

Syndrome X (耐糖能異常、高血圧、高脂血症)
の成因と予後に関するコホート研究

(課題番号: H10-長寿-115)

平成10年度厚生科学研究費補助金(長寿科学総合研究事業) 総括研究報告書

平成11年 3月

主任研究者 小泉 昭夫

(秋田大学医学部衛生学教授)

Syndrome X (耐糖能異常、高血圧、高脂血症)

の成因と予後に関するコホート研究

主任研究者 小泉 昭夫 秋田大学医学部衛生学

研究要旨：平成 10 年度は、以下の研究項目で以下の成果を得た。

- 1) 動物モデルを用いた糖尿病の新たなメカニズムの発見：我々が開発した Akita mouse を用いその遺伝的機構を解明した。そのメカニズムは、insulin の構造異常を契機とし insulin の post translational な障害のため、Endoplasmic reticulum の機能異常を来すものであった。その結果、多くの post translational modification を受ける蛋白群のプロセッシングがうまく行かなくなるため、β細胞の機能低下をおこすものであった。このメカニズムは、蛋白の Folding 異常による疾病の発生という新しいメカニズムを証明したものであり、加齢による糖尿病の増加を一部説明しうる可能性を持っている。
- 2) 全身性カルニチン欠乏症の責任遺伝子 OCTN2 の発見とヘテロキャリアの遺伝疫学及びキャリアの健康リスク：中枢神経系や筋肉における Mitochondria における β-酸化の低下が、加齢によるこれら神経運動系の機能低下をもたらすと現在想定されている。我々は、この β-酸化に深く関わるカルニチンの異常について検討してきた。本物質は、脂肪酸の担体であり、加齢により mitochondria 内部への脂肪酸輸送が低下するが、カルニチンの投与で改善できるとの報告がある。我々は、カルニチンの輸送担体が血中および標的臓器内部の濃度を決定しており、その遺伝子異常がホモ状態で全身性カルニチン欠乏症をおこす事を見出した。さらにヘテロ保因者の疫学調査を A 市、N 市で行った。
- 3) Lysinuric protein intolerance (LPI) のヘテロキャリアについての遺伝疫学：LPI は 2 塩基アミノ酸輸送の異常であり、劣性遺伝形式をとり発症する。ヘテロ個体においても加齢と相乗的に健康リスクを増加する可能性が考えられる。我々は、本疾患多発地域内のヘテロ個体の存在頻度を決定することが出来、今後の健康リスク評価への足掛りを築くことが出来た。
- 4) Wolfram Syndrome ヘテロ保因者の健康リスク：Wolfram Syndrome は、常染色体劣性遺伝疾患であり、ホモ個体では、糖尿病、難聴、尿崩症、視神経萎縮を若年から発症する。N 市における大家系の疫学調査を行い、ヘテロ保因者では加齢により糖尿病、難聴を発生するリスクが高くなることを見出した。
- 5) 障害高齢者の膝関節屈曲拘縮予防のための自己ストレッチング法の効果の検証：2 種類の自己ストレッチング法の効果を検討した結果、ハムストリングストレッチングに比して膝関節伸展ストレッチングの方がより優れていることが明らかとなった。

A. 動物モデルを用いた糖尿病の 新たなメカニズムの発見

1. はじめに

今日わが国の糖尿病が強く疑われる人推計は 690 万人であり、可能性のある 680 万人とあわせると実に人口の 10% を超える 1370 万人が糖尿病人口と言える。糖尿病の発症には遺伝的素因が大きく関与し、その解明が重要な課題である。

動物モデルは遺伝素因の解明には有効な手段となる。特に、遺伝的背景の濃厚な糖尿病である MODY や、多因子遺伝であると考えられる多くの NIDDM については有用である。本レビューでは、我々が開発した Mody 遺伝子座 (Mody4 からヒトとの混乱を避けるために Mody に改変した。http://mgd.niaj.affrc.go.jp 参照) の異常

