

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 23 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26461553

研究課題名(和文)日本人小児1型糖尿病におけるmicroRNA多型解析

研究課題名(英文)Polymorphism of micro RNA in Japanese children with type 1 diabetes

研究代表者

浦上 達彦 (URAKAMI, Tatsuhiko)

日本大学・医学部・准教授

研究者番号：60223616

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：1型糖尿病187例を解析対象者とし、これら対象者の保存DNAサンプルを用いて候補micro RNAをターゲットとしたアンプリコンシーケンスを次世代シーケンサーにて行った。その結果、対象とした187例の解析をそれぞれ2回施行したが、いずれにおいてもDNAからのアンプリコンシーケンスの際に形成するクラスターが不十分もしくは過剰形成となり、シーケンサーでの解析判別が不可能であった。この結果から、新たに新規発症1型糖尿病26例における血清micro RNAの発現量と臨床的特徴の関連について検討したが、臨床経過と候補としたmicro RNA発現量との間に有意な関連は見いだされなかった。

研究成果の概要(英文)：One hundred eighty seven children with type 1 diabetes, who showed positive for β -cell associated antibodies and exhausted endogenous insulin secretion, were studied. Using their stored DNA, we performed amplicon-based assay for targeted resequencing of the DNA, targeting the 69 candidate micro RNAs, with next generation sequencer. We conducted this procedure twice, however, the results were not provided, because of poor clustering or excessive clustering from DNA samples. It was impossible to perform the same procedure using the same DNA samples. We therefore evaluated association between clinical features and vivo expression of micro RNA in newly diagnosed patients with type 1 diabetes. However, we did not find significant association between dose of expression of miRNA and all the clinical features, including onset-age, onset-type of diabetes, presence of β -cell associated antibodies and residual β -cell function.

研究分野：小児科学

キーワード：小児 1型糖尿病 micro RNA 発症機序 発症予防

1. 研究開始当初の背景

糖尿病は成因分類により、1型糖尿病、2型糖尿病、その他の特定の機序による糖尿病、妊娠糖尿病の4型に分類される。1型糖尿病は、主に膵島特異的なTh1優位の自己免疫機序により膵細胞の破壊を生じ、絶対的なインスリン分泌の低下あるいは欠乏の結果発症するとされる。一方1型糖尿病の発症に関連する遺伝子に関しては、GWASなどの手法により責任遺伝子として、HLA遺伝子(HLA-DRB1, DQB1, DPB1, A,B,C)、HLA以外の糖尿病感受性遺伝子(INS遺伝子、CTLA4遺伝子、PTPN22遺伝子、RGS1遺伝子、IL10遺伝子、AFF3遺伝子など)、糖尿病発症・感受性候補遺伝子(MICA遺伝子、MyD88遺伝子、TLR2遺伝子、TLR3遺伝子、TLR4遺伝子など)が同定されている。しかし1型糖尿病の中でこれらの既知遺伝子異常を有する患者はむしろ少数であり、本症の発症には、既知遺伝子以外の遺伝子が関与することが示唆されている。

他方、近年になり1型糖尿病発症早期における血清microRNAの変化が種々の論文で報告されており、膵島特異的な自己免疫発症機序に関連して特定のmicroRNAが発症に関連することが示唆されている。そして1型糖尿病発症の遺伝子要因として、イントロン領域にコードされるmicroRNA多型が存在する可能性があり、新規遺伝子あるいは疾患感受性に関連する多型が存在する場合には1型糖尿病発症の疾患感受性に関与している可能性がある。しかしながら1型糖尿病発症機序に関連するmicroRNAの新規遺伝子あるいは多型について検討した論文は極限られており、更に小児期発症1型糖尿病においてRNAの新規遺伝子あるいは多型に関して検討した論文は未だない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、小児期発症1型糖尿病のmicroRNA新規遺伝子の発見と機能解明およびmicroRNA多型の検討により、1型糖尿病の疾患発症機序の発見と疾患重症化および疾患進行に関連する因子を解明することにある。そしてこれらの結果から小児期発症1型糖尿病の発症予防法の確立あるいは新たな治療法の開発を通して、1型糖尿病を有する患児および家族の診療に寄与することおよび成育医療研究の進展に貢献することにある。このことは小児期発症1型糖尿病の長期的予後を改善するばかりでなく、1型糖尿病患児および家族のQOLを改善することに繋がる。

