

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：32206

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461344

研究課題名(和文)全エクソーム解析による1型糖尿病感受性バリエーションの同定

研究課題名(英文) Identification of susceptibility variants to type 1 diabetes using whole-exome sequencing

研究代表者

粟田 卓也 (Awata, Takuya)

国際医療福祉大学・大学病院・教授

研究者番号：40184303

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)：21例の1型糖尿病患者の全エクソーム解析を施行した。検出した感受性バリエーション候補の中で、自然免疫に重要である Toll 様受容体 (Toll-like receptor, TLR) ファミリーの1つの遺伝子に発見された低頻度の非同義変異に着目した。5000例を超える関連解析において変異の homozygote の頻度が1型糖尿病患者に有意に増加し、1型糖尿病兄弟発症の1家系において兄弟が共にこの変異の homozygote であることが判明した。一方、興味深いことに、2型糖尿病では野生型アレルが有意に増加していた。機能解析を現在進めている。

研究成果の概要(英文)：We performed whole-exome sequencing of 21 patients with type 1 diabetes mellitus. Among the detected susceptibility variant candidates, we focused on low-frequency nonsynonymous mutations found in one gene of the Toll-like receptor (TLR) family, which is important for innate immunity. In case-control association tests including over 5000 subjects, the frequency of homozygotes of the mutation was significantly increased in patients with type 1 diabetes, and in a family of type 1 diabetes brothers, it was found that both brothers were homozygotes of this mutation. Interestingly, wild-type alleles were significantly increased in type 2 diabetes. We are currently conducting functional analysis.

研究分野：糖尿病

キーワード：1型糖尿病 疾患感受性遺伝子 全エクソーム解析 2型糖尿病 トール様受容体 バリエーション SNP

1. 研究開始当初の背景

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。解析された全ての人種において、HLA 領域の DRB1 遺伝子および DQB1 遺伝子が強い関連を示す (白人では遺伝因子全体の 50% 程度の強い感受性効果と見積もられている)。一方、非 HLA 遺伝子に関しては、白人では候補遺伝子解析により *INS*、*CTLA4*、*PTPN22*、*IL2RA* の各遺伝子が同定され、ゲノムワイド関連解析 (GWAS) により数多くの感受性遺伝子座が同定された。

しかしながら、すべての明らかになった非 HLA 感受性遺伝子を総合しても、HLA クラス 遺伝子 (DRB1、DQB1) の効果よりも格段に弱く、1型糖尿病の発症予知という観点からは疾患感受性遺伝子の役割は依然として限定的である。日本人 1型糖尿病においても、当施設も参画する国内遺伝子共同研究グループの解析 (Awata T et al. *JCEM* 2007; Ikegami H, Awata T et al. *JCEM* 2006; Kawasaki E, Awata T et al. *JCEM* 2009; Awata T et al. *JCEM* 2009) により関連が判明した非 HLA 感受性遺伝子 (*INS*、*CTLA4*、*IL2RA*、*ERBB3*、*CELE16A*) などによる 1型糖尿病発症予知効果は、HLA クラス 遺伝子と比較して格段に低かった (Yamashita H, Awata T et al. *Diabetes Metab Res Rev* 2011)。

白人 1型糖尿病における解析では、候補遺伝子解析・GWAS により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 3 割程度が未だ明らかになっていないものと見積もられている (Polychronakos C et al *Nat Rev Genet* 2011)。この点に関して、右図の中央に示すように、「低頻度の感受性バリエーション (アレル頻度 5% 未満)」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、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

1型糖尿病の遺伝因子に関して、候補遺伝子解析・ゲノムワイド関連解析 (GWAS) により多くの疾患感受性遺伝子が同定されたが、発症予知という観点からはその役割は限定的である。非 HLA 感受性遺伝子の多くが依然不明であり、日本人独自の感受性遺伝子もほとんど明らかになっていない。本研究では、日本人 1型糖尿病において、アレル頻度は低いが発症リスクへの影響が大きいバリエーションを次世代シーケンス解析による全エクソーム解析により同定することを目的とする。本研究により同定が期待される感受性遺伝子は、発症予防手段の対象となるハイリスク者の選別に有用であり、発症機構に関す

る新知見をもたらし、新たな発症予防手段の開発に役立つことが期待される。

本研究では、次世代シーケンサーによる「低頻度バリエーション」の解析を行うことが特色の一つである。白人 1型糖尿病における同様な研究として、2009 年に *Science* 誌に報告されたもの (*Science* 324:387-399, 2009) があり、その論文では GWAS で感受性遺伝子として同定されていた *IFIH1* の「低頻度バリエーション」の白人 1型糖尿病との関連 (抵抗性) が見出されたが、その後はほとんど報告がない。日本人 1型糖尿病においては、上述のわれわれの報告 (BBRC 437:521-525, 2013) がなされているのみである。

日本人は白人よりも近親婚率が高いことが知られており (今泉: 人口問題研究 182:1, 1987)、「低頻度バリエーション」の関与が強いことも予想される。さらに、日本人では 1型糖尿病の発症率が低いにもかかわらず患者同胞の発症率が白人 1型糖尿病と同程度である点からも感受性効果の強い低頻度バリエーションの存在が示唆される。

