

200906208A

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患克服研究事業

日本人における新生児糖尿病発症原因
遺伝子異常の実態把握および遺伝子変異
部位による薬効変化に関する検討

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 稲垣 暢也

平成 22 (2010) 年 4 月

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患克服研究事業

日本人における新生児糖尿病発症原因
遺伝子異常の実態把握および遺伝子変異
部位による薬効変化に関する検討

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 稲垣 暢也

平成 22 (2010) 年 4 月

目 次

I. 総括研究報告

日本人における新生児糖尿病発症原因遺伝子異常の実態把握および
遺伝子変異部位による薬効変化に関する検討

稲垣 暢也 ----- 1

II. 分担研究報告

1. 日本人新生児糖尿病の遺伝子解析・臨床症状との関連と MODY 様発症例
における新生児糖尿病原因遺伝子変異に関する研究

依藤 亨 ----- 6

2. 日本人新生児糖尿病の疫学的実態把握、発症原因遺伝子および
薬剤反応性変化に関する研究

長嶋 一昭 ----- 9

3. 本邦における新生児糖尿病発症頻度および発症原因遺伝子に関する研究

佐々木 真弓 ----- 13

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 16

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 19

I. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
総括研究報告書

日本人における新生児糖尿病発症原因遺伝子異常の実態把握および
遺伝子変異部位による薬効変化に関する検討

研究代表者 稲垣 暢也 所属 京都大学医学研究科 糖尿病・栄養内科学

研究要旨：新生児糖尿病は、通常、高血糖あるいはケトアシドーシスの発症を契機に発見され、生涯インスリン治療が必要であるとされてきた希な疾患である。発症頻度は詳細不明であり、幾つか報告されている発症原因遺伝子に関しても各々の遺伝子異常の頻度など詳細不明な点が多い。本研究では、全国主要病院へのアンケート調査により日本人新生児糖尿病の疫学的実態把握を行うとともに、本症の主要な発症原因遺伝子として報告されている各遺伝子に関するスクリーニングを行い、日本人新生児糖尿病における発症原因遺伝子変異の頻度に関して検討する。さらに患者個々人の遺伝子変異部位に関して、*in vitro* 解析による治療薬反応性変化を検討し、より費用対効果と利便性に優れる経口血糖降下薬での治療選択肢提示のための論拠集積と、遺伝子変異部位に応じたテーラーメイドの治療薬選択指針の提示を目指す。

分担研究者

依藤 亨 京都大学医学研究科 講師

長嶋 一昭 京都大学医学研究科 助教

佐々木 真弓 京都大学医学部附属病院
医員

A. 研究目的

新生児糖尿病発症機序の詳細は不明である。近年 ATP 感受性 K^+ (K_{ATP}) チャンネル遺伝子を構成する Kir6.2 および SUR1 遺伝子の異常により発症することが欧米 (Gloyn ら)、本邦 (申請者ら) から報告されたが、その出現頻度は人種差が示唆されているため、日本人新生児糖尿病症例における上記遺伝子異常頻度の実態把握は急務である。また、同じ遺伝子上であっても変異部位の違いによる薬剤反応性の変化が報告されており、各薬剤の本来目的とする主作用だけでなく、副作用に関しても変化が起こりえることも報告されている。

本研究を申請するまでの過程で、申請者らは、糖尿病研究領域において、膵 β 細胞インスリン分泌機序の鍵分子である K_{ATP} チャンネルの分子的基盤を世界に先駆けて確立し (Science. 1995)、生理的条件下での意義を証明し (PNAS. 1997, 1998)、多様な活性調節機構 (EMBO J. 1999) および薬剤作用機序 (DRCP. 2007) 等を明らかにし、同分泌機序で重要な電位依存性 Ca^{2+} チャンネル (VDCC) の機能調節因子に関する先駆的解明も行ってきた (Nature 2001, Nat Med. 2005)。インスリン分泌に関わる遺伝子群の機能修飾に関して基礎的視点から詳細かつ広範に研究を重るとともに、臨床的視点でも本邦初の Kir6.2 遺伝子異常を伴う新生児糖尿病症例を同定し、世界で初めて Kir6.2 遺伝子異常による成人発症糖尿病症例の MODY 様家系を報告し (JCEM. 2005)、従来必須とされてきたインスリン治療でなく、経口糖尿病薬による治療選択肢の論拠に寄与する報告を行ってきた。この過程で、日本各地か

ら新生児糖尿病症例での遺伝子異常の解析依頼があり、 K_{ATP} チャンネル遺伝子異常症例の同定、薬剤反応性含む機能解析を行っており現在も継続中である。

これらの研究経緯を基に、本申請研究は、いまだ実態不明である本邦における新生児糖尿病において、1) 疫学的実態の解明、2) 発症原因遺伝子の実態把握、3) 遺伝子変異部位による *in vitro* での薬効変化の評価、および 4) 遺伝子変異部位に応じた治療薬選択論拠を提示することを目的とする。

B. 研究方法

本申請研究の主要な検討項目である、新生児糖尿病の疫学的調査、患者集積、発症原因遺伝子のスクリーニングおよび遺伝子変異部位による *in vitro* での薬効評価に関して、平成 21 年度は、以下の手法により検討を行った。

(1) 本邦における新生児糖尿病発症に関する疫学的検討

病床数 300 床以上を有し小児科 (または新生児科) 診療が行われている全国主要病院 956 施設に、過去 3 年間の新生児糖尿病患者の加療経験の有無等に関する 1 次アンケートを実施。さらに新生児糖尿病症例経験有りの施設には、具体的な症例数を含む、より詳細な追加アンケート (2 次アンケート) を実施した。各症例の生年月、性別および加療地域等により、各々の新生児糖尿病症例の重複症例を除外し、実数把握に努め、総務省住民基本台帳統計による過去 3 年間の総出生数を用いて、本邦における新生児糖尿病の発症頻度を算出した (稲垣、依藤、長嶋、佐々木)。

