

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 8 月 29 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591140

研究課題名（和文）小児 1 型糖尿病の遺伝的素因の探索

研究課題名（英文）Research of genetic factor for childhood-onset Type 1 diabetes

研究代表者

杉原 茂孝（SUGIHARA SHIGETAKA）

東京女子医科大学・医学部・教授

研究者番号：10241960

研究成果の概要（和文）：

1 型糖尿病の大部分は、遺伝因子と環境因子の関与のもとで自己免疫反応により、インスリンを産生する膵β細胞が障害される疾患（1A 型）である。

今回我々は、多施設共同研究により、日本人小児期発症 1A 型糖尿患者の HLA-DRB1、DQB1、DPB1、A、C、B 遺伝子の解析を行った。日本人に特徴的な遺伝子の関連が明らかになった。一部白人と共通する遺伝子の関連も見いだされ点は興味深い。TDT によって 1A 型糖尿病では、HLA 遺伝子のゲノミックインプリンティングを示唆する結果は得られなかった。HLA 以外の遺伝子 SNP についても重要な情報が得られた。

研究成果の概要（英文）：

Most cases of type 1 diabetes mellitus are type 1A (T1A), caused by an autoimmune reaction, involving genetic and environmental factors, which ultimately disrupt insulin-producing pancreatic β cells.

This study analyzed the HLA-DRB1, DQB1, DPB1, A, C, and B genes in Japanese patients with T1A to identify candidate genes specific for Japanese individuals. Some of the genes were also involved in diabetes in Caucasian. The results of TDT demonstrated no genomic imprinting of HLA genes in Japanese patients. We also identified SNPs in genes other than HLA.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
2012 年度	400,000	120,000	520,000
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：小児 1 型糖尿病、遺伝素因、HLA 遺伝子、自己免疫、SNP、疾患感受性遺伝子、疾患抵抗性遺伝子、遺伝子—遺伝子相互作用

1. 研究開始当初の背景

1 型糖尿病の大部分は、遺伝因子と環境因子の関与のもとで自己免疫反応によりインスリンを産生する膵β細胞が障害される疾患（1A 型）である。遺伝因子としては、HLA クラス II 遺伝子が最も重要で白人では 50%

以上の関与があるといわれる。他に、インスリン遺伝子、CTLA-4 遺伝子など多数の免疫関連遺伝子の関与が示唆されている。日本人小児では 1 型糖尿病の発症頻度が、白人小児の 10 分の 1 から 30 分の 1 と少ないが、その理由は不明であり、白人とは異なる遺伝・環境

因子が示唆されている。さらに、小児期発症例は成人発症例と遺伝素因が異なることが推測される。しかし、これまで多数例による研究はなく、日本人小児例全体について結論は得られていない。

今回は以下に示す2種類の遺伝的素因について検討する。

(1) HLA クラス II、クラス I 遺伝子、特に HLA-DPB1 遺伝子の関与の解明

1 型糖尿病では、日本人の HLA-DRB1、DQB1 疾患感受性アレルが、白人とは全く異なっている。私どもは以前、88 人の日本人小児 1 型糖尿病患者を対象として、患児のほとんどが HLA-DRB1*0901-DQB1*0303、あるいは DRB1*0405-DQB1*0401 を持つ 2 群に大別され、両群間でグルタミン酸脱炭酸酵素 (GAD) に対する自己抗体産生や膵β細胞の傷害過程に差が生ずること、発症年齢 10 歳以上と未満で遺伝素因が異なる可能性を報告した。他にも、HLA 遺伝子が発症年齢に関与することを示唆する報告があるが結論は得られていない。DPB1 遺伝子については、最近いくつかの民族集団で 1 型糖尿病疾患感受性、あるいは抵抗性となるという報告があるが、日本人では結論は得られていない。

