

201128057A

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23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 稲垣暢也

平成24(2012)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23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 稲垣 暢也

平成 24 (2012) 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 -----1
遺伝子変異部位による薬効変化に関する検討
稲垣 暢也 京都大学医学研究科糖尿病・栄養内科学 教授

II. 分担研究報告

1. 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 -----7
薬剤反応性変化に関する検討
長嶋 一昭 京都大学医学研究科糖尿病・栄養内科学 講師
2. 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検討-----11
佐々木 真弓 京都大学医学研究科糖尿病・栄養内科学 医員
3. 我が国の新生児・乳児糖尿病の遺伝背景 -----14
依藤 亨 大阪市立総合医療センター小児代謝・内分泌内科 部長
4. 糖尿病家族歴濃厚家系を用いたゲノム解析-----18
小泉 昭夫 京都大学医学研究科環境衛生学 教授
5. 新生児糖尿病の分子遺伝学的原因に関する検討-----22
棚橋 祐典 旭川医科大学小児科学 助教
6. 小児1型糖尿病に関する遺伝素因に関する検討-----26
雨宮 伸 埼玉医科大学小児科 教授
7. 単一遺伝子異常による糖尿病発症に関する検討-----29
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
8. 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-----32
古田 浩人 和歌山県立医科大学第一内科学 講師
9. 劇症1型糖尿病における疾患感受性遺伝子の検討-----35
花房 俊昭 大阪医科大学医学部内科学I 教授

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表	38
Ⅳ. 研究成果の刊行物・別刷	49

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 京都大学医学研究科 糖尿病・栄養内科学教授

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を契機に発見され、生涯インスリン治療が必要とされてきた希な疾患である。発症頻度も詳細不明、診断基準および糖尿病成因分類での位置づけも不明瞭、新生児期での急激な発症、治療法がインスリン療法に限定される本人・家族の多大な負担ゆえ、本疾患の疫学的実態の解明、早期発見のための発症原因解明および新たな治療選択肢の開拓が切望されてきた。

本申請研究では、平成21年度厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）にて行った「新生児糖尿病の疫学的実態把握のための全国調査」を継続し、日本人新生児糖尿病発症頻度の検討を進めるとともに、同疾患で主要な発症原因遺伝子であるKir6.2、SUR1およびインスリン遺伝子変異に関してスクリーニングを行い、その遺伝学的実態の把握を進め、同定された遺伝子変異に関するin vitro機能解析を行った。未だ明確に提示されていない新生児糖尿病診断基準に関して、内科および小児科の糖尿病領域での専門家で構成された本研究班で有機的に協議・検討し、我が国における新生児糖尿病診断基準案を提示する。

分担研究者

長嶋 一昭	京都大学医学研究科	講師	雨宮 伸	埼玉医科大学	教授
佐々木 真弓	京都大学医学研究科	医員	南條 輝志男	那智勝浦町立温泉病院地域医療センター	総長
依藤 亨	大阪市立総合医療センター	部長	古田 浩人	和歌山県立医科大学	講師
小泉 昭夫	京都大学医学研究科	教授	花房 俊昭	大阪医科大学	教授
棚橋 祐典	旭川医科大学	助教	A. 研究目的		

新生児糖尿病は、未だ本邦における発症

頻度も詳細不明であり、診断基準および糖尿病成因分類での位置づけも不明瞭である。新生児期の急激な発症、治療法がインスリン療法に限定される本人・家族の多大な負担ゆえ、本疾患の疫学的実態の解明、早期発見のための発症原因解明および新たな治療選択肢の開拓が切望されてきた。

研究初年度（平成 22 年度）は、「新生児糖尿病の疫学的実態把握のための全国調査」を継続し、日本人新生児糖尿病発症頻度の検討を進めてきた。

本年度（平成 23 年度）は、同定された遺伝子変異に起因する薬効変化等を含めた *in vitro* 機能解析を継続すること、加えて、内科、小児科、糖尿病の 3 領域の有機協力を可能とするために内科糖尿病領域専門家と小児糖尿病領域専門家で編成した本研究班専門科間で協議し、我が国における新生児糖尿病診断基準案を作成することを本年度の目標とする。

B. 研究方法

(1) 日本人新生児糖尿病の発症頻度に関する検討

平成 21 年度採択された厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）による、日本人新生児糖尿病発症頻度の実態把握のためのアンケート調査を継続し調査対象施設を増やしていくとともに、症例経験のある施設にはより詳細な追加アンケートを実施し、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症例間での重複症例を除外することで、症例実数の把握を行う。さらに総務省住民基本台帳統計および厚生労働省人口動態統計等による本邦出生数を用いて、本邦における疾患発症頻度を算出する（長嶋、依藤、稲垣、棚橋、雨宮、古田）。

(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する（依藤、長嶋、佐々木、棚橋、雨宮、古田、小泉）。さらに、他疾患（症候群）を合併し、新生児期に血糖調節異常（主に低血糖症）を認める患者群に関して、Kir6.2、SUR1 およびインスリン遺伝子に関してスクリーニングを行う（長嶋、佐々木、稲垣）。

