

E. 結論

変異が最も多かったが、他の変異も同定された。

0歳代で発症した糖尿病 25 例について包括的遺伝子検索を行い、15 例に遺伝子変異を同定した(同定率 60%)。SU剤治療の対象となり得る *KCNJ11*

表1

| 症例 | 遺伝子 | 変異 | 性別 | 在胎週数 | 出生体重 | DM発症月令 | DM発症日例 |
|----|---------|--------------|----|------|------|--------|--------|
| 1 | KCNJ11 | p.R201G | M | 39 | 2596 | 0 | 0 |
| 2 | GCK | P417T | M | 38 | 2354 | 0 | 3 |
| 3 | KCNJ11 | D323G | F | 39 | 2402 | 0 | 8 |
| 4 | KCNJ11 | R201H | M | 38 | 2426 | 0 | 1 |
| 5 | | ND | F | 40 | 1638 | 0 | 0 |
| 6 | | ND | M | 39 | 3125 | 0 | 1 |
| 7 | | ND | M | | | 0 | 0 |
| 8 | | ND | F | 38 | 3530 | 0 | 1 |
| 9 | | ND | M | 30 | 690 | 0 | 0 |
| 10 | INS | G32S | F | 39 | 2592 | 0 | 4 |
| 11 | | ND | F | 37 | 2760 | 0 | 6 |
| 12 | chr6q24 | Paternal dup | F | | | 0 | |
| 13 | KCNJ11 | V59A | F | 38 | 2710 | 0 | 0 |
| 14 | HNF1B | exon 1-4 del | M | 40 | 3396 | 0 | 11 |
| 15 | KCNJ11 | V64M | F | 37 | 2460 | 0 | 3 |
| 16 | KCNJ11 | R201C | M | 39 | 2308 | 0 | 1 |
| 17 | | ND | M | 39 | 2236 | 0 | 0 |
| 18 | | ND | M | 36 | 2576 | 0 | 0 |
| 19 | KCNJ11 | V59M | F | | | 0 | |
| 20 | chr6q24 | Paternal dup | F | 36 | 1702 | 0 | 0 |
| 21 | ABCC8 | R1380C | M | 38 | 2264 | 0 | 0 |
| 22 | | ND | M | 39 | 2562 | 0 | 0 |
| 23 | | ND | M | 38 | 1680 | 0 | 0 |
| 24 | KCNJ11 | R50P | M | | | 0 | 0 |
| 25 | HNF1B | S148W | F | 39 | 1896 | 0 | 15 |

F. 健康危険情報
特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yorifuji T, Kawakita R, Nagai S, Sugimine A, Doi H, Nomura A, Masue M, Nishibori H, Yoshizawa A, Okamoto S, Doi R, Uemoto S, Nagasaka H. Molecular and Clinical Analysis of

Japanese Patients with Persistent Congenital Hyperinsulinism: Predominance of Paternally Inherited Monoallelic Mutations in the *KATP* Channel Genes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2011, in press

2. Hori T, Egawa H, Miyagawa-Hayashino A, Yorifuji T, Yonekawa Y, Nguyen JH, Uemoto S. Living-donor Liver Transplantation for Progressive

Familial Intrahepatic Cholestasis.
World J. Surg. 2011, in press

3. Kita F, Shibata Y, Yorifuji T, Nakahata T, Kawakami J, Kawakami K. Prescription trends for treatment of paediatric gastroenteritis at a Japanese hospital between 1997 and 2007. *J. Clin. Pharm. Ther.* 35:87-92, 2010

4. Ueda M, Kanematsu A, Nishiyama H, Yoshimura K, Watanabe K, Yorifuji T, Mikami Y, Kamoto T, Ogawa O. Testicular thecoma in an 11-year-old boy with nevoid basal-cell carcinoma syndrome (Gorlin syndrome). *J. Pediatr. Surg.* 45:E1-3, 2010

5. Goto H, Kanematsu A, Yoshimura K, Miyazaki Y, Koyama T, Yorifuji T, Nishiyama H, Ogawa O. Preoperative diagnosis of congenital segmental giant megaureter presenting as a fetal abdominal mass. *J. Pediatr. Surg.* 45:269-271, 2010

2. 学会発表

1. 依藤 亨. 小児期発症遺伝性糖尿病の分子基盤と臨床への応用 **第 128 回**

分泌セミナー (特別講演). 2010 年 9 月 4 日、東京

2. 依藤 亨. 小児糖尿病の遺伝要因と臨床の関連. **第 9 回東海小児糖尿病内分泌研究会** (特別講演). 2010 年 7 月 31 日、名古屋

3. 依藤 亨. 優性遺伝性糖尿病の分子基盤と臨床への応用. **第 43 回発育異常研究会** (特別講演). 2010 年 6 月 26 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

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）

分担研究報告書

糖尿病家族歴濃厚家系を用いたゲノム解析

研究分担者 小泉 昭夫 京都大学医学研究科環境衛生学教授

研究要旨 本研究目的は、3世代以上にわたり糖尿病患者を有し、常染色体優性遺伝形式が示唆される遺伝的要因が強いと考えられる糖尿病家族歴濃厚家系を用いて、連鎖解析およびハプロタイプ解析により糖尿病発症原因遺伝子を絞り込み、日本人コホートでの検証を経て新たな糖尿病発症原因遺伝子を同定することにある。3世代にわたり糖尿病に罹患している10家系を収集し、10家系発端者について既知のMODY1-MODY6遺伝子の配列決定を行い、既知の糖尿病発症原因であるMODY3遺伝子変異 HNF1A R583Gを有する1家系を除外した家系の中で、連鎖解析に十分な人数の家族に同意を得られた4家系にて全ゲノム連鎖解析を行い、染色体領域2p25-p22の23.6Mbに発症と有意な連鎖を示す候補領域を同定し、データベースを用いた手法による解析優先順位に従い塩基配列決定を行った。その結果、GCKR遺伝子について、家系発端者において稀な変異が一般対照者に比して有意に多発することを明らかにし、同一家系内で、GCKR遺伝子変異が罹患状態の有無と分離することを見いだした。このことから、糖尿病多発集積家系においてGCKR遺伝子が、発症原因遺伝子である可能性が示唆された。