(2) HLA 以外の関連遺伝子 SNP の関与の解明

私どもは以前、免疫制御に関与する CTLA-4 遺伝子について、49 位塩基の A/G 多型を調べ日本人小児例では有意に G アレルが多いことを報告した。他にも、Vitamin D 受容体遺伝子、Foxp3 遺伝子、PD-1 遺伝子などについて小児 1 型糖尿病との関連を示唆する報告があるが、いずれも少数例での検討であり結論は得られていない。最近、白人でゲノムワイドスタディ (GWAS) によって新規遺伝子が発見されているが、日本人では不明である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、全国多施設の共同研究によって、かつてない多数例の日本人小児 1 型糖尿病患者を対象として、発症に関与する遺伝素因を明らかにすることである。また、未発症同胞と両親の DNA 検体を収集し患者-同胞間比較や伝達不平衡解析などを行い、遺伝素因伝達様式について明らかにする。

また、HLA 以外の関連遺伝子の関与を明らかにする。既報の各遺伝子については SNP 解析を実施する。さらに、臨床情報と遺伝子解析の結果から遺伝統計学を用いて、遺伝子型と表現型との関連について解析する。

これらの知見は、小児 1 型糖尿病の発症機構の解明とともに、患者およびハイリスク群である近親者、特に同胞への新たな予防・早期介入・治療指針の作成にも寄与する。

3. 研究の方法

全国 37 施設において、研究の目的と意義

を説明し同意の得られた提供者から静脈血を採取して血液試料を得た。血液試料は匿名化された後、DNA を抽出し、国立成育医療センター研究所に保管された。

16 歳以下発症の小児 1 型糖尿病患者 531 人 (男子 199 人、女子 332 人)、患者の父母 186 組 (372 人)、患者の健常同胞 113 人の DNA 検体を集積した。同時に患者の臨床データおよび両親、同胞の臨床情報は、匿名化されたデータシートを使用して収集した。

GAD 抗体かつ/または IA-2 抗体陽性 (1A 型) の患者 430 人 (男子 158 人、女子 272 人、診断時年齢 0.1~16.4 歳)、抗体陰性 (1B 型) 67 人、1A 型の同胞 83 人、149 組の両親-患児トリオを主たる対象とした。

末梢血単核球より DNA を抽出し、WAKFlow HLA typing kit を用いてタイピングを行った。

統計解析は、Fisher's exact test を用い、corrected p values (Pc) (p values に検討した locus や haplotype の数をかけたもの) を算出し (ボンフェローニ法)、 $P_c < 0.05$ を統計学的に有意と判定した。HLA のコントロールは第 11 回日本 HLA ワークショップのデータを用いた。

HLA 以外の遺伝子として、rs1131896 (MICA)、rs11171739 (ERBB3)、rs3757247 (BACH2)、rs231726 (CTLA4)、rs628224 (PAX6)、rs3822607 (CAMK2A)、rs6356 (TH-INS-IGF2)、rs2073610 (AIRE)、など 142 個の SNP について検討した。有意のデータが得られた tag SNP を有する遺伝子では、より詳細なハプロタイプ解析を実施した。

4. 研究成果

(1) HLA 遺伝子の解析

① ケース-コントロールスタディと TDT (transmission disequilibrium test)

疾患感受性アレルと疾患抵抗性アレルの結果のまとめを表 1 に示す。カッコ内のアレルはケース-コントロールスタディでは有意であったが、TDT で有意でなかったものを示す。横列のハイフンで繋がれたアレルは強い連鎖不平衡をもつハプロタイプを示す。即ち C*01:02-B*54:01-DRB1*04:05-DQB1*04:01、C*08:01-B*40:06-DRB1*09:01-DQB1*03:03、DRB1*08:02-DQB1*03:02、という 3 つの疾患感受性ハプロタイプと C*12:02-B*52:01-DRB1*15:02-DQB1*06:01-DPB1*09:01、DRB1*15:01-DQB1*06:02、DRB1*08:03-DQB1*06:01、A*33:03-C*14:03-B*44:03 という 4 つの疾患抵抗性ハプロタイプの存在が明らかとなった。