(2) 新生児糖尿病発症原因遺伝子のスクリーニング

現在までに新生児糖尿病の主な発症原因遺伝子として報告のある Kir6.2 遺伝子、SUR1 遺伝子およびインスリン遺伝子に関して、京都大学医学部附属病院自験症例および他施設から解析を委託された日本人新生児糖尿病患者血液検体から抽出したゲノム DNA を用いて遺伝子シーケンスを行い、日本人新生児糖尿病における発症原因遺伝子の実態を明らかにするため、各遺伝子に関して変異の有無を検討した(依藤、長嶋、佐々木)。

(3) 各遺伝子変異部位に基づく蛋白機能変化および治療薬反応性の変化に関する検討

a) 遺伝子変異による機能性蛋白の特性変化の検討。

変異遺伝子を導入した発現ベクターをリポフェクション法により培養細胞へ遺伝子導入し、当該遺伝子由来の機能性蛋白に関する基本的な特性変化を検討した(K_{ATP} チャンネル構成遺伝子の変異である場合は、チャンネルコンダクタンス、開口確率および ATP 感受性の変化など)。GFP 等で標識した変異遺伝子を細胞発現させ共焦点顕微鏡にて変異蛋白の細胞内局在変化に関して検討し、蛋白量直接測定および電気生理学的手法により、蛋白の膜面への機能的発現量の変化を評価した。これら多面的評価により、糖尿病発症に関わるメカニズムを検証する(長嶋、佐々木、稲垣)。

b) 経口血糖降下薬の薬効変化に関する検討。

遺伝子変異が Kir6.2 遺伝子あるいは SUR1 遺伝子上にある場合には、それらに起因する経口血糖降下薬 SU 薬の薬効変化の

程度と機序に関して、分子生物学的手法、電気生理学的手法、細胞膜面への蛋白発現実験等により解析した(長嶋、稲垣)。

(4) 遺伝子変異部位に応じた処方選択指針の提示

各遺伝子変異部位による遺伝子レベルの個体差に由来する経口血糖降下薬の反応性変化を明らかにし、それらの結果を基に、遺伝子変異部位に応じたテーラーメイドの処方選択指針の論拠を提示する(稲垣、依藤、長嶋、佐々木)。

(倫理面への配慮)

本申請研究は、ヘルシンキ宣言および京都大学大学院医学研究科・医学部医の倫理委員会規定に則り施行され、検体は匿名化(記号化)により個人情報保守の厳守を徹底している。遺伝子カウンセリングを含む患者フォローアップ体制を確立している。

C. 研究結果

本年度(平成 21 年度)、主要病院 956 施設に、過去 3 年間の新生児糖尿病加療経験の有無等に関してアンケートによる全国調査を行った。956 施設中、760 施設から返答を得て、37 施設で 1 症例以上(1 施設あたり 1~4 症例)の治療経験を有することが判明した。総務省住民基本台帳統計の本邦総出生数を用いた計算により、本邦における新生児糖尿病出生頻度は、およそ 8.9 万人出生に 1 人以上と、これまでの想定(30~40 万人出生に 1 人程度)を上回る頻度であることが示唆された。現在、新生児糖尿病症例経験を有と回答した施設に対し、より詳細な追加アンケート(2 次アンケート)を実施し、発症年齢、性別、病態、治療法、

治療経過等について現在調査中である。また、各症例の生年月および加療地域等により、重複症例を除外し、実数把握に努めている。

一方、日本各地から依頼を受けた18症例の新生児糖尿病について、 K_{ATP} チャンネルを構成する Kir6.2 遺伝子および SUR1 遺伝子について解析中である。これまでに18症例の全例について Kir6.2 遺伝子の解析を終え、18症例中12症例(66.7%)に10種類の rare variant が認められた。その中で、 K_{ATP} チャンネル機能に異常をきたし新生児糖尿病の発症の原因となりうる既知の変異は8症例(7種類)であった。他の4症例に認められた新規の3種類の変異については現在機能解析中である。また、全18症例中2症例について SUR1 遺伝子の rare variant が確認され、 K_{ATP} チャンネル構成遺伝子(Kir6.2 および SUR1 遺伝子)全体で77.8%を占めることが判明した。

海外の報告では、白人の永続型新生児糖尿病に占める Kir6.2 遺伝子異常の割合は52%との報告がある(Diabetes, 53, 2719-22, 2004)。今回の結果から、日本人新生児糖尿病においても K_{ATP} チャンネル構成遺伝子である Kir6.2 遺伝子異常の頻度が最も高いことが示唆された。今後、各々の変位部位による薬剤反応性の検討および残りの4症例の解析を継続予定である。

テーラーメイド医療への応用に関して、同定された Kir6.2 遺伝子および SUR1 遺伝子変異に関して、薬剤反応性変化を *in vitro* で評価することにより、インスリン療法から経口血糖降下薬への変更が可能か否か、さらには各 SU 薬の中での反応性の残存程度の相違に関して評価を行い、より効

