

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 10 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461348

研究課題名(和文) 1型糖尿病濃厚発症家系を用いた1型糖尿病疾患感受性遺伝子の同定と機能解析

研究課題名(英文) Identification and characterization of susceptible genes to type 1 diabetes using in the clustered family

研究代表者

川畑 由美子 (KAWABATA, Yumiko)

近畿大学・医学部・准教授

研究者番号：80423185

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：現在50以上の1型糖尿病疾患感受性遺伝子座が報告されているが、これら全てをあわせても1型糖尿病の遺伝素因の70-80%しか説明できない。残されたmissing heritabilityの一部は、アレル頻度は低い浸透率が高いrare variantにより説明できる。日本人では1型糖尿病発症頻度が低いので3人以上の同胞発症家系は稀である。我々は4姉妹中3人に1型糖尿病を認め、残りの1人は膵島自己抗体が陽性である1家系を見いだした。これら4姉妹および両親を対象に全エクソームシーケンスを行い、全変異から11の候補変異に絞り込み、さらにゲノム連鎖解析の結果等から1つの変異を候補変異として絞り込んだ。

研究成果の概要(英文)：More than 50 genetic loci have been associated with type 1 diabetes in multiple studies among Caucasian populations, but they have been able to explain only 70-80% of the heritability for type 1 diabetes. Rare variants with high permeability are likely to explain a part of the remaining missing heritability. In Japan, where the prevalence of type 1 diabetes is very low, it is extremely rare for type 1 diabetes to develop in three or more siblings within a family. We found a family, in which type 1 diabetes occurred in three siblings among four sisters and the fourth sister was positive for GAD antibody but had not developed diabetes. To search the rare causative genetic variants, we performed whole-exome sequencing, using parents and four sisters. We narrowed down all exome variants to 11 candidate variants. Moreover, we performed whole-genome linkage analysis. By combining whole-exome sequencing and linkage analysis, we extracted one locus as candidate regions to type 1 diabetes.

研究分野：糖尿病学

キーワード：1型糖尿病 遺伝因子

1. 研究開始当初の背景

1 型糖尿病は主として自己免疫性機序により膵細胞が破壊されることにより引き起こされる。その遺伝子研究が我々を含む内外のグループによって精力的に進められ、複数の遺伝子座が同定されてきた。

欧米白人においては、50 以上の疾患感受性遺伝子座がマッピングされているが、遺伝子本体まで明らかになっているものは、もっとも強く疾患感受性に関与している主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) 領域のほかには、インスリン遺伝子、CTLA4、PTPN22、IL2RA などにすぎない。

一方、GWAS では遺伝子頻度が低い多型 (rare variant) を同定することは原理的に困難である。そのため、頻度的には稀ではあるが、浸透率の高い多型が見逃されている可能性があり、rare variant はいわゆる missing heritability の原因の一つであると考えられている。

欧米白人とは異なる遺伝背景を有する日本人において、濃厚発症家系を見出し解析することで、欧米白人における解析では明らかにできない rare variant を同定できる可能性がある。

日本人では 1 型糖尿病発症頻度が低いことから 3 人以上の同胞発症家系は極めて稀である。我々は、4 姉妹中 3 人に 1 型糖尿病を認め、残りの 1 人も膵島自己抗体が陽性である 1 家系を見出し解析する機会を得た (図 1)。

この家系において、1 型糖尿病発症にもっとも強く関連する HLA クラス II の遺伝子型をタイピングした結果、母と 4 姉妹すべてが *DRB1\*04:05 - DQB1\*04:01* (DR4 ハプロタイプ) と *DRB1\*08:02 - DQB1\*03:02* (DR8 ハプロタイプ) とのヘテロ接合体であった (図 2)。この組み合わせは、1 型糖尿病急性発症典型例において、もっとも高い Odds Ratio (OR=39.3) を示すことを我々は報告している (Kawabata Y et al, *Diabetologia*, 2009. 川畑他, 第 58 回日本糖尿病学会年次学術集会, 2015) (図 3)。家系内に同じ HLA クラス II ハイリスクハプロタイプの組み合わせを有するにも関わらず、1 型糖尿病を発症したものと未発症のものが存在することから、HLA クラス II 領域以外の遺伝因子がこの家系の 1 型糖尿病濃厚発症に関与している可能性が高いと考え解析を開始した。

