

第7回万有医学奨励賞 – 生活習慣病領域 –

研究成果報告書（追加助成） <概要>

所 属	京都大学大学院医学研究科 糖尿病・内分泌・栄養内科学
氏 名	田中大祐
研究テーマ	若年発症糖尿病患者における、次世代シーケンスを用いた原因遺伝子同定

概要の構成は自由ですが、研究助成報告として広報資料に掲載されます点をご留意ください。研究目的、研究手法、研究成果などを1ページにまとめてください。（図表、写真などの貼付を含む）

目的

若年発症、非肥満、家系集積といった顕著な特徴を持ち、単一遺伝子異常による糖尿病が疑われる例はしばしばみられるが、若年発症成人型糖尿病(MODY)の原因である既知の遺伝子で説明できる例は一部に過ぎない。本研究の目的は、単一遺伝子異常による糖尿病の新規発症原因遺伝子を同定することである。

方法

35歳未満での若年発症糖尿病患者で、膵島関連自己抗体が陰性で、既知遺伝子で説明できない例を全エクソンシーケンスで解析した。SNV(single nucleotide variants)データベースやSNVの機能予測ツールを用いて、タンパク質機能に重大な影響を及ぼす可能性の高い希少な variant を絞り込み、さらに家系集積情報やゲノムコホートを活用して発症原因変異候補を選択し、変異候補の機能解析を行うことで、発症原因遺伝子変異の同定を試みた。

成果

MODYの原因であることが確立されている6遺伝子（HNF4A, GCK, HNF1A, PDX1, HNF1B, NEUROD1）に糖尿病の原因と判断される変異を見いださなかった29名とその血縁者につき、全エクソンシーケンス解析を行った。SNVデータベースにおいて対立遺伝子頻度が1%以上のものを除外し、機能予測ツールを用いてタンパク質機能に影響を及ぼすと考えられる変異(SNPEff; Moderate, High)を選択した。

このうち、1名にみられたPTF1A遺伝子S18F変異(NC_000010.11:g.23192583C>T)は家系内罹患者計3名(図1)に認められ、一般人口コホートにおいて検出されなかったため、糖尿病発症原因変異候補と考え、変異を有するPTF1Aの転写活性を明らかにすべくレポーターアッセイを行った。レポーター3Rbpjl.Ela1p.lucとともに、S18F変異もしくは野生型のPTF1Aを発現するベクターをHEK-293にそれぞれ導入し、ルシフェラーゼの酵素活性を測定することで、変異PTF1Aの転写活性が野生型に比して40%低下することが明らかとなった。PTF1Aは膵の発生に重要な役割を果たすことが明らかになっており、当該家系においてS18F変異が糖尿病発症原因であることが示唆された(EASD 56th annual meeting オンラインポスターセッションにおいて発表を行った)。

若年発症糖尿病患者の全エクソンシーケンスにより新規発症原因変異の同定が可能であることが示された。

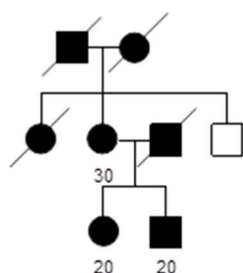


図 1; PTF1A 遺伝子 S18F 変異が認められた家系

発症年齢を数字で示した 3 名を解析した。■・●が罹患者である。

第7回万有医学奨励賞 – 生活習慣病領域 –
研究成果報告書（追加助成） <詳細>

所 属	京都大学大学院医学研究科 糖尿病・内分泌・栄養内科学
氏 名	田中大祐
研究テーマ	若年発症糖尿病患者における、次世代シーケンスを用いた原因遺伝子同定

研究目的/方法/結果/考察/今後の課題など(3 ページ以内)

目的

糖尿病発症には環境素因に加え、遺伝素因が重要な役割を果たす。糖尿病の遺伝素因を解明するため、これまでゲノムワイド関連解析(GWAS)が大規模に行われ、240 以上の 2 型糖尿病発症関連遺伝子座位が同定されたが、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 2 型糖尿病遺伝素因の一部にとどまると考えられている。これは、同定されたものが主に一般集団において高頻度の common genetic variants で、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)のものであったことが要因とされる。2020 年になって新規に同定された 2 型糖尿病発症関連遺伝子座位に存在するのはやはり odds 比 1.1 程度の variants であり、GWAS のみで糖尿病遺伝素因の全容解明を行うことが困難である状況は現在も変わっていない。

