

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成30年 6月17日現在

機関番号：84427

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09636

研究課題名(和文)原因不明の単一遺伝子性糖尿病における既知遺伝子内変異の再検索

研究課題名(英文)A search for known gene mutations in suspected monogenic diabetes.

研究代表者

依藤 亨(Yorifuji, Tohru)

地方独立行政法人大阪市民病院機構大阪市立総合医療センター(臨床研究センター)・臨床研究センター・部長

研究者番号：60220779

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：新生児糖尿病とMODYについて既知遺伝子の包括的解析を行い、その遺伝背景を明らかにするとともに、治療反応性の検討を行った。新生児糖尿病70名中、25名にATP感受性カリウムチャンネル遺伝子の変異を同定した。うち、重症例17名中15例にスルホニル尿素剤治療が著効し、5名では神経学的改善を認められた。また、MODY 213家系の包括的遺伝子解析で103家系に既知遺伝子変異を同定した。さらに遺伝子変異が同定できなかった症例中3例に染色体6q24部位のインプリント異常を同定した。それ以外の変異同定できない症例は早発2型糖尿病の特徴を持ち、母系遺伝優位の非メンデル遺伝が特徴であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We screened for mutations in the known causative genes in 70 Japanese patients with neonatal diabetes and in 213 with MODY-like diabetes. Mutations in the KATP-channel genes were identified in 25 with neonatal diabetes. Sulfonylurea treatment was efficacious in 15 out of 17 patients, and 14 of them could be switched from insulin to sulfonylurea. In 5 of them, neurological improvement was also demonstrated. Among 103 families with MODY, mutations in the major MODY genes were identified in 103. We also identified chromosome 6q24 abnormality as a novel etiology of MODY-like diabetes. Those without mutations in the known genes showed characteristics of early-onset type 2 diabetes. Interestingly, the inheritance was maternal dominant. Non-Mendelian inheritance should be considered as a cause of unknown MODY-like diabetes.

研究分野：小児代謝内分泌学

キーワード：新生児糖尿病 MODY 遺伝子異常 個別化医療

1. 研究開始当初の背景

生後 6 か月未満発症の新生児糖尿病 (NDM) と若年発症優性遺伝性糖尿病 (MODY) に代表される単一遺伝子性糖尿病については、それぞれ多くの原因遺伝子が既に同定されている。変異遺伝子によって治療反応性が異なるものが多く、この分野での個別化医療(精密医療)が進みつつある。また、欧米では臨床的に NDM または MODY と診断された患者の大部分に既知遺伝子の変異が同定される。一方、我が国の NDM については、遺伝子変異のまとまった解析が行われておらず、変異スペクトルや臨床像が明らかでない。また、MODY については成人領域を中心に変異解析が行われているが、既知の原因遺伝子変異の同定率が欧米と比べて著しく低い。臨床的にも我が国の MODY はその 95%以上が診断されておらず、一般的な 1 型、2 型糖尿病として治療されていると考えられる。すなわち、NDM、MODY のいずれにおいても、我が国では遺伝子診断が行われておらず、不適切な医療を受けている可能性が高い。

2. 研究の目的

本研究では、臨床的に MODY または新生児糖尿病と診断される日本人患者について、Sanger シーケンスや次世代シーケンサを用いたパネル解析を行い、既知遺伝子内の変異を網羅的に解析する。既知遺伝子のプロモータ領域、イントロン領域などに変異がある可能性もあり、次世代シーケンサを用いた検索を行なうことで、我が国の NDM、MODY の遺伝背景を明らかにする。これらの研究の成果を、罹患者に対する精密医療の達成と、未知の遺伝子同定に進むための基盤とする。

3. 研究の方法

(1) 臨床的に NDM または MODY と診断される患者の末梢血 DNA を臨床情報とともに集積し、臨床像から可能性の高い原因遺伝子を対象に Sanger シーケンスにより変異解析を行う。

(2) 上記の解析で変異が同定できない患者について、さらに他の既知遺伝子変異の解析を進める。この目的で、従来の Sanger シーケンスのみではなく、次世代シーケンサを用いたパネル解析の系を確立して使用する。