A. 研究目的

糖尿病発症原因遺伝子の多くは未だに同定されておらず、同定された原因遺伝子に関しても異常を有する頻度に人種差が報告されている。本研究目的は、常染色体優性遺伝形式が示唆される糖尿病多発集積家系を用いて連鎖解析を行い、糖尿病感受性遺伝子群を同定することにより、新たなMODYおよび新生児糖尿病発症原因遺伝子を同定することにある。多くの国々で行われている遺伝疫学研究では、複数の共同機関が参加し多数の患者と対照を用いた、相関研究が行われているが、その理論的根拠

は“Common variant, Common disease”仮説に基づいている。一方、MODYのような遺伝的な負荷が濃厚な家系を分析することにより、原因となるRare variantが原因遺伝子に見いだされ、この遺伝子の多型が集団の糖尿病の感受性遺伝子となる場合も想定できる(“Rare variants, multiple genes, common disease”仮説)。我々は後者のアプローチにより、糖尿病集積家系において糖尿病の感受性遺伝子を検出することを目指す。

B. 研究方法

遺伝的負荷の濃厚な家系の収集：京都大

学医学研究科・糖尿病・栄養内科学および関連共同施設で、3世代にわたる糖尿病多発集積家系を見出し、患者に参加協力を依頼した。

一般人口での検証：高山コホート(以下コホート)で検証をした。岐阜県旧丹生川村(現高山市)の970名からなるコホートは、2004年にスタートしている(臨床データは2002年から利用できる)。このコホートでは、すでに5年間の追跡を終了し、身体診察および血液検査のデータ整理を完了した。

遺伝解析：家系解析にあたり、罹患者は、(1)糖尿病の診断歴、(2)75gOGTTで境界型もしくは糖尿病型、(3)HbA1c(国際標準値)が6.0%以上、のいずれかに該当する者と定義した。また、非罹患者のうち55歳未満の者は、将来発症する可能性が存在するため、形質は不知(Unknown)として解析することとした。

これらの定義に基づき、3世代家系10家系の発端者に協力を得た。まず、既知の糖尿病原因遺伝子変異を除外すべく、家系発端者についてMODY1-MODY6遺伝子の配列決定を行い、既知の糖尿病発症原因であるMODY3遺伝子変異HNF1A R583Gを1名に同定した。このため、当該家系を除外した他の9家系のうち、家族にも協力を依頼し、連鎖解析に十分な人数の家族に同意を得られた4家系を連鎖解析の対象とした。

3世代家系では、一般的に常染色体優性遺伝形式が仮定できる。そこで、4家系について、常染色体優性遺伝形式にてパラメトリック連鎖解析を行った。常染色体全域にわたるゲノムワイド連鎖解析は、平均10cM間隔でマイクロサテライトマーカーを用い、合計382マーカーでタイピングを

行った。連鎖解析はGenehunterを用いて行った。

(倫理面への配慮)

本研究は京都大学医学研究科「医の倫理委員会」の承認を得ており、すべての研究はヘルシンキ宣言に基づき行われている。

C. 研究結果

家系の特徴：表1に連鎖解析対象4家系および、残り6家系発端者の情報(年齢、BMI、HbA1c、発症年齢、治療法)を示した。Additional Index cases中にID6として示された発端者が、MODY3遺伝子変異保有者であった。4家系において40歳未満の若年発症が4名にみられ、16名の糖尿病罹患者のうち3名が非肥満(BMI25未満)であった。

連鎖解析：常染色体優性遺伝形式が示唆された4家系(図1)の連鎖解析に際して用いたパラメータは、遺伝子頻度=0.0001、phenocopy率=0.0001、浸透率=0.9999である。4家系での連鎖解析の結果は染色体2番にLOD Score 2.52、染色体7番にLOD Score 3.72と、連鎖の示唆される領域を認めた(図2)。これらの領域においてfine-mappingを行い、連鎖領域を絞り込んだ。その結果、染色体2番に関してLOD Scoreは全ゲノムレベルの有意水準(3.3)を超える3.47に上昇した一方、染色体7番に関してはLOD Scoreが低下し、連鎖領域は染色体2番に絞り込まれた。家系ごとに疾患原因遺伝子座が異なる可能性(locus heterogeneity)を考慮し、HLOD scoreが正であるmarker D2S2199-marker D2S2230までの23Mbを候補領域とした。

