

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462500

研究課題名(和文) 遺伝因子解析に基づく日本人妊娠糖尿病の病態解明

研究課題名(英文) Association of common polymorphisms with gestational diabetes mellitus in Japanese women

研究代表者

宮越 敬 (Miyakoshi, Kei)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師

研究者番号：70265883

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)：現在まで日本人妊娠糖尿病(GDM)感受性遺伝子の網羅的検討はなされていない。今回我々は既知の糖代謝異常関連候補遺伝子の多型情報を取得し、日本人GDM感受性遺伝子を抽出した。対象は、妊娠中期に75g経口糖負荷試験を受けGDMの有無を判定した妊婦である(GDM：n=171、正常型：n=128)である。母体末梢血から抽出したDNAを用いた既知2型糖尿病もしくはGDM関連遺伝子(36遺伝子：45 SNP)とGDM発症との関連解析により、GDMではインスリン感受性関連1遺伝子、インスリン分泌関連2遺伝子のリスクアレルを有することが判明した。本研究により日本人GDM感受性候補遺伝子の存在が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Gestational diabetes mellitus (GDM) is regarded as one of the multifactorial disorders because its pathophysiology is similar to type 2 diabetes (T2DM) in metabolism. To date, GDM risk genes in Japanese women have not been analyzed. The aim of this study is to identify GDM candidate genes in Japanese pregnant women using T2DM risk gene variants. In this study, T2DM risk variants (45 single nucleotide polymorphisms [SNPs] from 36 genes) identified in previous studies were genotyped in a cohort of 171 Japanese women with GDM (n=171) and normal glucose tolerance (n=128). Of 45 SNPs, three genetic variants (insulin sensitivity: 1 gene, insulin secretion: 2 genes) were nominally associated with the risk of GDM. The combined analysis demonstrated that women with five or more risk alleles had an increased risk of GDM. Our data suggest several risk variants of T2DM had cumulative effects on the development of GDM in Japanese women.

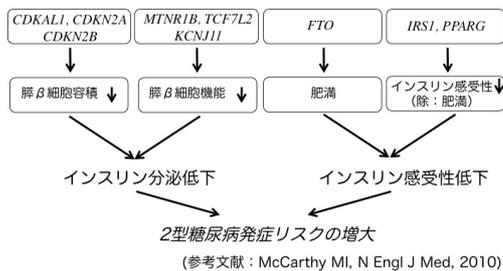
研究分野：周産期医学

キーワード：妊娠糖尿病 一塩基多型 インスリン分泌 インスリン感受性

1. 研究開始当初の背景

疾患の発症には遺伝的要因と環境要因が関わり、多くは両者が複雑に関与する多因子疾患である。近年、全ゲノム関連解析(genome wide association study: GWAS)を中心とした分子遺伝学的解析手法を用いて多因子疾患関連遺伝子の同定が試みられている¹⁾。例えば、膵細胞機能不全と慢性的なインスリン感受性低下を認める2型糖尿病(T2DM)では、膵細胞、インスリン感受性や肥満関連の遺伝因子がその病態形成に関与する(図1)²⁾。妊娠糖尿病(GDM)では、妊娠時のインスリン感受性低下に対して代償性のインスリン分泌増加が得られないため高血糖を呈する。これまで欧米人ではGDMの発症における膵細胞機能不全の関与が指摘されてきた。また、日本人においてもGDM例における膵細胞機能不全が推測される。GDM既往女性が将来的にT2DM発症のリスクが高いことを勘案すると、両者は膵細胞機能不全を中心とした共通の病態を有するものを推測される。

図1 一塩基多型と2型糖尿病の発症リスク



GDMの遺伝的要因に関しては、欧米人を中心にT2DM関連のSNPに着目した検討が行われてきた。一般に、疾患発症に関与する遺伝子の頻度は人種間で異なるため、日本人GDMの病態解明には日本人妊婦集団における独自の遺伝子関連解析が不可欠である。しかしながら、本邦ではこのような観点からのGDM感受性遺伝子の網羅的解析は行われていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は既知の糖代謝異常関連候補遺伝子の多型情報を取得し、日本人GDM感受性候補遺伝子を抽出することである。