(3) 変異解析にあたっては、既知遺伝子のエクソン、エクソンイントロン境界領域だけではなく、プロモータ、イントロン領域を含めた次世代シーケンスにより非翻訳領域内の変異が原因になる可能性を検討する。

(4) 変異同定できた患者については、担当医とコンタクトし変異情報を用いた医療として診療の場に還元する。

(5) これらの方法で変異が同定できない患者について、その臨床的特徴を検討し、将来の未知遺伝子同定のための基礎資料とする。

4. 研究成果

(1) 検体の収集

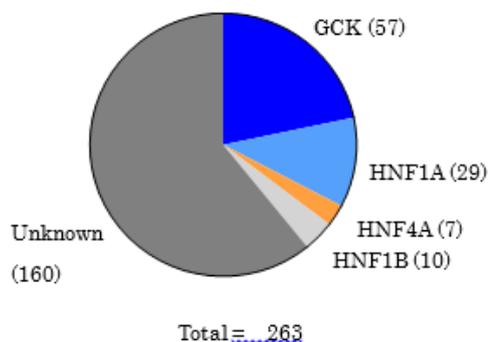
大阪市立総合医療センター臨床研究倫理委員会の承認 (no742) のもとで、本人または保護者からの同意の上で検体収集を行った。検体は日本各地から収集し、期間内に NDM、MODY を合わせて 531 検体を臨床データとともに集積した。

(2) 既知変異遺伝子解析のための方法

従来の Sanger シーケンスの系に加え、IonPGM を用いた次世代シーケンス用のパネルを作成し、使用した。パネル内には糖代謝関連遺伝子として 35 遺伝子を載せた。

(3) 既知遺伝子内変異検索の結果

MODYについては、収集した検体のうち独立した263家系について解析を行った。103家系(39.2%)について、遺伝子変異を同定した。既知遺伝子内の変異の内訳は下図のとおりであった。



偶然の高血糖で発見されたものと高血糖症状で発見されたもの両方を含むため、全体としてはGCK遺伝子変異が最も多かったが、GCK変異陽性者で高血糖症状をきたしてもものは1例もなく、高血糖症状で同定されたものでは、HNF1BとHNF1A遺伝子変異のものが多かった。

NDMの70例では、KATPチャネル遺伝子(KCNJ11またはABCC8)の変異を25例に同定した。18例は永続性NDMで7例は一過性NDMであった。

(4) 変異陽性の場合の診療への還元

KATPチャネル遺伝子変異をもつ永続性NDMでインスリン治療が行われていた18例の担当医にスルホニル尿素剤治療の可能性を伝えたところ、うち16例に治療が試みられた。その結果、14例がインスリンからの完全離脱、1例でインスリンの減量が可能となった。インスリン離脱が可能であった症例のうち、最年長は24歳であった。インスリン離脱後の糖尿病コントロールは良好で、平均HbA1cは6.4%であ

った。

(5) 変異陰性者の臨床的特徴

MODYの既知遺伝子変異陰性者の特徴として、変異陽性者と比較して有意に発症年齢が高く、BMIパーセンタイルが高値であり、若年発症2型糖尿病と共通する特徴もっていた。すなわち、変異陰性者の中には多くの若年発症2型糖尿病が含まれていることが推測された。興味深いことに、変異陽性者では糖尿病の親由来が父母同等なのに対して、変異陰性者では有意に母由来が多いことが明らかになった。また、両親とも糖尿病の場合には既知遺伝子変異陽性のは見られなかった。変異陰性者の原因検索にあたり、通常のメンデル遺伝をする遺伝子のみを対象とするのではなく、環境要因なども含めた非メンデル遺伝を考慮する必要が示唆された。

(7) あらたなMODY様糖尿病の原因同定
既知遺伝子変異陰性症例113例に対して通常新生児一過性糖尿病の原因とされる染色体6q24インプリント領域のメチル化異常の有無をメチル化特異的PCRによって検索したところ、3例に父性片親性ダイソミーを同定した。新生児期にNDMの既往はなく、臨床的にはMODYと鑑別が困難であった。全例、低出生体重児で在胎中にはインスリン欠乏状態が存在したことが推測された。すなわち、何らかの理由で出生前に治癒に至った症例が、年長になって再発をきたしたものと考えられた。低出生体重歴のない症例を検索したところでは1例も同定できなかったが、低出生体重歴のあるMODYでは稀ではない可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件