表 1 家系の特徴

| | ID | 年齢 | 性別 | BMI | HbA1c(%) | 診断時年齢 | 治療法 |
|-------------------------------|--------|----|------|------|----------|-----------|---------------|
| Pedigree 1 | II-4 | 70 | F | 16.2 | 5.0 | | |
| | II-5 | 71 | F | 22.5 | 10.6 | 60 (DM) | Insulin 66U/d |
| | III-1 | 40 | F | 21.9 | 5.4 | | |
| | III-2 | 37 | M | 26.0 | 6.9 | 20 (DM) | Insulin |
| Pedigree 2 | II-1 | 79 | M | 19.2 | 7.5 | 50 (DM) | Insulin 25U/d |
| | II-2 | 77 | F | 18.6 | 5.6 | | |
| | II-3 | 76 | M | 17.9 | 7.2 | 45 (DM) | Insulin |
| | II-5 | 74 | M | 18.2 | 6.0 | 64 (IGT) | Diet |
| | II-6 | 71 | F | 18.4 | 6.6 | N/A (DM) | Oral drug |
| | II-7 | 68 | F | 19.9 | 5.9 | | |
| | III-1 | 53 | M | 24.2 | 6.0 | 53 (IGT) | Diet |
| | III-3 | 51 | M | 20.4 | 5.6 | | |
| | III-4 | 47 | F | 19.3 | 5.2 | | |
| | III-5 | 46 | F | 19.6 | 4.9 | | |
| IV-1 | 23 | M | 19.9 | 5.6 | | | |
| Pedigree 3 | II-7 | 92 | F | 22.3 | 5.9 | | |
| | III-2 | 77 | F | 23.9 | 9.3 | 30 (DM) | Oral drug |
| | III-5 | 72 | F | 22.0 | 8.1 | 60 (DM) | Insulin 16U/d |
| | III-6 | 69 | F | 19.8 | 8.0 | 65 (DM) | Insulin 16U/d |
| | III-8 | 66 | F | 19.1 | 6.5 | 64 (IGT) | Diet |
| | III-10 | 59 | F | 19.3 | 10.2 | 57 (DM) | Oral drug |
| | III-11 | 67 | F | 20.4 | 6.9 | 62 (DM) | Oral drug |
| | III-12 | 66 | M | 21.1 | N/A | 57 (DM) | Oral drug |
| | III-13 | 64 | F | 20.0 | 6.6 | 25 (DM) | Insulin |
| III-14 | 62 | M | 20.2 | 10.3 | 50 (DM) | Oral drug | |
| Pedigree 4 | II-1 | 76 | F | 28.2 | 6.7 | 60 (DM) | Oral drug |
| | II-2 | 73 | F | 25.1 | 6.4 | 50 (DM) | Oral drug |
| | II-3 | 67 | F | 19.0 | 5.5 | | |
| | II-4 | 64 | M | N/A | 5.4 | | |
| | III-1 | 52 | F | 20.4 | 5.3 | | |
| | III-2 | 50 | M | 20.8 | 6.2 | 35 (DM) | Oral drug |
| Additional Index Cases | 1 | 57 | M | 25.7 | 7.1 | 30 (DM) | Oral drug |
| | 2 | 47 | F | 22.9 | 10.0 | 36 (DM) | Insulin 20U/d |
| | 3 | 68 | F | 19.7 | 7.1 | 45 (DM) | Insulin 19U/d |
| | 4 | 60 | F | 24.7 | 10.4 | 40 (DM) | Insulin 51U/d |
| | 5 | 60 | F | 28.0 | 9.7 | 50 (DM) | Insulin 8U/d |
| | 6 | 54 | F | 34.5 | 9.1 | 40 (DM) | Insulin |

図1 連鎖解析対象の4家系

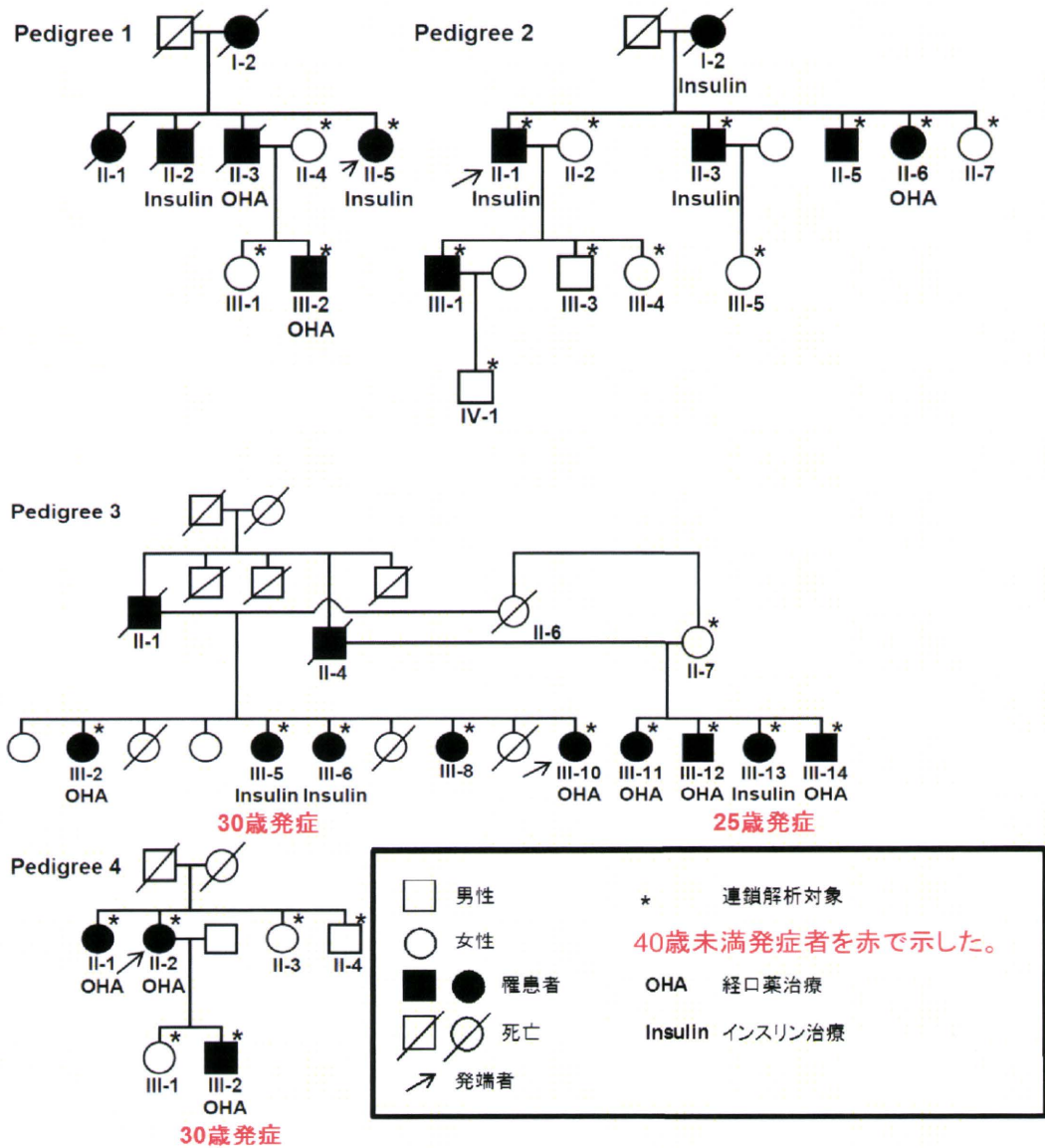
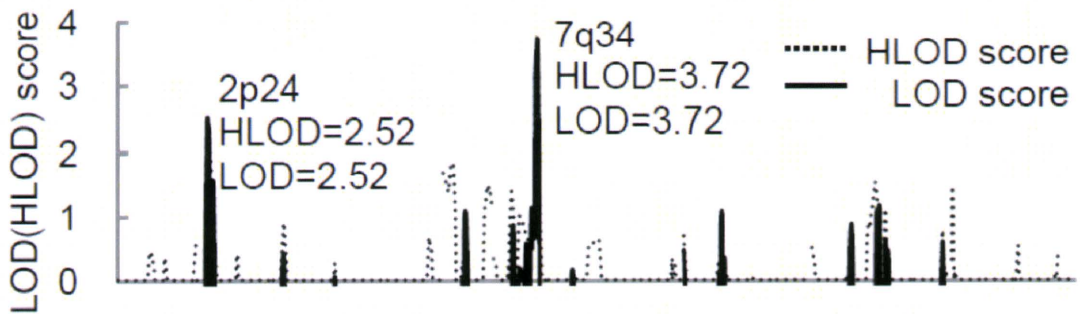


