

令和元年6月7日現在

機関番号：82612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15491

研究課題名(和文)新規アプローチによる1型糖尿病発症機序の解明

研究課題名(英文)Clarification of molecular basis of type 1 diabetes using novel technologies

研究代表者

深見 真紀 (Fukami, Maki)

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・分子内分泌研究部・部長

研究者番号：40265872

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、次世代シーケンスを含む最新の技術を用いて1型糖尿病患者の遺伝子解析を行った。その結果、PTPN2, CD101, KLF11, RFX6などの遺伝子の異常が日本人における1型糖尿病の発症に関与していることが明らかとなった。また、既知の糖尿病関連遺伝子の中では、INS, HNF1A, HNF4A, HNF1Bが、小児期発症1B型糖尿病の原因遺伝子としてとくに重要であることが見いだされた。また17q12-q21領域の多型が低年齢小児における糖尿病のリスクに関連することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

1型糖尿病は、生涯にわたる治療を必要とし、また多彩な合併症を招きうる難治性疾患である。本症の発症原因には未解明の点が多い。本研究では、日本人患者における既知遺伝子変異の特徴を明らかとし、また、1型糖尿病に関与すると推測される新たな遺伝子変異を明らかとした。これらの知見は、人種特異的な1型糖尿病の発症メカニズムの解明につながる。

研究成果の概要(英文)：Type 1 diabetes (T1D) is a multifactorial disorder, whose genetic basis is only partly understood. Here, we performed systematic molecular analysis for Japanese patients with this condition. We employed next generation sequencing and other new technologies. As a result, we identified novel T1D-associated genes such as PTPN2 and CD101. We also clarified clinical significance of rare variants in KLF11, RFX6, and other genes as the genetic causes of T1D. Furthermore, we found that a cis-regulatory haplotype at 17q12-q21 plays a role in the early-onset type 1 diabetes. These findings expand the current understanding of the etiology of type 1 diabetes.

研究分野：分子内分泌学

キーワード：遺伝子 疾患 感受性

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

1型糖尿病は、遺伝的因子と環境因子の両者が関与する多因子遺伝疾患である。本症は、生涯にわたる治療を必要とし、また多彩な合併症を招きうる難治性疾患である。本症には明確な家族集積性が認められ、遺伝的因子の関与が大きいことが示唆される。これまでに1型糖尿病の疾患関連遺伝子として、HLA や PTPN22 を含む 50 以上の遺伝子が単離されているが、患者の 20-30% を占める既知責任遺伝子変異陰性例の発症機序は不明である。とくに、日本人患者における発症原因は解明されていない。

従来、1型糖尿病などの多因子疾患関連遺伝子の探索には、ゲノム関連解析と候補遺伝子シーケンスが用いられてきた。しかしゲノム関連解析では、一般集団における頻度が 0.5% 以下のまれな疾患関連座位を同定することは不可能である。また、候補遺伝子シーケンスでは、新たな疾患原因遺伝子を単離することはできない。そのため、多くの未同定の1型糖尿病関連遺伝子が存在する可能性が否定できない。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、従来法とは異なるアプローチによって1型糖尿病の新規発症機序を解明することである。本研究では、多数の日本人小児期発症1型糖尿病患者を対象として、網羅的変異スクリーニングを行った。さらにその結果に基づいてバイオインフォマティクス解析や細胞発現実験を行い、1型糖尿病の発症に関与する新たな遺伝学的因子を同定した。

### 3. 研究の方法

#### 研究項目 1

これまでに集積した患者を対象として、次世代シーケンサー遺伝子パネルを用いた既知疾患原因遺伝子および候補遺伝子の網羅的変異スクリーニングを行った。同定された塩基置換の病的意義の有無は、バイオインフォマティクス解析、家族解析、細胞発現実験などを用いて評価した。