DPB1 アレルについて今回新たな知見が得られた。DPB1*02:01 と *03:01 は疾患感受性であった。DPB1*04:02 と *09:01 は疾患抵抗性であった。DPB1*09:01 は DRB1*15:02-

DQB1*06:01 疾患抵抗性ハプロタイプと連鎖不平衡を示したが、他の3つのDPB1 アレルはいずれのDRB1-DQB1 ハプロタイプとも関連を示さなかった。

表1. 日本人小児1A型糖尿病におけるHLA疾患感受性および疾患抵抗性遺伝子型のまとめ

	HLA Class II			HLA Class I			RD
	DRB1	DQB1	DPB1	A	C	B	
疾患感受性	*04:05 —	*04:01 —		*01:02 —	*54:01		0.697
アレル	*09:01 —	*03:03 —		*08:01 —	(*40:06)		0.597
	*08:02 —	*03:02					0.857
			(*02:01)	(*24:02)		(*07:02)	-
			(*03:01)				
疾患抵抗性	*15:02 —	*06:01 —	*09:01 —	*12:02 —	*52:01		0.861
アレル	*15:01 —	*06:02					0.907
	*08:03 —	*06:01					0.842
				*33:03 —	*14:03 —	(*44:03)	0.842
	(*04:06)	*03:01	(*04:02)	(*11:01)	(*15:02)	*15:01	-
				(*26:01)			

()内は case-control studyでは有意だが、TDTでは有意でないものを示す。(文献により引改変)
 “—”で繋がれ横一列に並べられたアレルは、高い連鎖不平衡値(RD)を示す。
 RD: relative linkage disequilibrium
 グレイのボックスは、多くの白人民族でも報告されているアレルを示す。

これらハプロタイプおよびアレルのほとんどは日本人に特徴的なものであったが、一部は白人と共通するものも認められた。DRB1*15:01-DQB1*06:02 疾患抵抗性ハプロタイプ、および DPB1*03:01、A*24:02、B*07:02 疾患感受性アレル、DPB1*04:02、A*11:01、B*44:03 疾患抵抗性アレルは多くの民族に共通して認められている (表1)。

②1A型患者と両親との比較

DRB1-DQB1 ハプロタイプの組み合わせについて患者と両親で比較すると、DRB1*09:01-DQB1*03:03 をホモに持つ場合 (DR9/9) (OR 3.77、95%CI: 1.84-7.72、 $P < 10^{-2}$)、と DRB1*04:05-DQB1*04:01 と DRB1*08:02-DQB1*03:02 をヘテロに持つ場合 (DR4/8) (OR 4.38、95%CI: 1.92-10.01、 $P < 10^{-2}$) が患者で有意に高かった。この2つの組み合わせが超ハイリスクタイプであることが示された。

一方、疾患抵抗性アレルを持つグループの頻度は明らかに低い。この結果は、疾患感受性 DRB1-DQB1 ハプロタイプの量的効果と疾患抵抗性アレルの抑制効果を示唆するといえる。

③1A型患者と未発症同胞との比較

DRB1-DQB1 ハプロタイプの組み合わせについて66人の患者と83人の未発症同胞で比較すると、疾患感受性ハプロタイプを持たず疾

患抵抗性アレルを持つ群が同胞で有意に高頻度であった。83人の同胞のうち45%が疾患抵抗性アレルを持っていた。一方、7人 (8.4%)の同胞がGAD抗体あるいはIA-2抗体を持っていた。7人とも疾患抵抗性のDRB1、DQB1アレルを持っていなかった。自己抗体陽性の同胞は、注意深くフォローする必要がある。

④HLA 遺伝子のゲノミックインプリンティングについて

これまでにHLAについてゲノミックインプリンティングを示唆する報告がいくつかみられる。しかし、今回の小児インスリン治療研究会の検討では、DRB1、DQB1、DPB1、A、C、Bアレルのいずれも、母親あるいは父親から患者に有意に高率に伝搬していなかった (表2)。

表2. 日本人小児1A型糖尿病149組の両親-患者トリオを用いたTransmission disequilibrium test (TDT)