図2 全ゲノム連鎖解析結果



候補遺伝子塩基配列決定：連鎖候補領域に存在する 106 遺伝子から、MODY1-MODY6 遺伝子と関連した特徴を持つ遺伝子群を、データベースを用いた方法(Endeavour web server)にて順位付けし、上位 10%にあたる 11 遺伝子を選択し、エクソンおよびプロモーター領域での塩基配列決定を糖尿病多発集積家系発端者において行った。その結果、GCKR 遺伝子変異が発端者において同定されたため、GCKR 遺伝子の塩基配列決定を、糖尿病多発集積家系 9 家系の発端者および、旧丹生川村コホートにおける 5 年間の追跡中 HbA1c<6.0%(国際標準値) 空腹時血糖<100mg/dl であった 18 名の正常対照者について系統的に行った。この際 GCKR 遺伝子において同定された SNPs のうち、既存データベースに未報告の SNPs については、旧丹生川村コホートの正常対照者 105 名 210 染色体においてタイピングを行い、正常対照者における頻度を決定した。頻度の低い(1%以下)SNPs を rare、そうでないものを common と定義した。その結果、表 2 に示すように糖尿病多発集積家系発端者において有意に多数の rare SNPs が見いだされた(Fisher の正確確率検定にて $p=0.033$)。また、連鎖解析に用いた 4 家系のうちの 1 家系である pedigree 3 において見いだされた rare なエクソン変異 g. 6859C>G は、当該家系内で疾患の有無と完全に co-segregate しており(図 3)、疾患との関連が強く示唆された。

D. 考察

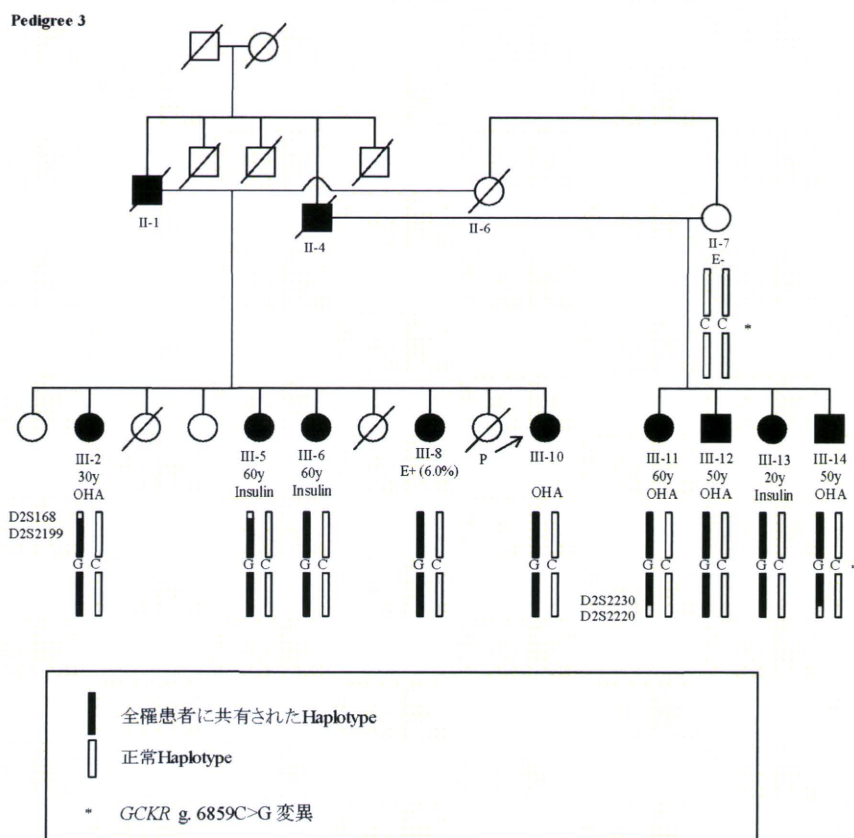
3 世代にわたり糖尿病に罹患する遺伝的負荷の濃厚な家系について原因遺伝子の検討を行った。10 家系のうち 1 家系の原因遺

伝子は既知の MODY3 遺伝子変異と考えられた。他の 9 家系のうち連鎖解析に十分な数の家族に協力が得られた 4 家系における全ゲノム連鎖解析によって絞り込んだ有意な候補領域において、空腹時血糖や 2 型糖尿病リスクとの関連が既報されている GCKR が存在しており、GCKR の配列決定にて、変異が糖尿病多発集積家系発端者において有意に高頻度であったことや、GCKR 変異と一致した発症がみられた家系の存在から、糖尿病多発集積家系の発症要因として GCKR 変異が影響を及ぼしていることが示唆された。

表 2 GCKR 遺伝子変異(rare SNPs)の頻度

| 位置 | 塩基変化 | 検出アレル数 | | | | p | Minor Allele Frequency (MAF) |
|-------------|------------|------------|-------|----------|-------|-------|------------------------------|
| | | 家系発端者(n=9) | | 対照(n=18) | | | |
| | | Major | Minor | Major | Minor | | |
| 変異 (MAF<1%) | | | | | | | |
| プロモーター | g. -689G>A | 17 | 1 | 36 | 0 | 0.33 | 0.00 |
| プロモーター | g. -299G>A | 17 | 1 | 36 | 0 | 0.33 | 0.00 |
| エクソン9 | g. 6859C>G | 17 | 1 | 36 | 0 | 0.33 | 0.00 |
| 合計 | | 15 | 3 | 36 | 0 | 0.033 | |