一方、50 歳以上で有病率が急増する 2 型糖尿病とは対照的な疾患群として、単一遺伝子異常による糖尿病が知られている。典型的には 25 歳未満の若年で糖尿病を発症するが、膵島自己抗体は陰性で、非肥満例が多く、しばしば家系集積を伴うという特徴を持ち、若年発症成人型糖尿病(MODY)遺伝子として明らかになった 14 遺伝子が原因として知られる。ただ、同様の特徴が認められ単一遺伝子異常の関与が示唆されるにもかかわらず、既知の原因遺伝子で説明できない例が多く存在する。本邦における小児期発症糖尿病例を中心とした検討では、既知遺伝子で説明できない例は 60%以上であり、成人発症例においては原因が未知である割合がさらに高いと考えられる。

本研究の目的は、若年発症・非肥満・家系集積といった特徴を有するが、既知の発症原因遺伝子により説明できない例に関して、次世代シーケンスを用いて新規発症原因変異を同定し、糖尿病発症に関与する新規分子機構を解明することである。

方法

1)解析対象

35 歳未満での若年発症糖尿病患者で、膵島関連自己抗体が陰性である者とその血縁者を解析対象とした。全血由来の DNA を用い、まず MODY の原因であることが確立されている 6 遺伝子 (HNF4A, GCK, HNF1A, PDX1, HNF1B, NEUROD1) につきサンガーシーケンスもしくは、Illumina iSeq 100 または Miseq を用いターゲットシーケンスを行った。

2)全エクソンシーケンス

既知の糖尿病発症原因遺伝子にて説明できない例につき、Agilent SureSelect Human All Exon V6, Illumina HiSeq を用いて全エクソンシーケンスを行った。

3)発症原因変異候補の絞り込み

全エクソンシーケンスで得られた 1 人あたり約 20,000 の、タンパク質のアミノ酸配列変化を引き起こす non-synonymous variant から発症原因変異候補の絞り込みを以下 A)-C)の順に行った。

研究目的/方法/結果/考察/今後の課題など(3 ページ以内)

A) 若年発症糖尿病患者の発症原因は non-synonymous かつ rare variant であることが推定されるため、SNV データベース(1000 genomes, Human Genetic Variation Database)を用い、一般人口における対立遺伝子頻度が 1%以上のものを除外し候補を絞り込んだ。

B) *in silico* 解析 : SNV の病原性につき機能予測ツール(SNPEff)を用いて検討し、タンパク質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。

C) 家系構成員 DNA をシーケンスした場合は、家系内罹患者に集積する変異に着目した。また、すでに存在する知見から膵発生や膵β細胞機能との関連が示唆される遺伝子の変異は糖尿病発症に関与する可能性が高いため、次のステップ 4)に進めた。

4) 10,000 人の一般人口コホートとの比較

絞り込まれた変異に関して、本学疾患ゲノム疫学講座との共同研究が承認されている 10,000 名以上の健診受診者コホートにつき、頻度検討を DNA アレイで行った。本コホートにおける糖尿病有病率は約 5%と他の調査に比して低く、ゲノムに加え、通常の就業者健診以上に詳細なデータを収集したものである。本コホートで全く検出されない変異や、頻度が極めて低い変異を糖尿病発症原因候補とした。

5) *in vitro* 解析

発症原因候補変異の機能が未知である場合、細胞株に変異遺伝子導入を行い、機能を検討した。例として、転写因子をコードする遺伝子の変異である場合、レポーターアッセイを行い、変異が転写活性に与える影響を検討した。

結果

MODY の原因であることが確立されている 6 遺伝子 (HNF4A, GCK, HNF1A, PDX1, HNF1B, NEUROD1) に糖尿病の原因と判断される変異を見いださなかった 29 名とその血縁者につき、全エクソンシーケンス解析を行った。SNV データベースにおいて対立遺伝子頻度が 1%以上のものを除外し、機能予測ツールを用いてタンパク質機能に影響を及ぼすと考えられる変異(SNPEff; Moderate, High)を選択した。そのうち、膵発生や膵β細胞機能との関連が示唆される遺伝子を含む 35 の単一遺伝子異常による糖尿病原因遺伝子(Nat Rev Endocrinol 2016; 12: 394-406)に存在する変異を表 1 に示す。

