

令和 6 年 5 月 16 日現在

機関番号：34419
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2021～2023
課題番号：21K08567
研究課題名（和文）次世代シーケンス技術を駆使した日本人特有の新規1型糖尿病遺伝子の同定と機能解析
研究課題名（英文）Identification and functional analysis of novel type 1 diabetogenic genes in the Japanese population by next-generation sequencing
研究代表者
能宗 伸輔（Noso, Shinsuke）
近畿大学・医学部・准教授
研究者番号：90460849
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：日本人1型糖尿病は欧米よりも有病率が低く、家族内集積率が高い。我が国では発症への効果が小さいありふれた遺伝子変異よりも、稀で強力な遺伝子変異が発症に寄与している可能性がある。本研究は次世代シーケンス法にて濃厚発症家系に共通する稀な変異を同定することで我が国特有の遺伝素因の基盤情報を得ることを目的としている。一般人では稀なHLAハプロタイプであるDRB1*08:02-DQB1*03:02は家族性1型糖尿病において特に強いオッズ比を示すことを見だし、本研究の仮説を証明する結果であった。またいくつかの家系において既報の疾患感受性遺伝子の新規変異を発見しており、成果を挙げている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

1型糖尿病は発症した時点で生命維持に必須なインスリン分泌が欠損しているため、現状国内での治療はインスリン注射による補充療法か、移植療法に限られており、発症機序に直接介入することができない。本研究により我が国特有の1型糖尿病の遺伝素因を解明し、発症に寄与する遺伝子変異を同定することができれば、未発症者の発症リスクや発症後のインスリン分泌能低下の進展リスクをスコア化することが可能となる。さらに遺伝子変異が発症に関わる機序を解明することにより、単なるインスリン補充療法に留まらず発症機序に直接介入する治療法の確立につながる基盤情報となる。

研究成果の概要（英文）：Japanese type 1 diabetes has a lower prevalence and higher familial clustering than in the West. In Japan, rare and strong genetic variants may contribute to the development of type 1 diabetes rather than common variants that have a small effect on the development of the disease. This study aims to identify rare mutations that are common in the families with type 1 diabetes by next-generation sequencing, and to clarify the basis of genetic predisposition specific to Japan. We identified a rare HLA haplotype DRB1*08:02-DQB1*03:02 in the general population with a robust odds ratio in familial type 1 diabetes mellitus, which confirms our hypothesis. We also found novel variants of previously known disease susceptibility genes in several families, which is an achievement.

研究分野：糖尿病、遺伝学、自己免疫

キーワード：1型糖尿病 次世代シーケンス法 遺伝学

1. 研究開始当初の背景

1型糖尿病において解決すべき課題：

1型糖尿病は、免疫細胞浸潤により膵細胞が特異的に破壊される疾患であり、発症時にはすでに生命維持に必要なインスリン分泌が失われている。したがって多くの患者にとっての治療は、欠損したインスリン分泌を日々のインスリン自己注射により補うホルモン補充療法である。約100年前のインスリン発見と臨床応用により生命維持は可能となったが、膵臓/膵島移植によりインスリン分泌が一時的に回復したとしても膵細胞の自己免疫性破壊を防ぐ有効な手段はなく、根治に至る治療は確立されていない。従って発症に関わる遺伝素因を明らかにすることで発症および進展のハイリスク症例を予知し、さらに遺伝素因から膵細胞破壊の機序を解明することは、発症遅延・根治療法を確立するために必要不可欠な研究課題といえる。