まず、1 型糖尿病との関連が報告されている *INS*、*CTLA4*、*PTPN22*、*IFIH1*、*SIRT1* について解析を行ったが、いずれの遺伝子座もこの家系の 1 型糖尿病濃厚集積との関連を認めなかった。

そこで、この家系の 1 型糖尿病濃厚集積には GWAS では同定できない rare variant が関与している可能性があると考え、本家系の濃厚発症に関与する遺伝因子の全貌を明らかにするために、全ゲノムシーケンスの手法を用いて解析を進めることとした。

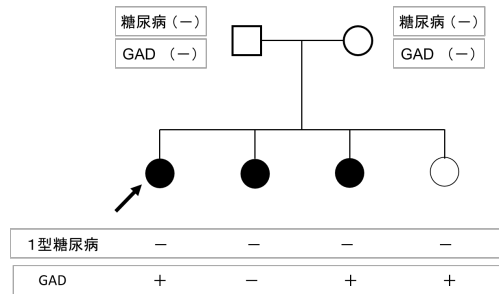


図1 4姉妹中3人に1型糖尿病を認めた1家系(父、母、姉妹4名)

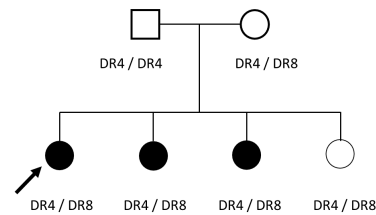


図2 HLA クラス II のタイピング結果

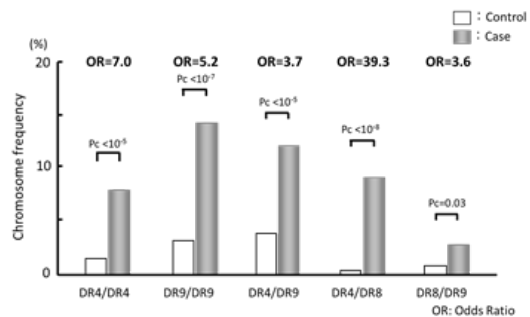


図3 1型糖尿病疾患感受性ハプロタイプの組み合わせの頻度

2. 研究の目的

本研究では、わが国では極めて稀な 1 型糖尿病濃厚発症家系を用いて、ゲノムワイド関連解析では同定できない、アリル頻度は低いが浸透率が高いいわゆる“rare variant”を同定し、1 型糖尿病におけるテーラーメイド医療の構築へと展開することを目的としている。

3. 研究の方法

4 姉妹中 3 人に 1 型糖尿病、1 人に膵島関連自己抗体陽性を認めた 1 家系 6 名(父、母、姉妹 4 名) (図 1) を対象とし、DNA ライブラリーを作成し、HiSeq システムで全エクソームシーケンスを行った。

さらに、エクソームシーケンスで得られた遺伝情報をを用いた全ゲノム連鎖解析を行った。

#### 4. 研究成果

全ゲノムシーケンスの結果、同定された全 variant から、母親をキャリアとするドミナントモデルを想定して変異の絞り込みを行ない、さらに種を超えて保存されている遺伝子による絞り込み、ダメージスコアを考慮に入れた絞り込みの結果、11 変異が抽出された。

一方、1 型糖尿病発症と連鎖する染色体領域の絞り込みのため、全ゲノム連鎖解析を行った。家系のサンプル数が限られるため、ロッドスコアは限定的であるが、10 箇所染色体領域との連鎖が認められた (図 4)。

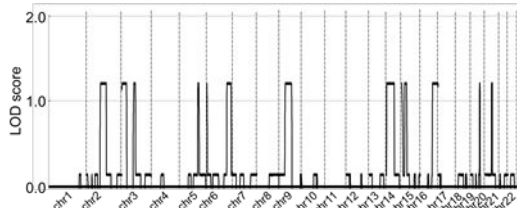


図4 エクソームシーケンスで得られた遺伝情報を用いた全ゲノム連鎖解析

候補 variant として抽出された 11 変異の中から、連鎖解析により 1 型糖尿病発症と連鎖が認められた染色体領域内に存在する 3 変異に候補を絞り込んだ (図 5)。

