

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 16 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670447

研究課題名(和文) 糖尿病患者遺伝子解析に基づくゲノムコピー数維持機構の解明

研究課題名(英文) Mechanism of determining genomic copy number according to analyses of early-onset diabetic patients

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) 2,800,000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、既に報告した第4染色体に加え、さらに2個所のサブテロメア領域において、糖尿病と高頻度・高寄与度で相関する新たなコピー数欠失を見出し、これらの3つのサブテロメア領域におけるCNVは同一患者に集積することを示した。さらに、4p16.3領域におけるマスアレイ解析により、少なくとも一部の患者にはゲノム変化が生じていることを証明した。4p16.3の領域のゲノムシーケンスにより、一部の患者に広範囲のゲノム変化を示唆する所見を得ており、詳細な解析により、2型糖尿病発症メカニズムと関連するゲノム変化を検出できることが期待される。

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 reported that copy number losses in the subtelomeric region on chromosome 4p16.3 were detected in early-onset Japanese T2DM patients at a high frequency. In this study, we found two novel copy number losses within the subtelomeric regions, which have significant associations with early-onset Japanese T2DM. In addition, using the MassArray system, we detected a "one-copy" region in four diabetic patients within the chromosome 4p16.3 region, indicating some genomic alterations in these affected subjects. Furthermore, the 4p16.3 region and whole exomes of 11 diabetic patients was sequenced by the next generation sequencer. Although the big sequencing data are now analyzing, we obtained novel findings which suggest genomic alterations in one allele of several affected subjects.

研究分野：内科学

キーワード：糖尿病 ゲノム コピー数多型 遺伝子診断

## 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わ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い。一方、自閉症などの疾患で、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、我々が報告する(下記)まで、2型糖尿病に関する有意な報告はなかった。また、CNV自体がどのような機序で生じ、さらに、それを修復するシステムが存在するのかなどは不明である。

我々はCNV解析に特化した手法を用い、35歳未満発症の日本人2型糖尿病患者100例と健康対照者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、第4番染色体短腕のサブテロメア領域(4p16.3)に2型糖尿病群の100例中13例にコピー数の減少を認めたとに対し、非糖尿病対照者で同領域のコピー数の減少を認めたとしたのは100例中1例のみであった( $P=0.00128$ ) (Exp Diabetes Res. 2011;2011:498460)。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かった。これらから、CNVとして検出されるこれらのゲノム変化が2型糖尿病と深く関連することが明らかとなった。

## 2. 研究の目的

我々が見出した糖尿病関連コピー数多型の概念構築に向け、さらなる検討を行う。1) 第4染色体サブテロメア領域以外に、2型糖尿病の発症と関連するゲノム変化はないか 2) これらのゲノム変化の実態は何か を解明することが目的である。これらの解明は、ゲノムコピー数を規定するメカニズムを解明し、糖尿病の発症機序の解明や簡易な遺伝子診断を開発することにもつながるものと期待される。

## 3. 研究の方法

まず、本研究は35歳未満発症2型糖尿病患者、および、正常対照者から得られた白血球ゲノムを用いて行われた。臨床所見や臍自己抗体の検査により1型糖尿病を除外し、膵・肝・他の内分泌疾患保有者を除外した。さらに、BMI35以上の肥満歴を有する者も本件等からは除外した。その結果、2型糖尿病患者には100人中94人に糖尿病家族歴が認められた。また正常対照者としては、60歳以上で

HbA1c 6.0%未満、糖尿病の診断歴がなく、明らかな糖尿病家族例を有しないものが選択された。

### (1) 他領域での「CNV」の検出

deCODE-Illumina CNV370K BeadChip systemによる全ゲノムスクリーニングを行い、CNVが見出された部位に対し、高密度カスタムメイドオリゴヌクレオチドタイリングアレイによる検証解析を進めた。

### (2) 4p16.3領域におけるマスアレイ解析

対照DNAサンプルに1塩基だけ異なった濃度既知の合成オリゴヌクレオチドを加え競合PCRを行い、MALDI-TOF MS for Quality and Throughput (MassARRAY) システムにて、定量解析を行うことにより、そのコピー数を絶対定量した。

### (3) 次世代シーケンサーによるゲノムシーケンス

#### (3-1) 4p16.3領域の配列の特定

タイリングアレイの解析で1)の解析も含め3つのサブテロメア領域においてコピー数減少の集積を認めたと11名について、4p16の部分のプローブをカスタム設計し、sureselectの反応を行いMiseqで解析することで4p16.3領域のシーケンスを行った。

