

令和 4 年 6 月 26 日現在

機関番号：84427

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K07895

研究課題名(和文) 若年発症遺伝性糖尿病におけるミトコンドリア遺伝子異常の役割

研究課題名(英文) Role of mitochondrial gene mutations for the development of early-onset familial diabetes

研究代表者

依藤 亨 (YORIFUJI, TOHRU)

地方独立行政法人大阪市民病院機構大阪市立総合医療センター(臨床研究センター)・臨床研究センター・部長

研究者番号：60220779

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：日本人若年発症糖尿病の遺伝背景、特にミトコンドリア遺伝子の関与を検討する研究である。(1)臨床的に単一遺伝子性糖尿病が疑われる患者の家系発端者368例について、既知の原因25遺伝子のパネル検査、MLPA法、ミトコンドリア遺伝子m.3243A>G変異のRFLP法、染色体6q24領域のメチル化特異的PCR法を行った。病原性バリエントを156名に、また病原性の可能性のあるバリエントを44名に同定した。(2)上記の検討で病的バリエントを認めない症例とMODY遺伝子の病的バリエントを持つ対象群各8例についてミトコンドリア遺伝子を検討したが、有意に頻度の高いヘテロプラスミー部位は認められなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

当初目的とした若年2型糖尿病特有のミトコンドリア遺伝子異常は認めなかったが、研究の過程で我が国における単一遺伝子性糖尿病の頻度、遺伝子スペクトルについて明らかにすることができた。単一遺伝子性糖尿病の治療戦略は一般の1型、2型糖尿病と異なるものがあり、通常の治療を行うことは時に有害であり、患者の不利益につながるばかりか、社会資本の浪費にもつながる。遺伝背景に応じた糖尿病のテーラーメイド治療のための基礎データを構築できた。

研究成果の概要(英文)：This is a study focusing on the genetic background of early-onset diabetes in Japan with special attention on the role of mitochondrial DNA variants. (1) For 368 Japanese patients with suspected monogenic diabetes, we performed targeted next generation sequencing of 25 known causative genes, MLPA analysis, PCR-RFLP analysis of mitochondrial m.3243A>G variant, and methylation-specific PCR analysis of the imprinted 6q24 locus. As a result, we identified 156 pathogenic/likely pathogenic variants. In addition, we could identify 44 patients with variants of the population frequency <0.001 and the CADD score >20. (2) We then established the methodology to deep-sequence mitochondrial DNA by using a next-generation sequencer. The analysis was applied to 8 patients without a pathogenic variant by the above mutational analysis and 8 control patients. As a result, we could identify 207 variant loci of heterogeneity. However, there were no locus significantly enriched in the patient group.

研究分野：医学

キーワード：MODY 遺伝子 ミトコンドリア

1. 研究開始当初の背景

単一遺伝子性糖尿病は新生児糖尿病、若年発症優性遺伝性糖尿病 (MODY)、ミトコンドリア性糖尿病、症候群性糖尿病などに代表される。糖尿病全体の 1-3%を占めると言われるが、通常の 1 型、2 型糖尿病と異なる管理が必要になることがあり、その同定は重要である。我々は、従来から我が国における単一遺伝子性糖尿病の遺伝背景の解明を進めてきた。その過程で、臨床的に MODY が疑われる患者の 48.1%に頻度の高い MODY 遺伝子病的バリエーションが同定されることを報告してきた (Yorifuji et al. *Pediatric Diabetes* 2012; 13: 26-32) が、その他の症例については不明のままであった。その後、GATA6 遺伝子異常 (Yorifuji et al. *J Med Genet.* 2012;49:642-3)、インプリントされた染色体 6q24 部位の異常 (Yorifuji et al. *Diab Med* 2015; 32, 963-967)などが、不明例の一部を説明することを報告したが、比較的被験者で大部分を説明できる要因は疑問のままであった。その後、遺伝子変異未同定例を同定例と比較すると、母系遺伝が多いことを見出し、ミトコンドリア遺伝子の関与が疑われた (Yorifuji et al. *Pediatric Diabetes.* 2018;1-9)。