果的な薬剤の検討を行っている。解析を依頼された新生児糖尿病症例に関して、代表的な SU 薬であるグリクラジドおよびグリベンクラミドでの薬剤反応性を電気生理学的手法により並列評価した結果、グリクラジドでは薬剤反応性の著明な低下を認め、グリベンクラミドではほとんど薬効低下が起こらず、同遺伝子変異部位に関して、グリベンクラミドであれば野生型 K_{ATP} チャンネルに対する効果に近い薬効が見込めるとの結果を得た。実際に解析依頼元の医療機関において SU 薬を用いた治療が行われ、*in vitro* 評価で十分な薬効が確認されたグリベンクラミド内服により著明な血糖改善を認めた。同症例は、本剤著効により、強化インスリン療法から離脱でき、経口血糖降下薬での血糖管理が可能となった。これらの成果は、経口治療薬反応性の変化を事前の *in vitro* における機能解析実験で評価することが実際に可能であることを示唆するものであり、本成果は臨床的にも大きな可能性を開く成果であると考えられる。

D. 考察

新生児糖尿病の疫学的調査に関しては、今後も全国調査を進めて行くことで、詳細不明であった日本人新生児糖尿病の出生頻度がより高い精度で明らかになっていくものと思われる。新生児糖尿病発症原因遺伝子(Kir6.2 遺伝子、SUR1 遺伝子およびインスリン遺伝子)に関して、現時点までの調査結果から、 K_{ATP} チャンネル(Kir6.2 および SUR1) 遺伝子異常が日本人新生児糖尿病発症原因遺伝子変異として高頻度で存在することが示唆され、本邦における新生児糖尿病症例の一部では、電気生理学的 *in vitro*

解析による経口血糖降下薬 (SU 薬およびグリニド薬) の処方前薬効評価が施行し得る可能性が示唆された。

E. 結論

アンケートによる全国調査により、従来 30~40 万人出生に 1 人程度と考えられてきた本邦における新生児糖尿病発症頻度は、実際は想定されていた以上に高頻度(約 8.9 万人出生に 1 人以上)であることが示唆された。本邦における新生児糖尿病発症原因遺伝子としては、白人での結果同様、K_{ATP} チャンネルを構成する Kir6.2 の遺伝子異常の頻度が最も高いことが示唆された。遺伝子変異に起因する経口血糖降下薬 (SU 薬) の薬効変化が in vitro 解析により事前評価可能であることが示唆された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Park SK, Amos L, Rao A, Quasney MW, Matsumura Y, Inagaki N, Dahmer MK. Identification and Characterization of a Novel ABCA3 Mutation. **Physiol Genomics**. 2010 (in press)
2. Fujita Y, Hosokawa M, Fujimoto S, Mukai E, Abudukadier A, Obara A, Ogura M, Nakamura Y, Toyoda K, Nagashima K, Seino Y, Inagaki N. Metformin suppresses hepatic gluconeogenesis and lowers fasting blood glucose levels through reactive nitrogen species in mice. **Diabetologia**. 2010(in press)
3. Ogura M, Nakamura Y, Tanaka D, Zhuang X, Fujita Y, Obara A, Hamasaki A, Hosokawa M, Inagaki N. Overexpression of SIRT5 confirms its involvement in deacetylation

and activation of carbamoyl phosphate synthetase 1. **Biochem Biophys Res Commun**. 393(1):73-8, 2010

4. Toyama K, Yonezawa A, Tsuda M, Masuda S, Yano I, Terada T, Osawa R, Katsura T, Hosokawa M, Fujimoto S, Inagaki N, Inui K. Heterozygous variants of multidrug and toxin extrusions (MATE1 and MATE2-K) have little influence on the disposition of metformin in diabetic patients. **Pharmacogenet Genomics**. 20(2):135-8, 2010
 5. Shimodahira M, Fujimoto S, Mukai E, Nakamura Y, Nishi Y, Sasaki M, Sato Y, Sato H, Hosokawa M, Nagashima K, Seino Y, Inagaki N. Rapamycin impairs metabolism-secretion coupling in rat pancreatic islets by suppressing carbohydrate metabolism. **J Endocrinol**. 204(1):37-46, 2010
 6. Mukai E, Toyoda K, Kimura H, Kawashima H, Fujimoto H, Ueda M, Temma T, Hirao K, Nagakawa K, Saji H, Inagaki N. GLP-1 receptor antagonist as a potential probe for pancreatic beta-cell imaging. **Biochem Biophys Res Commun**.389(3):523-6, 2009
 7. Liu X, Harada N, Yamane S, Kitajima L, Uchida S, Hamasaki A, Mukai E, Toyoda K, Yamada C, Yamada Y, Seino Y, Inagaki N. Effects of long-term dipeptidyl peptidase-IV inhibition on body composition and glucose tolerance in high fat diet-fed mice. **Life Sci**. 84(25-26):876-81, 2009
- ##### 2. 学会発表
- なし
- #### H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし

II. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

分担研究報告書

日本人新生児糖尿病の遺伝子解析・臨床症状との関連と MODY 様発症例における
新生児糖尿病原因遺伝子変異に関する研究

研究分担者 依藤 亨 京都大学医学研究科小児科学 講師

研究要旨： 我が国の新生児糖尿病の症例を集積して遺伝子解析、臨床症状との関連を検討するとともに、MODY 様発症家系において *KCNJ11*, *ABCC8* および *INS* の異常の関与の可能性を検討した。新生児糖尿病 14 例の遺伝子解析を行い、*KCNJ11* 変異 8 例、*ABCC8* 変異 1 例を同定するとともに、*INS* 変異による本邦初例を同定した。また、MODY 様の優性遺伝性糖尿病発症家系において新生児糖尿病関連遺伝子異常を 2 家系同定した。うち 1 家系は *KCNJ11* 変異、他の 1 家系は *ABCC8* 変異であった。*ABCC8* 変異家系では、家系内に新生児持続性高インスリン血症の患者が存在し発症機序の面から興味ある家系と考えられた。