図3. 1家系における、候補領域(2p25-22)のハプロタイプ解析および GCKR g. 6859C>G 変異



E. 結論

以上から、GCKR 遺伝子が糖尿病多発集積家系において発症感受性遺伝子となっていることが示唆された。今後、さらなる大

家系のデータ収集や、全エクソンシーケンシングによる網羅的解析を加えることにより、糖尿病多発集積家系の発症原因のさらに詳細を明らかにする必要があると考え

られる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Tanaka D, Nagashima K, Sasaki M, Yamada C, Funakoshi S, Akitomo K, Takenaka K, Harada K Koizumi A, and Inagaki N. *GCKR* mutations in Japanese families with clustered type 2 diabetes. *Mol. Genet. Metab.* 102(4):453-460, 2011
2. Takahashi I, Yamada Y, Kadowaki H, Horikoshi M, Kadowaki T, Narita T, Tsuchida S, Noguchi A, Koizumi A, Takahashi T. Phenotypical variety of insulin resistance in a family with a novel mutation of the insulin receptor gene. *Endocr. J.* 57:509-516, 2010

2. 学会発表

1. 島中裕子、人見敏明、小林果、岩沢こころ、原田浩二、小泉昭夫. Akita mouse 由来 insulinoma 細胞株を用いた ER strss と Box C/D snoRNPs の関連性の検討 **第 81 回日本衛生学会** 2010 年 3 月 25-28 日, 東京

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

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）

分担研究報告書

新生児糖尿病の分子遺伝学的原因に関する検討

研究分担者 棚橋 祐典 旭川医科大学小児科学助教

研究要旨： 新生児糖尿病の発症原因遺伝子を明らかにすることは成因および病態解明のみならず治療法選択に関しても重要な情報となる。本研究は、新生児糖尿病および MODY の発症原因遺伝子を明らかにすることを目的とする。本年度は新生児糖尿病 12 症例および MODY 5 症例に関して発症原因となりえる遺伝子変異および染色体異常に関してスクリーニングを行った。新生児糖尿病症例 12 例 (TNDM5 例、PNDM7 例) 中、TNDM 2 症例で pUPD6 を同定、1 症例で ABCC8 遺伝子に c.134C>T, P45L ヘテロ接合変異を同定し、PNDM 4 症例で KCNJ11 遺伝子ヘテロ接合変異 (R201H ; 3 例、G334S ; 1 例) を同定した。今後も解析を継続予定である。

A. 研究目的

新生児糖尿病（生後 6 か月未満発症）および MODY（生後 6 か月以上発症の自己抗体陰性、インスリン分泌低下による糖尿病）の原因遺伝子を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

当科に遺伝子解析依頼のあった新生児糖尿病症例に対し、既知原因遺伝子である *KCNJ11*、*ABCC8*、*INS* および染色体 6q24 ならびに MODY 関連遺伝子のスクリーニングを行った。原因不明症例に対しては、症例を選択し、次世代シーケンサーを用いた全エクソンシーケンスを行った。

（倫理面への配慮）

本申請研究は、ヘルシンキ宣言および当院医の倫理委員会規定に則り施行され個人情報保守の厳守を徹底している。

C. 研究結果

解析依頼のあった症例は、新生児糖尿病 12 例 (TNDM5 例、PNDM7 例)、MODY 5 例（診断年齢 6.2 ± 4.8 歳 ; $0.8 \sim 11$ 歳）。

【一過性新生児糖尿病 (TNDM) 解析結果】

TNDM 5 症例の解析を行い、2 症例で paternal uniparental disomy (pUPD6) を同定した。

他の 1 症例で、*ABCC8* 遺伝子に c.134C>T, P45L ヘテロ接合変異を同定した (*KCNJ11*、*INS* 遺伝子変異は否定的)。

他の 1 症例で、pUPD6、6q24 duplication、および *KCNJ11* 遺伝子変異の検索を行ったが全て否定的であった。

残り 1 例でも、pUPD6、6q24 duplication、*KCNJ11*、*ABCC8* および *INS* 遺伝子変異に関して解析行ったがいずれも否定的であった。

【永続型新生児糖尿病 (PNDM) 解析結果】

PNDM7 症例の解析を行い、4 症例に *KCNJ11* 遺伝子ヘテロ接合変異を同定した (R201H ;

3例、G334S；1例)。G334Sはde novoの新規変異で、intermediate DENDであった。

他の1症例は腭形成不全症例で、KCNJ11、INS、PDX1遺伝子変異が否定的であった。

その他の2例はKCNJ11およびINS遺伝子変異が否定的であった。

【MODYの解析結果】

10歳発症男児1例に新規HNF1 α 遺伝子変異(c.58-131del 74 heterozygote)を認めた。母も同じ変異を有し、小児期発症糖尿病であった。患児は現在14歳で、 α グルコシダーゼ阻害薬にて、HbA1c(JDS値)6%台となっている。

【全エクソンシーケンス】

腭形成不全症例に対し、Agilent SureSelect Human All Exon Kitを用いて、全エクソン領域をキャプチャーし、SOLiDを用いて解析した。結果、22479個のSNPが同定され、そのうち、1843個が未報告のSNPであった。

D. 考察

TNDMの原因不明の2例に関しては、6q24 methylation defectの可能性があり今後解析予定である。TNDMの一症例で認められたABCC8遺伝子P45L変異は、もう一つの変異との複合ヘテロ接合を有するPNDM症例が報告されている(Am J Hum Genet 81(2):375-382)。今回P45Lは、父親にも同定され、P45Lヘテロ変異がTNDMを発症するかについては、今後の機能解析を待つ必要がある。並行して6q24異常の合併の有無についての解析が必要である。今年度の症例を含め、これまで当科で解析したTNDM症例35例中、6q24異常が20例(57.1%)と最も高率であることに変わりはない。今年度の症例

