

令和元年6月12日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K01838

研究課題名(和文) 糖尿病の的確医療を実現する治療効果・心血管リスク予測法と新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of prediction model for cardiovascular diseases and novel therapeutic methods

研究代表者

小田原 雅人 (Odawara, Masato)

東京医科大学・医学部・教授

研究者番号：00224254

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：当院に通院する生活習慣病の患者からDNAを抽出し次世代シーケンサーでDNA解析を行ったところ単一遺伝子病としての脂質異常症の原因遺伝子であるPCSK9やLDLR遺伝子の多型を一定の割合で認め、生活習慣病においてもこれらの遺伝素因が心血管リスクと関連し、残余リスクの少なくとも一部を説明していることが示唆された。また、エクソーム解析により心血管疾患との関連性や変異自体の報告がない遺伝子変異を保持する症例を認め、機能解析で遺伝子産物の酵素活性の低下を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

比較的稀な単一遺伝子病の原因遺伝子に認められる高頻度の遺伝子多型が心血管疾患リスクに一定の影響を与えていることが示唆されたことで、今後症例数を増やした検討によってそれらの遺伝情報を取り入れたより精度の高い生活習慣病患者の心血管リスク評価法の開発が期待できる。また、全く予期しない遺伝子変異を同定しその機能解析から何らかの病態に関与していることが示唆された。今後更に症例数を増やした遺伝疫学的解析と、個体レベルでの機能解析を組み合わせることによって、心血管疾患発症における役割の解明のみならず新規治療法の開発につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：DNA was extracted from patients with lifestyle-related diseases visiting our hospital, and DNA analysis was performed with a next-generation sequencer. It was suggested that, even in general lifestyle-related diseases, these genetic variations are associated with cardiovascular risk and explain at least a part of the residual risk of cardiovascular diseases. Our exome analysis identified a case with a gene mutation that were not previously reported to be associated with cardiovascular disease. Functional analysis confirmed a decrease in enzyme activity of the gene product.

研究分野：エビデンスに基づく糖尿病の管理・治療

キーワード：ゲノム解析 感受性遺伝子 心血管疾患

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

2型糖尿病など生活習慣病の管理・治療の進歩により心筋梗塞・脳卒中などの心血管イベントリスクが年々低下してきているものの、日本人の死因に占める心疾患、脳血管疾患をあわせた動脈硬化疾患による割合は 23.4%と依然高い。心血管合併症の確立されたリスク因子である血糖・血圧・脂質レベル改善してもなお心血管合併症リスクが残るといった残余リスクの問題である。更に心血管イベントのリスクは個人によって異なっており、その個人差の少なくとも一部に何らかの遺伝素因が関与していることは間違いない。心血管疾患と関連する遺伝子多型は近年全ゲノム解析によって次々と同定されており、それら遺伝子多型やこれから同定されるものも含めた遺伝情報を取り入れたより精度の高い心血管リスク評価法の開発が期待できる。更に、心血管疾患関連遺伝子を標的とした治療薬が残存リスクを解消する治療法の実現につながることが期待される。

## 2. 研究の目的

心血管疾患の残余リスクの中には個人によって異なる心血管疾患易罹患性の遺伝素因が含まれていると考えられる。個人々の心血管疾患易罹患性の遺伝素因を考慮に入れた心血管疾患リスク評価法が開発できれば個人々の心血管疾患リスクをより正確に評価し、より重点的・集学的治療による効果的な心血管疾患の予防に有用であるばかりでなく、心血管疾患感受性遺伝子を標的とした治療薬の実現につながることが期待される。本研究では既知の心血管疾患関連遺伝子多型に加えて心血管リスクの評価や心血管疾患リスクの低下と関連する遺伝子多型を新たに同定し残余リスクの解消法に直結する新規治療標的分子を明らかにするための基礎的データを得ることを目的とする。遺伝子多型は地域性があり当院が位置する東京都新宿区は国内では有数の地域住民の多様性を持っており、多様な遺伝子多型が同定される可能性が高いと期待される。

