

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 24 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860694

研究課題名(和文)全エクソンシーケンスを用いた新規糖尿病発症原因遺伝子の同定

研究課題名(英文) Identification of novel diabetes susceptibility genes utilizing whole exome sequencing

研究代表者

田中 大祐 (Tanaka, Daisuke)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：50582904

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病罹患者を多数有する家系にて、全エクソンシーケンス(WES)を行い発症原因遺伝子変異を同定することを目的とした。家系内糖尿病罹患者および非罹患者につきゲノムDNAのWESを行い、罹患者に共通し非罹患者にみられず、一般人口において稀な遺伝子変異を絞り込んだ。結果、タンパクアミノ酸配列変化を伴う塩基配列変化は439検出され、SNPデータベースおよび105名の一般非罹患者におけるアレル頻度検討にて1%未満であったのは16個であった。このうち糖尿病との関連がすでに示唆されている遺伝子であるARHGEF11遺伝子のR608H変異について、家系における発症原因である可能性が高いと考えた。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to investigate the genetic background of a family with multiple cases of diabetes using whole exome sequencing. Whole exome sequencing identified 439 non-synonymous variants present in all affected members and absent in unaffected members. After excluding common variants with minor allele frequency of >1% in SNP databases or in 105 Japanese normal controls, 16 candidate variants were selected. Among them R608H mutation in the ARHGEF11 gene might be a mutation for susceptibility to diabetes because the ARHGEF11 gene has been implicated to be involved in glucose metabolism in genetic association studies.

研究分野：代謝学

キーワード：糖尿病

1. 研究開始当初の背景

糖尿病の急増は全世界的に深刻な問題である。本邦を含む西太平洋地域の成人糖尿病患者は1億3000万人以上で増加を続けており、本邦の成人糖尿病患者は950万人と推定される。網膜症・腎症・神経障害・動脈硬化系疾患をはじめとする糖尿病合併症に起因する患者のQOL低下や経済的損失は甚大であり、糖尿病発症の分子機構を解明し、新規診断・治療法を開発し、合併症を減少させることは急務である。

糖尿病の発症には食事・運動といった環境因子に加えて、遺伝的因子が重要な役割を果たすと考えられる。糖尿病発症に関わる遺伝的因子の解明により、糖尿病発症の分子機構を明らかにしようとする試みは以前から行われていた。

糖尿病発症に関わる遺伝因子を明らかにするため、2007年以降大規模に行われているのがゲノムワイド相関解析(GWAS)である。これは、一般2型糖尿病患者と一般対照者のDNA検体を収集し、全ゲノムの一塩基多型(SNPs)などをタイピングし、患者と対照者で頻度に差異がみられる多型を探索し、2型糖尿病発症関連遺伝子座位を同定する手法である。全世界において2型糖尿病のGWASおよびそのメタ解析研究が大規模に行われ、70以上の糖尿病発症関連遺伝子座位が同定された。しかし、同定された遺伝子座位の情報を全て総合して説明できるのは糖尿病発症に関わる遺伝因子の5-20%にとどまると考えられており、これは2型糖尿病のGWASにおいて同定されたものが一般集団において高頻度のCommon Variantsであり、個人の糖尿病発症に与える影響が比較的小さい(Odds比<1.5)ものであることが要因の一つと考えられた。

研究開始当初時点で100以上の2型糖尿病発症関連遺伝子座位がGWASにおいて同定されていたが、新規に同定されるものはやはりOdds比1.1程度のVariantsであり、GWASのみで糖尿病発症の遺伝素因の全容解明を行うことが困難であるという状況は変わっていなかった。この状況を打開するためには、これまで2型糖尿病のGWASでは同定困難であった、一般集団において低頻度だが疾患発症に与える影響の大きいRare variantsを同定することが不可欠と考えられた[表1]。

Rare variantsの同定には、遺伝因子の寄与が特に大きいと考えられる糖尿病患者を対象とすることが有効である。研究代表者らは研究開始以前複数の糖尿病多発家系について連鎖解析を行い、GCKR遺伝子の新規変異を同定した(田中ら, Mol Genet Metab 102巻, 453-460頁, 2011年)。

[表 1; 糖尿病発症に關与する遺伝因子解明についての、研究開始当初の状況]