A. 研究目的

新生児糖尿病の原因遺伝子として、*KCNJ11*, *ABCC8* および *INS* が同定され、前 2 者では DEND 症候群として中枢神経異常を伴う症例が存在すること、スルホニル尿素剤が著効する症例があることが欧米を中心に報告されているが、本邦での実態は不明である。また我々は、一部症例においては年長発症して MODY (Maturity-onset diabetes of the young) と同様の発症をする場合があることを報告したが、やはり本邦での MODY 症例においてこれらの遺伝子の異常がどの程度存在するかの実態は不明である。本研究では、新生児糖尿病症例の集積と遺伝子解析・臨床症状との関連を検

討するとともに、MODY 様の優性遺伝性糖尿病を呈する家系における新生児糖尿病関連遺伝子の変異の可能性を検討した。

B. 研究方法

(1) 新生児糖尿病の遺伝子解析と臨床症状の検討

インフォームドコンセントを得たうえで、生後 6 カ月未満の発症をした糖尿病患者から採血し、ゲノム DNA を抽出したのち、*KCNJ11*, *ABCC8* および *INS* の全エクソンを PCR 増幅し、直接塩基配列決定を行った。また、症例調査票より臨床情報の解析を行った。

(2) MODY 様発症を示す糖尿病家系にお

ける新生児糖尿病遺伝子異常のスクリーニング

分担研究者は、従来より小児期発症する患者を含む MODY 様家系を集積し、既知の MODY 遺伝子である *HNF1A*, *GCK* および *HNF4A* の遺伝子解析を行ってきたが、本研究ではこれら既知遺伝子に異常を認めない症例に対して新生児糖尿病遺伝子の異常の有無を検討した。

(倫理面への配慮)

本申請研究は、ヘルシンキ宣言および京都大学大学院医学研究科・医学部医の倫理委員会規定に則り施行され、検体は匿名化(記号化)により個人情報保守の厳守を徹底している。遺伝子カウンセリングを含む患者フォローアップ体制を確立している。

C. 研究結果

(1) 新生児糖尿病の遺伝子解析と臨床症状の検討

現在までに 14 症例の解析を行い、下記の結果を得た。

KCNJ11 変異 8 例、*ABCC8* 変異 1 例、*INS* 変異 1 例、6 番染色体 6q24 部位の paternal duplication 1 例。

内訳は以下のとおりである。*KCNJ11* 変異 (V59A, R50P, R201H, V64M, V59M, C42R, D323G, R201C), *ABCC8* (R1380C), *INS* 異常 (G32S) は同定時点で本邦初例であった。

(2) MODY 様発症を示す糖尿病家系における新生児糖尿病遺伝子異常のスクリーニング

2 例の遺伝子変異を同定した。1 例は前述の新生児糖尿病と同じ *KCNJ11* の D323G、他方は *ABCC8* の E1506K 変異であった。

E1506K 変異家系では Huopio らが同一の変異で新生児高インスリン血症をきたすことがあるとしているが、本症例は 2 例目の同定で、やはり新生児高インスリン血症をきたした児が含まれていた。その機序は現時点では不明である。

D. 考察

新生児糖尿病、MODY 様家系のいずれも *ABCC8* の変異は検索途上であり、今後さらに同定されてくる可能性がある。広い意味での新生児糖尿病関連遺伝子変異の臨床病型スペクトルが同定されていくものと考えられる。

E. 結論

新生児糖尿病患者 14 症例の解析を行い、*KCNJ11* 異常 8 例、*ABCC8* 変異 1 例、*INS* 変異 1 例、6 番染色体 6q24 部位の paternal duplication 1 例を同定した。さらに MODY 様発症を示す糖尿病家系において、*KCNJ11* 変異 1 症例および *ABCC8* 変異 1 症例の計 2 症例を同定した。今後も、症例集積、遺伝子解析および機能解析を進めていく予定である。

F. 健康危険情報 特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Ueki I, Kimura A, Chen HL, Yorifuji T, Mori J, Itoh S, Maruyama K, Ishige T, Takei H, Nittono H, Kurosawa T, Kage M, Matsuishi T. SRD5B1 gene analysis needed for the accurate diagnosis of primary 3-oxo-Delta4-steroid 5beta-reductase deficiency. **J Gastroenterol Hepatol.** 24:776-785, 2009

2. Nagasaka H, Yorifuji T, Momoi T, Yorifuji J,

Hirano K, Ota A, Takatani T, Tsukahara H, Takayanagi M, Kobayashi K, Chiba H, Sato Y, Miida T. Lipoprotein profiles in children with two common cholesteryl ester transfer protein gene mutations, D442G and I14A, during the first year of life. **Clin Chim Acta.** 406:52-56, 2009.

3. Nagasaka H, Okano Y, Tsukahara H, Shigematsu Y, Momoi T, Yorifuji J, Miida T, Ohura T, Kobayashi K, Saheki T, Hirano K, Takayanagi M, Yorifuji T. Sustaining hypercitrullinemia, hypercholesterolemia and augmented oxidative stress in Japanese children with aspartate/glutamate carrier isoform 2-citrin-deficiency even during the silent period. **Mol Genet Metab.** 97:21-26, 2009.

