

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591321

研究課題名(和文)次世代シーケンスを用いた日本人1型糖尿病における新規感受性SNPの同定

研究課題名(英文)Identification of novel susceptibility variants to type 1 diabetes by a next-generation sequencing

研究代表者

粟田 卓也(AWATA, TAKUYA)

埼玉医科大学・医学部・教授

研究者番号：40184303

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：日本人において、1型糖尿病の感受性遺伝子として、HLAクラスII遺伝子と弱い非HLA遺伝子がいくつか報告されている。24候補遺伝子についての次世代シーケンスを用いたバリエーションのスクリーニングにより、アミノ酸置換を伴うバリエーションが56個同定され、そのうちの34個が低頻度バリエーションであった。当科および共同研究施設の706症例および863例のコントロールについて関連解析を行い、GLIS3遺伝子のA908Vバリエーションが1型糖尿病に抵抗性であることを見いだした。白人以外では1型糖尿病に関連する低頻度バリエーションは初めての報告である。

研究成果の概要(英文)：In Japanese, HLA class II is a very strong susceptibility factor, and the insulin gene is another confirmed susceptible locus to type 1 diabetes (T1D). We have also obtained evidence for an association with several non-HLA loci. However, it was revealed that the cumulative effect of these non-HLA susceptibility loci was much weaker than that of the HLA class II loci. Thus, in the present study, we analyzed low-frequency variants of the non-HLA T1D candidate genes in Japan. We first screened for protein-changing variants of 24 T1D candidate genes and then the association with T1D was tested in 706 T1D patients and 863 control subjects. In total, 56 protein-changing variants were discovered; among them, 34 were low-frequency variants. The association analysis of the low-frequency variants revealed that only the A908V variant of GLIS3 was strongly associated with resistance to T1D. This is the first report on association of low-frequency variants with T1D in non-white populations.

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：1型糖尿病 疾患感受性遺伝子 SNP バリエーション GLIS3 日本人

## 1. 研究開始当初の背景

1型糖尿病は自己免疫により膵細胞が破壊されインスリン治療を生涯必要とする糖尿病であり、予知、予防、オーダーメイド医療の開発が望まれている。1型糖尿病の発症に關与する遺伝子を明確にすることは、そのための重要な研究課題である。

1型糖尿病の感受性遺伝子は、大きく HLA 領域の遺伝子と HLA 以外 (非 HLA) の遺伝子に分かれる。遺伝学的な解析では、HLA 領域遺伝子の主体は DRB1 および DQB1 遺伝子であり、遺伝因子全体の 50% 程度を説明する強い感受性効果を有している。一方、非 HLA 感受性遺伝子に関して、インスリン遺伝子 (INS)、CTLA4、PTPN22、IL2RA が明らかになってきたが、最近のゲノムワイド関連解析 (GWAS) により、白人では多数の遺伝子座が同定された。その多くは免疫機構に關与するものと想定されているが、ほとんどの遺伝子座で、関連の原因となっている遺伝子あるいは多型は明らかになっていない。

日本人における非 HLA 感受性遺伝子については、最近の当科を含めた多施設共同研究における多数例の解析により、インスリン、CTLA4、PTPN22 の各遺伝子との関連が日本人において明確になった。さらに、上記の白人 GWAS で見出された 1 型糖尿病感受性遺伝子座の中で、*ERBB3*、*CLEC16A* の SNP が有意に関連することも見出された。しかしながら、日本人においても、7 つの GWAS で同定された非 HLA 感受性 SNP を総合してもその効果は弱く、新たな感受性遺伝子の同定が望まれた。

一方で、GWAS の課題も明らかになっている。すなわち、今回明らかになった多数の遺伝子によっても、1 型糖尿病の遺伝率の 4 割程度が未だ明らかになっていない。この点に関して、「低頻度バリエーション」が相当数存在する可能性も考えられており、これらは GWAS では検出困難である。こうした「低頻度バリエーション」は、遺伝子頻度が数%以下と頻度は少ないものの、発症リスクは比較的高いことが多く、個別化医療においては、GWAS で同定されたオッズ比が 1.1~1.3 と低リスクの SNP よりも有用である。

## 2. 研究の目的

最近になり、多因子疾患の感受性遺伝子がゲノムワイド関連解析 (GWAS) により多数同定されている。1 型糖尿病においても、白人では多くの遺伝子領域が同定されているに至っているが、実際に関連の原因となっている遺伝子あるいは多型はほとんど同定されていない。申請者らは、多施設共同研究により、日本人 1 型糖尿病感受性遺伝子の解析を行ってきたが、本研究では、次世代シーケンスによる解析により、エクソン領域のアミノ酸を置換する多型 (非同義 SNP) などに絞って検討を行い、日本人 1 型糖尿病における新たな感受性 SNP として「まれな変異」の同

定を行うことを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (概要)

「低頻度バリエーション」のスクリーニングには、次世代シーケンスを用いて多数の候補遺伝子のエクソン領域をまとめて解析するという効率の良い手法を用いる。得られたエクソン領域の多型・変異の中で、本研究では、機能的に影響を与える可能性が高い「まれな変異」(アミノ酸を置換する非同義 SNP、スプライスに影響するもの、ストップコドンを生じるもの)を選別する。得られた「低頻度バリエーション」の中で、当科の症例・対照における検討をまず行い、実際に感受性に影響する可能性が高いと考えられるものについては、必要に応じて多施設共同研究による多数例での検討を行う。