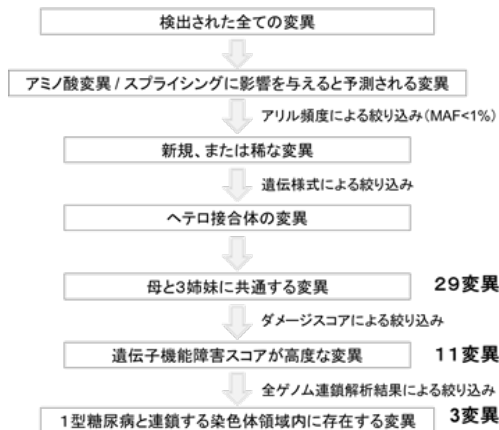


図5 候補変異の抽出

3 変異について、遺伝子変異によるダメージの大きさを評価し、さらに膵島およびリンパ球における遺伝子の発現状況を考慮して、自己免疫への関与が強いと考えられる 1 変異に着目した。

この多型が別の濃厚発症家系発症に関連しているか否かの検討のため、同胞と母に 1 型糖尿病を認める家系 (図 6) について、この多型のタイピングを行ったが、この家系の 1 型糖尿病発症とは関連を認めなかった。すなわち、この多型は家系を超えて 1 型糖尿病発症に関与するものではないことが示唆された。

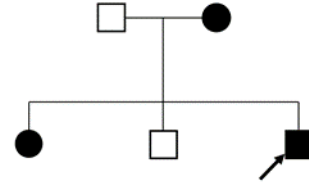


図6 同胞と母に1型糖尿病を認めた1家系

続いて、この多型が日本人 1 型糖尿病患者全体の発症に影響を及ぼしているか否かを明らかにするために、1 型糖尿病の孤発例と健常対象者を用いて Case-Control study を行った。その結果 minor allele が患者群で有意に高頻度を示し、この多型が日本人 1 型糖尿病患者全体の発症に寄与している可能性が示された。

以上の結果から、

全エクソームシーケンスと連鎖解析を用いる手法が 1 型糖尿病濃厚発症の原因遺伝子の探索に有用である可能性が示された。

1 型糖尿病未発症で膵島関連自己抗体陽性の妹を含めた解析との対比により、膵島自己免疫から 1 型糖尿病発症に至る一連のパスウェイ解明につながる可能性が示された。

絞り込まれた 1 多型が Case-Control study において 1 型糖尿病発症との関連を示したことから、濃厚発症家系を用いた rare variant の探索が missing heritability の一部を解明するために有用なアプローチであることが示唆された。

異なる 1 型糖尿病濃厚発症家系では、異なる遺伝子が 1 型糖尿病発症の濃厚集積に関与することが示唆され、濃厚発症家系を集積し遺伝子解析を進めることが 1 型糖尿病発症のメカニズムの解明につながることを示された。

#### 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 9 件)

1. Kawabata Y, Ikegami H(他 4 名、2 番目): A rare HLA genotype in two siblings with type 1 diabetes in a Japanese family clustered with type 1 diabetes. J Diabetes Investig, 査読有, DOI: 10.1111/jdi.12628 (in press)
2. Kawabata Y, Noso S, Babaya N, Hiromine Y(他 7 名、10 番目): Common phenotype and different non-HLA genes in Graves' disease and alopecia areata, Hum Immunol, 査読有, 78:185-189, 2017

3. Kawabata Y, Ikegami H, (他 16 名、11 番目) : Risk factors for sudden death and cardiac arrest at the onset of fulminant type 1 diabetes mellitus, *Diabetol Int*, 査読有, 7:281-288, 2016
4. Ikegami H, Kawabata Y, Noso S: Immune checkpoint therapy and type 1 diabetes, *Diabetol Int*, 査読有, 7, 221-227, 2016
5. Kawabata Y, Ikegami H (他 14 名、10 番目) : Clinical and Genetic Characteristics of Non-Insulin-Requiring Glutamic Acid Decarboxylase (GAD) Autoantibody-Positive Diabetes: A Nationwide Survey in Japan, *PLoS One*, 査読有, 11:e0155643, 2016
6. Kawabata Y, Hiromine Y, Noso S, Ikegami H (他 7 名、6 番目) : Low programmed cell death-1(PD-1) expression in peripheral CD4+ T cells in Japanese patients with autoimmune type 1 diabetes, *Clin Exp Immunol*, 査読有, 180, 452-457, 2015
7. Kawabata Y, Noso S, Babaya N, Hiromine Y, Ikegami H (他 8 名、12 番目) : Organ Specificity in Autoimmune Diseases: Thyroid and Islet Autoimmunity in Alopecia Areata, *J Clin Endocrinol Metab*, 査読有, 100, 1976-1983, 2015
8. Kawabata Y, Ikegami H (他 26 名、19 番目) : Diagnostic criteria for slowly progressive insulin-dependent (type 1) diabetes mellitus (SPIDDM) (2012): report by the Committee on Slowly Progressive Insulin-Dependent (Type 1) Diabetes Mellitus of the Japan Diabetes Society, *Diabetol Int*, 査読有, 6:1-7, 2015
9. Ikegami H (他 331 名、117 番目) : Genome-wide trans-ancestry meta-analysis provides insight into the genetic architecture of type 2 diabetes susceptibility. *Nat Genet*, 査読有, 46:234-244, 2014

