

令和 2 年 5 月 23 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07258

研究課題名(和文)原因遺伝子不明のmonogenic diabetesの網羅的解析

研究課題名(英文)Comprehensive analysis for causative genes in unknown monogenic diabetes

研究代表者

岩崎 直子 (Iwasaki, Naoko)

東京女子医科大学・医学部・教授

研究者番号：70203370

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)：糖尿病の90%は中年以降に発症する2型糖尿病であるが、若年発症で常染色体優性遺伝を特徴とする1種類の遺伝子を発症原因とする糖尿病(単一遺伝子糖尿病)が混在する。糖尿病全体の5%で、推定患者数は1万2千人でMODYがその大多数占める。日本人MODYの原因遺伝子を明らかにするために61名を対象として次世代シーケンサーで網羅的に解析した。16名(26.2%)に変異を同定、8名(13.1%)に病因の可能性のある多型を検出し、計24名(39.3%)となった。SLC308A、INSR、WFS1の各遺伝子を含め、アミノ酸の置換を伴う多型を26名(42.6%)に検出し、全体で50名(81.9%)となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

61名の規模のMODYの原因遺伝子を明らかにするための、次世代シーケンサーを用いた網羅的検討は知りうる限りでは我が国においては我々が最初である。これまで実施してきたサンガー解析、MLPA解析、micro array解析の結果をすべて統合し、MODY約300例の解析結果をまとめて論文化する準備を進めている。この報告は我が国独自の成績として海外で参照されることが期待され、人種によるMODYの頻度差などの検討に資すると考えられる。さらに我が国において大きく遅れている糖尿病の個別化医療の推進は患者QOLの向上を通じて社会貢献につながるほか、遺伝子解析結果は糖尿病新規治療薬のシーズとして期待される。

研究成果の概要(英文)：MODY is a subtype of diabetes mellitus characterized by early age of onset, autosomal dominant mode of inheritance and lack of obesity. MODY is caused by a single gene disorder and a good model for personalized medicine, because of the better outcomes on patients' QOL and overall medical costs. The number of MODY in JAPAN is estimated at least 12,000. To promote such personalized medicine for MODY in JAPAN, we aimed to clarify the causative gene of Japanese MODY. 61 MODY were comprehensively analyzed with a next-generation sequencer (NGS). Mutations were identified in 16 (26.2%) and possibly pathogenic variants were detected in 8 (13.1%), for a total of 24 (39.3%). Including the SLC308A, INSR, and WFS1 genes, polymorphisms with amino acid substitutions were detected in 26 (42.6%), thus, in total we identified any substitutions in 50 among 61 MODY (81.9%), indicating that NGS is a powerful tool for analyzing MODY causative genes as well as novel susceptible genes.

研究分野：臨床遺伝学

キーワード：MODY 若年発症糖尿病 単一遺伝子糖尿病 次世代シーケンサー 個別化医療 monogenic diabetes

## 1. 研究開始当初の背景

MODY は若年で発症し、常染色体優性遺伝を特徴とする糖尿病である。頻度は糖尿病全体の 1~5%程度と稀ではなく、わが国には 12000 名程度の患者がいると推定されるが、ほとんどは 2 型糖尿病や 1 型糖尿病として治療されている。MODY に代表される monogenic 糖尿病 (単一遺伝子糖尿病) は Personalized Medicine (個別化医療) の良い適応であり、個別化医療による患者 QOL の向上ならびに医療費の抑制が検証され (Naylor, *Diabetes Care*, 2013)、ガイドラインが作成されている (Rubio-Cabezas O, *Pediatric Diabetes* 2014)。一方、我が国では個別化医療が欧米と比べて大幅に立ち遅れているほか、英国では MODY の 80% の原因遺伝子が明らかにされているが、我が国は 20%程度であることから、本領域の研究の発展が望まれている。MODY の人種による頻度の差など明らかにされていない点についても検討が必要である。