- (1) Yorifuji T, Higuchi S, Kawakita R, Hosokawa Y, Aoyama T, Murakami A, Kawae Y, Hatake K, Nagasaka H, Tamagawa N. Genetic basis of early-onset, MODY-like diabetes in Japan and features of patients without mutations in the major MODY genes: dominance of maternal inheritance. *Pediatr Diabetes* 2018 (in press), 査読あり。
- (2) 依藤 亨 ゲノムインプリンティング異常による糖代謝異常症 内分泌・糖尿病・代謝内科 2018;46:195-199. 査読なし。
- (3) Yorifuji T, Higuchi S, Hosokawa Y, Kawakita R. Chromosome 6q24-related diabetes mellitus. *Clin Pediatr Endocrinol*. 2018;27(2):59-65. doi: 10.1297/cpe.27.59. 査読あり。
- (4) Matsukura H, Nagamori M, Miya K, Yorifuji T. MODY3, renal cysts, and Dandy-Walker variants with a microdeletion spanning the HNF1A gene. *Clin Nephrol*. 2017;88:162-166. doi: 10.5414/CN109149. 査読あり。
- (5) 依藤 亨 6q24 関連糖尿病 医学のあゆみ 2017; 263: 313-316. 査読なし。
- (6) Hashimoto Y, Dateki S, Hirose M, Satomura K, Sawada H, Mizuno H, Sugihara S, Maruyama K, Urakami T, Sugawara H, Shirai K, Yorifuji T. Molecular and clinical features of K_{ATP} -channel neonatal diabetes mellitus in Japan. *Pediatr Diabetes* 2017;18:532-539. doi:10.1111/vedi.12447. 査読あり。
- (7) 依藤 亨 GCK-MODY;常識の誤りとパラダイムシフト *BIO Clinica* 2017; 32: 78-80. 査読なし。
- (8) Okuno M, Yorifuji T, Kagami M, Ayabe T, Urakami T, Kawamura T, Kikuchi N, Yokota I, Kikuchi T, Amemiya S, Suzuki J, Ogata T, Sugihara S, Fukami M, The Japanese Study Group of Insulin Therapy for Childhood and Adolescent Diabetes (JSGIT) Chromosome 6q24 methylation defects are uncommon in childhood-onset non-autoimmune diabetes mellitus patients born appropriate- or large-for-gestational age. *Clin Pediatr Endocrinol* 2016; 25: 99-102. 査読あり。
- (9) Heneberg P, Malá M, Yorifuji T, Gat-Yablonski G, Lebenthal Y, Tajima T, Nogaroto V, Rypáčková B, Kocková L, Urbanová J, Anděl M. Low Frequencies of Autoimmunity-Associated PTPN22 Polymorphisms in MODY Patients, Including Those Transiently Expressing Islet Cell Autoantibodies. *Int Arch Allergy Immunol*. 2015 Apr 18;166(3):189-198. doi: 10.1159/000380853 査読あり。
- (10) 依藤 亨、榊原杏美、橋本有紀子、細川悠紀、藤丸季可、川北理恵、玉

川信吉、畑毛一枝、井澤雅子、鈴木潤一、松原圭子、鏡 雅代 MODY型の非肥満若年発症糖尿病の新たな発症分子機構の同定 ホルモンと臨床 2015; 1:27-30. 査読なし。

[学会発表] 計28件

(1) 2018.05.24 依藤 亨ほか 日本人MODYの遺伝学的背景 第61回日本糖尿病学会学術集会(口演、東京)

(2) 2018.04.26 依藤 亨 先天性血糖異常症の新しい治療 第91回日本内分泌学会(シンポジウム10、シンポジスト、宮崎)

(3) 2017.11.16 依藤 亨 6q24関連糖尿病 第62回日本人類遺伝学会(シンポジスト講演、神戸)

(4) 2017.11.16 依藤 亨 小児内分泌領域での小児内分泌領域での個別化医療 第62回日本人類遺伝学会(シンポジスト講演、神戸)

(5) 2017.09.30 Tohru Yorifuji. What's new in MODY? 2017 International Congress of Diabetes & Metabolism. (Invited symposium speaker, Seoul)

(6) 2017.09.30 Tohru Yorifuji. Epigenetics in neonatal diabetes mellitus and hyperinsulinism. 10th International Meeting of Pediatric Endocrinology. (Invited symposium speaker, Washington D.C.).