(3) 各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 SU 薬を含む種々の薬剤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等により直接的に *in vitro* 解析する。

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（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、あわせて蛋白量直接測定等により、発現蛋白総量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（長嶋、佐々木、稲垣）。

b) 各種治療薬の薬効（主作用および副作用）発現の変化に関する検討

各遺伝子変異に起因する治療薬（糖尿病治療薬であり K_{ATP} チャンネルに結合して薬効を発現する SU 薬およびグリニド薬等）薬効変化を検証する。同チャンネルに結合する上記糖尿病治療薬以外の薬剤（抗不整脈薬等）

に関して、各薬剤の副作用発現への変化に関して検討し、各遺伝子変異症例における副作用発現リスク変化の検討を行う（長嶋、佐々木、稲垣）。

(4) 新生児糖尿病診断基準の策定

本研究成果および既報の集積知見を踏まえ、内科糖尿病領域および小児糖尿病領域専門家で編成されている本研究班で討議し、本邦における新生児糖尿病診断基準を策定する（稲垣、雨宮、南條、花房、依藤、長嶋、古田、棚橋、佐々木、小泉）。

（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。また、京都大学医学部附属病院遺伝子診療部におけ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。動物実験に関しては、京都大学動物実験委員会・動物実験指針に則り遂行する。

C. 研究結果

「患者集積および調査」に関しては、最終的に一次アンケートは送付した全国 963 施設中 769 施設から返答あり、2 次・3 次アンケート送付した新生児糖尿病症例経験ありと答えた 43 施設中、40 施設から返答得た。検討期間 3 年間で 37 症例の新生児糖尿病症例を確認。男児 55% (女児 45%)、出生時体重平均 2180g、発達遅滞 40%、てんかん 5%、筋力低下 5%、巨舌 10%、重症例である DEND 症候群（発達遅延、てんかん、新生児糖尿病の合併症例）が 5%に認められ、40%の症例で糖尿病家族歴が認められた。新生児糖尿病の永続型と一過性の比率は、一過性が約 43%であった。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、従来 30~50 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、現時点での計算では約 9 万出生に 1 人程度となり、想定より高頻度であることが示唆された。

新生児糖尿病の発症遺伝子の検討に関して、本研究班での 46 症例の検討中、既報の主な同病発症原因遺伝子である Kir6.2 遺伝子、SUR1 遺伝子およびインスリン遺伝子に関して、Kir6.2 遺伝子変異 (C42R, H46R, R50P, V59M, V64M, W68R, R201H, R201G, R201C, E229K, D323G 等)、SUR1 遺伝子変異 (P45L, R1380C 等)、インスリン遺伝子変異 (G32S 等) を同定した。現時点で遺伝子変異が同定できた 30 症例中、Kir6.2 遺伝子異常 (rare variant のみ) が 15 症例 (50%)、SUR1 遺伝子 2 症例 (6.7%)、インスリン遺伝子 1 症例 (3.3%)、Kir6.2 遺伝子異常が多くを占めることが確認され、海外での報告（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）同様、日本人新生児糖尿病においても遺伝子異常の頻度に関しては Kir6.2 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薬剤反応性変化の検討に関して、上記同様、Kir6.2 および SUR1 遺伝子異常に関して機能解析、薬剤反応性解析を行い、SUR1 遺伝子変異を有する症例で、in vitro での SUR1 遺伝子変異による SU 薬反応性の残存と、異なる SU 薬間での薬効変化の相違が確認され（論文投稿中）、それが実際の患者での薬効程度と相関し、結果として、インスリン療法からの離脱、より効果的な SU 薬の選択に寄与した症例も経験した。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臨床意義深い知見であると考えられる。

本年度（平成 23 年度）、新生児糖尿病診断基準案を作成した。研究代表者稲垣、研究分担者長嶋、佐々木、南條、古田、花房

は内科糖尿病領域の専門科、研究分担者依藤、棚橋、雨宮は小児科糖尿病領域の専門科、研究分担者小泉は遺伝学の専門家であ

る。以下に新生児糖尿病診断基準案を記す(表1)。

(表1)

<p>【臨床診断案】</p> <p>新生児糖尿病の診断は、発症時期、持続的高血糖、新生児(乳児)特有の糖尿病の症状の有無に基づく。</p> <p>(1) 生後6か月未満に発症[*]</p> <p>(ただし、インスリン遺伝子異常の場合は6ヶ月以上の場合もある)</p> <p>(2) 随時血糖値200mg/dl以上の持続を確認^{**}</p> <p>(ただし低体重出生に伴う高血糖および輸液時等の特殊な状態は除く)</p> <p>(3) 新生児(乳児)特有の糖尿病の症状を認める^{***}</p> <p>(1)に加えて(2)又は(3)を確認できれば新生児糖尿病と診断</p> <p>[*] インスリン注射の初日を発症日とする</p> <p>^{**} 日を変えて2回以上の高血糖の確認が原則だが、急速に病状が悪化する(ケトアシドーシス等) ことがあり注意を要する。</p> <p>^{***} 新生児(乳児)特有の糖尿病の症状: 通常の輸液、通常の栄養法で血糖値が高く、臨床的にインスリンを使用しないと哺乳力障害を呈する、脱水を引き起こす、適切な体重増加などが認められない状態</p>
--