MODY の原因遺伝子として、MODY1-HNF4A, MODY2-GCK, MODY3-HNF1A, MODY4-IPF-1, MODY5-HNF1B, MODY6-NEUROD1, MODY7-KLF11, MODY8-CEL, MODY9-PAX4, MODY10-INS, MODY11-BLK, MODY12-ABCC8, MODY13-KCNJ11 の 13 種類が報告されている (Froguel 2014, *Cell Metabol*)。アンダーラインの 4 種はスクリーニング遺伝子とされ (PLoS One 7: e37423, 2012)、特に MODY2 と MODY3 で MODY 全体の 80% を占めると報告されている。しかしながら、我が国の学校検尿で発見された非肥満糖尿病児童におけるこれら 4 種類の検討による同定率は 50% に留まった (Yorifuji, 2012)。したがって未知の遺伝子も含めた網羅的な検討が必要であり、次世代シーケンサーによる検討が必要である。

MODY は疾患病態モデルとしての学術的意義が高く、糖尿病の成因研究に大きく寄与してきた。MODY 遺伝子の SNP は 2 型糖尿病の感受性多型として作用することが知られている。新規 MODY 遺伝子の同定は、新規糖代謝調節経路の同定につながる可能性があり、ゲノム創薬のシーズとして期待される。特に、アジア人に特徴的なインスリン分泌低下型糖尿病治療薬開発に期待が持てる。

## 2. 研究の目的

次世代シーケンサーを用いた網羅的解析によって、未確定の日本人 MODY の原因遺伝子を明らかにすること。

## 3. 研究の方法

### (1) 第 1 ステップ

13 種類の MODY 遺伝子をターゲットシーケンスにより解析した。対象は 30 歳以下で糖尿病と診断され、GAD 抗体陰性、BMI 30 の 48 症例。糖尿病家族歴は問わなかった。HaloPlex Target Enrichment System を用いて MODY14 遺伝子のコーディング領域をカバーするプライマーセットを作成し、Illumina MiSeq system v3 (Illumina, San Diego, CA) で解析した。塩基配列は GRCh37 を対照として ANNOVER によって抽出し、1000 genome、ClinVer、ExAc でフィルタリングの後、SIFT、PolyPhen-2、CADD などのアルゴリズムによる変異の機能予測を行った。本研究は本学ゲノム解析研究に関する倫理審査委員会の承認を得て実施された。

### (2) 第 2 ステップ

上記で変異が同定できなかった症例について、whole exome sequence を行った。家系内の複数の DNA の揃った家系を優先した。対象は 30 歳未満診断の糖尿病で膵島自己抗体陰性の 27 名を対象とした NovaSeq6000 Sequencing System (Illumina) を用い、BWA-

MEM を用いて参照配列(GRC h37)にマップした。Variant は Haplotype Caller を用いて抽出後、アノテーションには ANNOVAR を用いた。CNV は 27 名のデータを参照し、XHMN を用いて定量化した。

## 4. 研究成果

### (1) 第1ステップ

48 例の糖尿病診断時年齢は 16.5 歳、BMI は 21.5 であった。

26 種類のナンセンス置換およびミスセンス置換を 34 症例に認めた。アミノ酸配列の変化を生じるこれらの置換は 10 種類の MODY 遺伝子 (*HNF4A*, *GCK*, *HNF1A*, *PDX1*, *CEL*, *PAX4*, *INS*, *ABCC8*, *KCNJ11*, *RFX6*) に認められ、ナンセンス置換が 2 種類含まれていた (MODY2 遺伝子 C370X、MODY1 遺伝子 W324X)。機能予測により、MODY4 遺伝子 R148G、MODY9 遺伝子 R121W、MODY12 遺伝子 G826V、MODY13 遺伝子 E140K の 4 種類は病因と考えられた。MODY9 遺伝子 R121W は 5 例 (10.1%) に見いだされ、他の 2 種類は 1 例ずつに認めた。

興味深い事に、2 症例で 2 つの MODY 遺伝子の病的変異の併存を認め、1 例は MODY4 遺伝子 R148G と MODY9 遺伝子 R121W、別の例は MODY2 遺伝子 C370X と MODY9 遺伝子 R121W の併存であった。3 種類の変異は未報告であった。(図 1、図 2)

以上をまとめると、48 例中 8 例 (16.7%) に病因と考えられる変異を同定した。さらに 2 種類の MODY 遺伝子に pathogenic あるいは likely pathogenic な variant が併存する家系を複数認めた。この結果は 2018 年 10 月米国人類遺伝学会(San Diego)、同月の日本人類遺伝学会大会(横浜)で発表した。

