

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08868

研究課題名（和文）若年発症糖尿病濃厚家系の原因遺伝子探索と診療への応用

研究課題名（英文）Searching for causative genes in families with a high prevalence of juvenile-onset diabetes and its application to clinical practice

研究代表者

古田 浩人（Furuta, Hiroto）

和歌山県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90238684

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：若年発症糖尿病濃厚家系の新たな原因遺伝子の探索および、既知の原因遺伝子の遺伝子診断を行う上での問題点の解決に取り組んだ。前者では、PAX4のp.Arg200His変異が重要な役割を担っていることが明らかとなった。後者では、HNF1B異常の遺伝子診断において全エクソームシーケンス法のデータ解析を工夫することで染色体の微小欠失が原因の場合も検出が可能であることや、HNF1A異常の遺伝子診断において in silico機能障害予測ツールを利用する際のポイントなどを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

若年発症糖尿病の病態においてPAX4は重要な遺伝子の一つであることが明らかとなったことから、その詳細なメカニズムの解明は糖尿病のさらなる理解や新たな治療法の開発につながることを期待される。さらに、HNF1BおよびHNF1Aに関しては、今回の結果は遺伝子診断を行う上ですぐに利用可能なものである。

研究成果の概要（英文）：We sought to find new causative genes of juvenile-onset diabetes and also to solve problems during the genetic diagnosis of known causative genes of monogenic diabetes. In the former, it was clarified that the p.Arg200His mutation of PAX4 plays an important role. In the latter, we clarified that it is possible to detect chromosomal microdeletions by devising the data analysis of the whole exome sequencing method in the genetic diagnosis of HNF1B abnormality. We also clarified the important points when using in silico dysfunction prediction tools in the genetic diagnosis of HNF1A abnormality.

研究分野：糖尿病

キーワード：糖尿病 遺伝子 PAX4 HNF1B HNF1A

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

「一般的な」2型糖尿病は発症への寄与度が低い遺伝因子が多数関係している多遺伝子疾患であるが、若年から発症し糖尿病の家族歴が濃厚であることから単一遺伝子異常が原因と考えられる家系にもしばしば遭遇する。種々の原因遺伝子が報告されてはいるが、本邦においては既知の遺伝子が原因として同定される割合は40%程度に過ぎないことからさらなる原因遺伝子の探索が望まれている。さらに、既知の原因遺伝子の中では *GCK*、*HNF1A*、*HNF1B*、*HNF4A* 異常に遭遇する頻度が高いが、それらにおいても遺伝子診断を行う上で解決すべき問題が存在している。

### 2. 研究の目的

若年発症糖尿病濃厚家系の新たな原因遺伝子を探索するとともに、遺伝子診断の診療への応用において障壁となっている問題点を解決する。

### 3. 研究の方法

単一遺伝子異常が疑われる若年発症糖尿病濃厚家系症例(糖尿病診断年齢 25 歳未満、BMI<30、膵島関連自己抗体陰性)を対象に全エクソームシーケンス(WES)法にて遺伝子変異の探索を行った。同定した遺伝子変異に関しては、一般集団における頻度、過去の報告の有無、変異の種類(ナンセンス、フレームシフト、ミスセンスなど)、in silico 解析で予測される機能障害の程度、家系内での糖尿病との連鎖の有無などをもとに臨床的意義の判断を行った。

また、*PAX4* で同定したミスセンス変異に関しては、膵細胞株を用いた in vitro 実験を実施、ルシフェラーゼアッセイ系を用いグルカゴンプロモーター活性に対する作用を検証することで機能障害への影響の評価を行った。