2. 研究の目的

既知の単一遺伝子性糖尿病の原因遺伝子に病的バリエーションを認めない若年発症糖尿病におけるミトコンドリア遺伝子異常の役割の検討を行う。

3. 研究の方法

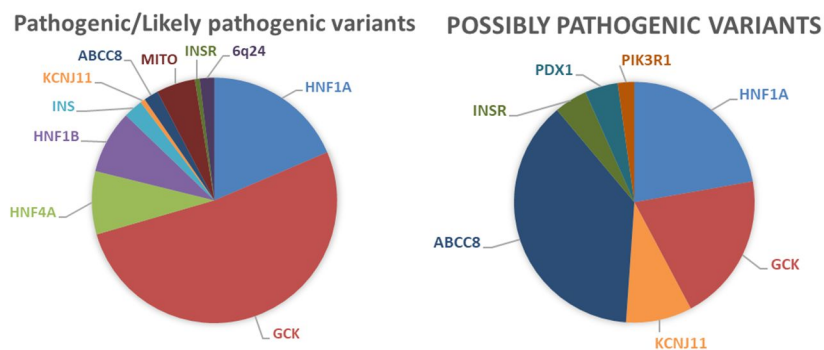
- (1) 単一遺伝子性糖尿病が疑われる 368 例の家系発端者に対して、可能な限り包括的な遺伝子解析を行い、既知遺伝子変異陰性者を同定する。その目的で、既知の単一遺伝子性糖尿病の原因遺伝子異常を次世代シーケンサーを使用した 25 遺伝子 (ABCC8, APPL1, CISD2, EIF2AK3, FOXP3, GATA4, GATA6, GCK, GLIS3, HNF1A, HNF1B, HNF4A, INS, INSR, KCNJ11, NEUROD1, NEUROG3, PAX6, PCBD1, PDX1, PIK3R1, RFX6, STAT3, WFS1, ZFP57) のパネル検査、Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)法、およびミトコンドリア遺伝子 m.3243A>G 変異の RFLP 法による検出、インプリントされた糖尿病関連の染色体 6q24 領域のメチル化特異的 PCR 法によってスクリーニングを行った。次世代シーケンサーには Thermo Fisher 者の IonPGM 卓上次世代シーケンサーを使用し、遺伝子バリエーション同定のためのプライマーセットは Ion AmpliSeq Designer® (Thermo Fisher)を使用して作成し、シーケンス結果は Ion Reporter®システム (Thermo Fisher)を使用して解析した。また、シーケンス結果を Integrative Genomics Viewer (Broad Institute) で可視化して確認し、必要に応じて Sanger シーケンスで確認した。MLPA 解析は主要な MODY 遺伝子である GCK, HNF1A, HNF1B, HNF4A 遺伝子を含む、MRC Holland 社の SALSA MLPA P241 を使用し、m.3243A>G 同定のための PCR-RFLP と 6q24 インプリント異常のためのメチル化特異的 PCR はそれぞれ既報の方法で行った (Yorifuji et al. *J. Med.Genet.* 33, 621-622; Yorifuji et al. *Diab Med* 2015; 32, 963-967)。次世代シーケンサーにより同定されたバリエーションは 2015 ACMG/AMP 基準に沿ってその病原性を判定し、

pathogenic, likely pathogenic (P/LP) と判断されるものを病的バリエントとして同定した。また、これによって病原性不明のバリエント (VUS) と判断されたバリエントのうち、gnomAD データベースおよび東北メディカルメガバンク (TMMo) の 14K データベースで遺伝子頻度 < 0.001 未満、かつ CADD スコア 20 以上のものを病原性の可能性のあるバリエントとして同定した。同定したバリエントはさらに HGMD professional データベースにより既報の有無を検討した。

- (2) 上記の検討によって病的バリエントを認めない若年発症糖尿病 8 例を対象、病的バリエントを認める例を高血糖コントロールとして、ミトコンドリア遺伝子解析を行った。すなわち、ミトコンドリア遺伝子を 2 組のプライマーセットと TaKaRa LA Taq Hot Start version (Takara) を用いて long range PCR を行い、0.8% SeaKem GTG agarose で電気泳動し、QIA quick Gel Extraction Kit を用いてゲルから抽出した。DNA 定量ののち、Ion Shear Plus Reagents kit (Thermo Fisher) を用いて酵素的に約 350 - 450 bp に断片化し、Agentcourt AMPure XP® によって回収したのち、NuSieve 3:1 agarose で電気泳動してフラグメントを回収した。回収したフラグメントに Ion Plus Fragment Library kit を用いて Ion Xpress Barcode Adapters 1-16 アダプター付加と Nick リペアを行い、再度 Agentcourt AMPure XP® によって回収したのち、E-gel Ex 2% size select で 350 bp 断片を回収した。定量後、100 pM に満たない場合は platinum PCR SuperMix high Fidelity を用いて 8 サイクルでライブラリー増幅した。作成したライブラリーを Ion PGM HiQ Chef システムと Ion PGM 卓上次世代シーケンサーを用いてシーケンスを行った。ミトコンドリア遺伝子の全長にわたりシーケンス深度 500 以上を得た。うち、Ion Reporter システムを使用して 1% 以上のヘテロプラスミーをミトコンドリア遺伝子変異として検出することとした。