を含め、これまで当科で解析したPNDM症例30例中14例(46.7%)がKCNJ11遺伝子変異で、最も高率であった。KCNJ11およびINS遺伝子変異が否定的な2例に関しては、ABCC8遺伝子変異解析を行う予定である。

腭形成不全症例に関しては、既知遺伝子変異は否定的であり、次世代シーケンサーを用いた網羅的解析を行っている。同様の症例を集積し、候補遺伝子を絞り込んでいく予定である。

E. 結論

新生児糖尿病症例12例(TNDM5例、PNDM7例)の遺伝子解析を行い、TNDM5例中2例でpUPD6を同定、1例でABCC8遺伝子にc.134C>T, P45Lヘテロ接合変異を同定し、PNDM7例中4例でKCNJ11遺伝子ヘテロ接合変異(R201H；3例、G334S；1例)を同定した。今後も解析継続予定である。

F. 健康危険情報 特になし

G. 研究発表

1. 論文発表
 1. Suzuki S, Fujisawa D, Hashimoto K, Asano T, Maimaiti M, Matsuo K, Tanahashi Y, Mukai T, Fujieda K. Partial paternal uniparental disomy of chromosome 6 in monozygotic twins with transient neonatal diabetes mellitus and macroglossia, *Clin. Genet.* 78:580-584, 2010.
 2. 学会発表
 1. Suzuki S, Maimaiti M, Matsuo K, Tanahashi Y, Mukai T, Fujieda K. Clinical implications of a molecular genetic classification for neonatal

diabetes mellitus. *International Symposium on Pediatric Endocrinology Official ICE Satellite Symposium*, 2010年3月31日-4月1日, Tokyo.

2. 鈴木滋、向井徳男、松尾公美浩、棚橋祐典、藤枝憲二：KCNJ11遺伝子変異による新生児糖尿病に対する4年間のスルホニルウレア治療経過とインスリン分泌評価、第44回日本小児内分泌学会学術集会、2010年10月7-9日、大阪市

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

小児1型糖尿病に関する遺伝素因に関する検討

研究分担者 雨宮 伸 埼玉医科大学小児科教授

研究要旨： 多施設共同研究によって『小児1型糖尿病に関する遺伝素因』の解析を進めている。膵自己抗体陰性の5歳未満発症乳幼児期発症患者34症例において *INS*, *KCNJ11* の遺伝子変異を検討し、*INS*の変異5種8例、*KCNJ11*の3種ミスセンス変異が同定された。*INS*異常の2例および *KCNJ11*異常の1例は生後6か月未満の所謂『新生児糖尿病』の定義に合致していたが、*INS*異常の他の6例はこの定義より遅い発症であった。*INS*異常は従来考えてきたよりも高頻度に存在し、同じ変異でも発症が遅い家族・同胞の存在し、インスリンが枯渇していないと思われる症例もいると考えられる。従来1型糖尿病と臨床されていた症例、特に *type 1b* においては、*INS*異常を含めた疾患感受性遺伝子の関与の検討が必要である。

A. 研究目的

従来1型糖尿病と分類される小児期発症患者における遺伝素因を明らかに、病態の解析とともに、診断・治療における特異性を明らかにする。この研究では特に自己免疫機転の明確でない乳・幼児期発症例について単一遺伝子変異による糖尿病の存在を明らかにする。

B. 研究方法

小児期発症1型糖尿病に関する多施設共同研究組織『インスリン治療研究会』の研究課題として5歳未満発症患児のうち膵自己抗体が陰性であった34例のゲノムDNAを用いて *INS*, *KCNJ11* の遺伝子変異を全coding領域、splice junctionsの塩基配列を決定した。

（倫理面への配慮）

『小児1型糖尿病に関する遺伝素因』研究としてDNA検体を患児、父母、同胞につ

いて文書同意を得て採取した。研究計画は各施設の倫理委員会の承認を得た。

C. 研究結果

*INS*のミスセンス変異5種（ヘテロ接合体）8例、*KCNJ11*の3種ミスセンス変異が同定された。*INS*異常の2例および *KCNJ11*異常（H46R）の1例は生後6か月未満の所謂『新生児糖尿病』の定義に合致していた。*INS*異常の他の6例はこの定義より遅い発症であった。

D. 考察

*INS*異常は従来考えてきたよりも高頻度に存在し、同じ変異でも発症が遅い家族・同胞の存在し、インスリンが枯渇していないと思われる症例もいると考えられる。*INS*異常は優性遺伝し、保因者の子どもの50%はインスリン依存糖尿病が新生児・乳幼児期に発症することの認識がひつようである。

E. 結論

INS 異常は新生児糖尿病の範囲を超えて存在する。従来1型糖尿病と臨床されていた症例、特に type 1b においては、INS 異常を含めた疾患感受性遺伝子の関与の検討が必要である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

本研究は小児期発症1型糖尿病に関する多施設共同研究組織『インスリン治療研究会』における『小児1型糖尿病に関する遺伝素因』プロジェクトの一環として実施した。研究協力者：

解析担当：横田 一郎（香川小児病院臨床研究部・小児ゲノム医療研究室）

プロジェクトリーダー：杉原 茂孝（東京女子医科大学東医療センター小児科）

プロジェクトサブリーダー：緒方 勤（国立成育医療センター研究所）

プロジェクトサブリーダーおよび『インスリン治療研究会』代表世話人：雨宮 伸（埼玉医科大学小児科）

1. 論文発表

1. Levy-Marchal C, Arslanian S, Cutfield W, Sinaiko A, Druet1 C, Marcovecchio ML, Chiarelli F, on behalf of ESPE-LWPES-ISPAD-APPES-APEG-S

LEP-JSPE and the Insulin Resistance in Children Consensus Conference Group (Amemiya S as a delegate of JSPE). Insulin Resistance in Children: Consensus, Perspective and Future Directions. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 95: 5189-5198., 2010