による糖尿病モデルマウスについて紹介するとともに、近年泉等によって明らかにされた遺伝子レベルでの異常についても言及する。

2. Mody mutant mouse (Akita mouse : C57Bl/6 Mody) の臨床的特徴^{1) 2) 3)}

a. 糖尿病の臨床的特徴

ヘテロ接合体 (Mody+/-) は 10 週齢までに糖尿病を発症する。症状として高血糖の他に多飲、多尿を呈する。糖尿病の症度およびその後の進展には性差があり、雄は週齢とともに進行性に悪化するが、雌の症状は軽度で緩やかである。雄は 18 週齢より、雌は 30 週より体重の減少が見られる。50% 生存率は 305 日で、雌の 50% 生存率の 690 日と比べると非常に悪い。雄雌ともに正常群と変わらず肥満は見られない。また、インスリン感受性は非常によくインスリン抵抗性は存在しない。

一方、ホモ接合体(Mody+/+)は他の2群に比べて生後直後より血糖は高めで2週齢で著明な高血糖を示す。ヘテロ接合体で見られた血糖値の性差は見られない。高血糖のために雄雌ともに4~5週齢で顕著な発育不全を呈し、体重の増加は見られない。またホモ接合体は短命で、生後より2週齢までに約12%、2~8週齢までに約10%、12週齢までにほぼ全部が死亡する。

b. 膵のインスリン含有量および分泌能

生後直後のヘテロ接合体の膵インスリン含有量は、正常個体(Mody-/-)の1/3倍、ホモ接合体では1/7倍となり明らかに減少している。それに対してグルカゴン含有量はこれら3群ともに差は見られない(表1)。2週齢のヘテロ個体では膵インスリン含有量が生後直後と同様に正常個体の1/2倍と軽度に減少しているが、ホモ個体では1/100倍と著明な減少が見られた(表1)。2週齢の膵のインスリン/グルカゴン含有量の比は、生後直後に比べて正常個体とヘテロ個体においては変化なかったが、ホモ個体では95%の著明な減少が見られた。また、生後直後と同様にグルカゴン含有量はこれら3群ともに差は見られない(表1)。

	ホモ	ヘテロ	正常
生後1日			
マウス数	10	12	10
血糖値(mM)	4.3±2.1 ^a	5.3±1.6 ^a	4.1±2.5 ^a
体重(g)	1.2±0.2 ^a	1.3±0.2 ^a	1.5±0.3 ^a
膵重量(mg)	6.6±2.5 ^a	10.1±1.8 ^b	9.3±2.2 ^b
インスリン含有量(pmol/pancreas)	15.6±2.6 ^a	32.4±2.0 ^b	114.6±1.6 ^c
グルカゴン含有量(pmol/pancreas)	72.4±1.9 ^a	77.4±1.5 ^a	97.7±1.5 ^a
インスリン/グルカゴン比	0.21 ^a	0.42 ^b	1.17 ^c
2週齢			
マウス数	14	20	9
血糖値(mM)	26.5±5.4 ^a	8.9±4.1 ^b	6.9±1.2 ^b
体重(g)	7.9±1.8 ^a	8.6±1.9 ^a	9.3±2.5 ^a
膵重量(mg)	40.0±12.5 ^a	35.4±8.42 ^a	39.0±13.0 ^a
インスリン含有量(pmol/pancreas)	3.9±2.7 ^a	117.8±1.9 ^b	361.4±1.6 ^c
グルカゴン含有量(pmol/pancreas)	380.2±1.5 ^a	329.6±1.6 ^a	324.3±1.3 ^a
インスリン/グルカゴン比	0.01 ^a	0.54 ^b	1.11 ^c

Mean±SD の比較は一元配置分散分析法を用い、有意差のある平均値(p<0.05)にはScheffe's testを用いた。

インスリンおよびプロインスリンの膵における含有量は両者ともその絶対値は減少しているが、インスリン/プロインスリン比は0.02~0.03で違いはみられなかった。分離した膵ラ氏島細胞から分泌されるインスリン、プロインスリンも減少しており、プロインスリンの割合に変化は見られない。

次に、膵ラ氏島細胞を用いて高グルコースに対するインスリン分泌能を検討した。その結果、ヘテロ個体のインスリンの分泌能は著しく低下していた。ホモ個体の膵ラ氏島細胞は分離できる大きさではないので、検討できなかった。これにより膵β細胞のインスリン分泌能不全が認められた。これらの結果より膵β細胞のインスリン分泌不全が糖尿病の成因に関わっていると考えられる。

c. 膵ラ氏島細胞の病理学的所見²⁾

生後直後および4~6週齢の膵ラ氏島細胞はヘテロ接合体でもβ細胞の密度の低下が見られる。膵β細胞は減少しており、β細胞間のインスリン含量はお互いに不均一である。膵β細胞の密度には雌雄差が見られる。雌は正常群に比べて低下しているが雄では雌より顕著に低下している。また、経時的観察で雌はインスリン含量に変化は見られないが、雄では週齢を経るにつれてβ細胞の減少が見られる。一方、膵α細胞に病理的变化は認められない。病理所見では、NODマウスの膵β細胞に見られるリンパ球浸潤などの自己免疫反応像は、糖尿病発症以前、およびそれ以降の全経過を通じて見られない。

