

受賞者

長嶋 一昭

京都大学大学院研究科 糖尿病・栄養内科学

研究テーマ

1万人コホートをを用いた K_{ATP} チャネル遺伝子異常糖尿病のゲノム疫学・病態・薬剤反応性に関する検討

1. はじめに

新生児糖尿病の発症原因として、 K_{ATP} チャネルを構成する Kir6.2 の遺伝子点変異が報告され、更に成人発症糖尿病の原因ともなりうるということが明らかになった。本申請研究は、京都大学医学研究科と長浜市との間で進めている 1 万人を対象にしたゲノム疫学コホートで得られる疫学的データ収集基盤、京都大学医学部附属病院および研究協力施設を含む糖尿病家族歴濃厚家系の収集基盤を背景に、日本人における K_{ATP} チャネル遺伝子異常による糖尿病（新生児発症、若年発症、成人発症を含む）に関して、変異部位の同定を行い、同定された同遺伝子上変異部位と主に治療薬反応性の変化との関連性に関して検討することを目的とする。特に *in vitro* での治療薬処方前の薬効評価が可能となる可能性を有し、ヒトゲノムテーラーメイド医療の先駆的モデルケースとして K_{ATP} チャネル遺伝子異常糖尿病の遺伝子変異部位に応じた治療薬選択のための論拠提供を目指すことを最終的な目標とする。

2. 方法

1) 糖尿病患者における新たな K_{ATP} チャネル遺伝子変異部位の同定

京都大学医学研究科は、滋賀県長浜市との間で 1 万人を対象にしたゲノム疫学コホート「ながはま 0 次予防コホート事業」の協定を締結し日本人生活習慣病遺伝子解明の基盤整備のために準備を進めており、本申請者は糖尿病の分野でこのコホート研究に参画している。これら疫学的データ収集基盤と、京都大学医学部附属病院および研究協力施設からの解析依頼を含む数多くの糖尿病発症に関して遺伝的負荷濃厚と考えられる症例を抽出・収集し、医の倫理委員会で承認された研究参加に関する同意書にて承諾を取得後、ゲノム DNA 採取のための採血および臨床データの収集を行った。

2) 糖尿病発症に関わる遺伝子変異の同定

集積された患者検体のうち、新生児糖尿病および MODY 様の臨床経過を示すものに対しては主に Kir6.2 遺伝子に関して DNA シークエンサーにて遺伝子変異の有無に関して検討し、3 世代以上にわたり糖尿病患者を有する糖尿病家族歴濃厚家系に対しては、抽出したゲノム DNA を用いて連鎖解析を行い、糖尿病感受性遺伝子群の絞り込みを行った。連鎖解析は、各単一家系内検体のみでの解析と多家家系集積検体を用いた解析を行い、各々で、「常染色体優性」、「locus heterogeneity を仮定した解析」および「遺伝様式を仮定しない nonparametric 解析」の 3 様式で解析を行った。全ゲノムの連鎖解析が終了した家系で、有意な連鎖が認められた領域に関して、fine mapping を行い領域の絞り込みを行い、さらに疾患感受性遺伝子の絞り込みを行った。

3) 同定された遺伝子変異部位に対する薬剤反応性の変化に関する検討

同定された K_{ATP} チャネル遺伝子変異部位による薬剤反応性の変化に関して、哺乳動物細胞（COS1 細胞）に変異 K_{ATP} チャネルを発現させた再構成系を用いて *in vitro* 解析により直接的に検討した。

4) 各遺伝子変異部位による薬剤反応性変化に基づいた新たな治療薬選択指針の提示

同チャンネル遺伝子異常を検討し、*in vitro*でのチャンネル特性変化の検討と臨床使用可能な経口血糖降下薬の薬剤反応性変化を検討・並列比較し、患者の内因性インスリン分泌能（糖負荷試験、食事負荷試験、尿中C-ペプチド排泄量等）とインスリン抵抗性データを評価項目に含む、 K_{ATP} チャンネル遺伝子変異部位に応じた治療薬選択のための論拠提供を目指す。