3. 研究の方法

(1) 対象

対象は2011年4月～2014年12月において慶應義塾大学病院および国立成育医療研究センターで周産期管理を行ったGDM合併妊婦および正常耐糖能妊婦(normal glucose tolerance: NGT)である。糖代謝異常に関し

ては、妊娠中・後期のGDMスクリーニング陽性例に対して75g経口ブドウ糖負荷試験(OGTT)を行い、日本糖尿病学会の診断基準にもとづきGDMの有無を判定した³⁾。また、分娩後、母体末梢血検査の余剰検体をEDTA入り採血管に保存(-20℃)ののち、QIA symphony DNA Midi Kit(96)(Qiagen, Valencia, CA, USA)を用いてゲノムDNAを抽出し、遺伝解析に供与した。なお、本研究は施設倫理委員会の承認を得て実施された。

(2) インスリン感受性・分泌能指標

OGTTにおける糖負荷前、糖負荷30分、60分、120分後のinsulin値とglucose値を用いて、インスリン感受性および膵細胞機能指標をそれぞれinsulin sensitivity index (IS_{OGTT})およびInsulin Secretion-Sensitivity Index-2 (ISSI-2)により評価した^{4,5)}。なお、ISSI-2は $IS_{OGTT} \times$ the ratio of area-under-the-insulin-curve to area-under-the-glucose-curveにより算出した。

(3) 解析対象遺伝子の選択

解析にあたり2014年10月にPubMedを中心に網羅的検索を行い、T2DMもしくはGDMとの関連が報告されている88遺伝子(151一塩基多型[single nucleotide polymorphism: SNP])を抽出した。さらに解析可能症例数をもとに検出力を算出し、対象SNPをマイナーアレル頻度(Minor allele frequency: MAF) > 30%とし、genotype relative risk 1.4のSNPを抽出可能な研究デザインを構築した。結果的に、既報のT2DMもしくはGDM関連遺伝子(36遺伝子: 45 SNP)とGDM発症との関連解析を行った。

(4) 遺伝子解析および統計学的検討

遺伝子解析にはHigh-throughput genotyping MassARRAY® platform (Sequenom, Inc, San Diego, CA, USA)を、プライマー設定にはAssay Design Suite® (Sequenom, Sequenom, Inc, San Diego, CA, USA)を用いた。なお、本手法におけるgenotypingのsuccess rateは94%、concordance rateは99.8%であった。統計学的検討はロジスティック回帰分析を用いた。

4. 研究成果

研究期間におけるGDMは357例、このうち妊娠中・後期診断例は171例であった。また、妊娠中・後期にGDMスクリーニングが陽性となるもOGTTが正常型を示したNGT群は128例であった。GDM群およびNGT群において、母体年齢、妊娠前肥満(BMI > 25)、OGTT施行時妊娠週数には有意差は認められなかった(表1)。一方、NGT群に比べ、GDM群における IS_{OGTT} およびISSI-2は有意に低値を示した。45 SNPのうち、NGT群に比べGDM群はrs266729 (*ADIPOQ*: $p=0.013$, odds ratio [OR]: 1.56, 95% confidence interval [CI]: 1.10-2.23)

表1 母体背景：妊娠糖尿病 vs 正常耐糖能

	妊娠糖尿病	正常耐糖能	P
母体年齢 (才)	36.1 ± 4.6	36.6 ± 4.3	0.36
妊娠前BMI (kg/m ²)	21.4 ± 3.3	20.7 ± 2.5	0.05
妊娠前肥満 (BMI≥25)	24 (14.0)	10 (7.8)	0.63
OGTT施行時妊娠週数 (週)	27.5 ± 3.1	27.8 ± 2.8	0.36
IS _{OGTT}	5.09 ± 2.46	7.79 ± 3.51	6.5×10 ⁻¹²
ISSI-2	1.75 ± 0.54	2.46 ± 0.70	1.3×10 ⁻¹³

数値：平均 ± 標準偏差、例数 (%)

rs10811661 (*CDKN2A/2B*: $p=0.035$, OR: 1.46, 95% CI: 1.03-2.08), rs9505118 (*SSR1-RREB1*: $p=0.046$, OR: 1.41, 95% CI: 1.01-1.97) に関してリスクアレルを有する傾向にあった (図2)。また、抽出された3 SNPを用いて複合解析を行うと、GDM群はNGT群と比較して有意に多くのリスクアレルを有し (3.8 ± 1.3 vs 3.1 ± 1.4 , $p=6.0 \times 10^{-6}$) 5個以上のリスクアレル保有群は1個以下保有群と比較してGDM発症リスクが有意に高値であった ($p=5.6 \times 10^{-5}$, OR 7.3) (図3)