#### (3-2) 全エキソームの配列の特定

家系解析可能な6名について、SureSelectXT v5反応を行い、HiSeq2500 101bpペアエンドでシーケンスしBwaまたはnovoalignでマッピングを行いGATKでバリエーションコールを施行した。

なお、本研究は、東北大学倫理委員会にて承認(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」)を受けて行われた。承認内容

2型糖尿病患者、及びその第一度近親者から第三度近親者までを研究対象とする。対象とする疾患：糖尿病、解析する遺伝子・遺伝子群：糖尿病の発症、糖尿病合併症の発症・進展に関する遺伝子群、解析する試料：血液、末梢静脈からの採血にて採取、および2005年倫理委員会申請承認の研究題目：糖尿病に関する遺伝子解析研究における同意書にて他の糖尿病遺伝子解析研究に使用されることに同意を得られた検体を併せて使用する。検体採取に際して、インフォームドコンセントを得る。

糖尿病領域におけるCNVに関してはまだ未知の領域であり、現時点で生命保険加入等での不利益を被ることは生じていないが、十分な配慮が必要である。また、採血には細心の注意を払い実施する。対象者に健康被害が生じた場合の補償がない旨を説明する。

遺伝子解析結果の正当性を期するため、再検に備える目的で実施期間中、検体を機関内で保存する。検体等を廃棄する際は、匿名のまま、密封容器に廃棄する。

#### 4. 研究成果

##### (1) 他領域での「CNV」の検出

deCODE-Illumina CNV370K BeadChip system による全ゲノムスクリーニングにより、を行い、CNVが見出された部位に対し、高密度カスタムメイドオリゴヌクレオチドタイリングアレイによる検証解析を進めたところ、他の染色体のサブテロメア領域 16q24.2~3 ( $P=0.00591$ , オッズ比 5.7) と 22q13.31~33 ( $P=0.00181$ , オッズ比 4.4) においても、糖尿病と高頻度・高寄与度で相関する新たなコピー数欠失を見出した。さらに興味深いことに、糖尿病群 100 人中 11 人にこれら 3 領域すべてに CNV が認められ、これらのサブテロメア領域におけるコピー数減少は、同一患者に集積することを見出した (Kodama et al. PLoS One 2014)。そこで、ゲノム変化の集積が見いだされた 11 名について、以下の検討を進めた。

##### (2) 4p16.3 領域におけるマスアレイ解析

これまでのタイリングアレイによる CNV 解析は、設定されたプローブの結合率を調べたものであり、実際にこの部位のゲノムがすべて抜け落ちているいわゆるコピー数減少という状況を検出しているかどうかは判定できず、むしろ、結合率が低下しているなんらかの状況がゲノムに生じている可能性が想起される。そこで、競合 PCR 産物についての MassARRAY 解析を行った。高密度カスタムメイドオリゴヌクレオチドタイリングアレイでの解析データに基づき、種々のプライマーを設定し、マスアレイを行ったところ、そのうち一つの primer pair における PCR にて、コピー数減少を示した 11 名中 4 名で、実際にコピー数が 1 であるとして減少が検出できた。このことから、タイリングアレイでのシグナル低下として検出された現象が別の手法でもゲノム変化として確認されたこととなり、簡便な診断法の開発に大きく発展するとともに、本ゲノム構造異常の実態解明に前進した。しかし一方で、タイリングアレイ解析でコピー数減少が見出されたすべての患者が検出できたわけではなく、アレイによるプローブの結合不良が示すゲノム構造変化について、第 4 染色体のサブテロメア領域に生じている現象は多様性を有していることが明らかとなった。

##### (3) 次世代シーケンサーによるゲノムシーケンス

###### (3-1) 4p16.3 領域の配列の特定

4p16 の部分のプローブをカスタム設計し、4p16.3 領域のシーケンスを行った。ゲノム配列の結果はビッグデータであり、さらなる

詳細な情報学的解析が必要であるが、これまでのところ、正常対照者は比較的均一な配列が認められた一方で、2 型糖尿病患者すべてに共通する変化は認められなかったが、一部の患者に広範囲のゲノム変化を示唆する所見を得ている。