2. 学会発表

1. Yorifuji T. Molecular analysis of Japanese patients with congenital hyperinsulinism. International Congress of Endocrinology, 2010年3月29日, Kyoto
2. 依藤 亨、川北理恵、野村安隆、長井静世、河井昌彦、杉峰啓憲、百井 亨、増江道哉、西堀弘記. 本邦における先天性高インスリン血症の臨床的・分子遺伝学的解析. 第43回日本小児内分泌学会, 2009年10月2日, 宇都宮
3. 依藤 亨. 本邦における先天性高インスリン血症の臨床的・分子遺伝学的解析. 第54回日本人類遺伝学会, 2009年9月25日, 東京
4. 依藤 亨、川北理恵、百井 亨. 日本人優性遺伝性糖尿病家系の遺伝子解析: major MODY-Xは存在するのか?. 第52回日本糖尿病学会, 2009年5月24日, 大阪
5. 依藤 亨、川北理恵、百井 亨. 日本人優性遺伝性糖尿病家系の遺伝子解析: major MODY-Xは存在するのか?. 第82回日本内分泌学会, 2009年4月25日, 前橋
6. 川北理恵、百井 亨、依藤 亨. HNF4A 遺伝子に変異を認めた新生児一過性高インスリン性低血糖症の双生児例. 第82回日本内分泌学会, 2009年4月23日,

前橋

7. 依藤 亨. 新生児の低血糖症. 第82回日本内分泌学会, 2009年4月23日, 前橋
8. 依藤 亨、川北理恵、野村安隆、河井昌彦、百井亨、長井静世、中畑龍俊. 先天性高インスリン血症の遺伝子診断. 第12回日本小児科学会, 2009年4月17日, 奈良

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

分担研究報告書

日本人新生児糖尿病の疫学的実態把握、発症原因遺伝子および薬剤反応性変化に関する研究

研究分担者 長嶋 一昭 京都大学医学研究科糖尿病・栄養内科学 助教

研究要旨： 新生児糖尿病は発症原因および機序が詳細不明な希少疾患であり、発症頻度等の疫学的実態に関しては詳細不明である。また、近年、発症原因遺伝子が幾つか報告されているが、その頻度および日本人における原因遺伝子としての実態は不明である。

本研究では、新生児糖尿病に関する主要病院へのアンケートによる全国調査により、日本人新生児糖尿病の疫学的実態把握を行い、発症頻度に関して検討する。本症の主要な発症原因遺伝子として報告されている遺伝子群に関してスクリーニングを行い本邦における各発症原因遺伝子頻度に関して検討する。さらに患者個々人の遺伝子変異部位に関して、*in vitro* 解析による治療薬薬効変化を検討し、より費用対効果と治療の簡便性の優れる経口血糖降下薬での治療選択肢の提示と論拠の集積を目的とする。

A. 研究目的

新生児糖尿病は生後 6 ヶ月未満に発症する希な難治性疾患である。本邦における疫学的実態は詳細不明である。

近年、同疾患の主要な発症原因遺伝子として Kir6.2、SUR1 およびインスリンの遺伝子異常が報告された。しかしながらゲノム疫学的実態は詳細不明であり、本邦での新生児糖尿病発症原因遺伝子として各遺伝子変異が占める割合に関しても不明である。本研究は、疫学的ならびにゲノム疫学的にも詳細不詳な新生児糖尿病に関して、全国主要病院へのアンケート調査により本邦における新生児糖尿病の発症頻度の実態を把握すること、日本人新生児糖尿病発症原因遺伝子に関して検討すること、同定された遺伝子変異部位に起因する薬剤反応性変化

に関して *in vitro* での薬効評価の可能性を検討することを目的とする。

B. 研究方法

(1) 本邦における新生児糖尿病の発症頻度に関する検討。

全国主要病院 956 施設（主に小児科）に、過去 3 年間の新生児糖尿病加療経験の有無等に関する 1 次アンケートを実施、施設によっては、複数回、同アンケート返信に関する依頼を行い、アンケート結果の集積を進めた。新生児糖尿病症例経験ありの施設には、より詳細な追加アンケート（2 次アンケート）を実施。各症例の生年月、性別および加療地域等により、集積された各々の症例の重複を除外し、実数把握に努めた。また、過去 3 年間の本邦総出生数に関して

は、総務省住民基本台帳統計を用いた。3年間に於ける各施設加療の新生児糖尿病症例数と当該年度の出生数により、直近3年間の本邦での新生児糖尿病発症頻度を算出した。

(2) 新生児糖尿病発症関連遺伝子群のスクリーニング。

日本人新生児糖尿病症例において現在までに主な発症感受性遺伝子として報告のある Kir6.2 遺伝子、SUR1 遺伝子およびインスリン遺伝子に関して、患者血液検体から抽出したゲノム DNA を用いて遺伝子シーケンスを行い、各遺伝子に関して変異の有無を検討した。

(3) 遺伝子変異部位に基づく機能異常の検討および治療薬薬効変化に関する検討。

各々の遺伝子変異に起因する経口血糖降下薬 SU 薬の薬効変化に関して、分子生物学的手法、電気生理学的手法、細胞膜面への変異蛋白発現実験および生理学的検討等により直接的に *in vitro* 解析した。

a) 遺伝子変異による機能性蛋白の特性変化の検討

変異遺伝子を導入した発現ベクターを培養細胞へリポフェクション法により遺伝子導入し、当該遺伝子由来の機能性蛋白に関する基本的な特性変化を検討し（チャンネル蛋白においては、チャンネル開口確率、細胞内代謝を反映する細胞内 ATP 濃度によるチャンネル活性変化等）、細胞内局在変化に関しては GFP 等で標識した変異遺伝子を細胞発現させ共焦点顕微鏡にて観察し、あわせて電気生理学的手法および蛋白量直接測定等により、蛋白の機能的発現量および蛋白発現総量の変化および細胞内局在変化等を評価する。これら多面的評価により、糖