図2 妊娠糖尿病発症オッズ比

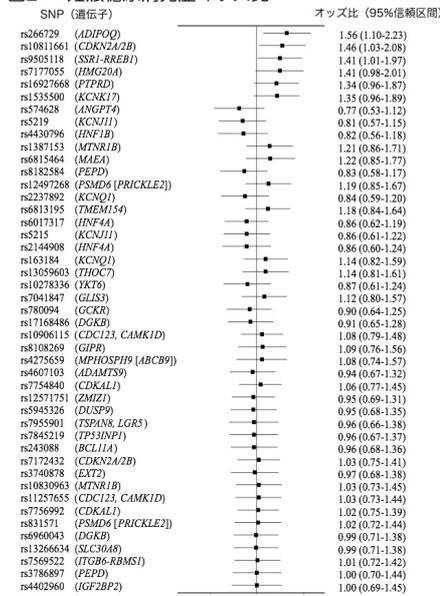
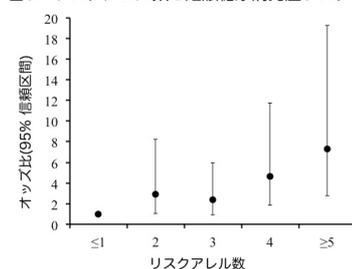


図3 リスクアレル数と妊娠糖尿病発症リスク



遺伝子解析技術の進歩に伴い、GDM の病態

形成に關する遺伝因子についても多数の知見が得られてきた。Zhang et al.による systematic review では 10 遺伝子 (*TCF7L2*, *GCK*, *KCNJ11*, *CDKAL1*, *IGFBP2*, *MTNR1B*, *IRS1*, *PPARG*, *ADRB3*, *TNF*) が GDM 関連候補遺伝因子であった⁶⁾。これら 10 遺伝子すべてが T2DM 関連遺伝因子であり、6 遺伝子はインスリン分泌に、1 遺伝子はインスリン感受性に関与するとされる。報告例が最多の *TCF7L2* は膵細胞の増殖やアポトーシス、糖やインクレチン刺激に対するインスリン分泌に關する遺伝子であり、Caucasian および Asian において GDM と密接に關連するとされる。既報をまとめると遺伝学的にも膵細胞機能異常が GDM 発症の主因と考えられる。

本研究で抽出された 3 つの SNP/遺伝子のうち、rs266729 (*ADIPOQ*)はインスリン感受性関連遺伝子である⁷⁾。一方、rs10811661 (*CDKN2A/2B*)および rs9505118 (*SSR1-RREB1*)はいずれもインスリン分泌関連遺伝子である。これまで我々は臨床研究においてインスリン分泌不全(膵細胞機能不全)が日本人 GDM 発症に關与していることを報告してきた^{8,9)}。今回の遺伝子解析により、インスリン分泌不全の日本人 GDM 発症への關与が遺伝学的にも裏付けされたものと考えられる。

CDKN2A/2B は T2DM のみならず GDM との關連が示されている遺伝子である¹⁾。また、*SSR1-RREB1*が産生する RREB1 蛋白質は膵細胞の発生に關与する NeuroD とともに、DNA の転写の促進に關与する¹⁰⁾。このことから、RREB1 の働きが抑制されると膵細胞発達が抑制され、インスリン分泌不全が起るものと推測される。なお、GWAS を用いた T2DM との關連解析においても、*SSR1-RREB1*とインスリン分泌との關連が指摘されている¹¹⁾。*SSR1-RREB1*と GDM との關連に關する報告は未発表であり、日本人 GDM に特有の遺伝因子である可能性が推測される。

本研究対象は既報の GDM 関連の症例対照研究よりも解析症例の多い母集団であった。また、既報では中高年健康女性のデータが正常対照群として用いられていることが多い。GDM 発症に關わる遺伝因子の探索には、インスリン感受性の低下ならびに膵細胞への負荷を惹起する「妊娠」という同一の環境要因下での疾患群(GDM)と正常対照群を対象とした SNP 解析が望ましい。この観点より本研究対象は理想的な母集団と考えられる。