###### (3-2) 全エキソームの配列の特定

家系として DNA を取得した 6 名について、全エキソーム解析を施行したが、遺伝学的に血縁は認められず、家系解析としては活用できなかった。発端者については、詳細に全エキソームのビッグデータを情報学的に解析中であり、特徴的な変異が認められるかどうかの検討を進めている。

##### 結論および考察

異なった染色体上のサブテロメア領域 3 カ所に集積するゲノム変化と遺伝的背景の強い 2 型糖尿病患者とは強い関連が認められた。実際に、タイリングアレイの情報に基づいて作成された primer を用いた PCR により、一方の allele が増幅されず、マスアレイにてコピー数が 1 として定量されることを観察し、ゲノム上に実際に変化が生じていることが明らかとなった。サブテロメア領域は繰り返し配列などが多く遺伝子変異が起りやすいことが知られていることから、その修復機構が不十分なことなどが原因でこれらの領域に変異が蓄積し、アレイプローブの結合不良を招いている可能性を想起したが、同部のシーケンスでは、共通の変異は今のところ認められず、マスアレイの結果からも、この部の変化は非常に多様であることが推察された。これらのことは、従来の解析技法では説明のつかないゲノム異常の存在を示唆していると考えられ、これまでの報告とは桁違いの寄与度・特異度・頻度の異常を我々が見出していることのまさにその理由とも考えられ、大変興味深いものである。引き続きビッグデータ解析を行う一方、シーケンスサンプルの調整段階の詳細な分析などを進めることで、これらの結果が意味する真のゲノム構造異常の実態解明につなげていきたいと考えている。

#### 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 11 件)

Chiba Y, Yamada T, Tsukita S, Takahashi K, Munakata Y, Shirai Y, Kodama S, Asai Y, Sugisawa T, Uno K, Sawada S, Imai J, Nakamura K, Katagiri H. Dapagliflozin, a sodium-glucose co-transporter 2 inhibitor, acutely reduces energy expenditure in BAT via neural signals in mice. PLoS One. 査読有. 11 巻. 2016. e0150756.

DOI: 10.1371/journal.pone.0150756

Sakayori N, Kikkawa T, Tokuda H, Kiryu E, Yoshizaki K, Kawashima H, Yamada T, Arai H, Kang JX, Katagiri H, Shibata H, Innis SM, Arita M, Osumi N. Maternal dietary imbalance between omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids impairs neocortical development via epoxy metabolites. *Stem Cells*. 査読有. 34 巻. 2016. 470-482.  
DOI: 10.1002/stem.2246

Okubo H, Kushiya A, Sakoda H, Nakatsu Y, Iizuka M, Taki N, Fujishiro M, Fukushima T, Kamata H, Nagamachi A, Inaba T, Nishimura F, Katagiri H, Asahara T, Yoshida Y, Chonan O, Encinas J, Asano T. Involvement of resistin-like molecule in the development of methionine-choline deficient diet-induced non-alcoholic steatohepatitis in mice. *Sci Rep*. 査読有. 28 巻. 2016. 20157.  
DOI: 10.1038/srep20157

Tanaka M, Imai J, Satoh M, Hashimoto T, Izumi T, Sawada S, Uno K, Hasegawa Y, Kaneko K, Yamada T, Ishigaki Y, Imai Y, Katagiri H. Impacts of the Great East Japan earthquake on diabetic patients. *Journal of Diabetes Investigation*. 査読有. 6 巻. 2015. 577-586.  
DOI: 10.1111/jdi.12336

Uno K, Yamada T, Ishigaki Y, Imai J, Hasegawa Y, Sawada S, Kaneko K, Ono H, Asano T, Oka Y & Katagiri H. A hepatic amino acid/mTOR/S6K-dependent signalling pathway modulates systemic lipid metabolism via neuronal signals. *Nature Communications*. 査読有. 6 巻. 2015. 1-15.  
DOI: 10.1038/ncomms8940

Nakatsu Y, Iwashita M, Sakoda H, Ono H, Nagata K, Matsunaga Y, Fukushima T, Fujishiro M, Kushiya A, Kamata H, Takahashi S, Katagiri H, Honda H, Kiyonari H, Uchida T and Asano T. Prolyl Isomerase Pin1 Negatively Regulates AMPK by Associating with the CBS Domain in the -subunit. *J Biol Chem*. 査読有. 290 巻. 2015. 24255-66.  
DOI: 10.1074/jbc.M115.658559

Motomura Y, Kanno S, Asano K, Tanaka M, Hasegawa Y, Katagiri H, Saito T, Hara H, Nishio H, Hara T, Yamasaki S. Identification of pathogenic cardiac CD11c+ macrophages in Nod1-mediated acute coronary arteritis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 査読有. 35 巻. 2015. 1423-33.