2. Nakamura N, Sasaki N, Kida K, Matsuura N, the Study Group of Health Science Research (Amemiya S as a co-author). Health-related and diabetes-related quality of life in Japanese children and adolescents with type 1 and type2 diabetes. *Pediatr. Int.* 52:224-229, 2010
3. Yagasaki H, Kobayashi K, Saitou T, Nagamine K, Mitsui Y, Mochizuki M, Kobayashi K, Cho H, Ohyama K, Amemiya S, Nakazawa S. Nocturnal blood glucose and IGFBP-1 changes in type 1 diabetes: Differences in the dawn phenomenon between insulin regimens. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 118:195-199, 2010

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

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）

分担研究報告書

単一遺伝子異常による糖尿病発症に関する検討

研究分担者 南條輝志男 那智勝浦町立温泉病院地域医療研究センター 総長

研究要旨： 本研究は、新生児糖尿病を含む単一遺伝子異常により発症する糖尿病の発症原因遺伝子に関して検討を行うことを目的とする。今回、生後 7 ヶ月発症糖尿病患者においてこれまで新生児糖尿病で発症原因遺伝子として報告のある *KCNJ11*、*ABCC8*、*PDX1* および *INS* の遺伝子変異の検索を行った。ATP 感受性 K⁺チャンネル (K_{ATP} チャンネル) の構成タンパクの一つである SUR1 をコードする遺伝子 *ABCC8* に Pro1198Leu 変異を同定した。この変異はこれまでに報告がなく第 8 番目の細胞質内領域に位置する。遺伝子変異による蛋白機能変化に関する解析から、SUR1 Pro1198Leu 変異は本症例における糖尿病発症原因となり得ることが示唆された。

A. 研究目的

糖尿病の病型で大多数をしめる 2 型糖尿病は遺伝因子に過食や運動不足といった環境因子が加わることで発症する多因子疾患である。発症に関与する遺伝因子自体も一つ一つは発症リスクをわずかに増加させるにすぎない変化が複数個組み合わせられている場合がほとんどで、その意味では多遺伝子疾患であるといえる。一方、頻度は多くないものの、単一遺伝子異常に起因する糖尿病が知られており、代表的例として常染色体優性遺伝形式の糖尿病家族歴を有し若年発症（一般に 25 歳以下発症）の maturity-onset diabetes of the young (MODY) などがある。近年、新生

児糖尿病の発症原因として、*KCNJ11*、*ABCC8*、*PDX1*、*INS* を含むいくつかの遺伝子異常が報告された。従来まで、新生児糖尿病の治療は、インスリン療法が必須とされてきたが、原因遺伝子の解明とともに、膵β細胞の ATP 感受性 K⁺チャンネル (K_{ATP} チャンネル) の構成タンパクである Kir6.2 と SUR1 をコードする *KCNJ11* や *ABCC8* 遺伝子の異常が原因である場合、スルホニル尿素 (SU) 薬投与での治療に反応する症例があることが徐々に明らかになってきており、新生児糖尿病を含む単一遺伝子異常に起因する糖尿病発症の原因遺伝子を明らかにすることは治療法選択においても非常に有用であると考えら

れる。今回、生後7か月発症糖尿病患者に関して発症原因遺伝子を検索した。本研究は古田浩人博士（分担研究者）らと共に実施した。

B. 研究方法

症例は、3世代にわたる糖尿病家族歴を有する生後7ヶ月発症の糖尿病患児。末梢血有核細胞から遺伝子を抽出し、PCR-直接シーケンス法で *KCNJ11*、*ABCC8*、*PDX1*、*INS* の各遺伝子に関し遺伝子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研究実施施設における医の倫理委員会規定に則り施行され個人情報保守の厳守を徹底している。

C. 研究結果

これまでに新生児糖尿病の発症原因遺伝子として報告されている遺伝子；*KCNJ11*、*ABCC8*、*PDX1*、*INS* に関して遺伝子変異を検討し、*ABCC8* (*SUR1* 遺伝子) に Pro1198Leu 変異を同定した。この変異はこれまでに報告がなく第8番目の細胞質内領域に位置する。その後の、電気生理学的検討により、同遺伝子変異を有する変異 K_{ATP} チャンネルは ATP に対する感受性が低下しており、本症例における糖尿病発症原因として、同遺伝子変異が関与する可能性が示唆された。

D. 考察

従来、新生児糖尿病の治療は、インスリン療法しか選択枝がなかったが、発症原因遺伝子の解明とともに、一部の症例

では、新たな治療選択枝として経口血糖降下薬 (SU 薬) による治療が可能であることが報告された。遺伝子診断は、治療法の選択においてきわめて有用であり、今後、積極的に活用されるべきと考えられた。

E. 結論

生後7ヶ月発症糖尿病患者において *ABCC8* (*SUR1* 遺伝子) 変異 Pro1198Leu 変異を同定した。機能解析の結果、糖尿病発症原因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. Komori T, Doi A, Furuta H, Wakao H, Nakao N, Nakazato M, Nanjo K, Senba E, Morikawa Y: Regulation of ghrelin signaling by a leptin-induced gene, negative regulatory element-binding protein, in the hypothalamic neurons. *J. Biol. Chem.* 285:37884-37894, 2010

2. Wang Y, Nishi M, Doi A, Shono T, Furukawa Y, Shimada T, Furuta H, Sasaki H, Nanjo K. Ghrelin inhibits insulin secretion through the AMPK-UCP2 pathway in beta cells. *FEBS Lett.* 584:1503-1508, 2010

2. 学会発表

1. Takagi T, Miyawaki M, Nagashima K, Nishi M, Sasaki H, Inagaki N, Yoshikawa N, Nanjo K, Furuta H. A P1198L mutation in *ABCC8* gene decreases ATP sensitivity of the K_{ATP} channel and causes permanent neonatal diabetes. *8th International Diabetes Federation Western Pacific Region Congress.* 2010.10.17-20, Busan, Korea

2. 高木伴幸, 古田浩人, 宮脇正和, 長嶋一昭, 西理宏, 佐々木秀行, 稲垣暢也, 吉川徳茂, 南條輝志男. ABCC8 遺伝子の Pro1198Leu 変異は K_{ATP} チャネルの ATP 感受性を低下させ永続型新生児糖尿病の原因となる. **第 53 回日本糖尿病学会総会**, 2010 年 5 月 27 日、岡山