D. 考察

我が国における新生児糖尿病の疫学的調査ならびに発症原因遺伝子頻度の解析については今後の調査継続により更なる精度向上が期待できる。今回策定した新生児糖尿病の診断基準に関しては、臨床現場へのフィードバック、実地検証後の臨床現場からの再フィードバックを繰り返し、改訂を重ねることが必須であると考ええる。

E. 結論

全国アンケート調査により、従来30~50万人出生に1人程度と考えられてきた新生児糖尿病発症頻度は、実際は想定以上に高頻度(現時点で約9万人出生に1人程度)

であることが判明した。本邦における新生児糖尿病発症原因遺伝子としては、海外(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。内科および小児科の糖尿病領域専門科により我が国における新生児糖尿病診断基準案を策定した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Flamein F, Riffault L, Muselet-Charlier C, Pernelle J, Feldmann D, Jonald L, Durand-Schneider AM, Coulomb A, Maurice M, Nogee LM, Inagaki N, Amselem S, Dubus JC, Rigourd V, Brémont F, Marguet C, Brouard J, de Blic J, Clement A, Epaud R, Guillot L. Molecular and cellular characteristics of ABCA3 mutation associated with diffuse parenchymal lung diseases in children. *Hum. Mol. Genet.*, in press.

Funakoshi S, Fujimoto S, Hamasaki A, Fujiwara H, Fujita Y, Ikeda K, Takahara S, Seino Y, Inagaki N. Analysis of factors influencing postprandial C peptide levels in Japanese patients with type 2 diabetes: Comparison with C peptide levels after glucagon load. *J. Diabetes Invest.*, in press.

Ikeda K, Fujimoto S, Goto M, Yamada C, Hamasaki A, Shide K, Kawamura T, Inagaki N. Impact of endogenous and exogenous insulin on basal energy expenditure in patients with type 2 diabetes under standard treatment. *Am. J. Clin. Nutr.*, 94: 1513-1518, 2011

Harada N, Hamasaki A, Yamane S, Muraoka A, Joo E, Fujita K, Inagaki N. Plasma GIP and GLP-1 levels are associated with distinct factors after glucose loading in Japanese subjects. *J. Diabetes Invest.* 2: 193-199, 2011.

Yamane S, Hamamoto Y, Harashima S, Harada N, Hamasaki A, Toyoda K, Fujita K, Joo E, Inagaki N. GLP-1 receptor agonist attenuates ER stress-mediated b-cell damage in Akita mice. *J. Diabetes Invest.* 2: 104-110, 2011.

Fujimoto H, Toyoda K, Okitsu T, Liu X, Mukai E, Zhuang X-T, Uemoto S, Mochizuki N,

Inagaki N. Three dimensional ex vivo imaging and analysis of intraportal islet transplants. *Transpl. Int.* 24: 839-844, 2011

Takeda Y, Amano A, Noma A, Nakamura Y, Fujimoto S, Inagaki N. Systems analysis of GLP-1 receptor signaling in pancreatic β -cells. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* 301: C792-803, 2011.

Himeno T, Kamiya H, Naruse K, Harada N, Ozaki N, Seino Y, Shibata T, Kondo M, Kato J, Okawa T, Fukami A, Hamada Y, Inagaki N, Seino Y, Drucker DJ, Oiso Y, Nakamura J. Beneficial effects of exendin-4 on experimental polyneuropathy in diabetic mice. *Diabetes* 60: 2397-2406, 2011.

Cha C-Y, Nakamura Y, Himeno Y, Wang J, Fujimoto S, Inagaki N, Earm YE, Noma A. Ionic mechanisms and Ca^{2+} dynamics underlying the glucose response of pancreatic β -cells: A simulation study. *J. Gen. Physiol.* 138: 21-37, 2011.

Funakoshi S, Fujimoto S, Hamasaki A, Fujiwara H, Fujita Y, Ikeda K, Takahara S, Nagashima K, Hosokawa M, Seino Y, Inagaki N. Utility of indices using C-peptide levels for indication of insulin therapy to achieve good glycemic control in Japanese patients with type 2 diabetes. *J. Diabetes Invest.* 2: 297-303, 2011.

Nishi Y, Fujimoto S, Sasaki M, Mukai E, Sato H, Sato Y, Tahara Y, Nakamura Y, Inagaki N. Role of mitochondrial phosphate carrier in metabolism-secretion coupling in rat insulinoma cell line INS-1. *Biochem. J.* 435: 421-430, 2011.