DOI: 10.1161/ATVBAHA.114.304846

Noda K, Nakajima S, Godo S, Saito H, Ikeda S, Shimizu T, Enkhjargal B, Fukumoto Y, Tsukita S, Yamada T, Katagiri H, Shimokawa H. Rho-Kinase Inhibition Ameliorates Metabolic Disorders through Activation of AMPK Pathway in Mice. *PLoS One*. 査読有. 9 巻. 2014. e110446.  
DOI:10.1371/journal.pone.0110446.  
eCollection 2014

Tanaka M, Imai J, Satoh M, Hashimoto T, Izumi T, Sawada S, Uno K, Hasegawa Y, Kaneko K, Yamada T, Ishigaki Y, Imai Y, Katagiri H. Glycemic control in diabetic patients with impaired endogenous insulin secretory capacity is vulnerable after a natural disaster: study of Great East Japan Earthquake. *Diabetes Care*. 査読有. 37 巻. 2014. e212-e213.  
DOI: 10.2337/dc14-1479

Imai J, Yamada T, Satoh J, Katagiri H. Type B insulin resistance syndrome as an H. Pylori-associated autoimmune disease. *Journal of Endocrinology, Diabetes & Obesity*. 査読有. 2 巻. 2014. 1026.  
<http://www.jscimedcentral.com/Endocrinology/endocrinology-2-1026.pdf>

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 type 2 diabetes mellitus. *PLoS One*. 査読有. 9 巻. 2014. e88602.  
DOI:10.1371/journal.pone.0088602.  
eCollection 2014

[学会発表](計 7 件)

宇野健司, 片桐秀樹. Neuronal network from the liver regulates systemic lipid metabolism. The 93th Annual Meeting of the physiological Society of Japan. 2016年3月22-24日. 札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

山田哲也, 片桐秀樹. Inter-organ neural network mediate the regulation of systemic energy metabolism. The 36th Annual Meeting of Japan Society for the Study of Obesity, The 46th NIPS International Symposium (Homeostatic mechanisms among interacting organ systems - Key to understanding obesity). 2015年10月2-3日. 名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)

宇野健司, 片桐秀樹. Neuronal signals

from the hepatic amino acid/mTOR/S6K pathway regulates systemic lipid metabolism. 75th Scientific Sessions, American Diabetes Association. 2015年6月5-9日. Boston (USA)

片桐秀樹. Neuronal Information Highways for Metabolic Regulation at the Whole Body Level. 第37回日本分子生物学会年会. 2014年11月25日. パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

Suzuki T, Gao J, Kondo K, Ishigaki Y, Imai J, Yamada T, Katagiri H. CHOP Modulates Adipose Tissue Macrophage Polarization. 74th Scientific Sessions American Diabetes Association. 2014年6月13-17日. San Francisco, California (USA)

Kondo K, Gao J, Suzuki T, Ishigaki Y, Imai J, Yamada T, Katagiri H. CHOP Involvement in Hepatic Glucose Production and Insulin Resistance. 74th Scientific Sessions American Diabetes Association. 2014年6月13-17日. San Francisco, California (USA)

児玉慎二郎, 山田哲也, 高橋圭, 突田壮平, 金子慶三, 宇野健司, 澤田正二郎, 今井淳太, 石垣泰, 岡芳知, 片桐秀樹. 複数のサブテロメア領域に同時に認められる若年発症2型糖尿病患者の高頻度コピー数欠失. 第57回日本糖尿病学会年次学術集会. 2014年5月22-24日. 大阪国際会議場(大阪府大阪市)

〔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・医学系研究科・教授  
研究者番号: 00344664

### (2) 研究協力者

近藤 敬一 (Kondo Keiichi)  
東北大学・東北メディカルメガバンク機構・フェロー  
研究者番号: 70644805  
児玉 慎二郎 (Kodama Shinjiro)  
東北大学・東北メディカルメガバンク機構・フェロー  
研究者番号: 60747062