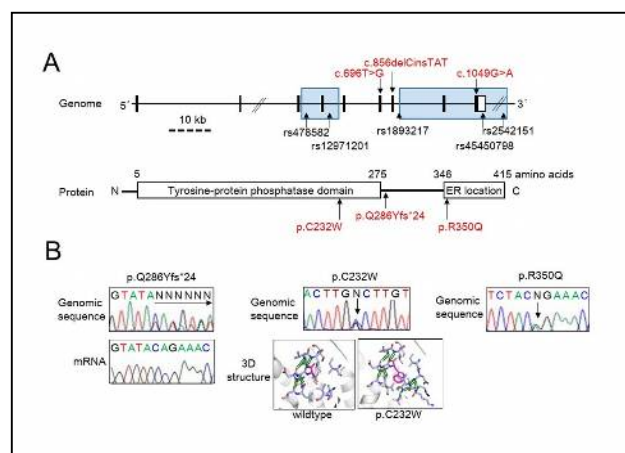
#### 研究項目 2

複数の糖尿病患者を有する家系において全エクソーム解析を行い、疾患に連鎖した塩基置換を抽出した。次いで、孤発例を対象として抽出された遺伝子のシーケンス解析を行った。さらに、変異陽性患者由来末梢血の fluorescence-activated cell sorting (FACS) 解析を行い、変異体タンパクの機能を評価した。

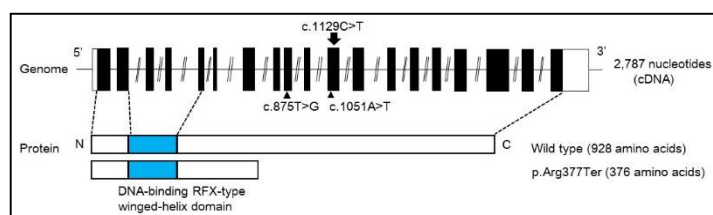
### 4. 研究成果

#### 研究項目 1

① 1型糖尿病患者 3 例において、疾患に関与されると推測される PTPN22 遺伝子内ヘテロ接合性バリエーション (p.Q286Yfs\*24, p.C232W, p.R350Q) を同定した(下図)。このうち、p.Q286Yfs\*24 は当該患者のゲノム DNA には存在したが mRNA 中には検出されず、nonsense-mediated mRNA decay によって早期に分解されることが示唆された。また、バイオインフォマティクス解析では p.C232W が明瞭なタンパク立体構造変化を招くことが示唆された。これらの塩基置換は、PTPN22 近傍の既知糖尿病関連 SNP の連鎖不平衡領域の外に位置していた。変異陽性患者には明らかな合併症を認めなかった。患者は HLA リスクアリルを有していた。以上の成績は、PTPN22 が新規 1 型糖尿病発症関連遺伝子であることを示唆するものである。今回同定された変異は、既知疾患 SNP と連鎖しない独立したリスクアリルを形成していることから、1A 型糖尿病の missing heritability に寄与する可能性がある。

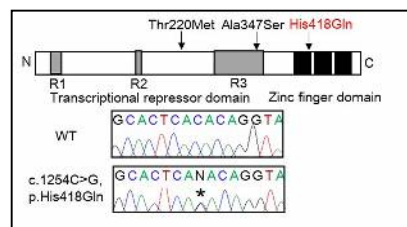


② RFX6 ヘテロ接合性ナンセンスバリエーション (p.Arg377Ter) を有する糖尿病患者家系を同定した(下図)。これまでにヘテロ接合性 RFX6 変異は思春期以降に発症する糖尿病を招くこと、

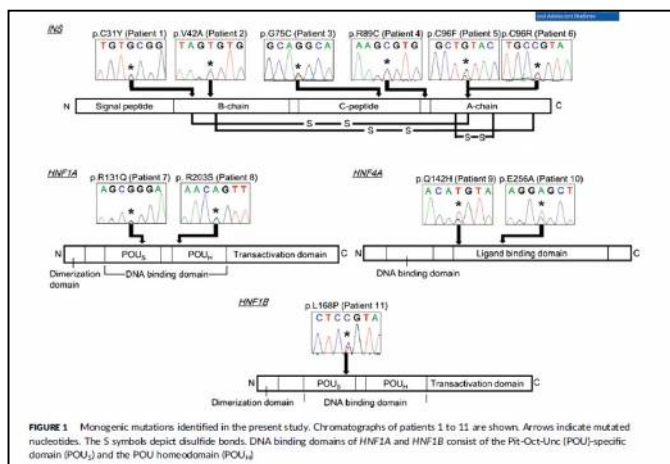


その浸透率は比較的低いことが見いだされている。しかし、RFX6 異常症の表現型は十分解明されていなかった。本研究によって、RFX6 半量不全が同一家系内においても異なる重症度の糖尿病を招くこと、さらにその表現型には思春期前発症糖尿病と妊娠糖尿病が含まれることが明らかとなった。