我々は網羅的検索により T2DM・GDM 関連遺伝子(88 遺伝子[151SNPs])を抽出した。さらに症例数をもとに解析対象遺伝因子を MAF > 30%とし、genotype relative risk 1.4 の SNP を抽出可能な研究とした。日本人妊婦を対象に明瞭な研究デザインに基づく症例対照研究を行い、初めて日本人 GDM 関連遺伝因子を同定したという点で本研究は学術的に

意義深いものとする。一方、MAF 30%である遺伝因子が日本人 GDM に関与する可能性も否定できない。今後、症例集積ののち大規模集団において今回の成果を再確認するとともに、MAF 30%の SNP に関する検討も実施予定である。

GDM 既往女性は将来的に糖代謝異常発症のリスクが高く、産後 1 年以内に耐糖能異常を呈することも少なくない。GDM 既往女性には耐糖能評価を含む定期的な検診が推奨されるが、未だにフォローアップ率は 50%程度である。そこで、妊娠中の臨床遺伝情報に基づき“産後糖代謝異常ハイリスク群”の抽出が可能となれば産後のフォローアップにも有用である¹²⁾。本研究と並行して実施した検討(対象: GDM 既往女性 230 名)によるとインスリン分泌に関与する 5 遺伝子が産後 1 年以内の糖代謝異常に関与することが示唆された。今後、症例を集積した上で、産後糖代謝異常発症に関与する遺伝子の同定を試みる予定である。

<引用文献>

1. Imamura M, Maeda S. Genetics of type 2 diabetes: the GWAS era and future perspectives [Review]. *Endocr J.* 2011;58:723-39.
2. McCarthy MI. Genomics, type 2 diabetes, and obesity. *N Engl J Med.* 2010;363:2339-50.
3. 日本産科婦人科学会・日本産婦人科医会. CQ 005-1 妊婦の耐糖能検査は? . 産婦人科診療ガイドライン産科編. 2014:19-23.
4. Matsuda M, DeFronzo RA. Insulin sensitivity indices obtained from oral glucose tolerance testing: comparison with the euglycemic insulin clamp. *Diabetes Care.* 1999;22:1462-70.
5. Retnakaran R, Qi Y, Goran MI, Hamilton JK. Evaluation of proposed oral disposition index measures in relation to the actual disposition index. *Diabet Med.* 2009;26:1198-203.
6. Zhang C, Bao W, Rong Y, Yang H, Bowers K, Yeung E, et al. Genetic variants and the risk of gestational diabetes mellitus: a systematic review. *Hum Reprod Update.* 2013;19:376-90.
7. Beltcheva O, Boyadzhieva M, Angelova O, Mitev V, Kaneva R, Atanasova I. The rs266729 single-nucleotide polymorphism in the adiponectin gene shows association with gestational diabetes. *Arch Gynecol Obstet.* 2014;289:743-8.
8. Saisho Y, Miyakoshi K, Tanaka M, Shimada A, Ikenoue S, Kadohira I, et al. Beta cell dysfunction and its clinical significance in gestational diabetes. *Endocr J.* 2010;30:973-80.
9. Saisho Y, Miyakoshi K, Ikenoue S, Kasuga Y, Matsumoto T, Minegishi K, et al. Marked decline in beta cell function during pregnancy leads to the development of glucose intolerance in Japanese women. *Endocr J.* 2013;60:533-9.
10. Ray SK, Li HJ, Metzger E, Schule R, Leiter AB. CtBP and associated LSD1 are required for transcriptional activation by NeuroD1 in gastrointestinal endocrine cells. *Mol Cell Biol.* 2014;34:2308-17.
11. Replication DiG, Meta-analysis C, Asian Genetic Epidemiology Network Type 2 Diabetes C, South Asian Type 2 Diabetes C, Mexican American Type 2 Diabetes C, Type 2 Diabetes Genetic Exploration by Next-generation sequencing in multi-Ethnic Samples C, et al. Genome-wide trans-ancestry meta-analysis provides insight into the genetic architecture of type 2 diabetes susceptibility. *Nat Genet.* 2014;46:234-44.
12. Kwak SH, Choi SH, Jung HS, Cho YM, Lim S, Cho NH, et al. Clinical and genetic risk factors for type 2 diabetes at early or late post partum after gestational diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98:E744-52.