### (2) 第2ステップ

上記 48 名の検討で変異が検出できなかった 14 名、これまでに変異が未同定の別の 3 名、新規患者サンプル 10 名の合計 27 名(F/M=14/13)を対象とした。診断時年齢は  $15.9 \pm 3.9$ 。

うち 8 名(30%)に変異を見出した。内訳は *HNF1A*(MODY3)2 名(splicing, Stop-gain)、以下の 6 種類で各々 1 名ずつ変異を同定：*HNF4A*(MODY1)(gene deletion)、*GCK*(MODY2)(stop-gain)、*HNF1B*(MODY5)(nonsynonymous)、*CEL*(MODY8)(gene deletion)、*ABCC8*(MODY13)(nonsynonymous LOF)、*INSR*(frame shift)。さらに 2 名に *SLC30A8*、2 名に *BLK*、2 名に *INSR*、1 名に *GCK5* 領域に病因の可能性の高い variant を見出ししており、サンガーシーケンスによる validation と家系内サンプルの確認中である。この結果は 2020 年ヨーロッパ糖尿病学会において発表予定で抄録を提出した。

### 3 年間の総合的な結果

最終的に 61 名の検討を行った。うち 16 名 (26.2%) に病因と考えられる変異を検出した。また、likely-pathogenic な variant を 8 名 (13.1%) に検出し、計 24 名(39.3%) となった。さらに、既知 MODY 遺伝子内の他、*SLC30A8*、*INSR*、*WFS1* において non synonymous variant を 26 名 (42.6%) に検出した。これらが糖代謝異常の成因となるかについてはさらなる解析が必要であるが、これらを含めると 50 名(81.9%)となった。引き続き、検討を継続して結果を確定する。

61 名の規模の MODY の網羅的検討は知りうる限りではわが国においては我々が最初である。過去のサンガー解析や MLPA、microarray 結果もすべて統合し、MODY 約 300 例