### 4. 研究成果

(1) 若年発症非肥満非1型糖尿病では *PAX4* のミスセンス変異が重要な役割を担っている。

既知の原因遺伝子内に単独で発症と関連すると考えられる変異が認められなかった17例に関して詳細な解析を行った。その結果、*PAX4* の低頻度の遺伝子多型である p.Arg200His 変異(rs2233580)が、日本人の一般集団(東北メガバンクデータ)に比し高頻度(アリル頻度:0.082 VS 0.324,  $p=3.67e-7$ )に認められた。同変異は「一般的な」2型糖尿病の発症に関係することが報告されている遺伝子多型であることから、BioBank Japan で公開されている2型糖尿病群のアリル頻度との比較を行ったが有意に高頻度であった[OR:3.52 (1.71-7.23),  $p=2.55e-4$ ] (図1)。さらに、3名(18%)は同変異がホモ接合体であり劣性遺伝モデルで解析した場合のオッズ比は 13.72 (3.9-48.23),  $p=7.04e-8$  にもおよんだ。

一方、*GCK* 異常による MODY2 患者6名、*HNF1A* 異常による MODY3 患者5名を対象とした検討では同多型は認められなかった。さらに、膵細胞株を用いた実験においてグルカゴンプロモーター活性は wild type の *PAX4* の強発現により抑制されたが200番目を His に置換した *PAX4* ではその効果が消失していた。今回の結果は、若年発症糖尿病の原因としては、MODY2 や MODY3 など単一遺伝子異常により若年から糖尿病が発症する場合に加え複数の原因遺伝子が関与する場合も想定すべきであること、後者の場合においては *PAX4* の p.Arg200His 変異が重要な役割の一つを担っていることを示唆しているものと考えられた。

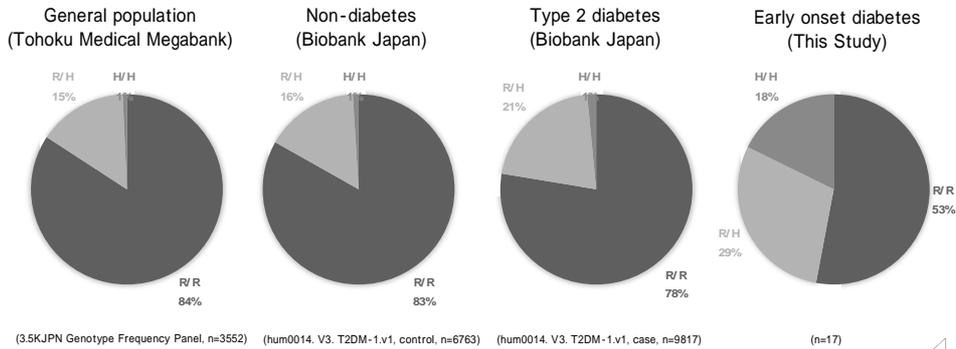


図1：様々な集団における *PAX4* の p.Arg200His 変異の頻度比較

(2) 17q12 微小欠失症候群の遺伝子診断において WES 法は有用である。

*HNF1B* 異常は、若年発症糖尿病に加え腎形成不全、膵形成不全など多彩な臨床像を伴う疾患である。ミスセンス、ノンセンス、フレームシフトなどのタイプの遺伝子変異が原因の場合に加え、同遺伝子を含む染色体 17q12 領域の欠失が原因の場合も少なくない。一般に前者のタイプの探索では、候補遺伝子に対するターゲットシーケンス法や WES 法が有用であるが、後者のタイプの探索では MLPA 法やアレイ CGH 法による解析が必要であるとされている。今回、染色体 17q12 領域の欠失が原因の膵体尾部欠損を伴う糖尿病症例を新たに同定したが、WES 法のデータ解析において *HNF1B* 周辺に位置する遺伝子多型にヘテロ接合型を認めないことがその契機であった(図2)。さらに、WES 法の結果から推定した欠失領域はアレイ CGH 法の結果と一致していた。*HNF1B* 異常は、若年発症糖尿病の原因として比較的頻度の高い遺伝子異常であるが、*HNF1B* に対するターゲットシーケンス法+MLPA 法もしくはターゲットシーケンス法+アレイ CGH 法の組み合わせで解析されることが多い。今回の結果は、WES 法を用い *HNF1B* のみならずその周辺領域に位置する遺伝子を同時に解析することで、MLPA 法やアレイ CGH 法を行わずに欠失診断が可能であることを示唆し、同遺伝子異常診断の効率化に貢献できるものと考えている。