HLA	Parent of origin	Transmitted			Non-transmitted			TDT	OR	[95%CI]	P
		Parent of origin		Parent of origin		Pc	Transmission from				
		Combined	Maternal	Paternal	Combined						
DRB1	*04:05	85	41	44	30	12	18	<10 ⁻⁵	2.83	(1.87-4.36)	NS
	*08:02	22	13	19	6	5	1	<10 ⁻³	5.33	(2.23-12.78)	NS
	*09:01	85	47	38	33	13	20	<10 ⁻⁵	2.58	(1.72-3.86)	NS
	*08:03	6	1	5	23	13	10	<0.05	0.26	(0.11-0.64)	NS
	*15:01	0	0	0	26	15	11	<10 ⁻⁵	0.00		NS
	*15:02	3	1	2	39	21	18	<10 ⁻⁴	0.08	(0.02-0.26)	NS
	*04:06	2	2	0	10	4	6	NS			NS
DQB1	*04:01	80	38	42	29	12	17	<10 ⁻⁵	2.76	(1.88-4.22)	NS
	*03:02	49	29	21	17	9	8	<10 ⁻³	2.88	(1.68-5.06)	NS
	*03:03	86	46	48	32	15	17	<10 ⁻⁵	2.89	(1.79-4.63)	NS
	*03:01	7	4	3	40	17	23	<10 ⁻⁴	0.18	(0.08-0.39)	NS
	*06:01	8	2	6	62	34	28	<10 ⁻⁴	0.13	(0.06-0.27)	NS
	*06:02	0	0	0	25	15	10	<10 ⁻⁵	0.00		NS
DPB1	*02:01	63	30	33	43	17	26	NS			NS
	*03:01	23	12	11	14	8	6	NS			NS
	*09:01	7	3	4	35	18	17	<10 ⁻⁴	0.20	(0.08-0.48)	NS
	*04:02	21	10	11	24	14	10	NS			NS
A	*24:02	106	48	52	70	36	34	NS			NS
	*33:03	9	4	5	39	17	11	<10 ⁻²	0.32	(0.15-0.68)	NS
	*11:01	19	11	8	25	15	11	NS			NS
	*26:01	14	8	5	20	10	10	NS			NS
C	*01:02	89	30	38	36	18	18	<10 ⁻³	1.92	(1.28-2.87)	NS
	*08:01	43	22	21	20	11	9	<0.05	2.15	(1.28-3.65)	NS
	*12:02	7	4	3	40	21	19	<10 ⁻⁵	0.18	(0.08-0.39)	NS
	*14:03	8	4	4	24	14	10	<0.05	0.33	(0.15-0.74)	NS
	*15:02	7	4	3	13	8	5	NS			NS
B	*54:01	62	27	35	15	7	8	<10 ⁻³	4.13	(2.36-7.26)	NS
	*01:06	28	14	14	12	3	9	NS			NS
	*07:02	17	7	10	12	5	7	NS			NS
	*15:01	19	6	4	29	14	15	<0.05	0.34	(0.17-0.71)	NS
	*52:01	7	4	3	42	23	19	<10 ⁻⁵	0.17	(0.07-0.37)	NS
	*44:03	9	5	4	24	14	10	NS			NS

この結果から、日本人小児1A型糖尿病では、HLAクラスII遺伝子とクラスI遺伝子のゲノミックインプリンティングが発症機序に関与していないと示唆された。

⑤HLA 遺伝子型と発症年齢との関連

遺伝子型-表現型関連の一つとして、発症

年齢と HLA-DRB1*アレルの関連を検討した。

図 1 に示すように DRB1*09:01 の頻度は 2～5 歳発症例で有意に高かった。DRB1*08:02 は 6～16 歳発症例で高い傾向を示したが、有意ではなかった。DRB1*04:05 アレル頻度は発症年齢とは有意な関連がなかった。また、C*01:02、C*08:01 などのクラス I 遺伝子については発症年齢で有意な差はなかった。