3. 研究の方法

15歳以下の小児期において発症した1型糖尿病患児を対象として、対象から採取したmicroRNAを用い、microRNAの新規遺伝子あるいは多型の有無およびその機能を明らかにするために、

- (1) 小児期発症1型糖尿病児におけるmicroRNA新規遺伝子を発見する。
- (2) 小児期発症1型糖尿病児におけるmicroRNA多型解析を行う。
- (3) microRNA多型における機能解析を行う。
- (4) microRNA多型解析の結果を明らかにし多形の存在が確認できたmicroRNAについて、microRNA多型における機能解析を行い、小児期発症1型糖尿病発症との関連を明らかにする。

小児1型糖尿病におけるmicroRNA多型解析

(1) 研究対象の抽出

1型糖尿病は膵島特異的な自己免疫機序を介して膵細胞の破壊を来し、内因性インスリン分泌が欠乏し発症する糖尿病である。本研究においては膵島特異的な自己免疫の関与が明らかな典型的な1型糖尿病小児例を抽出し対象とする。具体的には、小児インスリン治療研究会第3コホートに登録されている15歳以下発症の小児1型糖尿病児736例(男/女=331/405、平均年齢10.2±3.2歳、平均離病期間3.3±3.0年)から、発症時において膵島関連抗体であるインスリン自己抗体、glutamic acid decarboxylase: GAD抗体、insulinoma-associated 2 molecule: IA-2抗体のいずれかあるいは複数の抗体が陽性である症例を抽出し、発症年齢および性別を考慮して約200名の対象を研究対象として抽出する。

小児インスリン治療研究会の検体は、現在、国立成育医療研究センター分子内分泌研究部内にて保管されている。

尚本研究を開始するに際して、小児インスリン治療研究会第3コホートに登録されている本研究に関する対象の全員およびその家族、保護者から研究に関する同意を書面にて得ており、本研究の倫理的配慮に関しては、国立成育医療研究センター倫理委員会および日本大学病院の倫理委員会の承認を得ている。

(2) 候補microRNAの決定

新規電子の発見および多型解析を行うmicroRNAを以下の条件から抽出する。

膵細胞における発生および分化に関連することが明らかなmicroRNA

膵細胞のアポトーシスに関連することが明らかなmicroRNA

免疫担当細胞の発生・分化および機能調節に関連するmicroRNA

1型糖尿病発症早期に血清中発現量の変化に有意差を認めているmicroRNA

文献的に既に上記に示したことが明らかとなっているmicroRNAに関する研究が多数報告されており、これらのmicroRNAを本研究における候補microRNAとして決定するものとする。

(3) アンプリコンシーケンスを用いた多型

解析

抽出した患者の DNA を用いて、候補 micro RNA をターゲットとしたアンプリコンシーケンス (イルミナ社 TruSeq Custom Amplicon Project) を次世代シーケンサー (イルミナ社 Miseq) を用い候補 micro RNA の多型解析を行い、1 型糖尿病発症に関与する可能性がある塩基配列置換の抽出を行う。

そして 1 型糖尿病発症に関連した新規候補遺伝子が同定された場合には、研究対象の第 2 親等までの家系に蔵する対照における解析および年齢と性を一致させた非糖尿病正常対照における micro RNA 変異解析を行い評価する。

4. 研究成果

(1) 研究対象とした小児期発症 1 型糖尿病患者 736 例 (男/女=331/405、平均年齢 10.2±3.2 歳、平均離病期間 3.3±3.0 年)の中から、発症時において前述した膵島関連自己抗体のいずれかあるいは複数の抗体が陽性かつ血清インスリンもしくは血清 C-ペプチドで表されるインスリン分泌能の低下 (空腹時血清インスリン 5μU/ml 以下あるいは空腹時血清 C-ペプチド 0.3ng/ml 以下、もしくはグルカゴン負荷試験 (0.03mg/kg・体重、最大 1mg のグルカゴン負荷)における血清 C-ペプチド頂値 0.5ng/ml 以下、もしくは 24 時間尿中 C-ペプチド排泄 20μg 以下のいずれかあるいは複数の項目が証明)が確認できた症例 187 例 (男/女=90/97、平均年齢 10.0±3.8 歳、平均離病期間 3.2±3.0 年)を本研究の解析対象者とした。