尿病発症に関わるメカニズムを検証する。

b) 経口血糖降下薬の薬効変化に関する検討。

遺伝子変異が K_{ATP} チャンネルを構成する Kir6.2 あるいは SUR1 の遺伝子上に同定された場合、各遺伝子変異に起因する経口血糖降下薬 SU 薬の薬効変化の程度と機序に関して、分子生物学的手法、電気生理学的手法、細胞膜面への蛋白発現実験等により解析する。

(4) 遺伝子変異部位に応じた処方選択論拠の集積

各遺伝子変異部位による遺伝子レベルの個体差に由来する経口血糖降下薬の薬剤反応性変化を明らかにし、それらの結果を基に、遺伝子変異部位に応じたテーラーメイドの処方選択論拠を集積する。

(倫理面への配慮)

本申請研究は、ヘルシンキ宣言および京都大学大学院医学研究科・医学部医の倫理委員会規定に則り施行され、検体は匿名化（記号化）により個人情報保守の厳守を徹底している。遺伝子カウンセリングを含む患者フォローアップ体制を確立している。

C. 研究結果

(1) 本邦における新生児糖尿病発症に関する疫学的検討

全国主要病院 956 施設への過去3年間の新生児糖尿病加療経験の有無等に関する全国調査結果から、956 施設中 37 施設で同疾患治療経験有り（各施設 1~4 症例）との返答を得た。

報告症例の重複等を除外するため、現在、より詳細な 2 次アンケートを実施中。本邦における新生児糖尿病発症頻度に関する疫

学調査を進めている。

(2) 新生児糖尿病発症関連遺伝子群のスクリーニング

日本人新生児糖尿病症例において現在までに主な発症感受性遺伝子として報告のある Kir6.2、SUR1 およびインスリン遺伝子に関して、患者（18 症例）の血液検体から抽出したゲノム DNA を用いて、遺伝子シーケンスを行った。その内、12 症例に 10 種類の rare variant が認められた。その中で、K_{ATP} チャンネル機能に異常をきたし新生児糖尿病の発症の原因となりうる既知の変異は 8 症例（7 種類）であった。また、2 症例について SUR1 遺伝子の rare variant が確認され、機能解析中である。

(3) 遺伝子変異部位に基づく治療薬剤反応性変化に関する検討

同定された Kir6.2 遺伝子および SUR1 遺伝子上の遺伝子変異に関して、哺乳動物細胞 COS1 細胞に遺伝子導入し、変異 K_{ATP} チャンネル蛋白を細胞膜上に発現させ、電気生理学的手法（パッチクランプ法）によりチャンネル特性、ATP 感受性、経口血糖降下薬 SU 薬の薬効変化に関して in vitro 解析を行った。その結果、遺伝子変異部位によっては、SU 薬の種類によって薬効変化に著明な相違が生じる症例が存在することが判明した。

(4) 遺伝子変異部位に応じた処方選択論拠の集積

Kir6.2 遺伝子および SUR1 遺伝子で確認された変異に関して、薬剤反応性変化を in vitro で評価することにより、インスリン療法から経口血糖降下薬への変更が可能か否か、さらには各 SU 薬間で薬効変化程度に違いが生じるか否かに関して検討を行って

る。

解析を依頼された新生児糖尿病症例（SUR1 遺伝子異常）に関して、代表的な SU 薬であるグリクラジドおよびグリベンクラミドでの薬剤反応性を電気生理学的手法により並列評価した結果、グリクラジドでは著明な薬剤反応性の減弱を認め、グリベンクラミドではほとんど薬効低下を生じず、同遺伝子変異部位に関して、グリベンクラミドであれば野生型 K_{ATP} チャンネルに対する効果に近い薬効が見込めるとの結果を得た。実際に解析依頼元の医療機関において SU 薬を用いた治療が行われ、in vitro 評価で十分な薬効が確認されたグリベンクラミド内服により著明な血糖改善を認めた。本症例は、同薬著効により、強化インスリン療法から離脱でき、経口血糖降下薬での血糖管理が可能となった。

本症例は、in vitro 解析で著明な薬効減弱が認められたグリクラジドを過去に処方されており、その際の薬効は、in vitro での結果同様、インスリン分泌促進および血糖状態改善乏しく、高容量内服にても十分な薬効は得られなかった。

これらの成果は、経口治療薬反応性の変化を事前の in vitro における機能解析実験で評価することが実際に可能であることを示唆するものであり、本成果は臨床的にも大きな可能性を開く成果であると考えられる。

D. 考察

新生児糖尿病の疫学的調査に関しては、全国調査を今後も継続することにより、日本人新生児糖尿病発症率をより高い精度で推定できるものと考えている。

現時点までの解析で、日本人新生児糖尿病では K_{ATP} チャンネル構成遺伝子、なかでも Kir6.2 遺伝子異常の頻度が最も高く、多くの新生児糖尿病症例で電気生理学的な *in vitro* 解析による経口血糖降下薬 (SU 薬およびグリニド薬) の処方前薬効評価の可能性が想定される。

また、*in vitro* 解析での薬効評価と、ヒトでの薬効発現が良く関連した結果が得られたことから、 K_{ATP} チャンネル構成遺伝子の異常に起因した新生児糖尿病症例では、経口血糖降下薬の薬剤反応性の変化を処方前の *in vitro* 機能解析で事前に評価することが実際に可能であることが示唆され、本成果は臨床的にも大きな可能性を開く成果であると考えられる。