Tanaka D, Nagashima K, Sasaki M, Yamada C,

Funakoshi S, Akitomo K, Takenaka K, Harada K, Koizumi A, M, Inagaki N. GCKR mutations in Japanese families with clustered type 2 diabetes. *Mol. Genet. Metab.* 102(4):453-460, 2011

Ogawa E, Hosokawa M, Harada N, Yamane S, Hamasaki A, Toyoda K, Fujimoto S, Fujita Y, Fukuda K, Tsukiyama K, Yamada Y, Seino Y, Inagaki N. The effect of gastric inhibitory polypeptide on intestinal glucose absorption and intestinal motility in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 404:115-120, 2011

Mukai E, Fujimoto S, Sato H, Oneyama C, Kominato R, Sato Y, Sasaki M, Nishi Y, Okada M, Inagaki N. Exendin-4 suppresses Src activation and reactive oxygen species production in diabetic GK rat islets in an Epac-dependent manner. *Diabetes* 60:218-226, 2011

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

【政策提言】

平成 22 年～24 年度 厚生労働科学研究費補助金 糖尿病戦略等研究事業「糖尿病診療均てん化のための標準的診療マニュアル作成とその有効性の検証-ガイドラインを実用化するためのシステム・体制整備の視点から」の研究分担者として政策提言に関与している。さらに、糖尿病学会高血圧学会合同委員会の委員として糖尿病患者における高血圧治療のガイドライン作成、日本糖尿病学会の糖尿病診断基準に関する調査検討委員会委員として新しい糖尿病診断基準の策定、ならびに日本糖尿病学会のインクレチン（GLP-1 受容体作動薬と DPP-4 阻害薬）の適正使用に関する委員会委員としてインクレチン関連薬の適正使用に関して提言を行った。

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
に関する検討

研究分担者 長嶋 一昭 京都大学医学研究科糖尿病・栄養内科学講師

研究要旨： 近年、新生児糖尿病患者においてKir6.2、SUR1 およびインスリンの各遺伝子異常が報告されたが、これら遺伝子変異頻度は人種差も示唆されており、本邦における同病発症頻度の実態調査、発症原因解明、病因・病態に即した診断基準および治療指針の策定等が必要である。これらの策定基盤となるデータ集積を目的として、日本人新生児糖尿病発症頻度の実態把握、発症原因遺伝子に関するスクリーニングおよび同定された遺伝子変異による治療薬薬効変化の検討を行うことが本分担研究の目的である。全国アンケート調査により、本邦における新生児糖尿病発症頻度を推定し、同定された遺伝子変異による蛋白機能異常および薬剤反応性に関して *in vitro* で検討を行った。さらに新生児糖尿病の診断基準案の策定のための協議を行った。

A. 研究目的

新生児糖尿病は生後 6 ヶ月までに発症する希な難治性疾患であり、本邦における疫学的実態の詳細は不明である。近年、新生児糖尿病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各遺伝子異常が報告されたが、ゲノム疫学的実態の詳細は不明であり、本邦における疾患発症原因遺伝子要因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。本分担研究は、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新生児糖尿病の発症頻度の実態把握を目的とすること、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、明らかとなった遺伝子変異による薬剤反応性に関して *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) 日本人新生児糖尿病の発症頻度に関する検討

日本人新生児糖尿病発症頻度の実態把握のためのアンケート調査を継続し、症例経験のある施設にはより詳細な追加アンケートを実施し、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症例間での重複症例を除外することで、症例実数の把握を行う。具体的には、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する。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を実施し、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、実数把握を進める。さらに総務省住民基本台帳統計および厚生労働省人口動態統計等による本邦出生数を用いて、本邦における疾患発症頻度を算出

する。

(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する。さらに、他疾患（症候群）を合併し、新生児期に血糖調節異常（主に低血糖症）を認める患者群に関して、Kir6.2、SUR1 およびインスリン遺伝子に関してスクリーニングを行う（長嶋、佐々木、稲垣）。

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

各々の遺伝子変異に起因する SU 薬を含む種々の薬剤の薬効変化に関して、分子生物学的手法、電気生理学的手法等により直接的に in vitro 解析する。

(4) 新生児糖尿病診断基準の策定

本研究研究成果および既報の集積知見を踏まえ、内科糖尿病領域および小児糖尿病領域専門家で編成されている本研究班で討議し、本邦における新生児糖尿病診断基準を策定する。

(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。また、京都大学医学部附属病院遺伝子診療部におけ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。動物実験に関しては、京都大学動物実験委員会・動物実験指針に則り遂行する。