### 平成 23 年度

#### (1) 症例 DNA および臨床データの収集

1 型糖尿病について、当科で約 200 例以上の DNA をすでに収集している。各症例について、内科的臨床データ (性、発症年齢、治療、発症時の HbA1c、GAD 抗体、IA-2 抗体、甲状腺疾患の合併、甲状腺自己抗体、C ペプチドなど) は綿密に調査済みである。健常対照も 900 例以上収集済みであり、2 型糖尿病 (糖尿病の別の病型としての対照) についても 800 例以上収集済みである。

#### (2) 「まれな変異」の解析

「まれな変異」のスクリーニングには、次世代シーケンサーを用いる。次世代シーケンサーとしては、得られる配列データが非常に多く精度も高い Illumina GenomeAnalyser を用いる。具体的には、ゲノム DNA を数十サンプル混合し、数十個の候補遺伝子の各エクソンを別々に PCR 増幅する。さらに、増幅 PCR 産物を精製後にすべて混合して、Illumina GenomeAnalyser による塩基配列の読み取りを行い、その後各遺伝子へマップする。一度に 20 億以上の配列の解析が可能であることから、効率よく「まれな変異」を検出することができる。「まれな変異」がどの個人にあるかについては、個別にシーケンスあるいは TaqMan 多型解析を行い確認する。当科の 1 型糖尿病患者 200 例、コントロール 200 例の解析を予定している。なお、スクリーニングの対象とする遺伝子として、1 型糖尿病感受性領域の遺伝子、単一遺伝子異常による糖尿病の原因遺伝子の一部 (*WFS1*、*AIRE* など) などを解析する。すでに述べたように、「まれな変異」については、アミノ酸を置換するもの、スプライスに影響するもの、ストップコドンを生じるものの意義が高いと思われる、そうしたものを優先して、関連解析、機能面からの検討などを行っていく。

## 平成 24 年度以降

平成 24 年度以降は、平成 23 年度の解析を引き続いて行う予定である。具体的には、「まれな変異」の関連解析のためにも症例数を増加させることは重要であり、当施設において、患者・対象の収集を継続するとともに、国内の 1 型糖尿病共同研究グループ（800 例以上の 1 型糖尿病患者、1000 例以上の対照者）の多施設共同研究として関連解析を行う。検出された「まれな変異」の機能面からの検討をウェブ上および in vitro の解析から検討することを予定している。

### 4. 研究成果

1 型糖尿病 96 症例と健常コントロール 96 例について、INS、CTLA4、IL2RA などの既知の感受性遺伝子と AIRE、WFS1 などの候補遺伝子を合計 24 遺伝子について次世代シーケンス解析を行い、18 遺伝子において、アミノ酸置換を伴うバリエーションが合計 56 個同定され、そのうちの 34 個が低頻度バリエーション（対照における MAF<0.05）であった。得られたバリエーションについて、当科および共同研究施設の症例・対照について関連解析を行い、GLIS3 遺伝子の A908V バリエーションが 1 型糖尿病に抵抗性であることを見いだした（Haldane's OR = 0.046,  $p = 8.21 \times 10^{-4}$ , and  $pc = 2.22 \times 10^{-2}$ ）。白人以外では 1 型糖尿病に関連する低頻度バリエーションは初めての報告である。GLIS3 は膵細胞に発現する重要な転写因子であるが、A908V バリエーションを含むエピトープでは膵細胞に対する自己免疫が抑制されるという新規な関連機序を考えている。

### 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 5 件)

1. Awata T, Yamashita H, Kurihara S, Morita-Ohkubo T, Miyashita Y, Katayama S, Kawasaki E, Tanaka S, Ikegami H, Maruyama T, Shimada A, Takahashi K, Kawabata Y, Kobayashi T, Nishida N, Mawatari Y. A low-frequency GLIS3 variant associated with resistance to Japanese type 1 diabetes. *Biochem Biophys Res Commun* 437:521-525, 2013. 査読有
2. 粟田卓也、山下富都 . 1 型糖尿病遺伝子解析の最新情報 . 月刊糖尿病 4(9):120-130, 2012 . 査読無
3. 粟田卓也 . 1 型糖尿病の遺伝因子 ~ 特に日本と欧米の共通点・相違点について ~ . *Diabetes Frontier* 23(3):267-278, 2012 . 査読無

〔学会発表〕(計 7 件)

1. 粟田卓也 . 1 型糖尿病関連遺伝子 . 第 47 回糖尿病学の進歩 (2013 年 2 月 15 日、三重県四日市)(招待講演).

2. Takuya Awata, Susumu Kurihara, Tomoko Morita-Ohkubo, Yumi Miyashita, Eiji Kawasaki, Hiroshi Ikegami, Shoichiro Tanaka, Taro Maruyama, Akira Shimada, Kazuma Takahashi, Yumiko Kawabata, Tetsuro Kobayashi: A rare GLIS3 variant associated with resistance to type 1 diabetes. The 48th Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes (EASD), 2012.10.4, Berlin, Germany.

〔図書〕(計 3 件)

1. 粟田卓也: 急性発症典型 1 型糖尿病 . 日本臨床 70 巻増刊号 3 (最新臨床糖尿病学・上). pp358-364, 日本臨床社、大阪、2012

〔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

粟田 卓也 (AWATA TAKUYA)

埼玉医科大学・医学部・教授

研究者番号: 40184303

#### (2) 研究分担者

なし

#### (3) 連携研究者

栗原 進 (KURIHARA SUSUMU)

埼玉医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90286104

森田 智子 (MORITA TOMOKO)

埼玉医科大学・医学部・講師

研究者番号：40348214

飯塚 裕幸 (IIZUKA HIROYUKI)

埼玉医科大学・医学部・助教

研究者番号：20348246