Common variants	Rare variants
一般人口における対立遺伝子頻度5%以上	Mutations (変異)
ゲノムワイド関連解析(GWAS)で同定	GWASでは同定困難
2型糖尿病発症に与える効果オッズ比1.0~1.5	発症に与える効果オッズ比2以上
GWASにより同定された70以上の2型糖尿病発症感受性遺伝子座位の情報にて説明できるのは2型糖尿病の遺伝的背景全体の20%未満	家系解析や希少疾患解析(腭発生異常・新生児糖尿病など)で同定

さらに、2007年頃から活用されはじめた次世代シーケンス技術により、希少な遺伝疾患における原因遺伝子変異同定を効率よく行えるようになり、研究代表者らは13名の罹患者を擁する糖尿病家系について、次世代シーケンスを用いEEA1遺伝子変異を糖尿病発症感受性遺伝子変異の候補として同定した(田中ら, Mol Genet Metab 109巻, 112-117頁, 2013年)。その後も、腭発生異常を伴う希少な糖尿病症例などにおける原因遺伝子同定が次世代シーケンスを用いて行われた。糖尿病におけるRare variants研究により、糖尿病発症の遺伝因子解明の進捗が期待された。

2. 研究の目的

本研究の目的は、次世代シーケンス技術による全エクソンシーケンスを用い、連鎖解析では原因遺伝子同定が困難であった糖尿病多発家系において新規糖尿病発症原因遺伝子を同定し、糖尿病の新規診断・治療法開発に寄与することであった。

遺伝的因子の関与が特に強いと想定される、若年発症者(40歳未満)を擁する糖尿病多発家系に次世代シーケンスを用いることで、GWASでは検出が困難な稀な塩基配列変化(Rare Variants)を明らかにし、糖尿病発症に大きな影響を与え、かつ糖尿病発症の分子機序において重要な役割を果たす遺伝子の同定を目指す点が特色であると考えた。

3. 研究の方法

1) 研究代表者らが情報を得、同意を得て DNA 提供を受けた 70 家系 268 名の糖尿病家系のうち、20 家系の発端者につき MODY1~6 遺伝子のシーケンスを Sanger 法にて行った結果、1 家系(MODY3)を除いて既知の MODY 遺伝子では説明できないことがすでに明らかとなっており、この 19 家系について検討することとした。特に糖尿病発症における遺伝的要因が強いと考えられる、インスリン分泌能低下が著明な家系や、40 歳未満での若年発症者を複数有する糖尿病多発家系について優先的に検討に着手することとし、家系構成員ゲノム DNA の全エクソンシーケンスを行った。

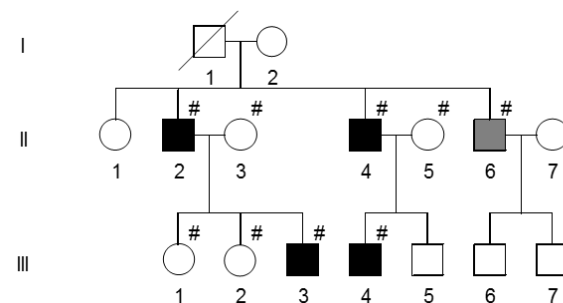
2) 1 名あたり約 10,000 個の、タンパクのアミノ酸配列変化を引き起こすエクソン内塩基配列変化(Non-synonymous variant)につき、家系内罹患者に共通し家系内非罹患者に存在しないものを抽出した。1000 genomes project や日本人ゲノムデータベース(Human Genome Variation Browser)における対立遺伝子頻度が 1%以上と高頻度のもは除外した。

3) 絞り込まれた候補につき Sanger 法にて変異の確認を行ったうえ、日本人一般正常耐糖能者 105 名における実際の頻度を検討した。(研究代表者および協力者に 3000 名以上の検診受診者の DNA 検体を得ており、このうち 55 歳以上で空腹時血糖<100mg/dl の正常耐糖能者 105 名を選択した。)日本人一般正常耐糖能者において希な(対立遺伝子頻度 1%未満)変異は新規糖尿病発症原因遺伝子変異の可能性が高いため、*in vitro*解析を行い原因遺伝子であることを確定することとした。

4. 研究成果

1) 検討した家系のうち 1 家系では、糖尿病罹患者 4 名と、両親・同胞に糖尿病罹患者を有しない家系内非罹患者 2 名の協力を得た[図 1]。糖尿病罹患者 4 名は全員、空腹時血清 C-ペプチド<0.3ng/ml であり、非肥満(BMI<25kg/m²)であった。糖尿病罹患者 4 名ならびに、両親・同胞に糖尿病罹患者を有しない家系内非罹患者 2 名につき WES を行った結果、罹患者全員に共通し非罹患者にみられない Non-synonymous な塩基配列変化は 439 個検出された。また、既知 MODY1~6 遺伝子変異は検出されなかった。