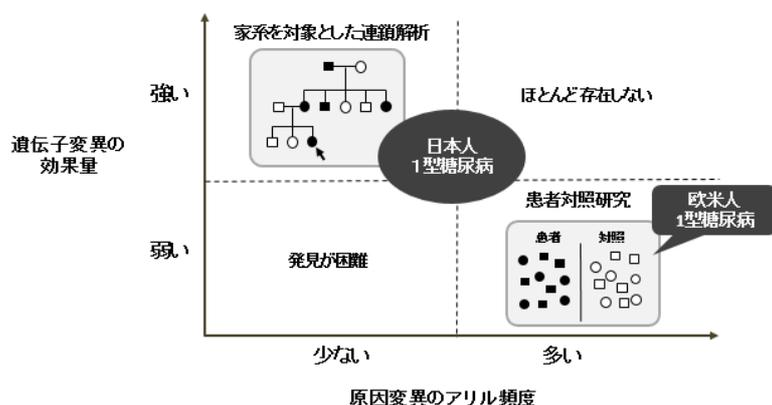
課題解決への手段とその問題点：

成因解明のために有効な手段の一つが、疾患感受性遺伝子の同定とその機能解析である。1型糖尿病は複数の遺伝素因を有する個体に環境因子が契機となり発症する多因子疾患であり、その遺伝子解析は、有病率が高く多数の症例を集めやすい欧米において先行している。大規模検体を対象とした全ゲノム関連解析により、50以上の1型糖尿病遺伝子座が報告されているが (*Nat Genet* 41:703-707, 2009)、その多くは単独では発症への寄与率が低く(オッズ比1.3未満)、健常人にも一定頻度保有しているありふれた変異 (common variant) であり、有病率の高いCommon diseaseの疾患感受性遺伝子が多くのCommon variantで構成されているという仮説を裏付けるものであった。ただ、欧米人における疾患感受性遺伝子が必ずしも日本人の1型糖尿病発症に寄与しない事 (Ikegami H et al. *Rev Diabet Stud.* 5: 64-72, 2008)、また日本人における疾患感受性遺伝子が欧米では関連しない例もあり (Nosso S et al. *Diabetes* 54: 3582-86, 2005, Nosso S et al. *Diabetes* 59: 2579-87, 2010)、我が国独自の解析が必須であるが、有病率の低い日本では欧米同様のアプローチが有効とは言い難い。

我が国の疫学的特徴を活用した解析：

有病率が低い我が国においては、実は患者同胞(兄弟姉妹)における発症率は欧米人並に高く、家族内集積率はむしろ欧米よりも極めて高い (Ikegami H et al. *Diabetes Res Clin Pract.* 77:S116-21, 2007)。Common diseaseというよりもRare diseaseに近い我が国における1型糖尿病の疫学的特徴を最大限に活かすには、1型糖尿病を複数発症する家系を解析することで、発症への寄与率(効果量)が低く健常人にも一定頻度認められるありふれた変異 (common variant) ではなく、健常人はほとんど保有していないが、発症に極めて強く寄与する稀な変異 (rare variant) を発見できることが見込まれ、日本人特有の1型糖尿病遺伝子同定の合理的アプローチとなる可能性がきわめて高い (図1)。

図1. 日本人1型糖尿病の疫学的特徴と遺伝子解析のアプローチ



2. 研究の目的

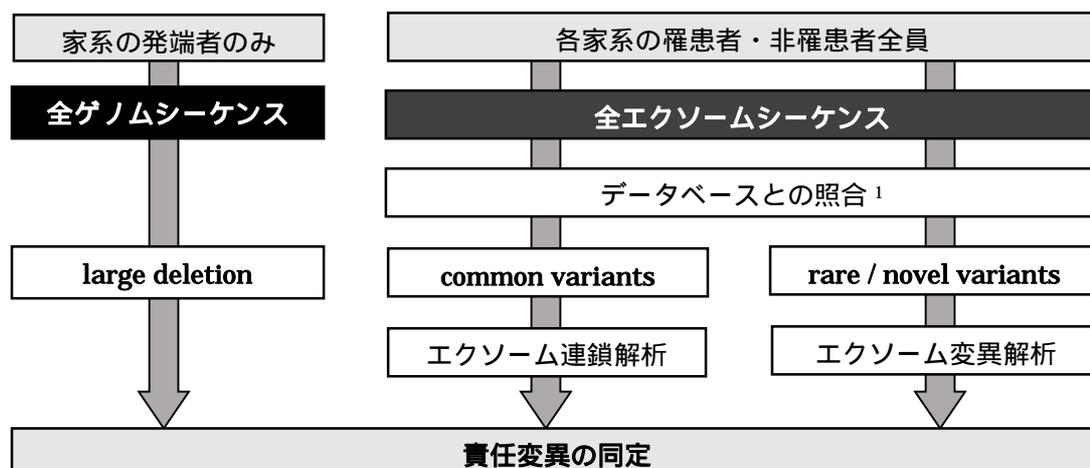
1型糖尿病を家系内に複数発症する濃厚発症家系を全国から集積することにより、日本人特有、かつ発症に強く寄与するrare variantを同定し、その機能を解明することで我が国の1型糖尿病の予知、根治に資する基盤情報を得ることを目的とする。