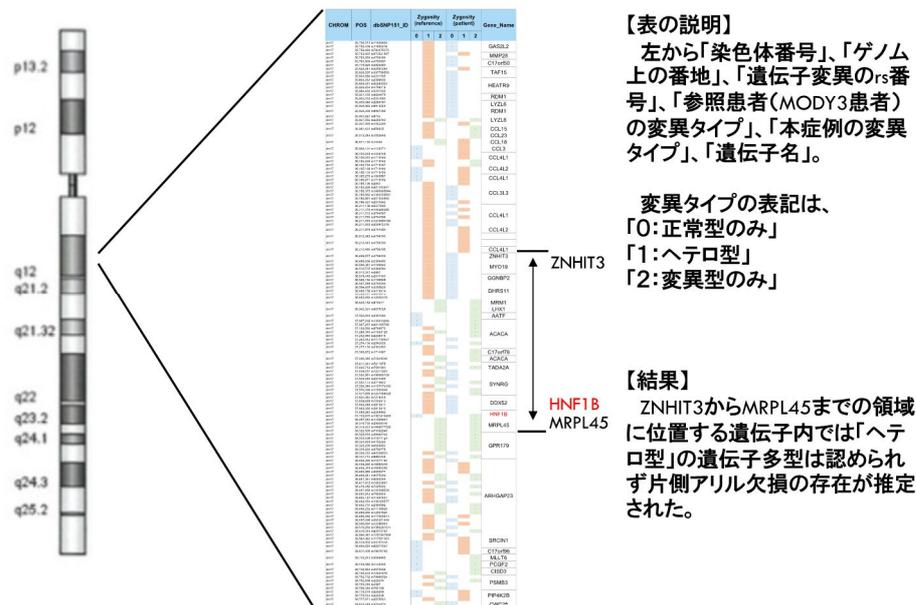


図2：*HNF1B* を含む染色体 17q12 領域に位置する遺伝子多型のパターン解析による微小欠失の検出

(3) HNF1A のミスセンス変異の病的意義の判定における in silico 機能障害予測ツールの有用性の比較

HNF1A 異常は若年発症糖尿病の原因として比較的頻度の高い遺伝子異常であるが、ミスセンス変異が同定された場合、その臨床的な意義の判定に苦慮することも少なくない。その場合は in vitro 機能解析による障害の評価が推奨されているが手間や費用の関係で実施は容易ではない。近年、ミスセンス変異がその機能に与える影響の推定に関する in silico の解析ツールが次々と開発されている。変異型 HNF1A の in vitro 機能解析の結果と in silico 機能障害予測ツールの解析結果を比較し、後者の臨床利用における有用性の検討を行った。

変異型 HNF1A の in vitro 機能解析の結果は既報のデータ(Althari et al. AJHG 107: 670-682, 2020、n=50)を用い、様々な in silico 機能障害予測ツールでの解析は dbNSFP(<http://database.liulab.science/dbNSFP>)を用い行った。

ガイドラインに従い in vitro 機能解析の結果が正常型の 40%以下に低下している変異を「病原性変異」と定義し遺伝子変異を 2 群に分け、様々な in silico 機能障害ツールでの判定値を用い ROC 曲線解析を行い AUC (area under the curve)およびに cut-off 値を算出した。さらに、データベース (Clinver) に pathogenic 変異(n=35)および likely benign/benign 変異(n=20)として登録されている変異を用いて、算出された cut-off 値の感度および特異度の検討を行った (表 1)

算出された cut-off 値は、各々の in silico 機能障害予測ツールで一般的に用いられている値よりも厳しいものであったが、それらを用いた「感度」、「特異度」は良好で、特に、VEST4、PROVEAN、REVEL、BayesDel などの in silico 機能障害予測ツールが有用であると考えられた。