[図 1; 家系図(協力を得たのは II-2, 3, 4, 5, III-3, 4)。 がインスリン分泌不全著明]



2) 糖尿病多発家系における発症原因は、タンパク機能に影響を及ぼす Non-synonymous variant であり、かつ一般集団において低頻度の Rare variants である可能性が高いと考えた。このため、439 個の候補について、タンパク機能変化予測データベースを複数(Polyphen-2, SIFT)用い、タンパク機能に重大な影響を及ぼす可能性が低いものは除外したうえ、ゲノムデータベース(1000 genomes project, Human Genetic Variation Browser)を用い、対立遺伝子頻度が 1%以上のものを除外した。この結果、糖尿病発症原因変異候補は 18 個に絞り込まれた。

3) 18 個の糖尿病発症原因変異候補について Sanger 法にて検討した結果、すべて家系内罹患者 4 名全員においてヘテロ接合にて確認された。さらに、研究代表者および協力者にて DNA 取得済みの一般正常耐糖能者 105 名における頻度検討を、Taqman 法を用いて行った。その結果、一般正常耐糖能者において低頻度(対立遺伝子頻度 1%未満)である変異を 16 遺伝子変異に絞り込んだ[表 2]。

このうち、ARHGEF11 遺伝子 R608H 変異については、ARHGEF11 遺伝子の SNP と糖尿病発症との関連がすでに示唆されていることから発症原因候補の可能性が高いと考え、膵細胞株にて ARHGEF11 遺伝子の RNA 干渉を用いた *in vitro* 解析を行った。ARHGEF11 遺伝子がマウス膵島や複数の膵細胞株にて発現し、RNA 干渉による遺伝子発現抑制が可能であることを予備検討にて確認した。

[表2; 16の発症原因候補遺伝子変異]

アミノ酸 変化	遺伝子名
R595Stop	ICK
R124H	R3HCC1L
E653K	TTC13
A137T	ADAMTSL3
R608H	ARHGEF11
R459Q	SNAP47
P555S	FMN2
S2743L	NBEAL2
C1607F	TG
R355I	USH1C
V1830M	TECTA
G186R	IRAK3
D911N	RBM19
A180V	IDH2
P11S	EXOSC6
E397K	STXBP4

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2件)

1. Glycemic variability is associated with quality of life and treatment satisfaction in patients with type 1 diabetes. Ayano-Takahara S, Ikeda K, Fujimoto S, Hamasaki A, Harashima S, Toyoda K, Fujita Y, Nagashima, Tanaka D, Inagaki N. Diabetes Care. 査読有 38 巻 e1-2 頁 2015 年

2. 糖尿病と遺伝子 全エクソンシーケンスによる解析の試み

田中大祐・長嶋一昭・稲垣暢也
糖尿病 査読無 57 巻 88-90 頁 2014 年

[学会発表](計4件)

1. Whole Exome Sequencing in a Family with Multiple Cases of Type 1 Diabetes Reveals a Candidate Susceptibility Mutation. Byambatseren Jambaljav, Daisuke Tanaka, Kazuaki Nagashima, Norio Harada, and Nobuya Inagaki. American Diabetes Association 75th Scientific Sessions, Boston, 2015/6/7

2.

1 型糖尿病多発家系における、次世代シーケンスを用いた発症原因遺伝子変異同定の試み

田中大祐 Byambatseren Jambaljav 長嶋一昭 原田範雄 小泉昭夫 稲垣暢也
第 58 回日本糖尿病学会年次学術集会, 下関, 2015/5/23

3.

Whole Exome Sequencing in a Japanese Family with Highly Aggregated Type 2 Diabetes Identifies a Candidate Susceptibility Variant.

Daisuke Tanaka, Kazuaki Nagashima, Shin-ichi Harashima, and Nobuya Inagaki. The American Diabetes Association 74th Scientific Sessions, San Francisco, 2014/6/16

4.

日本人糖尿病多発家系における、全エクソンシーケンスを用いた新規糖尿病発症原因遺伝子の同定

田中大祐 長嶋一昭 原島伸一 小泉昭夫 稲垣暢也

第 57 回日本糖尿病学会年次学術集会, 大阪, 2014/5/22

[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]なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

田中 大祐 (TANAKA, Daisuke)
京都大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号: 50582904

(2)研究分担者 なし
(3)連携研究者
小泉昭夫 (KOIZUMI, Akio)
京都大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：50124574