このうち、対象者 ID 10A にみられた PTF1A 遺伝子 S18F 変異(NC_000010.11:g.23192583C>T) は家系内罹患者 3 名(図 1)に認められ、一般人口コホートにおいて検出されなかったため、糖尿病発症原因変異候補と考え、変異を有する PTF1A の転写活性を明らかにすべくレポーターアッセイを行った。レポーター 3Rbpjl.Ela1p.luc とともに、S18F 変異もしくは野生型の PTF1A を発現するベクターを HEK-293 にそれぞれ導入し、ルシフェラーゼの酵素活性を測定することで、変異 PTF1A の転写活性が野生型に比して 40%低下することを明らかにした。

さらに、対象者 ID 6 および ID 9 に明らかな血縁は聴取できなかったが、2 名に同一の GATA6 遺伝子 E68V 変異(NC_000018.10:g.22171347A>T)が検出され、この変異は一般人口コホートにおいて、ジェノタイピングを行った 4073 名中 3 名においてヘテロ接合で検出された。この 3 名は糖尿病を未発症であったが、うち 1 名は HbA1c>6%で糖尿病家族歴を有していた。

考察

PTF1A は膵の発生に重要な役割を果たすことが明らかになっており、対象者 ID10 の家系において S18F 変異が糖尿病発症原因であることが示唆された。この成果を学会発表 1、2 において報告した。

また、注目すべき結果として、同じく膵発生に関与する GATA6 遺伝子の同一変異が明らかな血縁のない若年発症糖尿病患者 2 名に検出され、さらに、一般人口においては極めて低頻度(アレル頻度 0.0003)であったことから、糖尿病感受性変異であることが示唆された。

研究目的/方法/結果/考察/今後の課題など(3 ページ以内)

対象者 ID	Chr	Position	ref	alt	GENE	EFFECT
1	4	6291303	CAAG	C	WFS1	p.Lys193del
2	2	88575391	G	T	EIF2AK3	p.Arg698Ser
3	7	117542095	C	T	CFTR	p.Ala399Val
3	9	3937085	C	G	GLIS3	p.Gln450His
4	13	27920537	G	T	PDX1	p.Gln133His
4	3	57268430	A	G	APPL1	p.Ile642Met
5	7	117540270	G	A	CFTR	p.Arg347His
6	18	22171347	A	T	GATA6	p.Glu68Val
7	3	57268430	A	G	APPL1	p.Ile642Met
8	4	6300847	A	G	WFS1	p.Tyr351Cys
9	18	22171347	A	T	GATA6	p.Glu68Val
10A	10	23192583	C	T	PTF1A	p.Ser18Phe
10B	10	23192583	C	T	PTF1A	p.Ser18Phe
10C	10	23192583	C	T	PTF1A	p.Ser18Phe
11A	6	26092754	ACTA	A	HFE	p.Tyr231del
11B	6	26092754	ACTA	A	HFE	p.Tyr231del
12A	2	88627240	C	G	EIF2AK3	p.Arg12Pro
12B	2	88627240	C	G	EIF2AK3	p.Arg12Pro
13	3	12392650	T	TA	PPARG	p.Tyr173fs
14	3	170998076	G	C	SLC2A2	p.Leu468Val
15	9	133062063	G	A	CEL	p.Ala24Thr
15	2	88586016	C	T	EIF2AK3	p.Arg492Gln

表 1; 若年発症糖尿病患者 29 名とその血縁者において 35 の単一遺伝子異常による糖尿病原因遺伝子に存在した変異 (対象者 ID; 同一数字で A,B,C と記したものは A が発端者、B 以降は罹患血縁者。Chr; 染色体番号 Position; GRCH38 における位置 ref; リファレンス配列 alt; 変異後配列) すべてヘテロ接合体であった。