これらの対象者から採取した保存 DNA サンプルを用いて、候補 micro RNA をターゲットとしたアンプリコンシーケンスを次世代シーケンサーにて行った。しかしながらその結果として、対象とした 187 例の解析をそれぞれ計 2 回施行したにもかかわらず、いずれの解析においても全症例において DNA からアンプリコンシーケンスの際に形成するクラスターが不十分もしくは過剰形成となり、その結果アンプリコンシーケンサーでの解析判別が不可能であった。

(2) 上記の結果を受けて、候補 micro RNA をターゲットとしたアンプリコンシーケンスでは同サンプルによる解析は困難であり、micro RNA 多型による 1 型糖尿病発症の機序を解明することが困難であると判断した。

この結果を受けて、近年になってそのターゲットが明らかになっている micro RNA の生体内での発現量を明らかにすることが 1 型糖尿病発症機序の解明につながる可能性を考え、新たに新規発症で先に示した解析対象の条件を満たす小児期発症 1 型糖尿病 26 例 (男/女=(12/14、平均年齢 10.8±3.0 歳、平均離病期間 3.5±3.1 年)における血清 micro RNA の発現量と臨床的特徴の関連について検討した。しかし発現解析を行ったいずれの対象においても、1 型糖尿病の臨床的特徴であ

る発症様式 (急性発症型あるいは緩徐進行型)、発症年齢、性別、先に示したそれぞれの膵島関連自己抗体の抗体価、血清あるいは尿 C-ペプチド値あるいはグルカゴン負荷試験における C-ペプチド頂値を指標とした残存インスリン分泌能と候補とした micro RNA 発現量との間には統計学的に有意な相関関係は見い出されなかった。

(3) 結論

小児期発症 1 型糖尿病の microRNA 新規遺伝子の発見と多型解析および機能解明は行えなかった。

他方、血清 micro RNA の発現量と臨床的特徴の関連について有意な関係は見いだされなかった。

これらの結果から、今回行った検討では、小児期発症 1 型糖尿病に関連する発症機序の解明および本症の臨床経過、進行、重症度および長期予後に関連する因子を解明することは出来なかった。

今回の検討では解明されなかった小児期発症 1 型糖尿病の発症予防法の確立あるいは新たな治療法の開発が今後新たな研究によって期待される。そしてこれらの研究が、1 型糖尿病を有する患児およびその家族の診療に寄与することおよび今後の小児 1 型糖尿病における成育医療研究の進展に貢献することが期待される。

<引用文献>

Sugihara S, Ogata T, Urakami T, et al. The Japanese Study Group of Insulin Therapy for Childhood and Adolescent Diabetes (JSGIT). HLA-class and class genotypes among Japanese children with type 1A diabetes and their families. *Pediatr Diabetes* 13: 33-44, 2012

Nielsen LB, Wang C, Sorensen K, et al. Circulation levels of microRNA from children with newly diagnosed type 1 diabetes and healthy controls: Evidence that miR-25 associates to residual beta-cell function and glycaemic control during disease progression. *Exp Diabetes Res* 896: 362-368, 2012

Hezova R, Slaby O, Faltejskova P, et al. MicroRNA-342, microRNA-191 and microRNA-510 are differentially expressed in T regulatory cells of type 1 diabetes. *Diabet Immunol* 260: 30-34, 2010

SalsPerez F, Codner E, Valencia E, et al. MicroRNAs miR21a and miR93 are down regulated in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from patients with type 1 diabetes. *Immunology* 218: 1016, 2012

Klein D, Misawa R, Bravo-Egana V, et al. MicroRNA expression in alpha and beta cells of human pancreatic islets. *Immunology* 8 210-213, 2013

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計7件)

Urakami T, Mine Y, Aoki M, Okuno M, Suzuki J. A randomized crossover study of the efficacy and safety from insulin glargine to insulin degludec in children with type 1 diabetes. *Endocr J* 64: 133-140, 2018

(原著論文)

Urakami T, Mine Y, Aoki M, Okuno M, Suzuki J. Insulin glargine for continuous subcutaneous insulin infusion in pediatric type 1 diabetes. *Pediatr Int* 59: 647-649, 2017

