

# 学位論文の要旨

学位の種類	博 士	氏 名	鈴 木 滋
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p>Molecular Basis of Neonatal Diabetes in Japanese Patients (日本人新生児糖尿病の分子基盤)</p> <p>共著者名 蒔田芳男, 向井徳男, 松尾公美浩, 上田修, 藤枝憲二</p> <p>公表雑誌 The Journal of Clinical Endocrinology &amp; Metabolism 92: 3979-3985, 2007</p> <p>研 究 目 的</p> <p>新生児糖尿病 (Neonatal Diabetes Mellitus, NDM) は, 生後 6 か月までに発症し, インスリン分泌が自然回復する一過性糖尿病 (Transient NDM, TNDM) と生涯にわたりインスリン治療を必要とする永続型糖尿病 (Permanent NDM, PNDM) に分類されてきた. 近年, インプリンティングにより父由来アレルのみが発現する遺伝子領域(6q24 critical region)のコピー数異常, あるいは膵β細胞の機能, 分化に関わる遺伝子変異が同定されており, 白人では, 染色体 6q24 異常および KCNJ11 遺伝子変異が, それぞれ TNDM, PNDM の主たる原因である.</p> <p>KCNJ11 遺伝子は ABCC8 遺伝子とともにインスリン分泌に必須である ATP 感受性カリウムチャネルを構成する遺伝子で, それぞれ Kir6.2, SUR1 をコードする. これらのヘテロ接合性機能活性型変異により NDM が発症する. これらの症例において, インスリンからスルホニルウレア治療へ変更し, 良好な血糖コントロールが得られることが報告されている. 従って, NDM の原因を確定することは, 予後推定や治療の観点から極めて重要である.</p> <p>本研究では, 日本人 NDM において 6q24 異常, KCNJ11 遺伝子および ABCC8 遺伝子変異の寄与する割合を明らかにすること, さらにそれぞれの臨床像を解析することを目的とした.</p> <p>材 料 ・ 方 法</p> <p>【患者】</p> <p>31 例の NDM(TNDM 16 例, PNDM 15 例)を対象とした. 年齢の中央値は 1.9 歳 (0.2~14.6 歳) であり, 糖尿病発症日齢の中央値は 37 (0~115)であった.</p>			

#### 【遺伝学的解析】

患者およびその両親の末梢血より抽出した DNA を用いた。父由来の 6q24 critical region のコピー数異常の検索ために、6 番染色体の paternal uniparental disomy (pUPD(6)), 父由来の 6q24 critical region の重複、および 6q24 critical region のメチル化不全の有無を解析した。pUPD(6)については 27 のマイクロサテライトマーカーを用い、重複に関しては、6q24 critical region(約 461kb)上に新たな 6 つのマイクロサテライトマーカーを作成し、それぞれを PCR で増幅後、ABI 377 sequencer にて電気泳動し、GeneScan で解析した。メチル化の状態に関しては、DNA を bisulfate で処理した後、6q24 critical region 上でインプリントを受ける領域の一つである NV149 を PCR で増幅し、TaqI で消化した。これにより、メチル化されていれば TaqI で消化される配列が新たにできるが、これをポリアクリルアミドゲル電気泳動で判定した。KCNJ11 遺伝子および ABCC8 遺伝子については、それぞれの exon を PCR で増幅後、直接シーケンス法で解析した。さらに、臨床的に Immune dysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-linked (IPEX) syndrome と診断した 1 例については、FOXP3 遺伝子解析を行った。また、新規変異に関しては、正常対照 96 名の当該部位の解析を行った。

#### 【臨床像の解析】

出生歴、糖尿病発症時の症状・検査所見、糖尿病の寛解の有無、神経学的発達異常の有無、随伴症状の有無についての情報を収集し、原因毎の臨床像を比較した。

### 成 績

#### 【遺伝学的解析】

6q24 異常を 11 例、KCNJ11 遺伝子ヘテロ接合性変異を 9 例、ABCC8 遺伝子ヘテロ接合性変異を 2 例、FOXP3 遺伝子ヘミ接合性変異を 1 例に同定した。6q24 異常のうち、7 例は pUPD(6)、4 例は重複であった。KCNJ11 遺伝子変異のうち、2 つは新規変異 (R50G, A174G) であり 4 つは既報変異であった (R50Q; 1 例, C166Y; 1 例, R201H; 4 例, R201C; 1 例)。ABCC8 遺伝子変異はいずれも新規変異であり (A90V, N1122D), FOXP3 遺伝子変異も新規変異であった (F367L)。同定された変異は全て *de novo* であり、また正常対照には変異を認めなかった。