3. 研究の方法

濃厚発症家系を対象とした解析

研究期間中、家系を随時追加し最終的に17家系62名（罹患者40名、非罹患者22名）を集積し、下記の工程で責任変異の同定をおこなう（図2）。

図2．濃厚発症家系を用いた1型糖尿病責任変異の戦略的かつ戦略的絞り込み



¹ Human Genetic Variation Database, 1000 genome project, ToMMo

(1) 各家系の発端者における全ゲノムシーケンス

次世代シーケンス技術を用いて全エクソンの塩基配列を解析する場合（全エクソームシーケンス）、イントロン配列を含まないため、染色体上の大きな構造変異（large deletionなど）を見逃す可能性がある。この点を考慮し、各家系の発端者（17家系中、残余DNAを有する14名）に限定して全ゲノムシーケンスによる解析をおこなった。

(2) 家系の全員を対象とした全エクソームシーケンス

濃厚発症家系における罹患者・非罹患者を含む全対象者における全てのエクソンの塩基配列を決定し、公開されているデータベースにおけるゲノム情報と照合することで、得られた全遺伝子変異からありふれた変異common variant、稀な変異rare variant（新規多型を含む）を抽出、その両者を用いて下記のように責任変異を効率的に同定する。

Common variantを用いた解析（エクソーム連鎖解析）：全染色体上に見いだしたcommon variantと、家系における罹患者情報を対比し、罹患者に共通して見いだされる多型を抽出することで染色体上における疾患感受性遺伝子座を位置的に絞り込む。

Rare variantを用いた解析（エクソーム変異解析）：日本人における変異情報と変異のdamage score・conservation scoreを元に発症者に共通するrare variantを絞り込む。

4．研究成果

2020年度に本研究課題を申請した時点では12家系46名についてDNAサンプルを取得、臨床情報のデータベースを所有していたが、その後着実に家系集積を進め、研究機関終了時点で17家系62名（罹患者40名、非罹患者22名）となった。

(1) 発端者に対する全ゲノムシーケンス

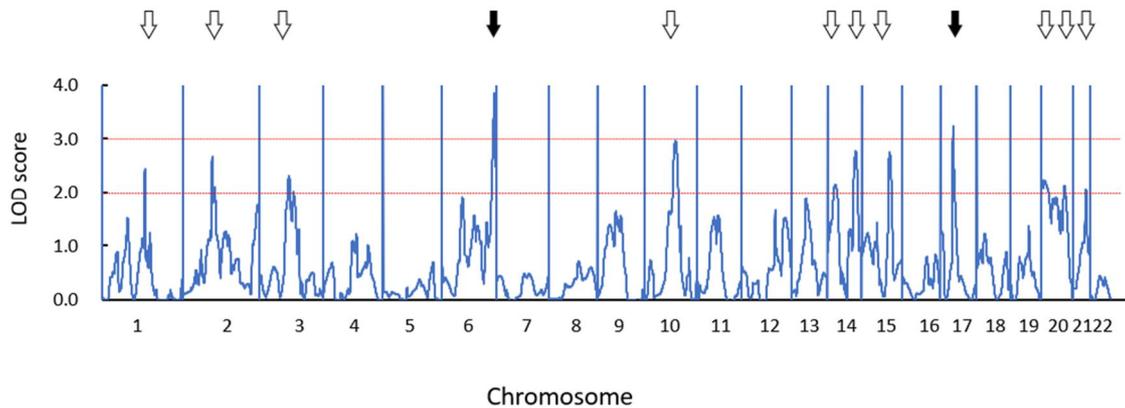
初年度に独立基盤形成支援にともなう交付決定後増額を得たことにより、各家系の発端者（17家系のうち残余DNAのある14名）に対して全ゲノムシーケンス（WGS）作業を完了した。現在、染色体上の大きな構造変異の探索、およびミスアライメントをリストアップしノイズの除去作業をおこなっている。このことにより発端者以外の対象者については全エクソンに限定して次世代シーケンスをおこなうことが可能となり、作業の効率化につながるが見込まれる。

(2) 全エクソームシーケンス

Common variantを用いた解析（エクソーム連鎖解析）

健常者にも一定頻度認められる多型（common variant）を用いて連鎖解析をおこなった結果、6番染色体と17番染色体上にLODスコア3.0以上のsignificant peakを認め、LODスコア2.0以上のsuggestive peakも10か所に認め、これまで報告のない未知の疾患感受性遺伝子座の染色体上の位置情報の絞り込みに成功した（図3）。