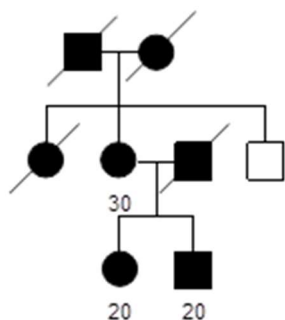


図 1; 対象者 ID 10A, 10B, 10C の家系図
発症年齢を数字で示した 3 名を解析した。■・●が罹患者である。

今後の課題

若年発症糖尿病患者の全エクソンシーケンスにより、新規発症原因変異の同定が可能であることが示された。一方、いまだ多くの患者において発症原因変異の同定に至っておらず、血縁者情報の集積による候補変異の絞り込みや、*in vitro* 解析を進めることにより、変異の病態に及ぼす意義の解明を行うことが重要と考えられた。

第7回万有医学奨励賞－生活習慣病領域－

研究成果報告書（追加助成）＜発表実績/予定一覧＞

所 属	京都大学大学院医学研究科 糖尿病・内分泌・栄養内科学
氏 名	田中大祐

1. 論文発表実績

- ・ 掲載年次順（新しいものから）に記入すること。ただし、本研究助成金交付後のものに限る。
- ・ 論文 PDF 添付ありとなしに分けてリストを作成のこと。
- ・ 著者名、論文名、掲載誌名、巻、最初と最後の頁、発表年(西暦)、査読の有無について記入する。なお、著者名は省略せず、全てを記入し、自分の名前に下線を引く。
- ・ 国内外雑誌を問わない。
- ・ 印刷中は in press と記入、学会のアブストラクトおよび投稿中の論文は含めない。
- ・ 欄が足りない場合は、増やして記入すること。

① <論文 PDF 添付あり>

1	Yuki Fujita, <u>Daisuke Tanaka</u> , Hisato Tatsuoka, Miho Matsubara, Takanori Hyo, Yoshiyuki Hamamoto, Toshiyuki Komiya, Nobuya Inagaki, Yutaka Seino, and Yuji Yamazaki. A novel splice-site mutation of the HNF1B gene in a family with maturity onset diabetes of the young type 5 (MODY5) Endocrinol Diabetes Metab Case Rep. 20-0092, 2020, 査読あり
2	Yanyan Liu , Shin-Ichi Harashima , Yu Wang , Kazuyo Suzuki , Shinsuke Tokumoto , Ryota Usui , Hisato Tatsuoka , <u>Daisuke Tanaka</u> , Daisuke Yabe , Norio Harada , Yoshitaka Hayashi , Nobuya Inagaki. Sphingosine kinase 1-interacting protein is a dual regulator of insulin and incretin secretion. FASEB J. 33: 6239-6253, 2019, 査読あり

② <論文 PDF 添付なし>

1	
2	
3	

2. 学会発表実績		
<ul style="list-style-type: none"> ・ 発表年順（新しいものから）に記入すること。ただし、本研究助成金交付後のものに限る。 ・ 発表学会名、発表者名、演題を記入する。 ・ アブストラクト、プログラム等の PDF を添付すること。 ・ 国内外を問わない。 ・ 欄が足りない場合は、増やして記入すること。 		
	発表時期	発表学会名、発表者名、演題
1	2020年9月	European Association for the Study of Diabetes, 56th Annual Meeting <u>Daisuke Tanaka</u> , Saki Okamoto, Yanyan Liu, Katsumi Iizuka, Yoshiyuki Hamamoto, Yukio Horikawa, Daisuke Yabe, and Nobuya Inagaki 297: Whole-exome sequencing in a family with multiple cases of early-onset diabetes reveals a candidate causative mutation in the PTF1A gene
2	2020年6月	American Diabetes Association, 80th Scientific Sessions <u>Daisuke Tanaka</u> , Saki Okamoto, Yanyan Liu, Katsumi Iizuka, Yoshiyuki Hamamoto, Yukio Horikawa, Daisuke Yabe, and Nobuya Inagaki 1660-P: Exome Sequencing in a Family with Multiple Cases of Early-Onset Diabetes Reveals a Candidate Causative Mutation in the PTF1A Gene
3. 投稿、発表予定（投稿中の論文も含める）		
	投稿/発表時期	雑誌名、学会名等
1		
2		
3		
4		