E. 結論

アンケートによる全国調査により、本邦における新生児糖尿病発症頻度は、実際は想定されていたものより多く、約 8.9 万人出生に 1 人以上であることが示唆された。本邦における新生児糖尿病発症原因遺伝子としては、 K_{ATP} チャンネル構成遺伝子、なかでも Kir6.2 遺伝子異常の頻度が最も高く、症例によっては、遺伝子変異に起因する SU 薬の薬効変化が *in vitro* 解析により事前評価可能であることが示唆された。新生児糖尿病の処方選択に関して電気生理学的な事前薬効評価は有効なアプローチとなる可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Fujita Y, Hosokawa M, Fujimoto S, Mukai E, Abudukadier A, Obara A, Ogura M, Nakamura Y, Toyoda K, Nagashima K, Seino Y, Inagaki N. Metformin suppresses hepatic gluconeogenesis and lowers fasting blood glucose levels through reactive nitrogen species in mice. *Diabetologia*. 2010(in press)

2. Shimodahira M, Fujimoto S, Mukai E, Nakamura Y, Nishi Y, Sasaki M, Sato Y, Sato H, Hosokawa M, Nagashima K, Seino Y, Inagaki N. Rapamycin impairs metabolism-secretion coupling in rat pancreatic islets by suppressing carbohydrate metabolism. *J Endocrinol*. 204(1):37-46, 2010

3. 学会発表

1. Takagi T, Furuta H, Miyawaki M, Nagashima K, Nishi M, Sasaki H, Inagaki N, Yoshikawa N, Nanjo K. A P1198L mutation in ABCC8 gene decreases ATP sensitivity of the K_{ATP} channel and causes permanent neonatal diabetes. The 11th Symposium on Molecular Diabetology in Asia. 2009年12月19日. Taipei, TAIWAN.

2. 渋谷由紀、木戸良明、浅原俊一郎、松田友和、竹田章彦、井上 妙、小柳真希、長嶋一昭、清野 進、春日雅人 「2型糖尿病候補遺伝子 KCNQ1 の膵β細胞に及ぼす役割の検討」 第52回日本糖尿病学会総年次学術集会, 2009年5月21-24日, 大阪

3. 長嶋一昭, Pascal Beguin, Walter Hunziker, 稲垣暢也. 「新規電位依存性 Ca^{2+} チャンネル調節因子の同定および膵β細胞インスリン分泌調節への影響に関する検討」 第52回日本糖尿病学会総年次学術集会, 2009年5月21-24日, 大阪

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

分担研究報告書

本邦における新生児糖尿病発症頻度および発症原因遺伝子に関する研究

研究分担者 佐々木 真弓 京都大学医学部附属病院 糖尿病・栄養内科 医員

研究要旨： 本邦における新生児糖尿病の発症頻度は詳細不明である。発症原因の一つとして幾つかの遺伝子変異が報告されている。本研究では、従来 30～40 万人出生に 1 人程度と考えられてきた日本人新生児糖尿病発症頻度に関して全国規模でのアンケート調査を行い、本邦における新生児糖尿病発症頻度に関して検討を行うこと、さらには既報の発症疾患遺伝子である Kir6.2 遺伝子、SUR1 遺伝子およびインスリン遺伝子に関して、遺伝子スクリーニングを行い、発症原因遺伝子および変異部位を同定し、さらには本邦における新生児糖尿病における上記 3 遺伝子変異の頻度を検証することを目的とする。

A. 研究目的

新生児糖尿病の発症頻度に関する実態把握は不十分であり、本邦における同疾患の全国的規模での詳細な検討は乏しく、また発症原因の一つと想定されている遺伝子異常の実態に関しても不詳な点が多い。

本研究は、疫学的に詳細不詳な新生児糖尿病に関して、全国主要病院へのアンケート調査により本邦における新生児糖尿病の発症頻度の実態把握を行うことを目的とする。さらに、同疾患の主要な発症原因遺伝子として報告のある Kir6.2 遺伝子、SUR1 遺伝子およびインスリン遺伝子に関して、日本人新生児糖尿病における各遺伝子変異の頻度（各々の占める割合）について具体的に検討し、欧米との比較・検討を行うことを目的としている。

B. 研究方法

(1) 本邦における新生児糖尿病の発症頻度の把握。

全国主要病院 956 施設に、過去 3 年間の新生児糖尿病加療経験の有無等に関する 1 次アンケートを実施、返信なかった施設には再度同アンケート返信依頼を行い、アンケート結果の集積を行った。新生児糖尿病症例経験有りの施設には、より詳細な追加アンケート（2 次アンケート）を実施。各症例の生年月、性別および加療地域等により、御連絡頂いた各々の新生児糖尿病症例の重複症例を除外し、実数把握に努めた。また、過去 3 年間の本邦総出生数に関しては、総務省住民基本台帳統計を用いた。3 年間における各施設加療の新生児糖尿病症

例数と当該年度の出生数により、直近3年間の本邦での新生児糖尿病発症頻度を算出した。

(2) 新生児糖尿病発症関連遺伝子群のスクリーニング

日本人新生児糖尿病症例において現在までに主な発症感受性遺伝子として報告のある Kir6.2 遺伝子、SUR1 遺伝子およびインスリン遺伝子に関して、患者血液検体から抽出したゲノム DNA を用いて遺伝子シーケンスを行い、上記各遺伝子に関して変異の有無を検討した。

(倫理面への配慮)

本申請研究は、ヘルシンキ宣言および京都大学大学院医学研究科・医学部医の倫理委員会規定に則り施行され、検体は匿名化(記号化)により個人情報保守の厳守を徹底している。遺伝子カウンセリングを含む患者フォローアップ体制を確立している。