図3. 日本人1型糖尿病濃厚発症家系を用いたエクソーム連鎖解析

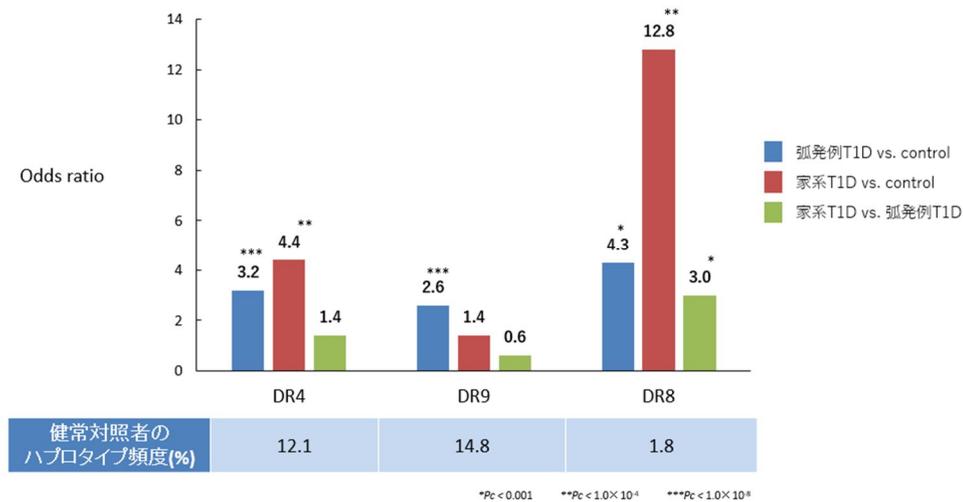


Rare variant を用いた解析 (エクソーム変異解析)

- 1. HLA 遺伝子の検討

Class HLA DRB1-DQB1 ハプロタイプのオッズ比を、典型的な孤発例1型糖尿病 (青) と今回集積した家系1型糖尿病 (赤) で比較したところ、DR4 (*DRB1*04:05-DQB1*04:01*) および DR8 (*DRB1*08:02-DQB1*03:02*) において有意な関連を認め、DR9 (*DRB1*09:01-DQB1*03:03*) については有意な関連には至らなかった。特に DR8 のオッズ比は 12.8 と極めて高く、孤発例1型糖尿病を対象としたオッズ比も 3.0 と有意な関連を認めたことから、一般集団におけるハプロタイプ頻度が 1.8% と比較的稀なハプロタイプ DR8 が家族内集積に寄与する rare haplotype であり発症に強く寄与する (効果量が高い) ことが示された。

図4. 家系、および孤発例1型糖尿病における DRB1-DQB1 ハプロタイプのオッズ比

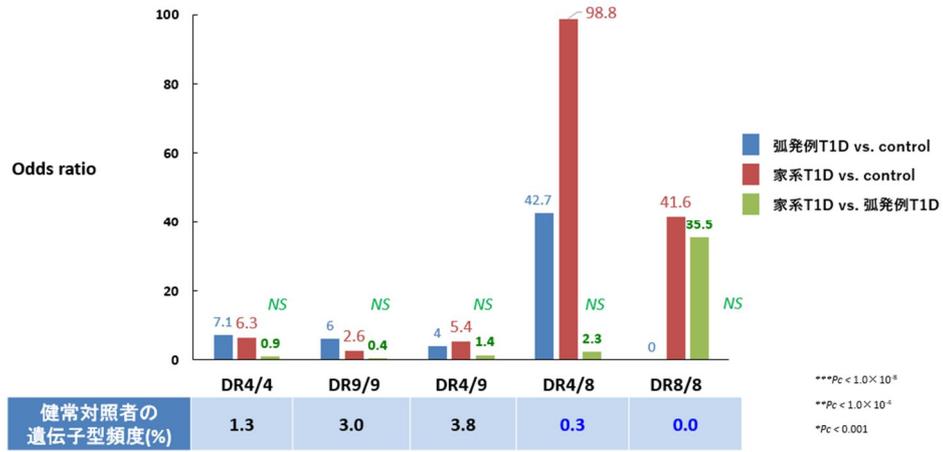


さらに、DRB1-DQB1 ハプロタイプの組み合わせに当たる遺伝子型によるオッズ比を同様に比較したところ、DR4/DR8 という一般集団では 0.3% しか分布していない稀な遺伝子型が、家系1型糖尿病において 98.8 という突出したオッズ比を示すことも判明し、DR8 のホモ (DR8/DR8) という一般集団では認められない遺伝子型も家系1型糖尿病には認められたことで日本における家族内集積に DR4/DR8 および DR8/DR8 遺伝子型が強く寄与することが明らかとなった。