この一方、ホモ接合体では、膵ラ氏島細胞は、正常群やヘテロ群に比べて極めて小さく、β細胞の減少とα細胞の相対的増加が生後直後から見られる。また、性差はみられない。

電子顕微鏡による微細構造の観察では、ヘテロ、ホモ接合体の膵β細胞はともに特異的な変性像が見られる。ヘテロ接合体では、変性像は、糖尿病の進展した30週齢で細胞質の狭小化および核の濃染が認められ、核膜の膨化による間隙が認められる。また、粗面小胞体の増加および拡張が見られ、細胞質の空洞化が目立っている。ミトコンドリアは糖尿病の発症時より膨化し、週齢とともに変性や破裂像が見られる。また、細胞あたりのインスリン分泌顆粒数は減少しており、週齢とともに減少が著しい。これらの変化に対してα細胞の微細構造に変化は見られない。この一方、ホモ接合体では生直後から、分泌顆粒数の著しい減少や粗面小胞体の増加が見られ、2週齢で既に、ミトコンドリアの膨化が目立っている。

以上の如く、膵β細胞に特異的な変性像が糖尿病個体に認められ、ModyのDosage effectにより、より早期に微細構造の変化が生じるものと考えられる。

d. 合併症

糖尿病性腎症は、糖尿病患者の予後を左右する重篤な合併症の一つである。これに対して、現在までアロキサン⁴⁾やストレプトゾトシン⁵⁾など、膵のβ細胞を特異的に傷害する方法での検討がなされてきた。しかし、この方法では、薬剤自体が直接生体に及ぼす影響を完全に否定できないことから、近年NSYマウス⁶⁾、KKマウス⁷⁾、GKラット⁸⁾、OLETF⁹⁾等の糖尿病自然発症動物モデルでの研究がさかんに行われている。

Akita mouse 雄群 [以下ヘテロ接合体 (Mody+/-) についてのみ言及する] では、20週例から約半数にはメサンギウム領域の増殖、基底膜の肥厚と糸球体毛細血管の著明な拡張とを主体とし、ヒトのびまん性糸球体硬化症に一致した病変が出現する。この変化は、30週齢では、ほぼ全例に認められる。また、40週以降の長期生存例に関しては、結節性病変に類似した小結節が出現した。電顕的観察を行った例では基底膜の肥厚と不整化が認められた。これらの変化は、雌群では極めて軽度だった。雄群で血清及び尿について、生化学的検討を行った結果、糖尿病群では、加齢とともに低蛋白・低アルブミン血症が認められたが、クレアチニンに有意差は認められず、尿蛋白の増加も証明されなかった。

Akita mouse 雄群では、糖尿病発症時期である10週齢前後から、尿崩症に類似した多飲多尿が出現する。組織学的には、同時期より尿細管上皮の糖原性変化が生じ、20週程で尿管の拡張、膀胱の腫大を呈し、加齢により腎乳頭の萎縮と皮質の菲薄化等を生じ、30週齢でほぼ全例がいわゆる水腎症の像を呈する。本mouseにおいては、糖尿病の発症に肥満や薬物投与が関与せずに糖尿病を発症し、糸球体病変に関して、加齢に伴い組織学的にヒト類似の病変が認められる事から、本糖尿病性腎症の糸球体病変の発症機序、治療の研究について有力な手段となることが期待される。