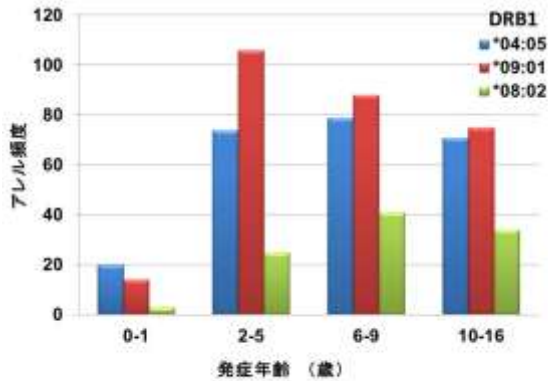


図1. 日本人小児1A型糖尿病患者の発症年齢別の4群におけるDRB1アレル頻度

(2) HLA 以外の関連遺伝子 SNP について

① ケースコントロールスタディ

142 個の SNP のうち、ケースコントロールスタディで 7 個の SNP が、1A 型糖尿病患者で有意に高頻度であることが明らかとなった。

有意な 7 個の SNP は、rs1131896 (MICA)、rs11171739 (ERBB3)、rs3757247 (BACH2)、rs231726 (CTLA4)、rs628224 (PAX6)、rs3822607 (CAMK2A)、rs6356 (TH-INS-IGF2) である。

これらについて、ロジスティック重回帰分析を行ったが、特に有意な遺伝子-遺伝子相互作用は見出されなかった。

② HLA と HLA 以外の関連遺伝子 SNP との関連

HLA DRB1-DQB1 疾患感受性ハプロタイプ 2 つのホモ (I 群: DR4/4, DR9/9, DR8/8)、疾患感受性 2 つのヘテロ (II 群: DR4/9, DR4/8, DR9/8)、疾患感受性 1 つ (III 群: DR4/X, DR9/X, DR8/X)、およびその他 (IV~VI 群) に分類し、142 SNP のアレル頻度を各群間で比較した。rs1131896 (MICA) で有意な、また rs2776 (TXN)、および rs706779 (IL2RA) で有意ではないが大きな差異が認められ、これらの SNP が HLA 遺伝子と何らかの相互作用を介して易罹患性に寄与している可能性が考えられた。ただし、rs1131896 は HLA クラス III 領域に位置しているため連鎖不平衡についてさらに検討が必要である。

③ SNP と発症年齢との関連

rs2290400 (ORMDL3-GSDMB) のリスクアレ

ルをヘテロで有する場合、幼児期の発症リスクの増加が示唆された。

rs2290400 (ORMDL3-GSDMB) と DRB1*09:01 との間には有意な関連はなかった。

終わりに

HLA については、得られた遺伝子多型の情報から、今後、抗原提示分子の構造と提示される自己抗原ペプチドの関連などの研究が進められることが期待される。

HLA 以外の遺伝子 SNP についても今回重要な情報が得られた。

白人と比べ発症頻度の非常に低い日本人 1A 型糖尿病についてのこれらの遺伝子因子の研究結果は、糖尿病の発症機序の解明のためにも貴重なデータとなると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① Sugihara S. Genetic Susceptibility of Childhood Type 1 Diabetes Mellitus in Japan. *Pediatric Diabetes, Endocrine and Metabolic Diseases in Japan Past, Present and Future, Pediatric Endocrinology Reviews*, 10, Supplement 1:62-71, 2012, 査読有
- ② Sugihara S, Ogata T, Kawamura T, (他 36 名, 1 番目), HLA-class II and class I genotypes among Japanese children with Type 1A diabetes and their families. *Pediatr Diabetes*. 13(1): 33-44, 2012, 査読有
- ③ 杉原茂孝, 日本人小児期発症 1 型糖尿病の遺伝的素因, 特集小児思春期糖尿病の最近の動向, *Diabetes Frontier*, 23:654-665, 2012, 査読無
- ④ 杉原茂孝, 小児 1 型糖尿病～特に日本と欧米の共通点・相違点 特集 1 型糖尿病～日本から世界への発信～ *Diabetes Frontier*, 23:295-303, 2012, 査読無