C. 研究結果

「患者集積および調査」に関しては、累計、全国主要病院 963 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し、症例有する施設に 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重複症例を除外し、実数把握に努めた。一次アンケートは全国 963 施設中 769 施設（約 80%）から返答を得、より詳細な 2 次・3 次アンケートは送付 43 施設中 40 施設（93%）から返答得た。検討期間 3 年間で 37 症例の新生児糖尿病症例を確認。男児 55%（女児 45%）、出生時体重平均 2180g、発達遅滞 40%、てんかん 5%、筋力低下 5%、巨舌 10%、重症例である DEND 症候群（発達遅延、てんかん、新生児糖尿病の合併症例）が 5%に認められ、40%の症例で糖尿病家族歴が認められた。新生児糖尿病の永続型と一過性の比率は、一過性が約 43%であったが、今後の経過により一過性の比率が増加する可能性がある。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、従来 30~50 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、現時点での計算では約 9 万出生に 1 人程度となり、想定より高頻度であることが示唆された。

新生児糖尿病の発症遺伝子の検討に関して、本研究班での 46 症例の検討中、既報の主な同病発症原因遺伝子である Kir6.2 遺伝子、SUR1 遺伝子およびインスリン遺伝子に関して、Kir6.2 遺伝子変異（C42R, H46R, R50P, V59M, V64M, W68R, R201H, R201G, R201C, E229K, D323G 等）、SUR1 遺伝子変異（P45L, R1380C 等）、インスリン遺伝子変異（G32S 等）を同定した。現時点で遺伝子変異が同定できた 30 症例中、Kir6.2 遺伝子異常（rare variant のみ）が 15 症例（50%）、SUR1 遺伝子 2 症例（6.7%）、インスリン遺伝子 1 症例（3.3%）、Kir6.2 遺伝子異常が多くを占めることが確認され、海外での報告（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）

同様、日本人新生児糖尿病においても遺伝子異常の頻度に関しては Kir6.2 遺伝子異常の頻度が最も高いことが示唆された。

また常染色体優性遺伝形式が示唆される 3 世代以上にわたる糖尿病患者を有する糖尿病家族歴濃厚家系を用いて MODY 様家系の発症原因遺伝子の同定を試みた。全ゲノム連鎖解析、ハプロタイプ解析により糖尿病発症と関連する候補染色体領域を絞り込み、日本人コホートを用いた検証解析をへて、家族歴濃厚家系における糖尿病発症原因遺伝子として GCKR 遺伝子の可能性を報告した。

遺伝子変異に起因する薬剤反応性変化の検討に関して、上記同様、Kir6.2 および SUR1 遺伝子異常に関して機能解析、薬剤反応性解析を行い、SUR1 遺伝子変異を有する症例で、*in vitro* での SUR1 遺伝子変異による SU 薬反応性の残存と、異なる SU 薬間での薬効変化の相違が確認され（論文投稿中）、それが実際の患者での薬効程度と関連し、結果として、インスリン療法からの離脱、より効果的な SU 薬の選択に寄与した症例も経験した。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臨床上意義深い知見であると考ええる。

さらに、ヘテロな疾患群であると想定されている Beckwith-Wiedemann 症候群症例の中で、新生児期に血糖調節異常を認めた一群（33 症例）に着目して、Kir6.2、SUR1 およびインスリン遺伝子に関して塩基配列決定を行った。33 症例全例において上記 3 種類の遺伝子変異をスクリーニングしたところ、SUR1 遺伝子上に 3 か所の変異が確認され、そのうちの 1 つ SUR1 R275Q 変異がチャンネル機能（血糖調節異常）に関与する変異であった。新生児糖尿病以外の新生児期に血糖調節異常を呈する症例において、新生児糖尿病同様、病態発症原因として

Kir6.2 遺伝子異常が関与する症例が存在し得ることが示唆された。

また、本年度、新生児糖尿病診断基準案策定のための協議を行った。

D. 考察

我が国における新生児糖尿病の疫学的調査ならびに発症原因遺伝子頻度の解析については今後の調査継続により更なる精度向上が期待できる。新生児糖尿病の診断基準に関しては、臨床現場へのフィードバック、実地検証後の臨床現場からの再フィードバックを繰り返し、改訂を重ねることが必須であると考ええる。

E. 結論

全国アンケート調査により、従来 30～50 万人出生に 1 人程度と考えられてきた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（現時点で約 9 万人出生に 1 人程度）であることが判明した。本邦における新生児糖尿病発症原因遺伝子としては、海外での報告同様、 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。新生児糖尿病の発症原因となる K_{ATP} チャンネル遺伝子異常は、新生児糖尿病のみならず他の血糖調節異常を呈する疾患（症候群）・病態に関与し得ることが示唆された。内科および小児科の糖尿病領域専門科により我が国における新生児糖尿病診断基準案を策定した。

F. 健康危険情報 特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Funakoshi S, Fujimoto S, Hamasaki A,

Fujiwara H, Fujita Y, Ikeda K, Takahara S, Nagashima K, Hosokawa M, Seino Y, Inagaki N. Utility of indices using C peptide levels for indication of insulin therapy to achieve good glycemic control in Japanese patients with type 2 diabetes. *J Diabetes Invest.* 2(4):297-303, 2011