## 3. 研究の方法

当院に通院・入院する生活習慣病患者から収集された全血検体より DNA を抽出し、次世代シーケンサー (MiSeq, Illumina 社) で遺伝子多型・変異を検出し解析する。肘部からの通常の静脈採血手法によって、全血測定用スピッツ 1 本に約 2ml、並びに生化学検査用スピッツ 1 本に約 5ml の採血を実施する。両スピッツには匿名化用の番号が書かれたシールを貼付する。全血 1ml から DNA 抽出キットを利用して DNA を抽出する。Illumina 社 MiSeq 等を利用してエクソーム解析 (一部プロモーター領域を含む) を実施する。既知遺伝子として記載した遺伝子のプロモーター領域 (計 1.5Mb 領域) を濃縮するオリゴプローブを追加したものを利用し、対象試料の全エクソンならびに既知原因遺伝子のプロモーター領域を濃縮する。平均カバレッジ 100 程度を目標として MiSeq に供しシーケンスを実施する。シーケンスのリード情報は ELANDv2 ソフトウェアを利用して NCBI build36/hg18 にマップし、CASAVA (version 1.6, Illumina) を利

用して quality score 10 以上かつカバレッジ 8 以上をカットオフとして変異候補リストを得る。得られた遺伝子変異リストから、HGMD, dbSNP, 1000 Genomes Project などの公共データベースを利用して、既知・新規の遺伝子変異・多型のスクリーニングを行う。既知の原因遺伝子領域については MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) によって欠失・重複などのコピー数変化の解析も検討する。臨床的意義が高いと判断されるものについてはプローブを設計して、直接シーケンスを行って変異の確認を行う。遺伝子内に存在するナンセンス変異か、ミスセンス変異で SIFT や PolyPhen-2 等の予測ソフトウェアで遺伝子産物の機能が障害されると予測されるものについて抽出する。心血管疾患との因果関係が明らかになったものはこれまでに報告した血管機能・酸化ストレスマーカーと組み合わせて心血管リスク因子のリスク予測法を開発する。

#### 4 . 研究成果

次世代シーケンサー (MiSeq, Illumina 社) で網羅的遺伝子多型・変異を探索したところ PCSK9 や LDLR など家族性高コレステロール血症の原因遺伝子多型を一定の割合で認めた。生活習慣病においてもこれらの遺伝子多型が心血管リスクと関連し、残余リスクの少なくとも一部を説明していることが示唆された。また、次世代シーケンサーによるエクソーム解析により心血管疾患との関連性がなく変異自体も報告のない遺伝子変異を保持する症例を認めた。アミノ酸を置換する本変異の塩基は哺乳動物種で保存されており、変異体を HEK293 細胞にトランスフェクションして行った機能解析では、正常型に比して遺伝子産物である酵素活性の低下を認めた。また、近年では高 LDL-C 血症の鑑別疾患として、ライソゾーム酸性リパーゼ欠損症 (Lysosomal acid lipase disease: LALD) が報告されている。LALD は高 LDL-C 血症および脂肪肝、肝脾腫を呈し、死に至る疾患で LIPA 遺伝子の変異により引き起こされる。LIPA 遺伝子変異のヘテロ接合体保持者の頻度は白人では 780 人に一人、ドイツでは 200 人に一人とも言われており、日本人でも一定の頻度であることが確認された。今後 LIPA 遺伝子多型の心血管疾患残余リスクに占める割合について検討していく。

#### 〔雑誌論文〕(計 1 件)

Hara K, Kadowaki T, Odawara M. Genes associated with diabetes: potential for novel therapeutic targets? Expert Opin Ther Targets. 2016;20(3):255-67. doi: 10.1517/14728222.2016.1098618. 査読有り

#### 〔学会発表〕(計 1 件)

Akiko Teshima, Rokuro Ito, Takuya Ishikawa, Jumpei Shikuma, Akira Kanazawa, Takashi

Miwa, Masato Odawara Complications of Type 2 diabetes after SGLT2 inhibitor administration for 18 months: Examination using two risk engines 53th Scientific Sessions, European Association for the Study of Diabebes, Lisbon, Portugal, September, 2017  
〔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：

国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：原 一雄

ローマ字氏名：HARA KAZUO