4. 研究成果

- (1) 368 名の MODY 様糖尿病家系発端者において、156 例に P/LP バリエントを同定し、さらに 44 例に 45 種類の病原性の可能性のあるバリエントを同定した。これらバリエントの内訳を図に示す。



P/LP バリエントの内訳で、頻度の高い MODY 遺伝子としては GCK>HNF1A>HNF4A, HNF1B の順に頻度が高かった。GCK 遺伝子変異の頻度は 1000 人に 1.1 人とされ

ており、予想される結果であった。従来、HNF1A-MODY が最多と考えられていたが、GCK-MODY の多くが軽症で、医療機関を受診していないものが多いためと考えられ、人口ベースで見れば成人でも GCK が最多というのが実情であると考えられた。ミトコンドリア m.3243A>G 変異は頻度の高い MODY 遺伝子に続く頻度で同定された。頻用されるメトホルミンで乳酸アシドーシスのリスクが高いと考えられており、母系遺伝の症例では、難聴などの症状の有無にかかわらず遺伝子検査を行うべきであると考えられた。

病原性の可能性のあるバリエント (possibly pathogenic variant) の 45 バリエントのうち 11 バリエントは HGMD データベースに疾患表現型と関連して報告されており、真の病原性変異である可能性の高いバリエントが多く含まれていると考えられた。現在国際的に使用されている 2015ACMG/AMP の基準では、まれな原因遺伝子の場合、大規模な家系解析や in vitro での機能解析がないと P/LP と判定されにくく、受診者のみの検査を行う現状の臨床検査では真の病原性バリエントの多くが VUS と判断されてしまう可能性が示唆された。

病原性の可能性のあるバリエントのうち、約半数は ATP 感受性カリウムチャネル (K_{ATP} チャネル) を構成する ABCC8, KCNJ11 遺伝子のバリエントであった。興味深いことに、ABCC8 バリエントのうち少なくとも 4 バリエントは HGMD データベースに糖尿病ではなく高インスリン性低血糖症としてリストされていた。また、HGMD に記載のないバリエントのうち一つは明らかな機能喪失性バリエントで、本来糖尿病ではなく高インスリン性低血糖症を起こすべき遺伝子変異であった。当初高インスリン性低血糖症をきたし、次第に耐糖能異常をきたすようになる症例は散発的に報告されており、 K_{ATP} チャネルの活性化変異による従来の K_{ATP} チャネル性 MODY と異なる機序による一群であると考えられた。活性化変異の糖尿病では、スルホニル尿素薬が劇的に有効でインスリン離脱できることが多いが、機能喪失型バリエントをベースにする K_{ATP} チャネル性 MODY の薬剤反応性は異なる可能性がある。新たな一群として診療ストラテジーの確立をする必要がある。

興味深いことに MODY 疑いとされた今回の対象症例のうち、INSR のバリエントが P/LP 群に 1 例、病原性の可能性があるバリエント群に 3 例同定された。これらのうち 1 例はインスリン抵抗性糖尿病をきたす可能性のある SHORT 症候群の原因遺伝子として知られる PIK3R1 遺伝子のバリエントを伴っていた。全例、非肥満で優性遺伝性糖尿病の病歴を持っていたが、うち 2 例では明らかなインスリン過分泌が認められた。我が国のインスリン抵抗症症例の全国調査では空腹時インスリン 35 mIU/L 程度の A 型インスリン抵抗症も存在することが明らかになっており (Takeuchi et al. J Diabetes Investig. 2020;11:603-616) 比較的軽度の過体重でインスリン分泌低下による 2 型糖尿病を来しやすい

いわが国症例では MODY と臨床診断されてしまう可能性が考えられた。MODY 検出のための遺伝子パネルに INSR や PIK3R1 遺伝子を含めることの重要性が考えられた。

本研究では PDX1 のミスセンスバリエーションも 2 名に検出された。PDX1 遺伝子には、病的意義のないバリエーションが数多く存在することが報告されており (Edghill et al. Diabet Med. 2011;28:681-4) これら 2 例においてはこれらが真の病原性バリエーションであると判断するには慎重であるべきであると考えられた。

- (2) 上記の検討で病的バリエーション、病原性の可能性のあるバリエーションを持たない 8 例と明らかな病的バリエーションを検出した 8 例を対象として、ミトコンドリア遺伝子のヘテロプラスミー検出を試みた。結果として、ミトコンドリア全長にわたり、ミトコンドリア reference 配列と比較し、207 か所のヘテロプラスミー部位を検出した。しかしながら、T2D 群に特異的に集積するヘテロプラスミー部位を同定することはできなかった。