- 2. non HLA 遺伝子の検討

欧米における既報の全ゲノム関連解析で同定された疾患感受性遺伝子座はこれまで 81 以上報告されている。家系1型糖尿病の全染色体上の全エクソムの塩基配列を同定することで、エクソン上のアミノ酸変異をとまなう Rare variant をリスト化することが可能になる。このうち、NOTCH2 遺伝子 (1p12)、PTPN22 遺伝子 (1p13.2)、CFTR 遺伝子 (7q31.2)、CEL 遺伝子 (9q34.2)、SH2B3 遺伝子 (12q24.12)、TYK2 遺伝子 (19p13.2) などの候補遺伝子上に、遺伝子の機能に影響する可能性の高いアミノ酸変異を抽出した。

図5. 家系、および孤発例1型糖尿病におけるDRB1-DQB1遺伝子型のオッズ比



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 12件）

1. 著者名 Nosō S, Babaya N, Hiromine Y, Taketomo Y, Niwano F, Yoshida S, Ikegami H.	4. 巻 14
2. 論文標題 Metabolic signatures of β -cell destruction in type 1 diabetes.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 J Diabetes Investig.	6. 最初と最後の頁 48-57
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jdi.13926.	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 Babaya N, Itoi-Babaya M, Ueda H, Kobayashi M, Nosō S, Hiromine Y, Ishikawa A, Fujisawa T, Ikegami H.	4. 巻 13
2. 論文標題 Novel loci for hyperglycemia identified by QTL mapping of longitudinal phenotypes and congenic analysis.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 1315
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-023-28189-9.	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 Ikegami H	4. 巻 14
2. 論文標題 Which comes first in type 1 diabetes: Autoimmunity or dysglycemia?	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 J Diabetes Investig.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jdi.13984	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 Kawasaki E, Shimada A, Imagawa A, Abiru N, Awata T, Oikawa Y, Osawa H, Kawabata Y, Kozawa J, Kobayashi T, Takahashi K, Chujo D, Fukui T, Miura J, Yasuda K, Yasuda H, Kajio H, Hanafusa T, Ikegami H; Committee of type 1 diabetes, Japan Diabetes Society.	4. 巻 14
2. 論文標題 Bivalent GAD autoantibody ELISA improves clinical utility and risk prediction for adult autoimmune diabetes	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 J Diabetes Investig.	6. 最初と最後の頁 570-581
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jdi.13980	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 Kawasaki E, Shimada A, Imagawa A, Abiru N, Awata T, Oikawa Y, Osawa H, Kawabata Y, Kozawa J, Kobayashi T, Takahashi K, Chujo D, Fukui T, Miura J, Yasuda K, Yasuda H, Kajio H, Hanafusa T, Ikegami H; Committee of type 1 diabetes, Japan Diabetes Society.	4. 巻 14
2. 論文標題 Comparing the clinical significance and antigen specificity of insulinoma-associated antigen-2 autoantibodies between radioimmunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay in Japanese patients with type 1 diabetes	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 J Diabetes Investig.	6. 最初と最後の頁 58-66
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jdi.13910.	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 Niwano F, Babaya N, Hiromine Y, Matsumoto I, Kamei K, Taketomo Y, Yoshida S, Takeyama Y, Noso S, Ikegami H.	4. 巻 107
2. 論文標題 Three-Year Observation of Glucose Metabolism After Pancreaticoduodenectomy: A Single-Center Prospective Study in Japan.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Clin Endocrinol Metab.	6. 最初と最後の頁 3362-3369
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1210/clinem/dgac529.	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 Hiromine Y, Noso S, Babaya N, Taketomo Y, Niwano F, Okuda Y, Yasutake S, Minohara T, Tsuda N, Hama Y, Ikegami H.	4. 巻 62
2. 論文標題 Glycemic Excursion and Insulin Action Revealed in a Rare Case of Type 1 Diabetes Complicated with Short Bowel Syndrome.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Intern Med.	6. 最初と最後の頁 1023-1029
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2169/internalmedicine.0287-22.	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 Hiromine Y, Noso S, Rakugi H, Sugimoto K, Takata Y, Katsuya T, Fukuda M, Akasaka H, Osawa H, Tabara Y, Ikegami H.	4. 巻 13
2. 論文標題 Poor glycemic control rather than types of diabetes is a risk factor for sarcopenia in diabetes mellitus: The MUSCLES-DM study.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Diabetes Investig.	6. 最初と最後の頁 1881-1888