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 5 件)

Kasuga Y, Hata K, Tajima A, Ochiai D, Saisho Y, Matsumoto T, Arata N, Miyakoshi K, Tanaka M. Association of common polymorphisms with gestational diabetes mellitus in Japanese women: A case-control study. *Endocr J* 査読有 Vol.64, No.2, 2017, pp.463-475、

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28202837>

宮越敬. 科学的根拠に基づく妊娠糖尿病診療を目指して. 日本周産期・新生児医学会雑誌 Vol.51、No.5、2016、pp.1576-1578.

宮越敬 他、メディカルレビュー社、妊娠糖尿病の病態について. Diabetes Frontier Vol.27、No.10、2016、pp.585-590.

Itoh A, Saisho Y, Miyakoshi K, Fukutake M, Kasuga Y, Ochiai D, Matsumoto T, Tanaka M, Itoh H. Time-dependent changes in insulin requirement for maternal glycemic control during antenatal corticosteroid therapy in women with gestational diabetes: a retrospective study. Endocr J 査読有 Vol.63、No.1、2016、pp.101-104.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26510662>

Ikenoue S, Miyakoshi K, Saisho Y, Sakai K, Kasuga Y, Fukutake M, Izumi Y, Matsumoto T, Minegishi K, Yoshimura Y. Clinical impact of women with gestational diabetes mellitus by the new consensus criteria: two year experience in a single institution in Japan. Endocr J 査読有 Vol.61、No.4、2014、pp.353-358.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24430729>

[学会発表](計11件)

Miyakoshi K, Saisho Y, Sato Y, Akiba Y, Otani T, Kasuga Y, Ikenoue S, Ochiai D, Matsumoto T, Tanaka M: Glycemic features of gestational diabetes by the world health organization 2013 in early pregnancy. The 9th International DIP symposium on Diabetes, Hypertension, metabolic syndrome & pregnancy, Barcelona (Spain), 2017.3.8-12

Miyakoshi K, Saisho Y, Kasuga Y, Ikenoue S, Ochiai D, Matsumoto T, Tanaka M: Clinical features of gestational diabetes: a 5-year experience in a single institution in Japan. The 19th Congress of the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, Taipei (Taiwan), 2016.12.1-4

Kasuga Y, Miyakoshi K, Hata K, Tajima A, Ikenoue S, Ochiai D, Matsumoto T,

Arata N, Tanaka M: Common polymorphisms with gestational diabetes mellitus in Japanese women. The 19th Congress of the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, Taipei International Convention Center, Taipei (Taiwan), 2016.12.1-4
春日義史, 宮越敬, 税所芳史, 佐藤佑, 秋葉洋平, 大谷利光, 福武麻里絵, 池ノ上学, 落合大吾, 松本直, 荒田尚子, 田嶋敦, 秦健一郎, 田中守: 妊娠糖尿病既往日本人女性における産後糖代謝異常発症に關与する遺伝因子の検討. 第32回日本糖尿病妊娠学会年次学術集会, 岡山県医師会館・ホテルグランピア岡山・岡山国際交流センター(岡山県岡山市), 2016年11月18-19日

宮越敬, 税所芳史, 佐藤佑, 秋葉洋平, 大谷利光, 福武麻里絵, 池ノ上学, 春日義史, 落合大吾, 松本直, 田中守: 当院における妊娠糖尿病例の胎児発育に關する後方視的検討. 第32回日本糖尿病妊娠学会年次学術集会, 岡山県医師会館・ホテルグランピア岡山・岡山国際交流センター(岡山県岡山市), 2016年11月18-19日

Kasuga Y, Miyakoshi K, Arata N, Tajima A, Tanaka M, Hata K: The Polymorphism in KCNQ1 gene may influence insulin secretion in Japanese pregnant women. The 63th Annual Scientific Meeting of Society for Reproductive Investigation, Montreal (Canada), 2016.3.16-19

春日義史, 秦健一郎, 宮越敬, 福武麻里絵, 正木繭, 池ノ上学, 落合大吾, 松本直, 荒田尚子, 田中守: QTL解析を用いた日本人妊娠糖尿病關連候補遺伝子の検討. 第39回日本産科婦人科栄養代謝研究会, 東京医科歯科大学 M&D タワー鈴木章夫記念講堂(東京都文京区), 2015年8月21-22日