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 0件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Yamada Y, Kitayama K, Oyachi M, Higuchi S, Kawakita R, Kanamori Y, Yorifuji T.	4. 巻 11
2. 論文標題 Nationwide survey of endogenous hyperinsulinemic hypoglycemia in Japan (2017-2018): Congenital hyperinsulinism, insulinoma, non-insulinoma pancreatogenous hypoglycemia syndrome and insulin autoimmune syndrome (Hirata's disease).	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Diabetes Investig	6. 最初と最後の頁 554-563
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jdi.13180	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 Takeuchi T, Ishigaki Y, Hirota Y, Hasegawa Y, Yorifuji T, Kadowaki H, Akamizu T, Ogawa W, Katagiri H.	4. 巻 11
2. 論文標題 Clinical characteristics of insulin resistance syndromes: A nationwide survey in Japan.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Diabetes Investig	6. 最初と最後の頁 603-616
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jdi.13171	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 依藤 亨	4. 巻 50
2. 論文標題 血糖異常 (低血糖症、高血糖症)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 周産期医学	6. 最初と最後の頁 673-675
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 -
1. 著者名 依藤 亨	4. 巻 73
2. 論文標題 家族性若年発症糖尿病 (MODY)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 小児科診療	6. 最初と最後の頁 791-794
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 -

1. 著者名 依藤 亨	4. 巻 12
2. 論文標題 新生児糖尿病の遺伝子異常	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 月刊糖尿病	6. 最初と最後の頁 31-38
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 -

1. 著者名 依藤 亨	4. 巻 62
2. 論文標題 小児糖尿病と遺伝子異常	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 糖尿病	6. 最初と最後の頁 464-467
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 -

1. 著者名 Yorifuji T, Higuchi S, Kawakita R, Hosokawa Y, Aoyama T, Murakami A, Kawae Y, Hatake K, Nagasaka H, Tamagawa N.	4. 巻 19
2. 論文標題 Genetic basis of early-onset, maturity-onset diabetes of the young-like diabetes in Japan and features of patients without mutations in the major MODY genes: Dominance of maternal inheritance.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Pediatric Diabetes	6. 最初と最後の頁 1164-1172
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pedi.12714	査読の有無 有
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 Hosokawa Y, Higuchi S, Kawakita R, Hata I, Urakami T, Isojima T, Takasawa K, Matsubara Y, Mizuno H, Maruo Y, Matsui K, Aizu K, Jinno K, Araki S, Fujisawa Y, Osugi K, Tono C, Takeshima Y, Yorifuji T.	4. 巻 10
2. 論文標題 Pregnancy outcome of Japanese patients with GCK-MODY.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Diabetes Investig	6. 最初と最後の頁 1586-1589
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jdi.13046	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8件(うち招待講演 2件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Tohru Yorifuji
2. 発表標題 Landscape of early-onset monogenic diabetes mellitus in Japan.
3. 学会等名 第65回日本人類遺伝学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 細川悠紀、吉崎加奈子、脇研白、依藤亨
2. 発表標題 SU薬からグリニドへの切り替えにより低血糖を回避できたHNF1A-MODYの同胞例
3. 学会等名 第59回日本小児内分泌学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 樋口真司、北山称、大矢知真希、山田勇氣、川北理恵、依藤 亨
2. 発表標題 日本人におけるMODY calculator有用性の検討
3. 学会等名 第59回日本小児内分泌学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 依藤 亨
2. 発表標題 遺伝性インスリン分泌異常症：現状と展望
3. 学会等名 第59回日本小児内分泌学会(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tohru Yorifuji
2. 発表標題 MODY diagnosis and treatment.
3. 学会等名 2019 International Diabetes Federation (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 依藤 亨、川北理恵、細川悠紀、樋口真司
2. 発表標題 日本人MODYの遺伝学的背景
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 Tohru Yorifuji, Rie Kawakita, Shinji Higuchi, Yuki Yamada, Maki Oyachi, Kana Matsumura
2. 発表標題 Features of Japanese patients with early-onset, MODY-like diabetes without mutations in the major MODY genes
3. 学会等名 57th annual ESPE Meeting
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 依藤 亨, 北山 称, 川北 理恵, 樋口 真司, 山田 勇気, 大矢知 真希
2. 発表標題 日本人MODYの遺伝学的背景 Molecular basis of MODY in Japan
3. 学会等名 第63回日本人類遺伝学会
4. 発表年 2018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
--	---------------------------	-----------------------	----

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