3. 結果 研究成果

京都大学医学部附属病院および関連病院において、3世代にわたる糖尿病患者を有する家系の調査を行い、15家系（100名）以上の研究参加の承諾を得、採血を行った。5家系については、連鎖解析が完了した。5家系での連鎖解析の結果、ある染色体領域に有意な連鎖を認めた（LOD Score 2.19, NPL Score 4.66; $p < 0.0004$ ）。さらに同領域に関して、1cMの解像度でfine-mappingを行い連鎖領域を絞り込み、連鎖領域を23Mbに絞りこんだ。現在、絞り込まれた候補領域中に存在する遺伝子群から、候補遺伝子を選択し、両端100bpをふくむ全エクソンの配列の決定が順次進行中である。

一方、コホートのデータベース整理に関しては、従来から進めている1万人を対象にしたゲノム疫学コホート事業（ながはま0次予防コホート事業）に加えて、すでにコホートが進行している秋田県能代市（能代コホート）および岐阜県高山市（丹生川村コホート）の協力を受け、ゲノムデータ集積基盤を固めている。秋田県能代市では、1998年にコホートがスタートし、10年間におよぶ約3500人の健診データおよび血液検体が、岐阜県高山市では2004年にコホートがスタートし、約1000名の臨床情報および血液検体が保存・管理されている。既に京都大学での倫理委員会での承認は完了し、市長との懇談で、新たに「体質予防プロジェクト」として我々と共同して取り組むよう要請を受けている。今後、住民への研究協力および検体使用の承諾書の取得作業を進めていく予定である。丹生川村コホートでは2002年からの追跡が完了し、現在、データの入力作業を行っている。既に入力の完了している2002～2004年のデータを用いた解析では、年齢、体重増加が糖尿病発症リスク要因であることが見いだされ、経年的に大きく HbA_{1c} が増加する感受性の高い個体が見いだされ、これらの高感受性者は遺伝子解析の候補と考えられた。

また、主に新生児糖尿病等により研究協力病院等からの症例に関する候補遺伝子（Kir6.2遺伝子）解析に関する検討により、Kir6.2遺伝子上の複数部位での遺伝子変異を同定し、*in vitro*機能解析により、同遺伝子異常によりATP感受性の減弱、チャンネル活性上昇、細胞膜面へのチャンネル発現量低下など遺伝子変異によるチャンネル機能異常が明らかとなった。

4. 考察・まとめ

3世代以上にわたる糖尿病家族歴を有する遺伝的負荷濃厚症例を集積した上での連鎖解析および新生児期に耐糖能異常の既往を有する特徴的な臨床経過を有する症例における K_{ATP} チャンネル遺伝子異常に焦点を絞った解析により、前者では従来から行われているGWASでの解析に比べて小規模の検体数でより効率的な疾患発症原因遺伝子の絞り込みができ、後者では特徴的な臨床経過により対象を絞った上での解析のため同遺伝子異常同定頻度の向上が期待できると考えられた。今後も、更なる新規糖尿病感受性遺伝子および当該遺伝子上の様々な変異部位の同定を行い、順次、治療薬反応性の評価を検討することで、遺伝子変異部位に応じた糖尿病治療薬の処方前*in vitro*評価に寄与する知見が集積

できるよう検討を進めていく予定である。

最後に、本研究の遂行にあたり貴重な研究助成金を交付頂いた財団法人病態代謝研究会に深謝いたします。

5. 発表論文、参考文献

1) Béguin P, Nagashima K, Mahalakshmi RN, Ng MY, Ng YJA, Tay HS, Hwang LA, Firsov D, Tang BL, Mori Y, Inagaki N, Seino S, Hunziker W. VGCC-BARP: a novel regulator of voltage-gated Ca²⁺-channels and calcium-dependent exocytosis. *Neuron* (on revision).