Tanaka D, Nagashima K, Sasaki M, Yamada C, Funakoshi S, Akitomo K, Takenaka K, Harada K, Koizumi A, M, Inagaki N. GCKR mutations in Japanese families with clustered type 2 diabetes. *Mol Genet Metab.* 102(4):453-60, 2011

2.学会発表

Nagashima K, Tohru Yorifuji T, Sasaki M, Tanaka D, Inagaki N. Functional analysis of *KCNJ11* mutation in neonatal diabetes. *3th Asian Association for the Study of Diabetes (AASD)*. Oral presentation, 2011.7.22-24, 北京, 中国

Tanaka D, Nagashima K, Sasaki M, Yamada C, Funakoshi S, Akitomo K, Koizumi A, Inagaki N. Pedigree analysis of a highly aggregated Japanese families with diabetes mellitus. *American Diabetes Association, 71st Scientific*

Sessions, Audio Poster Tour, 2011.6.24-28, San Diego, USA

長嶋一昭、依藤 亨、佐々木真弓、田中大祐、船越生吾、菱澤方洋、穂友絹美代、稲垣暢也。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検討。第54回日本糖尿病学会総会，口演，2011.5.19-21，札幌

田中大祐、長嶋一昭、佐々木真弓、山田千積、船越生吾、穂友絹美代、菱澤方洋、小泉昭夫、稲垣暢也。日本人糖尿病多発家系を用いた全ゲノム連鎖解析と疾患感受性遺伝子の同定。第54回日本糖尿病学会総会，口演，2011.5.19-21，札幌

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検討

研究分担者 佐々木 真弓 京都大学医学研究科糖尿病・栄養内科学医員

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。本分担研究では、全国規模でのアンケート調査により本邦における新生児糖尿病発症頻度を検討し、さらには既報の疾患発症原因遺伝子である Kir6.2 遺伝子、SUR1 遺伝子およびインスリン遺伝子に関して変異頻度を検討し、本邦新生児糖尿病における遺伝子変異の実態に関する検証を行った。本邦発症頻度は約 9 万人出生に 1 人程度であり、発症原因遺伝子としては Kir6.2 遺伝子変異が大半を占めていることが示唆された。また、新生児糖尿病診断基準策定に参加した。

A. 研究目的

新生児糖尿病の発症頻度等の実態は不明な点が多い。本邦における同疾患の全国的規模での詳細な検討も少なく実態解明が望まれている。本分担研究は、疫学的に詳細不詳な新生児糖尿病に関して、本邦における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。

全国主要病院に新生児糖尿病担当経験に関する 1 次、2 次、3 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、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) 新生児糖尿病発症遺伝子群の検討

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

一次アンケートは全国 963 施設中 769 施

設(約80%)から返答を得、より詳細な2次・3次アンケートは送付43施設中40施設(93%)から返答得た。検討期間3年間で37症例の新生児糖尿病症例を確認。男児55%(女児45%)、出生時体重平均2180g、発達遅滞40%、てんかん5%、筋力低下5%、巨舌10%、重症例であるDEND症候群(発達遅延、てんかん、新生児糖尿病の合併症例)が5%に認められ、40%の症例で糖尿病家族歴が認められた。新生児糖尿病の永続型と一過性の比率は、一過性が約43%であったが、今後の経過により一過性の比率が増加する可能性がある。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、従来30~50万人出生に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、現時点での計算では約9万出生に1人程度と推定された。

D. 考察

新生児糖尿病症例の中の永続性と一過性の比率等に関しては、経過とともに症状軽快し、当初、永続性と思われていた症例が実は一過性新生児糖尿病であることが判明することも散見するため、新生児糖尿病の実態調査に関しては、今後の調査継続により更なる精度向上が期待できる。新生児糖尿病の診断基準に関しては、臨床現場へのフィードバック、実地検証後の臨床現場からの再フィードバックの検証が今後も必須と考える。

E. 結論

全国アンケート調査結果により、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以上に高頻度(現時点で約9万人出生に1人程度)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。新生児糖尿病診断基準案の策定に参加した。

F. 健康危険情報
特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Nishi Y, Fujimoto S, Sasaki M, Mukai E, Sato H, Sato Y, Tahara Y, Nakamura Y, Inagaki N. Role of mitochondrial phosphate carrier in metabolism-secretion coupling in rat insulinoma cell line INS-1. *Biochem J.* 435(2):421-30, 2011

Tanaka D, Nagashima K, Sasaki M, Yamada C, Funakoshi S, Akitomo K, Takenaka K, Harada K, Koizumi A, Inagaki N. GCKR mutations in Japanese families with clustered type 2 diabetes. *Mol Genet Metab.* 102(4):453-60, 2011

Mukai E, Fujimoto S, Sato H, Oneyama C, Kominato R, Sato Y, Sasaki M, Nishi Y, Okada M, Inagaki N. Exendin-4 suppresses SRC activation and reactive oxygen species production in diabetic Goto-Kakizaki rat islets in an Epac-dependent manner. *Diabetes.* 60(1):218-26, 2011