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

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）

分担研究報告書

単一遺伝子異常による糖尿病発症および遺伝子変異部位に関する検討

研究分担者 古田 浩人 和歌山県立医科大学第一内科学講師

研究要旨： 本研究目的は、主に新生児糖尿病を含む単一遺伝子異常による糖尿病の発症原因遺伝子および遺伝子変異部位を明らかにすることである。今回、生後 7 ヶ月発症糖尿病患者において *KCNJ11*、*ABCC8*、*PDX1* および *INS* の各遺伝子変異を検索した。ATP 感受性 K^+ チャネル (K_{ATP} チャネル) の構成タンパクの一つである SUR1 をコードする遺伝子 *ABCC8* に Pro1198Leu 変異を同定した。この変異はこれまでに報告がなく第 8 番目の細胞質内領域に位置し、COS1 細胞を用いた機能解析では、チャネル発現への影響は見られなかったが ATP に対する感受性は変異群で低下認めた。患者は遺伝子診断後、インスリンからグリベンクラミドへ治療が変更された。SUR1 Pro1198Leu 変異は K_{ATP} チャネルの ATP 感受性を低下させ糖尿病発症原因となり得ることが示唆された。

A. 研究目的

新生児糖尿病は、新生児期から乳児期に発症する糖尿病のうち 1 型糖尿病を除外できる糖尿病の総称で、臨床経過から永続型新生児糖尿病と、糖尿病が一過性で発症後に寛解する一過性新生児糖尿病の 2 群に分類される。これまでの検討から *KCNJ11*、*ABCC8*、*PDX1*、*INS* を含むいくつかの遺伝子が新生児糖尿病の原因遺伝子として報告されている。新生児糖尿病患者の多くは中等度から重度の高血糖を呈し、発症後からすぐにインスリン治療が開始されている場合がほとんどで

あるが、原因遺伝子の解明とともに、膵 β 細胞の ATP 感受性 K^+ チャネル (K_{ATP} チャネル) の構成タンパクである Kir6.2 と SUR1 をコードする *KCNJ11* や *ABCC8* 遺伝子の異常が原因である場合、スルホニル尿素(SU)薬投与での治療に反応することが徐々に明らかになってきている。従って、新生児糖尿病患者の原因遺伝子を明らかにすることは治療法の選択においてもきわめて有用であると考えられる。また、糖尿病発症時期や経過などに関して、同じ遺伝子変異であっても発症時期や経過などに違いが認められるケースも

散見し、新生児糖尿病家系で同一遺伝子変異を持ちながら糖尿病発症が成年発症の症例も存在する。そのため、新生児糖尿病発症は、一般的に生後6か月までとされているが、生後6か月以降の発症であっても同様な遺伝子変異に起因する症例も潜在的には少なからず存在することが想定される。今回、生後7か月発症糖尿病患者に関して発症原因遺伝子を検索した。

B. 研究方法

対象は生後7ヶ月発症の永続型新生児糖尿病患者で、末梢血有核細胞から遺伝子を抽出し、PCR-直接シーケンス法で *KCNJ11*、*ABCC8*、*PDX1*、*INS* の各遺伝子に関し遺伝子変異の有無を検討した。さらに、COS1細胞に *KCNJ11* と正常もしくは変異 *ABCC8* を Lipofectamine2000 を用い導入し、 K_{ATP} チャネル活性をパッチクランプ法にて測定した。

(倫理面への配慮)

本申請研究は、ヘルシンキ宣言および本学医の倫理委員会規定に則り施行され個人情報保守の厳守を徹底している。

C. 研究結果

ABCC8 に Pro1198Leu 変異を同定した。この変異はこれまでに報告がなく第8番目の細胞質内領域に位置し、COS1細胞を用いた機能解析では、チャネル発現への影響は見られなかったが ATP に対する感受性は変異群で低下していた。患者は生後7ヶ月にケトアシドーシスを伴う高血糖で糖尿病を発症し、それ以後インスリンで加療されていたが、グリベンクラミ

ド投与に対する内因性インスリン分泌は比較的保たれており、遺伝子診断後、グリベンクラミドへ治療が変更された。

D. 考察

ABCC8 の変異により K_{ATP} チャネルの ATP 感受性が低下し糖尿病発症を惹起している可能性が示唆された。遺伝子診断は、治療法の選択においてきわめて有用であり、今後、積極的に活用されるべきと考えられた。

E. 結論

生後7ヶ月発症糖尿病患者において *ABCC8* (*SUR1* 遺伝子) 変異 Pro1198Leu 変異を同定し、機能解析の結果、糖尿病発症原因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. Komori T, Doi A, Furuta H, Wakao H, Nakao N, Nakazato M, Nanjo K, Senba E, Morikawa Y: Regulation of ghrelin signaling by a leptin-induced gene, negative regulatory element-binding protein, in the hypothalamic neurons. *J. Biol. Chem.* 285:37884-37894, 2010

2. Wang Y, Nishi M, Doi A, Shono T, Furukawa Y, Shimada T, Furuta H, Sasaki H, Nanjo K: Ghrelin inhibits insulin secretion through the AMPK-UCP2 pathway in beta cells. *FEBS Lett.* 584:1503-1508, 2010

2. 学会発表

1. Takagi T, Miyawaki M, Nagashima K, Nishi M, Sasaki H, Inagaki N, Yoshikawa N, Nanjo K, Furuta H. A P1198L mutation in *ABCC8* gene decreases ATP

sensitivity of the K_{ATP} channel and causes permanent neonatal diabetes. *8th International Diabetes Federation Western Pacific Region Congress*. 2010年10月17-20日, Busan, Korea

2. 高木伴幸, 古田浩人, 宮脇正和, 長嶋一昭, 西理宏, 佐々木秀行, 稲垣暢也, 吉川徳茂, 南條輝志男. ABCC8 遺伝子の Pro1198Leu 変異は K_{ATP} チャネルの ATP 感受性を低下させ永続型新生児糖尿病の原

因となる. *第53回日本糖尿病学会総会*, 2010年5月27日, 岡山

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