- ③ 1b 型糖尿病と診断された 1 家系において新規 KLF11 ミスセンスバリエント(pHis418Gln)を同定した(下図)。KLF11 は MODY7 として知られる遺伝子であるが、この遺伝子の異常がどのような病態を招くかは不明であった。発端者と妹は 1 歳時に高血糖を指摘され、母は 4 歳時に糖尿病と診断された。この 3 名の患者は、発症後すぐにインスリン投与を必要とした。3 例ともに肥満はなく、膵島自己抗体は陰性であった。パイオインフォマティクス解析では、このバリエントが機能的に重要なドメインの構造変化を招くことが示唆された。6×GC box を搭載したルシフェラーゼレポーターを用いた *in vitro* 機能解析では、このバリエントが正常なタンパク局在を示すが、転写抑制機能を喪失していることが示唆された。さらに重要な点として、このバリエントは、共存する野生型タンパクの転写抑制機能を阻害することが見いだされた。以上の成績は、優性阻害効果を有する KLF11 バリエントが、不完全な浸透率を示す小児期発症糖尿病の原因であることを示唆する。本研究によって、小児期発症糖尿病を招く新たな単一遺伝子異常が明らかとなった。



- ④ 小児期発症 1B 型糖尿病患者 89 例を対象として、新生児糖尿病および MODY 原因遺伝子として知られている 30 遺伝子の網羅的シーケンス解析を行った。その結果、11 例において病的と推測される変異が同定された。このうち 6 変異は *INS* 遺伝子、他の 5 変異は *HNF1A*, *HNF4A*, *HNF1B* 遺伝子に認められた(右図)。これにより、1B 型糖尿病と新生児糖尿病および MODY が遺伝学的にオーバーラップする疾患であることが明らかとなった。また本研究によって、*INS* 遺伝子変異と *HNF* 遺伝子変異が胚細胞性 *de novo* 変異として生じること、および、変異陰性群の疾患発症には自己免疫の関与が大きいことが見いだされた。



- ⑤ 428 名の小児期発症 1 型糖尿病日本人患者および 457 名の非罹患日本人小児を対象として、63 座位の既知疾患関連 1 塩基多型 (SNP) の検討を行った。解析の結果、10 SNP が日本人小児における疾患感受性に関与することが見いだされた。とくに、*INS* 遺伝子の rs689 と *CTLA4* 遺伝子の re231775 が高いオッズ比を示した。また、*GDCMB* 遺伝子の rs2290400 を含む 17q12-q21 領域の多型が *cis-regulatory haplotype* として低年齢小児に特異的な免疫機能制御機能を発揮する可能性が見いだされた。

## 研究項目 2

- ① 1 家系の全エクソーム解析の結果、疾患に連鎖する CD101 の塩基置換を同定した。Cd101 はマウスの糖尿病に関与することが知られている遺伝子である。パイオインフォマティクス解析では患者で同定されたバリエントが機能変化を招くことが示唆された。次いで、127 例の孤発例を対象として CD101 のシーケンス解析を行い、2 例においてタンパク機能を障害すると推測されるミスセンス塩基置換を同定した。最後に、3 名の CD101 変異陽性患者では単核球や顆粒球表面における CD101 発現が減少していることを見出した。以上の結果により、CD101 がヒトにおける新規 1 型糖尿病新規感受性遺伝子であることが明らかとなった。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 6 件)

- Okuno M, Ayabe T, Yokota I, Musha I, Shiga K, Kikuchi T, Kikuchi N, Ohtake A, Nakamura A, Nakabayashi K, Okamura K, Momozawa Y, Kubo M, Suzuki J, Urakami T, Kawamura T, Amemiya S, Ogata T, Sugihara S, Fukami M; Japanese Study Group of Insulin Therapy for Childhood and Adolescent Diabetes. Protein-altering variants of PTPN2 in childhood-onset Type 1A diabetes.