2. 学会発表

Nagashima K, Tohru Yorifuji T, Sasaki M, Tanaka D, Inagaki N. Functional analysis of *KCNJ11* mutation in neonatal diabetes. *3th Asian Association for the Study of Diabetes (AASD)*. Oral presentation, 2011.7.22-24, 北京, 中国

Tanaka D, Nagashima K, Sasaki M, Yamada C, Funakoshi S, Akitomo K, Koizumi A, Inagaki

N. Pedigree analysis of a highly aggregated Japanese families with diabetes mellitus. *American Diabetes Association, 71st Scientific Sessions*, Audio Poster Tour, 2011.6.24-28, San Diego, USA

長嶋一昭、依藤 亨、佐々木真弓、田中大祐、船越生吾、菱澤方洋、穂友絹美代、稲垣暢也。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検討。第 54 回日本糖尿病学会総会，口演，2011. 5. 19-21，札幌

田中大祐、長嶋一昭、佐々木真弓、山田千

積、船越生吾、穂友絹美代、菱澤方洋、小泉昭夫、稲垣暢也。日本人糖尿病多発家系を用いた全ゲノム連鎖解析と疾患感受性遺伝子の同定。第 54 回日本糖尿病学会総会，口演，2011. 5. 19-21，札幌

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（難治性疾患克服研究事業）
研究分担報告書

我が国の新生児・乳児糖尿病の遺伝背景

研究分担者 依藤 亨 大阪市立総合医療センター小児代謝・内分泌内科部長

研究要旨： 新生児糖尿病発症に関わる遺伝的背景の詳細は未だ十分に明らかとなっていない。本分担研究では、生後 6 か月未満発症の日本人永続性（PNDM）および一過性（TNDM）糖尿病の遺伝背景を検討することを目的とする。36 症例の新生児糖尿病患者末梢血ゲノム DNA により、本症発症原因遺伝子との報告がある SUR1 遺伝子（*ABCC8*）、Kir6.2 遺伝子（*KCNJ11*）およびインスリン遺伝子（*INS*）の全エクソンシーケンスを行い、PNDM においては、従来の報告通り我が国でも *KCNJ11* の変異が最も多いこと、TNDM においては、従来海外では約 70% が 6 番染色体関連であるとされてきたが、今回の結果から *KCNJ11*, *ABCC8* の変異によるものが半数近く存在するとの結果を得た。新生児糖尿病の診療は、早期の遺伝子検索なくして不可能な状態になりつつあり、また、遺伝子変異によってはインスリン療法以外の経口血糖降下薬による治療選択肢が加わることになるため、早急に全国的な検査体制を整える必要があると考えられた。

A. 研究目的

生後 6 か月未満発症の日本人永続性糖尿病（PNDM）および一過性糖尿病（TNDM）の遺伝背景を検討する。

グを行った。

（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。

B. 研究方法

1. 対象

生後 6 か月未満発症の日本人糖尿病 36 症例（PNDM 21 例、TNDM 15 例）。

2. 方法

PNDM 症例については、末梢血ゲノム DNA より、*ABCC8*, *KCNJ11*, *INS* 遺伝子の全エクソンの PCR 増幅—直接シーケンスを行った。臨床症状により、*GCK*, *GATA6*, *RFX6*, *HNF1B*, *FOXP3* 遺伝子も検索した。TNDM 症例については、*PLAGL1*, *HYMA1* 遺伝子を含む新生児一過性糖尿病関連領域の DMR を対象にメチル化特異的 PCR にて検索を行い、異常が認められない症例に対しては PNDM 同様のシーケンシ

C. 研究結果

(1) PNDM

21 例中 12 人に変異を同定した。内訳は（下表）のとおりで、従来の海外の報告と比べて *INS*, *ABCC8* の変異の割合が少なかった。変異が同定できなかった症例のうち、臍形成不全、肝へモクロマトーシスを合併した 1 例に *RFX6* 遺伝子の検索を行ったが変異は認められなかった。また、新生児期より抗 GAD 抗体陽性の 1 例に対して *FOXP3* 遺伝子検索を行ったが、変異は見られなかった。さらに、

それらの症例を含め、KCNJ11, ABCC8, INS に変異が同定できなかった 7 症例に最近隣無形性の原因遺伝子として同定された GATA6 遺伝子の解析を行ったところ、うち 2 例に G15R、1 例に S184N の変異を同定した。G15R は、既知の SNP として報告されているが、in silico の機能解析では、蛋白機能に影響を与える事が予測された。また、S184N は以前ファロー 4 徴症において変異が同定されているが、in silico の機能解析

では benign と予測され、いずれも病原的意義は今後の機能解析を待つ必要があると考えられた。

(2) TNDM

14 例中 12 例で遺伝子異常を同定した。内訳は表のとおりで、染色体 6q24 のメチル化関連の異常が最も多かったが、海外での報告と比べて KCNJ11, ABCC8 の異常が比較的高頻度に認められた。