〔学会発表〕(計 8 件)

1. Noso S, Hosomichi K, Babaya N, Hiromine Y, Ito H, Taketomo Y, Kawabata Y, Ikegami H: Identification of Genetic Variants co-segregated with Islet Autoimmunity in Multiplex Families of Type 1 Diabetes by Genome-wide Exome Analysis, *Immunology of Diabetes Society, 15th International Congress*, 2017.1.20, San Francisco (USA)
2. 川畑由美子, 池上博司: 1 型糖尿病が濃厚集積した 1 家系:HLA との関連の検討, 第 59 回日本糖尿病学会年次学術集会, 2016.5.20, 国立京都国際会館(京都市)
3. 池上博司, 能宗伸輔, 川畑由美子: 1 型糖尿病の遺伝因子:濃厚集積家系の解析, 第 59 回日本糖尿病学会年次学術集会, 2016.5.19, 国立京都国際会館(京都市)

4. 川畑由美子, 能宗伸輔, 馬場谷成, 廣峰義久, 細道一善, 前川聡, 池上博司: 全エクソーム解析を用いた 1 型糖尿病濃厚発症家系における原因遺伝子変異の探索, 第 89 回日本内分泌学会学術総会, 2016.4.22, 国立京都国際会館(京都市)
5. 川畑由美子, 能宗伸輔, 馬場谷成, 廣峰義久, 池上博司(他 5 名、9 番目): 自己免疫性 1 型糖尿病の細胞機能廃絶に関わる臨床指標と遺伝因子の解明, 第 113 回日本内科学会総会・講演会, 2016.4.17, 東京国際フォーラム(東京)
6. 池上博司, 能宗伸輔, 川畑由美子: 1 型糖尿病の遺伝解析: 遺伝子と機能, 第 13 回 1 型糖尿病研究会, 2015.11.1, 2015, TKP ガーデンシティ PREMIUM 神保町(東京)
7. 川畑由美子, 能宗伸輔, 池上博司: 1 型糖尿病の遺伝: common variant から rare variant まで, 第 58 回日本糖尿病学会年次学術集会, 2015.5.23, ぱしふいっくびいなす(下関市)
8. Noso S, Kawabata Y, Babaya N, Hiromine Y, Hosomichi K, Ikegami H: Identification of genetic loci linked to type 1 diabetes susceptibility by linkage analysis with whole exome sequencing in clustered family, 2015.4.13, Munich (Germany)

〔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〕  
 ホームページ等

6. 研究組織  
 (1) 研究代表者  
 川畑 由美子 (KAWABATA, Yumiko)  
 近畿大学・医学部・准教授

研究者番号：80423185

(2)研究分担者

池上 博司 (IKEGAMI, Hiroshi)

近畿大学・医学部・教授

研究者番号：20221062

能宗 伸輔 (NOSO, Shinsuke)

近畿大学・医学部・講師

研究者番号：90460849

馬場谷 成 (BABAYA, Naru)

近畿大学・医学部・講師

研究者番号：10449837

廣峰 義久 (HIROMINE, Yoshihisa)

近畿大学・医学部・講師

研究者番号：30460851

(3)連携研究者：なし

(4)研究協力者

前川 聡 (MAEGAWA, Hiroshi)

滋賀医科大学・医学部・教授

研究者番号：00209363