 領域のコピー数欠失はいずれも認めなかった(図)。一方で、いずれかにコピー数欠失を認めた 23 人中 16 人は複数の領域でのコピー数欠失を保有していた。特に、4p16.3 領域および 16q24.2~3 領域にコピー数欠失を保有している若年 2 型糖尿病患者(それぞれ 14 人、15 人)にはすべて、他領域にもコピー数欠失が認められた。さらに、これらの 3 領域すべてにコピー数欠失を認める若年 2 型糖尿病患者は全患者 100 人中 11 人(11%)にも及んだ(図)。一方で、健常対照群においてはこれら 3 領域にいずれかにコピー数欠失を認めた者は全部で 8 人とどまり、うち 6 人は 1 領域のみのコピー数欠失、残り 2 人も 2 領域でのコピー数欠失であり、今回検討した 3 領域すべてにコピー数欠失を認めた健常対照者は全く認められなかった(図)。これは、若年 2 型糖尿病患者で 11 人に認められた結果と好対照をなすものであり、この 3 か所の CNV 検索は、2 型糖尿病発症を予測する上で非常に高い特異度を有し、かつ陽性者の頻度も比較的高い有用な検査手法となる可能性が考えられる(11/100 VS 0/100: $P=0.0007$ by Fisher's exact test)。さらに、これらの結果は、コピー数多型が発生する機序や修復する機序と、それにかかわる遺伝子など、CNV につな

がる上流の機能異常が2型糖尿病発症の遺伝的要因となる可能性を想起させる(Kodama et al. PLoS ONE 2014)。



サブテロメア3領域に認められたCNV

(2)4p16.3領域のコピー数簡易判定法の開発
4p16.3領域における高密度カスタムオリゴヌクレオチドマイクロアレイでの個々のプローブにおける解析データに基づき、まず、定量PCR (taqman PCR)を行うため、この領域の6MbpにおけるPCRプライマーの設定を行い、さまざまな部位での定量PCRを行った。しかし、検討した部位では、有意な差を認めることができなかった。

そこで、次に、PCRプライマーを設定し、その産物をMass Arrayによる定量を試みた。その結果、一種類のPCR産物で、コピー数が1となる患者を見出すことができた。今後は、他の部位の検討を進めるとともに、対象患者を増やして、この部位でのコピー数と糖尿病との関連について検討を進めるとともに、この部位のコピー数減少を見出した患者の家系内解析を進めることを予定している。

(3)コピー数多型糖尿病患者の臨床的特徴の検討

4p16領域、22q13領域と16q24領域の3箇所に同時にコピー数減少を認めた糖尿病患者11人と、いずれもコピー数減少認めなかった糖尿病患者77人と比較して、臨床像の特徴を検討した。

性別、発症年齢、家族歴の有無、肥満度(既往最大BMI)、血糖コントロール状況(HbA1c、随時血糖値)、内因性インスリン分泌指標(1日蓄尿の尿中CPR)とインスリン治療者の頻度をそれぞれ比較したところ、予想通り、3領域すべてにコピー数欠失を認めた11人にはすべて家族歴が認められ、その強い浸透性が示唆されたが、今回解析した35歳未満発症の糖尿病患者は、総じて家族歴を有する者が多く、有意差を認めるほどではなかった。さらに、上記その他のすべての項目において有意差はなく、インスリン分泌不全やインスリン抵抗性といった基本病態も含め、CNV糖尿病は、他の2型糖尿病と比し、特異な病態を示すものではないことが明らかとなった。さらに患者数を増やしての検討が必要ではあるが、このことは、一般の2型糖尿病患者の中にもコピー数多型を持つ糖尿病患者が多く認められる可能性を示唆するものと考えられる(Kodama et al. PLoS ONE 2014)。

以上、本萌芽研究により、「CNV関連糖尿病」

とも呼ぶべき糖尿病の疾患概念を構築に向けた研究が発展した。特に、新たな2か所の糖尿病関連CNVの発見と複数の別の染色体上でのCNVが同じ患者に集積しやすいことを見出したことは、本疾患の本態、および、その発症機序の解明にむけての大きな進歩となると考えられる。

今後は、本研究で開発しつつある新たな手法を用いて、糖尿病患者やその家族内解析をさらに進め、簡便に多くの患者でのCNVの検索を進め、遺伝形式、病態の特徴、一般2型糖尿病における寄与度を含め、その病態の全貌解明につなげたい。

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 1 件)

Kodama S, Yamada T, Imai J, Sawada S, Takahashi K, Tsukita S, Kaneko K, Uno K, Ishigaki Y, Oka Y, Katagiri H. Simultaneous copy number losses within multiple subtelomeric regions in early-onset type2 diabetes mellitus. PLoS ONE 査読有 9(4): e88602. doi:10.1371/journal.pone.0088602

〔学会発表〕(計 1 件)

児玉慎二郎、山田哲也、江見充、工藤宏仁、石井美穂、佐藤秀則、澤田正二郎、今井淳太、石垣泰、岡芳知、片桐秀樹、全ゲノムCNV解析による若年発症2型糖尿病患者における複数領域の高頻度ゲノム欠失、第56回日本糖尿病学会年次学術集会、2013年5月16-18日、熊本

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

片桐 秀樹 (KATAGIRI HIDEKI)

東北大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：00344664

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：