タイプ	KCNJ11	ABCC8	INS	6q24	HNFB	GOK	GATA6
PNDM	c.175G>A (V59M)						
PNDM							c.43G>C (G15R)
PNDM							
PNDM	c.149G>C (R50P)						
PNDM	c.602G>A (R201H)						
PNDM							
PNDM	c.602G>A (R201H)						
PNDM			c.93G>A (G32S)				
PNDM	c.601C>T (R201C)						
PNDM					c.443C>G (S148W)		
PNDM							
PNDM	c.968A>G (D323G)						
PNDM							c.551G>A (S184N)
PNDM							
PNDM	c.601C>G (R201G)						
PNDM							
PNDM	c.190G>A (V64M)						
PNDM						c.1249C>A (P417T)	
PNDM	c.176T>C (V59A)						
PNDM							c.43G>C (G15R)
PNDM							
TNDM				pat dup			
TNDM				pat dup			
TNDM							
TNDM		c.1819G>A (V607M)					
TNDM							
TNDM				patUPD6			
TNDM							
TNDM	c.680G>A (E227K)						
TNDM		c.646C>T (R216C)					
TNDM							
TNDM					pat dup		
TNDM	c.124T>C (C42R)						
TNDM		c.4138C>T (R1380C)					
TNDM	c.149G>A (R50Q)						
TNDM						pat UPD	
TNDM						pat UPD	

D. 考察

(1) PNDM においては、従来の報告通り我が国でも KCNJ11 の変異が最も多いことが確認された。KCNJ11 遺伝子変異による新生児糖尿病の多くはスルホニル尿素剤に反応することから、なるべく早期に遺伝子診断を行うことの重要性が再認識された。

(2) TNDM においては、従来海外では

約 70% が 6 番染色体関連であるとされてきたが、今回の結果から KCNJ11, ABCC8 の変異によるものが半数近く存在することが明らかになった。KCNJ11, ABCC8 遺伝子変異による一過性糖尿病症例の多くが、年長になって再発することが知られており、その際もスルホニル尿素剤が有効と考えられることから、一過性症例においても遺伝子検査は有用である。ま

た、6q24 関連糖尿病が検出された場合は、治療中であっても近い将来の寛解が予測され、診療計画の策定に有用であると考えられた。

(3) 膝無形成、肝へモクロマトーシスを伴う症例に最近 RFX6 遺伝子変異が同定されたが、本シリーズの 1 症例では臨床的にほぼ同一と考えられたにもかかわらず、同遺伝子の変異が同定されず、本疾患の遺伝的異質性が窺われた。

(4) GATA6 遺伝子異常症は、最近膝無形成性の最も多い原因遺伝子として同定され、さらに無形成症例のみならず様々な先天性糖尿病を来してくると報告されている。我々のシリーズでも 7 例中 3 例に遺伝子変化を同定したが、その病原的意義については今後の検討を待つ必要がある。

E. 結論

新生児糖尿病の診療は、早期の遺伝子検索なくして不可能な状態になりつつあり、早急に全国的な検査体制を整える必要がある。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Yorifuji T, Fujimaru R, Hosokawa Y, Tamagawa N, Shiozaki M, Aizu K, Jinno K, Maruo Y, Nagasaka H, Tajima T, Kobayashi K, Urakami T. Comprehensive molecular analysis of Japanese patients with pediatric-onset MODY-type diabetes mellitus. *Pediatr Diabetes*. 13: 26-32, 2012

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.*, 96:E141-145, 2011

Masue M, Nishibori H, Fukuyama S, Yoshizawa A, Okamoto S, Doi R, Uemoto S, Tokumi T, Kasai T, Yorifuji T. Diagnostic accuracy of [18F]fluoro-L-DOPA PET scan for persistent congenital hyperinsulinism in Japan: The first study on Asians. *Clin Endocrinol.*, 75:342-346, 2011

Yorifuji T, Hosokawa Y, Fujimaru R, Kawakita R, Doi H, Matsumoto T, Nishibori H, Masue M. Lasting 18F-DOPA PET uptake after clinical remission of the focal form of congenital hyperinsulinism. *Horm Res Pediatr.*, 76:286-290, 2011

Nagasaka H, Yorifuji T, Takatani T, Okano Y, Tsukahara H, Yanai H, Hirano KI, Hui SP, Hirayama S, Ito T, Chiba H, Miida T. CD36 deficiency predisposing young children to fasting hypoglycemia. *Metabolism*. 60: 881-887, 2011

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*, 35:393-402, 2011

Nagasaka H, Tsukahara H, Takatani T, Sanayama Y, Takayanagi M, Ohura T, Sakamoto O, Ito T, Wada M, Yoshino M, Ohtake A, Yorifuji T, Hirayama S, Miida T, Fujimoto H, Mochizuki H, Hattori T, Okano Y. Cross-sectional study of bone metabolism with