C. 研究結果

(1) 本邦における新生児糖尿病発症に関する疫学的検討

全国主要病院 956 施設への過去3年間の新生児糖尿病加療経験の有無等に関する郵送による全国調査結果を行った結果、956 施設中 760 施設から返答があり、37 施設で過去3年間の間に1~4症例の新生児糖尿病治療経験有りとの返答を得た。

症例の重複等を除外するため、現在、より詳細な2次アンケートを実施中である。

(2) 新生児糖尿病発症関連遺伝子群のスクリーニング

日本人新生児糖尿病症例において現在までに主な発症感受性遺伝子として報告のある Kir6.2、SUR1 およびインスリン遺伝子

に関して、18 症例の血液検体から抽出したゲノム DNA を用いて、遺伝子シーケンスを行った。その内、12 症例に 10 種類の rare variant が認められた。その中で、K_{ATP} チャンネル機能に異常をきたし新生児糖尿病の発症の原因となりうる既知の変異は 8 症例(7 種類)であった。また、2 症例について SUR1 遺伝子の rare variant が確認され、機能解析中である。

D. 考察

新生児糖尿病の疫学的調査に関して、従来想定されていた発症頻度(30~40 万人出生に 1 人程度)を上回る発症率であることが示唆され、今後も、全国調査を今後も進めて行き、より精度を高めていく予定である。

現時点までの解析で、日本人新生児糖尿病では K_{ATP} チャンネル構成遺伝子(Kir6.2 および SUR1 遺伝子)で rare variant を認めた症例は、18 症例中 14 症例(77.8%)であり、そのうち 12 症例(66.7%)は Kir6.2 遺伝子上の変異であった。海外の報告では、白人(Caucasian)の永続型新生児糖尿病に占める Kir6.2 遺伝子異常の割合は 52%との報告がある(Diabetes, 53, 2719-22, 2004)。日本人新生児糖尿病においても西欧人での報告同様、Kir6.2 遺伝子異常の頻度が最も高頻度であることが示唆され、今後も症例集積することで、同病における遺伝子異常の実態が明らかにされるものと考えられる。

E. 結論

アンケートによる全国調査により、本邦における新生児糖尿病発症頻度は、実際は想定されていたものより高頻度(約 8.9 万

人出生に1人以上)であることが示唆された。本邦における新生児糖尿病発症原因遺伝子としては、白人での報告同様、Kir6.2遺伝子異常の頻度が最も高いことが示唆された。

F. 健康危険情報
特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Shimodahira M, Fujimoto S, Mukai E, Nakamura Y, Nishi Y, Sasaki M, Sato Y, Sato H, Hosokawa M, Nagashima K, Seino Y, Inagaki N. Rapamycin impairs metabolism-secretion coupling in rat pancreatic islets by suppressing carbohydrate metabolism. **J Endocrinol.** 204(1):37-46, 2010

4. 学会発表

1. 福島 徹, 佐々木真弓, 原田範雄, 藤本新平, 細川雅也, 八幡三喜男, 稲垣暢也. 治療に難渋し、低親和性高結合容量の抗インスリン抗体をみとめた2型糖尿病の一例. 第46回日本糖尿病学会近畿地方会, 2009年11月3日, 京都

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Park SK, AmosL, Rao A, Quasney MW, Matsumura Y, <u>Inagaki N</u> , Dahmer MK.	Identification and Characterization of a Novel ABCA3 Mutation.	Physiol Genomics.	in press		2010
Fujita Y, Hosokawa M, Fujimoto S, Mukai E, AbudukadierA, Obara A, Ogura M, Nakamura Y, Toyoda K, Nagashima K, Seino Y, <u>Inagaki N</u> .	Metformin suppresses hepatic gluconeogenesis and lowers fasting blood glucose levels through reactive nitrogen species in mice.	Diabetologia	in press		2010
Ogura M, Nakamura Y, Tanaka D, Zhuang X, Fujita Y, Obara A, Hamasaki A, Hosokawa M, <u>Inagaki N</u> .	Overexpression of SIRT5 confirms its involvement in deacetylation and activation of carbamoyl phosphate synthetase 1.	Biochem Biophys Res Commun.	393(1)	73-8	2010

Toyama K, Yonezawa A, Tsuda M, Masuda S, Yano I, Terada T, Osawa R, Katsura T, Hosokawa M, Fujimoto S, <u>Inagaki N</u> , Inui K.	Heterozygous variants of multidrug and toxin extrusions (MATE1 and MATE2-K) have little influence on the disposition of metformin in diabetic patients.	Pharmacoge net Genomics.	20(2)	135-8	2010
Shimodahira M, Fujimoto S, Mukai E, Nakamura Y, Nishi Y, Sasaki M, Sato Y, Sato H, Hosokawa M, Nagashima K, Seino Y, <u>Inagaki N</u> .	Rapamycin impairs metabolism-secretion coupling in rat pancreatic islets by suppressing carbohydrate metabolism.	J Endocrinol.	204(1)	37-46	2010
Mukai E, Toyoda K, Kimura H, Kawashima H, Fujimoto H, Ueda M, Temma T, Hirao K, Nagakawa K, Saji H, <u>Inagaki N</u> .	GLP-1 receptor antagonist as a potential probe for pancreatic beta-cell imaging.	Biochem Biophys Res Commun	389(3)	523-6	2009
Liu X, Harada N, Yamane S, Kitajima L, Uchida S, Hamasaki A, Mukai E, Toyoda K, Yamada C, Yamada Y, Seino Y, <u>Inagaki N</u> .	Effects of long-term dipeptidyl peptidase-IV inhibition on body composition and glucose tolerance in high fat diet-fed mice.	Life Sci.	84	876-81	2009