[学会発表] (計 10 件)

- ① Ayabe T, Ogata T, Kawamura T, (他 3 名, 6 番目), 17q12-q21 variant is associated with early-onset type 1 diabetes. The 38th annual Meeting of the international Society for Pediatric and Adolescent Diabetes (ISPAD), 2012. 10.10, Istanbul, Turkey
- ② 竹本幸司, 杉原茂孝, 緒方勤, 雨宮伸, 小児インスリン治療研究会遺伝素因プロ

- ジェクトメンバー，小児 1 型糖尿病(1A 型)の同胞発症率と同胞における遺伝素因の解析. 第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会，2012. 5，横浜
- ③ 綾部匡之，緒方勤，川村智行，浦上達彦，菊池信行，雨宮伸，杉原茂孝，全国多施設共同研究による日本人小児期発症 1 型糖尿病の候補 SNP 研究(第 2 報)，第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会，2012. 5，横浜
- ④ 綾部匡之，緒方勤，雨宮伸，杉原茂孝，17q12-q21 染色体領域の多型は，喘息だけでなく 1 型糖尿病の幼児期発症とも関連する. 第 115 回日本小児科学会学術集会，2012. 4，福岡
- ⑤ 竹本幸司，杉原茂孝，緒方勤，雨宮伸，小児 1 型糖尿病(1A 型)の同胞発症率と同胞における遺伝素因の解析. 第 45 回日本小児内分泌学会学術集会. 2011. 10，大宮
- ⑥ 綾部匡之，緒方勤，雨宮伸，杉原茂孝，ORMDL3-GSDMB 遺伝子領域の SNP (rs2290400) は幼児期発症 1 型糖尿病と関連する. 第 45 回日本小児内分泌学会学術集会. 2011. 10，大宮
- ⑦ 杉原茂孝，緒方勤，川村智行，浦上達彦，菊池信行，佐治博夫，徳永勝士，雨宮伸，全国多施設共同研究による日本人小児期発症 1 型糖尿病およびその家族の HLA 遺伝子解析. 第 54 回日本糖尿病学会年次学術集会. 2011. 5，札幌
- ⑧ 綾部匡之，緒方勤，川村智行，浦上達彦，菊池信行，雨宮伸，杉原茂孝，全国多施設共同研究による日本人小児期発症 1 型糖尿病の候補 SNP 研究. 第 54 回日本糖尿病学会年次学術集会. 2011. 5. 札幌
- ⑨ Sugihara S, Ogata T, Kawamura T, (他 36 名 1 番目), The first nationwide multicenter study on the HLA-DRB1, DQB1, DPB1 genotype in Japanese type 1 diabetes children and their families. The 36th annual Meeting of the international Society for Pediatric and Adolescent Diabetes (ISPAD), 2010. 10. 30 . Buenos Aires, Argentina.
- ⑩ 杉原茂孝，緒方勤，川村智行，(他 36 名，1 番目)，全国多施設共同研究による日本人小児期発症 1 型糖尿病およびその家族の HLA-DRB1, DQB1, DPB1 遺伝子解析. 第 44 回日本小児内分泌学会学術集会. 2010. 10. 7，大阪

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉原 茂孝 (SUGIHARA SHIGETAKA)
東京女子医科大学・医学部・教授
研究者番号：10241960

(2) 研究分担者

雨宮 伸 (AMEMIYA SHIN)
埼玉医科大学・医学部・教授
研究者番号：10118903
(H22: 研究分担者)

(3) 連携研究者

緒方 勤 (OGATA TSUTOMU)
国立成育医療センター研究所小児思春期
発育研究部・部長
研究者番号：40169173

徳永 勝士 (TOKUNAGA KATSUSHI)
東京大学大学院医学系研究科・国際保健学
専攻人類遺伝学分野・教授
研究者番号：40163977