(7) 2017.05.19 細川悠紀ほか グルコキナーゼ遺伝子変異を有する妊婦の周産期予後の検討 第60回日本糖尿病学会(口演、名古屋)

(8) 2017.05.20 Tohru Yorifuji. Molecular analysis of suspected monogenic diabetes in children: experience of 476 cases. The 9th Scientific Meeting of the Asian Association for the Study of Diabetes. (Invited lecture, Nagoya)

(9) 2017.04.20 依藤 亨 ゲノムインプリンティング異常による糖代謝異常症 第90回日本内分泌学会(クリニカルアワー、京都)

(10) 2017.04.20 依藤 亨 MODY型糖尿病の新たな発症分子機構(6q24インプリンティング異常症) 第90回日本内分泌学会(シンポジウム2、京都)

(11) 2016.10.30 Tohru Yorifuji. Blood glucose abnormalities in mitochondrial disorders. 13th Conference of Asian Society for Mitochondrial Research and Medicine [ASMRM] and 16th Conference of Japanese Society of Mitochondrial Research and Medicine [J-mit] (Invited lecture, Tokyo)

(12) 2016.04.22 依藤亨ほか 6q24関連糖尿病:低出生体重歴のあるMODY型非肥満糖尿病の主要な原因 第89回日本内分泌学会[02-7-6] 京都

(13) 2015.10.08 橋本有紀子ほか 遺伝子診断された永続性新生児糖尿病の臨床経過 第49回日本小児内分泌学会02-5(口演、東京)

(14) 2015.10.08 依藤 亨ほか MODY型非肥満若年発症糖尿病の新たな発症分子機構の同定 第49回日本小児内分泌学会SP2(口演、東京)

(15) 2015.06.12 依藤 亨 小児糖尿病・低血糖症の personalized medicine Hokkaido Endo Forum (特別講演、札幌)

(16) 2015/05/21 依藤 亨ほか MODY型の非肥満若年発症糖尿病の新たな発症分子機構の同定 第58回日本糖尿病学会学術集会 (口演 II-4-8、下関)

(17) 2015/05/21 依藤 亨 小児科における遺伝性糖尿病診断の実態 第58回日本糖尿病学会学術集会 (シンポジスト 下関)

(18) 2015/4/25 川北理恵ほか MODY5の臨床像 第88回日本内分泌学会学術総会 (P3-17-2)

(19) 2015/4/23 橋本有紀子ほか HNF4A 変異の臨床像 第88回日本内分泌学会学術総会 (01-8-12、東京)

(20) 2015/4/16 Rie Kawakita et al. Clinical and molecular characteristics of MODY5. 11th Asian Society for Pediatric Research (2A0-060, Osaka)

〔図書〕 計1件

(1) 依藤 亨 C-1 単一遺伝子性糖尿病小児思春期糖尿病コンセンサスガイドライン 2015, 南江堂 pp26-30

〔産業財産権〕

なし

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

依藤 亨 (Tohru Yorifuji)

大阪市立総合医療センター小児代謝内分泌内科・部長・研究者番号60220779

(2) 研究協力者

① 細川悠紀 (Yuki Hosokawa)

大阪市立総合医療センター小児代謝・内分泌内科・医員・研究者番号なし

② 川北理恵 (Rie Kawakita)

大阪市立総合医療センター小児代謝・内分泌内科・医員・研究者番号なし

③ 橋本有紀子 (Yukiko Hashimoto)

大阪市立総合医療センター小児代謝・内分泌内科・医員・研究者番号なし

④ 榊原杏美 (Azumi Sakakibara)

大阪市立総合医療センター小児代謝・内分泌内科・医員・研究者番号なし

⑤ 樋口真司 (Shinji Higuchi)

大阪市立総合医療センター小児代謝・内分泌内科・医員・研究者番号なし