の解析結果をまとめて論文化する。この報告は日本独自の成績として海外で参照されることが期待され、人種による MODY の内訳の頻度差などの検討の資料に資すると考えられる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 岩崎直子	4. 巻 0
2. 論文標題 ミトコンドリア遺伝子異常による糖尿病	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 月刊糖尿病	6. 最初と最後の頁 0-0
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 978-4-287-82097-1 C3047	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ide Risa, Ogata Makiko, Iwasaki Naoko, Babazono Tetsuya	4. 巻 10
2. 論文標題 Low resting energy expenditure in postmenopausal Japanese women with type 2 diabetes mellitus	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Diabetology International	6. 最初と最後の頁 268, 278
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s13340-019-00391-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 岩崎直子, 尾形真規子, 大澤真里	4. 巻 62
2. 論文標題 ミトコンドリア遺伝子異常と糖尿病	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 糖尿病	6. 最初と最後の頁 457, 460
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11213/tonyoby.62.457	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Ide Risa, Ogata Makiko, Iwasaki Naoko, Babazono Tetsuya	4. 巻 see DOI
2. 論文標題 Low resting energy expenditure in postmenopausal Japanese women with type 2 diabetes mellitus	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Diabetology International	6. 最初と最後の頁 1 - 11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s13340-019-00391-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Mari MATSUO, Naoko IWASAKI, Kayoko SAITO	4. 巻 see DOI
2. 論文標題 Diagnosis and Genetic Counseling for Mitochondrial Disease at the Institute of Medical Genetics, Tokyo Women's Medical University	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Tokyo Women's Medical University	6. 最初と最後の頁 1 - 8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.24488/twmuj.2018003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Shigeharu G. Yabe1, Junko Nishida, Satsuki Fukuda, Fujie Takeda, Kiyoko Nasiro, Kazuki Yasuda, Naoko Iwasaki, Hitoshi Okochi	4. 巻 accepted
2. 論文標題 Expression of mutant mRNA and protein in pancreatic cells derived from MODY3- iPS cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 accepted
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 岩崎直子	4. 巻 9
2. 論文標題 糖尿病遺伝子診断の現状と展望	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 月刊糖尿病	6. 最初と最後の頁 102-109
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 978-4-287-82097-1 C3047	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 岩崎直子	4. 巻 15
2. 論文標題 糖尿病は遺伝するのか：2型糖尿病の遺伝子検査で何がわかるか	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 糖尿病診療マスター	6. 最初と最後の頁 572-577
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Naoko Iwasaki, Toshiyuki Yamamoto, Hiroyuki Akagawa, makiko Ogata, Kayoko Saito
2. 発表標題 Screening for mutations in 14 kinds of MODY genes in patients with MODY in Japanese by next generation sequencing
3. 学会等名 The American Society of Human Genetics 2018 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Naoko Iwasaki, Toshiyuki Yamamoto, Hiroyuki Akagawa, makiko Ogata, Kayoko Saito
2. 発表標題 Screening for mutations in 14 kinds of MODY genes in patients with MODY in Japanese by next generation sequencing
3. 学会等名 Annual meeting of Japan Society of Human Genetics 63rd Congress (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岩崎直子, 尾形真規子, 土屋美保, 大澤真里, 富岡光枝, 馬場園哲也
2. 発表標題 糖尿病診療における個別化医療の実践
3. 学会等名 第61回日本糖尿病学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 尾形真規子, 岩崎直子, 井出理沙, 富岡光枝, 馬場園哲也
2. 発表標題 ビタミンDが培養膵 細胞ミトコンドリア電子伝達系のグルコース反応性に及ぼす影響
3. 学会等名 第61回日本糖尿病学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Iwasaki Naoko, Akagawa Hiroyuki, Hase Michiyo, Takizawa Miho, Ogata Makiko, Babazono Tetsuya
2. 発表標題 A novel mutation in the IPF-1/PDX-1 gene identified in a Japanese family with MODY.
3. 学会等名 日本人類遺伝学会第62回大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 岩崎直子
2. 発表標題 日常診療におけるゲノム医療 QOL向上に貢献する個別化医療の実際 糖尿病治療における個別化医療
3. 学会等名 日本人類遺伝学会第62回大会(招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 岩崎直子, 赤川浩之, 長谷美智代, 土屋美保, 佐伯新子, 井出理沙, 尾形真規子, 富岡光枝, 内潟安子
2. 発表標題 次世代シーケンサーを用いたMODY家系の網羅的遺伝子解析
3. 学会等名 第59回日本糖尿病学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 IwasakiNaoko, AKAGAWA HIROYUKI, Hase Michiyo, FUJIMAKI Risa, Furukawa Toru, MITANI Shohei, UCHIGATA YASUKO
2. 発表標題 A novel mutation in the IPF-1/PDX-1 gene identified in a Japanese family with MODY.
3. 学会等名 53rd Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes (国際学会)
4. 発表年 2017年



1. 発表者名 Yukari Kiramura, Iwasaki Naoko, Ogata Makiko, AKAGAWA HIROYUKI, Saito Kayoko, YASUKO UCHIGATA
2. 発表標題 Newly identified mutation in 5'UTR of HNF4A in a case of MODY3
3. 学会等名 The 9th Scientific Meeting of the Asian Association for the Study of Diabetes (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 佐伯新子, 中村好宏, 北野滋彦, 馬場園哲也, 岩崎直子
2. 発表標題 糖尿病網膜症の発症、進展に関する遺伝因子の解析
3. 学会等名 日本人類遺伝学会第62回大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 岩崎直子、滝澤美保、尾形真規子	4. 発行年 2018年
2. 出版社 医歯薬出版社	5. 総ページ数 269
3. 書名 1型糖尿病 治療・ケアのエッセンス 分担執筆 [1型糖尿病と誤診されやすい糖尿病] p50-55	

1. 著者名 岩崎直子、滝澤美保、尾形真規子	4. 発行年 2018年
2. 出版社 医歯薬出版社	5. 総ページ数 269
3. 書名 1型糖尿病 治療・ケアのエッセンス 分担執筆 [糖尿病の遺伝子診断と個別化医療] p56-59	

1. 著者名 岩崎直子	4. 発行年 2020年
2. 出版社 朝倉書店	5. 総ページ数 ***
3. 書名 内科学	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----