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jdi.13882.	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 Ikegami H, Hiromine Y, Noso S.	4. 巻 22
2. 論文標題 Insulin-dependent diabetes mellitus in older adults: Current status and future prospects.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Geriatr Gerontol Int.	6. 最初と最後の頁 549-553
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ggi.14414.	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 Ikegami H, Babaya N, Noso S	4. 巻 12
2. 論文標題 Beta-cell failure in diabetes: common susceptibility and mechanisms shared between type 1 and type 2 diabetes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Diabetes Investig.	6. 最初と最後の頁 1526-1539
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jdi.13576.	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 Niwano F, Babaya N, Hiromine Y, Matsumoto I, Kamei K, Noso S, Taketomo Y, Takeyama Y, Kawabata Y, Ikegami H	4. 巻 106
2. 論文標題 Glucose metabolism after pancreatectomy: opposite extremes between pancreaticoduodenectomy and distal pancreatectomy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Clin Endocrinol Metab.	6. 最初と最後の頁 e2203-e2214
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1210/clinem/dgab036.	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 Babaya N, Noso S, Hiromine Y, Taketomo Y, Niwano F, Yoshida S, Yasutake S, Kawabata Y, Ikegami H	4. 巻 11
2. 論文標題 Relationship of continuous glucose monitoring-related metrics with HbA1c and residual β -cell function in Japanese patients with type 1 diabetes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 4006
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-83599-x.	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 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 6件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 池上博司、川畑由美子、能宗伸輔
2. 発表標題 1 型糖尿病の遺伝素因 : common variant と rare variant
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 長江亮太、橘恵、今川彰久、寺前純吾、金網規夫、小谷紀子、高橋信行、寺川瞳、阿比留教生、栗田卓也、池上博司、能宗伸輔 他
2. 発表標題 1 型糖尿病の発症時のビタミンD濃度 -日本人 1 型糖尿病の包括的データベースの構築と臨床研究への展開(TIDE-J)より-
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 池上博司、能宗伸輔
2. 発表標題 1 型糖尿病の発症・進展に関する遺伝素因とバイオマーカー
3. 学会等名 第21回日本先進糖尿病治療・1 型糖尿病研究会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ikegami H
2. 発表標題 Diabetes, obesity and liver disease: from mechanisms to therapies: Genetics of type 1 diabetes
3. 学会等名 KNUH-DDES International Symposium on Metabolic Disorders（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 池上博司
2. 発表標題 1型糖尿病の成因と病態
3. 学会等名 第57回糖尿病学の進歩（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 池上博司
2. 発表標題 NODマウス：マウスからヒトへ、1型から2型へ
3. 学会等名 第36回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Noso S, Hosomichi K, Babaya N, Hiromine Y, Taketomo Y, Niwano F, Kawabata Y, Ikegami H
2. 発表標題 Identification of rare variants in multiplex families of type 1 diabetes by whole exome sequencing
3. 学会等名 18th Immunology of Diabetes Society Congress（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Berard L, Javier AF, Brette S, Kelly C, Ikegami H, Dubravka EJ, Bruttomesso D, Peters A, Pilorget V, Rammanthan B, Renard E, Wilmot E
2. 発表標題 DIFFERENCES IN PATIENT-REPORTED OUTCOMES BY AGE AND REGION IN ADULTS WITH TYPE 1 DIABETES IN THE SAGE STUDY
3. 学会等名 14th International Conference on Advanced Technologies & Treatments for Diabetes（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 池上博司、能宗伸輔、川畑由美子
2. 発表標題 1型糖尿病の遺伝素因：劇症1型糖尿病・濃厚発症家系からのメッセージ
3. 学会等名 第64回日本糖尿病学会年次学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021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	池上 博司 (Ikegami Hiroshi) (20221062)	近畿大学・医学部・教授 (34419)	
研究分担者	馬場谷 成 (Babaya Naru) (10449837)	近畿大学・医学部・講師 (34419)	
研究分担者	廣峰 義久 (Hiromine Yoshihisa) (30460851)	近畿大学・医学部・講師 (34419)	

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
---------	---------