近年の遺伝学的や免疫学の進歩、さらには発症予防トリアルの困難さから、ヒトの 1型糖尿病の多様性がますます明らかになっている。1型糖尿病と関連する新たな「低頻度バリエーション」の同定は多様なヒト 1型糖尿病の発症機序の解明に有用であるのみならず、1型糖尿病の予知・リスク評価のための新たな遺伝子マーカーの確立に寄与することが期待される。すでに述べたように「低頻度バリエーション」による発症リスクは最近の GWAS で検出された感受性 SNP よりも高いことも予想されるので、予知・リスク評価のための遺伝子マーカーとしての有用性は高い。

さらに、GWAS で同定された感受性 SNP はマーカーに過ぎないことが多く真の感受性遺伝子を同定することは容易ではないが、今回のエクソーム解析では機能に影響する可能性が高い蛋白置換バリエーションについての検討であるため、関連を示したバリエーションが真の感受性をもたらしている可能性が高いという利点がある。

3. 研究の方法

本研究計画では、以下の研究手順により 1型糖尿病感受性/抵抗性バリエーションの同定を行う。

患者群と対照群において、全エクソーム解析により「バリエーション」のスクリーニングを行う。

検出された「バリエーション」の中から、蛋白機能に影響を与える可能性が高い「蛋白置換バリエーション」を公共データベースや *in silico* の機能予測ツールなどにより選別する。

選別されたバリエーションについて、多施設共同研究による多数例での関連解析を行う。

1型糖尿病との有意な関連が認められたバリエーションについて、家系解析・機能解析を

行い関連機序の検討を行うとともに、独立したサンプルによる replication 解析を行いリスクマーカーとしての意義を確認する。

4. 研究成果

21 例の 1 型糖尿病患者の全エクソーム解析を施行した。検出した感受性バリエーションの中で、自然免疫に重要である Toll 様受容体 (Toll-like receptor, TLR) ファミリーの 1 つの遺伝子に発見された低頻度の非同義変異に着目した。5000 例を超える関連解析において変異の homozygote の頻度が 1 型糖尿病患者に有意に増加し、1 型糖尿病兄弟発症の 1 家系において兄弟が共にこの変異の homozygote であることが判明した。一方、興味深いことに、2 型糖尿病では野生型アレルが有意に増加していた。機能解析を現在進めている。

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. Yasui J, Kawasaki E, Tanaka S, Awata T, Ikegami H, Imagawa A, Uchigata Y, Osawa H, Kajio H, Kawabata Y, Shimada A, Takahashi K, Yasuda K, Yasuda H, Hanafusa T, Kobayashi T; Japan Diabetes Society Committee on Type 1 Diabetes Mellitus Research. Clinical and Genetic Characteristics of Non-Insulin-Requiring Glutamic Acid Decarboxylase (GAD) Autoantibody-Positive Diabetes: A Nationwide Survey in Japan. *PLoS One*. 2016 May 13;11(5):e0155643. 査読有

2. Tsuchihashi T, Mori K, Horie-Inoue K, Okazaki Y, Awata T, Inoue S, Yoneya S. Prognostic phenotypic and genotypic factors associated with photodynamic therapy response in patients with age-related macular degeneration. *Clin Ophthalmol*. 2014 Dec 5;8:2471-8. 査読有

3. Awata T, Yamashita H, Kurihara S, Morita-Ohkubo T, Miyashita Y, Katayama S, Mori K, Yoneya S, Kohda M, Okazaki Y, Maruyama T, Shimada A, Yasuda K, Nishida N, Tokunaga K, Koike A. A genome-wide association study for diabetic retinopathy in a Japanese population: potential association with a long intergenic non-coding RNA. *PLoS One*. 2014 Nov 3;9(11):e111715. 査読有

4. 粟田卓也 .1 型糖尿病に関連した遺伝子研究の歴史と最近の流れ . 月刊糖尿病 7(5):76-86、2015 . 査読無

5. 粟田卓也 . 緩徐進行 1 型糖尿病の病態とそれを考慮した治療介入 . プラクティス 32(6):668-677、2015 . 査読無

[学会発表](計 11 件)

1. 梶尾 裕, 中條 大輔, 霜田 雅之, 安田 和基, 春日 雅人, 花房 俊昭, 今川 彰久, 池上 博司, 大澤 春彦, 川崎 英二, 粟田卓也, 高橋 和真, 小林 哲郎, 島田 朗, 安田 尚史, 阿比留 教生, 長澤 幹, 田中 昌一郎. 日本人 1 型糖尿病の包括的データベースの構築と臨床研究への展開(TIDE-J)(第 3 報). 第 58 回日本糖尿病学会年次学術集会 (2015 年 5 月 21 日、山口県下関市)

2. 粟田卓也 . 糖尿病網膜症の遺伝因子 . 第 20 回日本糖尿病眼学会総会 (2015 年 3 月 6 日、東京都千代田区)(シンポジウム).

[図書](計 1 件)

1. 粟田卓也 . 緩徐進行 1 型糖尿病の病態と成因 . 最新医学 70 巻 3 月増刊 (糖尿病と合併症(前編)糖尿病). pp549-563、最新医学社、大阪、2015

[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)

国際医療福祉大学・大学病院・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

岡崎 康司 (OKAZAKI YASUSHI)
埼玉医科大学・医学部・教授
研究者番号：80280733

西田 奈央 (NISHIDA NAO)
国立研究開発法人国立国際医療研究センター・肝炎・免疫研究センター・上級
研究員
研究者番号：50456109