#### 【臨床像の解析】

原因別の TNDM および PNDM の割合：TNDM において 6q24 異常は 69% であり、KCNJ11 遺伝子変異は 13% であった。6q24 異常は全例 TNDM に認められた。PNDM において KCNJ11 遺伝子変異は 47% で、ABCC8 遺伝子変異は 13% であった。KCNJ11 遺伝子変異において、TNDM, PNDM の割合はそれぞれ 22%, 78% であった。

出生時体重：NDM 患者の平均体重 SDS は、-1.5SD と一般集団より低く、原因間での有意差は認めなかった。

糖尿病発症年齢：6q24 異常群の発症時の日齢の中央値は 5 で、KCNJ11 遺伝子変異群の 45 より有意に早かった。ABCC8 遺伝子群、FOXP3 遺伝子および原因不明群の中央値はそれぞれ、45, 8, 16 であった。

発症時の血糖値と糖尿病性ケトアシドーシス(Diabetic Ketoacidosis, DKA): 血糖値の中央値は KCNJ11 遺伝子変異群では 845mg/dl であり, 6q24 異常群の 401mg/dl より有意に高値であった. DKA の割合は KCNJ11 遺伝子変異群で 78% であり, 6q24 異常群は 0% であった. ABCC8 遺伝子変異群と FOXP3 遺伝子変異の血糖値の中央値はそれぞれ 1008mg/day, 1352mg/day で, いずれも DKA で発症した.

臨床経過: 6q24 異常の 1 例を除く全例が, 初期治療としてインスリン治療を受けていた. 6q24 異常群は全例インスリン分泌能が回復し, その日齢の中央値は 53 であった. 1 例は抗糖尿病薬を使用することなく自然寛解した. KCNJ11 遺伝子の R50Q および A174G 変異例はともに日齢 307 に血糖値が正常化した. PNDM 症例はいずれもインスリンで治療されていた.

神経学的発達異常および随伴症状: KCNJ11 遺伝子の R50G 変異および C166Y 変異の 2 例が Developmental delay, Epilepsy and Neonatal Diabetes (DEND) 症候群を呈していた. 原因不明群においても 4 例が精神運動発達遅滞を示し, このうち 2 例はてんかんを伴っていた. 6q24 異常群の 45%, 原因不明群の 25% に糖尿病診断時, 巨舌を認めたが, KCNJ11 遺伝子変異群では認めなかった.

## 考 案

6q24 異常と KCNJ11 遺伝子変異は日本人においても白人と同様に NDM の主要な原因であることを示した. 6q24 異常は TNDM のみを呈し, KCNJ11 遺伝子変異は主として PNDM を呈し, その 50% を占めた. 5 つの新規変異を同定したが, これらは, いずれも *de novo* で, 種を超えて保存されているアミノ酸部位であり, 正常対照には認められなかったことから糖尿病発症に寄与しているものと考えられた.

KCNJ11 遺伝子あるいは ABCC8 遺伝子変異は, 日本人 PNDM の 60% と高率に認められた. これらの症例ではスルホニルウレア治療で良好な血糖コントロールが得られることから, 遺伝子解析を積極的に行うことが有用と考えられた.

今回同定した変異のうち, 興味深いものとして KCNJ11 遺伝子の R50Q および R50G が挙げられる. KCNJ11 遺伝子変異の臨床的重症度は *in vitro* でのチャネル機能の活性化の程度に相関することが報告されている. つまり TNDM, PNDM, DEND 症候群の順にチャネルが活性化されおり, DEND 症候群は Kir6.2 が脳, 骨格筋にも発現しているために発症すると考えられている. 以前, R50Q は PNDM を呈すると報告されたが, 我々の症例は TNDM を呈した. 同様に, PNDM を来す common な変異である R201H を有する患者が, TNDM を呈したことが報告されており, 同一の変異が必ずしも同じ臨床像をとるわけではないことが示唆された. また, これまで DEND 症候群は, チャネルの内因性 gating 機能の活性化を来す変異により引き起こされることが報告されていた. ところが, R50 は ATP 結合部位として知られた部位で, R50G は open probability に影響を与えずに, ATP 感受性を著しく減少させることが報告されており, ATP 結合親和性の低下自体でも DEND 症候群を来したしうことを示唆した.