Diabet Med. 35(3):376-380, 2018

2. Okuno M, Kasahara Y, Onodera M, Takubo N, Okajima M, Suga S, Watanabe N, Suzuki J, Ayabe T, Urakami T, Kawamura T, Kikuchi N, Yokota I, Kikuchi T, Amemiya S, Nakabayashi K, Hayashi K, Hata K, Matsubara Y, Ogata T, Fukami M, Sugihara S. Nucleotide substitutions in CD101, the human homolog of a diabetes susceptibility gene in non-obese diabetic mouse, in patients with type 1 diabetes. *J Diabetes Investig* 8(3):286-294, 2017.
3. Ushijima K, Narumi S, Ogata T, Yokota I, Sugihara S, Kaname T, Horiwaka Y, Matsubara Y, Fukami M, Kawamura T; Japanese Study Group of Insulin Therapy for Childhood and Adolescent Diabetes. KLF11 variant in a family clinically diagnosed with early childhood-onset type 1B diabetes. *Pediatr Diabetes*. 2019 doi: 10.1111/peidi.12868. [Epub ahead of print]
4. Akiba K, Ushijima K, Fukami M, Hasegawa Y. A heterozygous protein-truncating RFX6 variant in a family with childhood-onset, pregnancy-associated and adult-onset diabetes. *Diabet Med*. 2019. doi: 10.1111/dme.13970. [Epub ahead of print]
5. Ushijima K, Fukami M, Ayabe T, Narumi S, Okuno M, Nakamura A, Takahashi T, Ihara K, Ohkubo K, Tachikawa E, Nakayama S, Arai J, Kikuchi N, Kikuchi T, Kawamura T, Urakami T, Hata K, Nakabayashi K, Matsubara Y, Amemiya S, Ogata T, Yokota I, Sugihara S, Japanese Study Group of Insulin Therapy for Childhood and Adolescent Diabetes. Comprehensive screening for monogenic diabetes in 89 Japanese children with insulin-requiring antibody-negative type 1 diabetes. *Pediatr Diabetes*. 19(2):243-250, 2017.
6. Ayabe T, Fukami M, Ogata T, Kawamura T, Urakami T, Kikuchi N, Yokota I, Ihara K, Takemoto K, Mukai T, Nishii A, Kikuchi T, Mori T, Shimura N, Sasaki G, Kizu R, Takubo N, Soneda S, Fujisawa T, Takaya R, Kizaki Z, Kanzaki S, Hanaki K, Matsuura N, Kasahara Y, Kosaka K, Takahashi T, Minamitani K, Matsuo S, Mochizuki H, Kobayashi K, Koike A, Horikawa R, Teno S, Tsubouchi K, Mochizuki T, Igarashi Y, Amemiya S, Sugihara S. Variants associated with autoimmune Type 1 diabetes in Japanese children: implications for age-specific effects of cis-regulatory haplotypes at 17q12-q21. *Diabet Med*. 33(12):1717-1722, 2016.

[学会発表](計 6 件)

1. 深見真紀 次世代シーケンサーを用いた1型糖尿病感受性因子の探索。シンポジウム 小児思春期糖尿病をめぐる課題と展望。第61回日本糖尿病学会年次学術集会。2018
2. 牛嶋規久美、深見真紀、ほか。1B型糖尿病発症における単一遺伝子変異の寄与の解明。第90回日本内分泌学会学術総会、2017
3. 牛嶋規久美、深見真紀、ほか。若年発症1B型糖尿病家系で同定した新規KLF11変異について。第51回日本小児内分泌学会学術集会、2017
4. Okuno M, Fukami M, et al. Nucleotide substitutions in CD101, the human homolog of a diabetes susceptibility gene in non-obese diabetic mouse, in patients with type 1 diabetes. The 42nd annual conference of the International Society for Pediatrics and Adolescent Diabetes 2016
5. Ushijima K, Fukami M, et al. Next generation sequencing-based comprehensive mutation screening in 89 Japanese children clinically diagnosed with type 1B diabetes. The 9th biennial scientific meeting of the Asia Pacific Pediatric Endocrine Society 2016
6. Okuno M, Fukami M, et al. Nucleotide substitutions in CD101, the human homolog of a diabetes susceptibility gene in non-obese diabetic mouse, in patients with type 1 diabetes. The 9th biennial scientific meeting of the Asia Pacific Pediatric Endocrine Society 2016

[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:  
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:  
国内外の別:

[その他]

ホームページ

国立研究開発法人国立成育医療研究センター分子内分泌研究部

<http://nrichd.ncchd.go.jp/endocrinology/>

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名:綾部匡之

ローマ字氏名:AYABE TADAYUKI

所属研究機関名:国立成育医療研究センター

部局名:分子内分泌研究部

職名:研究員

研究者番号(8桁):80566555

### (2)研究協力者

研究協力者氏名:奥野美佐子、牛嶋規久美

ローマ字氏名:OKUNO MISAKO, USHIJIMA KIKUMI

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。