(原著論文)

Okuno M, Kasahara Y, Onodera M, Takubo N, Okajima M, Suga S, Watanabe N, Suzuki J, Ayabe T, Urakami T, Kawamura T, Kikuchi N, Yokota I, Kikuchi T, Amemiya S, Nakabayashi K, Hayashi K, Hata K, Matsubara Y, Ogata T, Fukami M, Sugihara S. Nucleotide substitutions in CD101, the human homolog of a diabetes susceptibility gene in non-obese diabetic mouse, in patients with type 1 diabetes. *J Diabetes Investig* 8: 286-294, 2017

(原著論文)

Mochizuki M, Kikuchi T, Urakami T, Kikuchi N, Kawamura T, Yokomichi H, Hoshino T, Matsuura N, Sasaki N, Sugihara S, Amemiya S, on behalf of The Japanese Study Group of Insulin Therapy for Childhood and Adolescent Diabetes (JSGIT). Improvement in glycemic control through changes in insulin regimens: findings from a Japanese cohort of children and adolescents with type 1 diabetes. *Pediatr Diabetes* 18: 435-44, 2017

(原著論文)

Ushijima K, Fukami M, Ayabe T, Narumi S, Okuno M, Nakamura A, Takahashi T, Ihara K, Ohkubo K, Tachikawa E, Nakayama S, Arai J, Kikuchi N, Kikuchi T, Kawamura T, Urakami T, Hata K, Nakabayashi K, Matsubara Y, Amemiya S, Ogata T, Yokota I, Sugihara S; Japanese Study Group of Insulin Therapy for Childhood and Adolescent Diabetes. Comprehensive screening for monogenic diabetes in 89 Japanese children with insulin-requiring antibody-negative type 1 diabetes. *Pediatr Diabetes* (doi: 10.1111/pedi.12544.), 2017

(原著論文)

浦上達彦. ここがポイント 小児診療ガイドラインの使い方. 小児・思春期糖尿病ガイドライン. 小児科臨床 70: 881-888, 2017

(総説)

鈴木潤一, 浦上達彦. 小児臨床検査のポイント 2017-糖尿病を疑ったときの検査の

進め方. 小児内科増刊号 49: 489-494, 2017

(総説)

〔学会発表〕(計6件)

浦上達彦. 小児糖尿病について(発症機序および臨床経過と重症度およびその予防と治療について). 第1回滋賀小児糖尿病勉強会. 3.14, 2018, 草津, 滋賀

(国内学会、教育講演)

浦上達彦. 1型糖尿病の治療と管理について. 第1回糖尿病治療を考える会. 3.10, 2018, 東京

(国内学会、招待講演)

Urakami T. New aspects of pharmacologic therapies in children with type 1 and type 2 diabetes. BIT's 5th World Congress of Diabetes-2017. 7.12-14, 2017, Prague, Czech Republic

(国際学会、招待講演)

浦上達彦. ライフステージごとの糖尿病への対処. 小児・思春期における糖尿病(成因、機序、診断、治療・管理について). 第54回日本糖尿病学会関東甲信越地方会. 1.21, 2017, 横浜

(国内学会、教育講演)

吉田 圭、與田 緑、高橋智子、峯 佑介、青木政子、奥野美佐子、鈴木潤一、浦上達彦、高橋昌里. 急性発症1型糖尿病におけるグルカゴン負荷試験に関する検討. 第54回日本糖尿病学会関東甲信越地方会. 1.21, 2017, 横浜

(国内学会、一般口演)

菊池 透、浦上達彦、杉原茂孝、川村智行、菊池信行、望月美恵、松浦信夫、佐々木 望、雨宮 伸. 小児期発症1型糖尿病におけるインスリン治療の進歩 - 小児インスリン治療研究会コホートより. 第59回日本糖尿病学会年次学術集会. 5.19-21, 2016, 京都

(国内学会、一般口演)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浦上 達彦 (URAKAMI, Tatsuhiko)

日本大学・医学部・准教授

研究者番号：60223616

(2) 分担研究者

鈴木 潤一 (SUZUKI, Junichi)

日本大学・医学部・助教

研究者番号：00573825