タンパク機能障害予測					統合的機能障害予測				
ツール名	AUC	Cut-off	感度	特異度	ツール名	AUC	Cut-off	感度	特異度
SIFT4G	0.973	0.004	77.1	100	REVEL	0.945	0.828	88.6	100
VEST4	0.948	0.804	91.4	100	BayesDel_withAF	0.925	0.317	97.1	100
PROVEAN	0.943	-3.01	94.3	100	Eigen	0.911	0.472	80	90
DEOGEN2	0.914	0.974	68.6	100	CADD_phred	0.903	25.3	82.9	90
Polyphen2_HDIV	0.900	0.999	77.1	100	ClinPred	0.895	0.989	85.7	100
LRT	0.880	0.000007	68.6	90	M-CAP	0.894	0.411	97.1	80
SIFT	0.876	0.003	80	100					
fathmm_XF	0.872	0.925	65.7	95					
fathmm_MKL	0.783	0.925	68.6	70					
Mutation Taster	0.779	0.81	91.4	75					
FATHMM	0.745	-5.37	48.6	100					

表 1 : HNF1A のミスセンス変異の病的意義の判定における in silico 機能障害予測ツールの有用性の比較

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 古田浩人
2. 発表標題 単一遺伝子異常による糖尿病 その特徴と診療のポイントー
3. 学会等名 第63回日本糖尿病学会年次学術集会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 古田浩人
2. 発表標題 糖尿病の遺伝因子
3. 学会等名 第57回日本糖尿病学会年近畿地方会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 古田浩人、松谷紀彦、宮脇正和、古田眞智、松野正平、浦木進丞、土井麻子、太田敬之、森田修平、岩倉 浩、西 理宏、鈴木啓之
2. 発表標題 HNF-1A遺伝子変異による糖尿病（MODY3）の臨床像の検討
3. 学会等名 第70回日本体質医学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 浦木進丞、古田浩人、宮脇正和、岩本美紀、松谷紀彦、松野正平、土井麻子、森田修平、有安宏之、西 理宏、鈴木啓之、赤水尚史
2. 発表標題 ABCC8遺伝子変異による新生児糖尿病症例の7年間の臨床経過
3. 学会等名 第63回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 古田浩人、松谷紀彦、松野正平、浦木進丞、土井麻子、森田修平、石橋達也、古川安志、岩倉 浩、西 理宏、松岡孝昭
2. 発表標題 全エクソームシーケンス法を用いた若年発症糖尿病の遺伝因子探索
3. 学会等名 第64回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岩橋真子、古田浩人、松野正平、大槻朋子、土井麻子、森田修平、石橋達也、古川安志、岩倉 浩、西 理宏、松岡孝昭
2. 発表標題 全エクソームシーケンス法を用いて新たに同定したMODYの2家系
3. 学会等名 第58回日本糖尿病学会近畿地方会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 古田浩人、松谷紀彦、松野正平、浦木進丞、土井麻子、森田修平、石橋達也、古川安志、岩倉 浩、西 理宏、松岡孝昭
2. 発表標題 「臨床医が知っておくべき糖尿病の基礎」遺伝子異常による糖尿病
3. 学会等名 第56回糖尿病学の進歩（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 早川佳奈、早川隆洋、中野好夫、吉松弘晃、芝みちる、山西一輝、太田敬之、古田浩人、松岡孝昭
2. 発表標題 血糖コントロール悪化を契機に発見された膵体尾部欠損の一例
3. 学会等名 第59回日本糖尿病学会近畿地方会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 古田浩人、浦木進丞、土井麻子、森田修平、石橋達也、古川安志、岩倉 浩、西 理宏、松岡孝昭
2. 発表標題 非典型的な臨床像を呈したMODY3の1家系
3. 学会等名 第65回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 古田浩人、浦木進丞、森田修平、石橋達也、古川安志、西 理宏、松岡孝昭
2. 発表標題 MODY3の遺伝子診断における遺伝子変異病原性予測ツールの有用性の検討
3. 学会等名 第66回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔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
研究分担者	森田 修平  (Morita Shuhei)  (50372868)	和歌山県立医科大学・医学部・講師    (24701)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------