春日義史, 秦健一郎, 宮越敬, 福武麻里絵, 正木繭, 池ノ上学, 落合大吾, 松本直, 峰岸一宏, 前原佳代子, 田中守, 青木大輔: 日本人妊娠糖尿病の分子遺伝学的病態解析. 第67回日本産科婦人科学会総会・学術講演会, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市), 2015年4月10-12日

Miyakoshi K, Saisho Y, Masaki M, Fukutake M, Kasuga Y, Ikenoue S, Ochiai D, Matsumoto T, Minegishi K, Tanaka M: Antepartum predictors of the development of postpartum glucose intolerance in women after

pregnancies complicated by gestational diabetes mellitus by the new IADPSG criteria. The 8th International DIP symposium on Diabetes, Hypertension, Metabolic Syndrome & Pregnancy, Berlin (Germany), 2015.4.15-18

Kasuga Y, Miyakoshi K, Saisho Y, Fukutake M, Ikenoue S, Ochiai D, Matsumoto T, Minegishi K, Maehara K, Hata K, Tanaka M: Common polymorphisms associated with gestational diabetes mellitus in Japanese women. The 8th International DIP symposium on Diabetes, Hypertension, Metabolic Syndrome & Pregnancy, Berlin (Germany), 2015.4.15-18

宮越敬, 税所芳史, 福武麻里絵, 春日義史, 落合大吾, 松本直, 峰岸一宏, 伊藤裕, 田中守: 妊娠糖尿病におけるインスリン導入リスク因子に関する検討. 第30回日本糖尿病妊娠学会年次学術集会, 長崎ブリックホール国際会議場(長崎県長崎市), 2014年11月28-29日
Miyakoshi K, Saisho Y, Fukutake M, Ochiai D, Matsumoto T, Minegishi K, Itoh H, Tanaka M: Antepartum clinical features associated with early postpartum glucose intolerance in gestational diabetes mellitus by the new criteria. 46th International Congress on Pathophysiology of Pregnancy, Tokyo (Japan), 2014.9.18-20

Miyakoshi K: Clinical features of gestational diabetes mellitus by the new consensus criteria: three year experience in a single institution in Japan. 46th International Congress on Pathophysiology of Pregnancy, Tokyo (Japan), 2014.9.18-20

宮越敬, 正木繭, 門平育子, 福武麻里絵, 池ノ上学, 春日義史, 落合大吾, 松本直, 峰岸一宏, 吉村泰典, 田中守: 妊娠糖尿病合併妊婦の産後早期糖代謝異常の予測因子に関する検討. 第50回日本産科・新生児医学会総会・学術集会, 幕張メッセ(千葉県千葉市), 2014年7月13-15日

〔図書〕(計3件)

宮越敬 他、メジカルビュー社、妊娠中の管理 13) 妊娠管理、研究に用いられるその他の指標は? 妊婦の糖代謝異

常 診療・管理マニュアル(日本糖尿病・妊娠学会編)、2015、pp.72-74

宮越敬 他、メジカルビュー社、妊娠中の管理 24) インスリン抵抗性とは何ですか? 妊婦の糖代謝異常 診療・管理マニュアル(日本糖尿病・妊娠学会編)、2015、pp.102-105

税所芳史, 宮越敬, 他、中外出版、カーボカウントやCSIIなど新しい血糖管理を行っている糖尿病合併妊娠での注意点を教えてください、産科診療Q&A 一つ上に行く診療の実践、2015、pp.190-193

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮越 敬 (Miyakoshi, Kei)
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号: 70265883

(2) 研究分担者

松本 直 (Matsumoto, Tadashi)
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号: 00327595

秦 健一郎 (Hata, Kenichiro)

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・周産期病態研究部・部長
研究者番号: 60360335

(3) 連携研究者

荒田 尚子 (Arata, Naoko)
国立研究開発法人国立成育医療研究センター・周産期・母性診療センター・母性内科・医長
研究者番号: 70214723

(4) 研究協力者

春日 義史 (Kasuga, Yoshifumi)
慶應義塾大学・大学院・博士課程