臨床像の解析により, 発症時期や発症時の検査所見や随伴症状に 6q24 異常群と KCNJ11 遺伝子変異群に有意な違いが見いだされたが, これは, 原因遺伝子毎の疾患概念として分類し, どの遺伝子から解析するか

を決定する一助となると思われる。

## 結 論

日本人 NDM の原因として、染色体 6q24 異常 35%, KCNJ11 遺伝子変異は 29%, ABCC8 遺伝子変異は 6%, FOXP3 遺伝子変異は 3%であった。6q24 異常群は糖尿病発症時期が他の原因と比較し有意に早く、発症時の糖尿病の重症度は軽度であり、発症時巨舌を有する割合が高いことが分かった。一方、神経発達異常は KCNJ11 遺伝子変異と原因不明による NDM に特徴的であった。

## 引 用 文 献

1. Temple IK, Gardner RJ, Mackay DJ, Barber JC, Robinson DO, Shield JP 2000 Transient neonatal diabetes: widening the understanding of the etiopathogenesis of diabetes. *Diabetes* 49:1359-66
2. Gloyn AL, Pearson ER, Antcliff JF, Proks P, Bruining GJ, Slingerland AS, Howard N, Srinivasan S, Silva JM, Molnes J, Edghill EL, Frayling TM, Temple IK, Mackay D, Shield JP, Sumnik Z, van Rhijn A, Wales JK, Clark P, Gorman S, Aisenberg J, Ellard S, Njolstad PR, Ashcroft FM, Hattersley AT 2004 Activating mutations in the gene encoding the ATP-sensitive potassium-channel subunit Kir6.2 and permanent neonatal diabetes. *N Engl J Med* 350:1838-49
3. Babenko AP, Polak M, Cave H, Busiah K, Czernichow P, Scharfmann R, Bryan J, Aguilar-Bryan L, Vaxillaire M, Froguel P 2006 Activating mutations in the ABCC8 gene in neonatal diabetes mellitus. *N Engl J Med* 355:456-66

## 参 考 文 献

1. Shigeru Suzuki, Tokuo Mukai, Kimiaki Uetake, Syun-ihci Sageshima, Kumihiro Matsuo, Osamu Ueda, Yoshiya Ito, Kenji Fujieda 2005 Permanent Neonatal Diabetes Mellitus with Growth Disturbance, Developmental Delay, Epilepsy and Dysmorphic Features. *Clin Pediatr Endocrinol* 14(Suppl 24):81-84
2. 鈴木滋, 蒔田芳男, 藤枝憲二 2005 新生児一過性糖尿病. *周産期医学* 35:1641-44
3. 蒔田芳男, 鈴木滋, 藤枝憲二 2006 新生児糖尿病. *Diabetes Frontier* 17:629-633
4. 鈴木滋, 蒔田芳男, 藤枝憲二 2007 新生児糖尿病. カラー版 糖尿病学 基礎と臨床 (門脇孝ら編) 西村書店: 399-401

## 学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第                      号		
学位の種類	博士 (医学)	氏    名	鈴木   滋
審査委員長      羽   田   勝   計   ㊞  審査委員          高   後      裕      ㊞  審査委員          藤   枝   憲   二   ㊞			
学   位   論   文   題   目  Molecular Basis of Neonatal Diabetes in Japanese Patients (日本人新生児糖尿病の分子基盤)			
<p>             新生児糖尿病は臨床的に一過性糖尿病と永続型糖尿病に大別されており、近年種々の原因遺伝子が同定されてきたが、全て欧米白人での検索に留まっていた。論文申請者である鈴木氏らは、日本人新生児糖尿病症例 31 例の遺伝子解析を行い、インプリンティングにより父由来アレルのみが発現する領域である染色体 6q24 のコピー数異常を 11 例、<i>KCNJ11</i> 変異を 9 例、<i>ABCC8</i> 変異を 2 例、<i>FOXP3</i> 変異を 1 例同定した。これらはいずれも <i>de novo</i> 変異であり、かつ、新規変異として、2 つの <i>KCNJ11</i> 変異、2 つの <i>ABCC8</i> 変異、および <i>FOXP3</i> 変異を同定した。臨床像の解析から、6q24 異常全例が一過性糖尿病であり、糖尿病発症時期は早く、発症時血糖値は低く、ケトアシドーシスの頻度は有意に少ないこと、<i>KCNJ11</i> 変異例は 2 例が一過性糖尿病、7 例が永続型糖尿病であり、22% が中枢神経症状を合併していたこと、<i>ABCC8</i> 変異の 2 例は永続型糖尿病であることを見出した。すなわち、鈴木氏らは日本人新生児糖尿病の 74% に原因遺伝子を同定し、6q24 異常が一過性糖尿病の、<i>KCNJ11</i> 変異が永続性糖尿病の主たる原因であることを示した。           </p> <p>             本研究により、日本人新生児糖尿病の主たる原因遺伝子が同定され、かつ今後の本疾患に対する遺伝子解析の有用性を示した点で、極めて重要な研究であると考えられる。           </p> <p>             尚、諸問審査においても、本論文とその関連領域に関して十分な知識を有することが確認できた。よって、本論文を、医学博士の学位論文に値するものと判断した。           </p>			