3. 責任遺伝子座の検索^{1) 2)}

a. 連鎖解析による責任遺伝子座の発見

我々は、C57BL/6Nを遺伝的背景に持つ本マウスの雄と遺伝的に異なるC3H/Heマウスの雌を用いて交配させF1世代を作成した。そのF1世代の雄および雌にC57BL/6NおよびC3H/Heマウスを戻し交配させてN2世代を作成した。糖尿病の判定は8~10週齢の早朝の随時血糖および経腹腔内ブドウ糖負荷試験によって決定した。そのN2世代178匹を用いて、マウス全ゲノム19染色体を81個のマイクロサテライトマーカーでタイピングを行った。連鎖解析の結果、責任遺伝子座は7番染色体テロメア側に存在することが判明した (Mody)。

b. QTL連鎖解析による責任遺伝子座の検索

我々はさらに詳細な連鎖地図を作成することおよび責任遺伝子座の生物学的効果(Dosage effect)を検討することにした。そのためには、本マウス (C57BL/6, *Mus musculus domesticus*) と遺伝的異質性の大きい M. Castaneus (*Mus musculus castaneus*) を交配に用いF1世代を作成した。その8~10週齢のF1世代より明確な糖尿病の雄および雌を選択し、交配させてF2世代を作成した。F1およびF2世代の糖尿病の判定はC3H/Heマウスでの解析と同様に早朝の随時血糖および経腹腔内ブドウ糖負荷試験によって判別した。

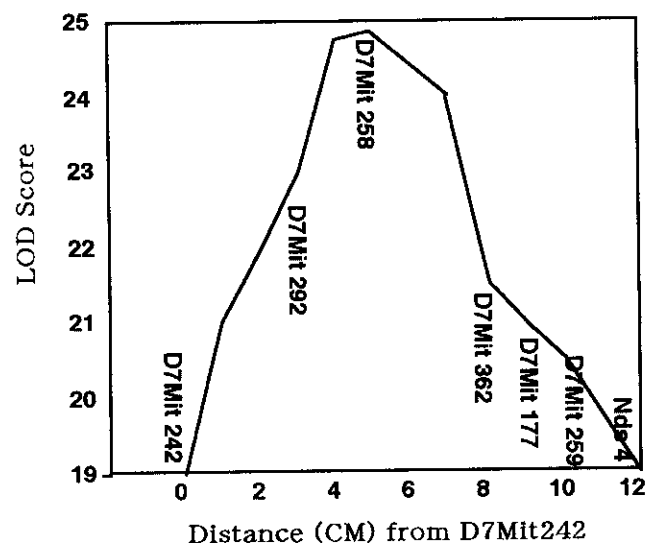


図6 QTL analysis in F2 (C57BL/6 x Castaneus) マウス7番染色体72.4cMに存在する7つのマイクロサテライトマーカーを用いたQTL解析を行った。

F2 世代の表現型は予想通り 3 つの表現型に分けることができた。すなわち正常なものと、10 週までに糖尿病を発症するものと生後直後から高血糖をしめす群に分けることができた。これらを我々は、既に述べたように、正常 (Mody^{-/-})、ヘテロ接合体 (Mody^{+/-}) およびホモ接合体 (Mody^{+/+}) の 3 群と考えた。これら 3 群のマウスを含む 5 週齢から 8 週齢の F2 世代 135 匹を用いて、7 番染色体の 72.4cM に存在する 7 つのマイクロサテライトマーカーを用い、早朝空腹時血糖値を定量的形質として、QTL 解を行った。その結果、責任遺伝子座 Mody は 7 番染色体 72±2cM に存在しており D7Mit258 に強く連鎖していることがわかった。

4. 分子レベルでの異常

Mody 遺伝子の Positional Cloning を目指して、遺伝子座の近傍にある候補遺伝子群について精力的な検索がまず行われた。その結果、共同研究者である泉等によって重要な発見がなされた⁹⁾。即ち、insulin 遺伝子 (Ins2) の Exon III の A 鎖 6 番目の cys をコードするコドンに TGC (Cys) から TAC (Tyr)へ変る変異が見い出された。この A 鎖の 6 番目の Cys は、B 鎖の 6 番目の Cys と disulfide bond で結ばれており、endoplasmic reticulum での Folding に重要な役割を担っていると考えられる。

従来の知見では、インスリンの突然変異は insulinopathy として知られているが、臨床的特徴は、軽度の NIDDM であり、通常は Hyperproinsulinemia をともなう。しかし今回 Mody 突然変異で明らかにされた insulinopathy では、hypoproinsulinemia および hypoinsulinemia であるだけでなく、β-細胞の増殖分化など広範囲に影響が及んでいる。さらに、この変異は、単に Ins2 でコードされる insulin 分子のみにとどまるものとは考えられない。マウスなどげっ歯類では合計で 4 つの insulin 遺伝子が存在する。Mody^{+/+}においても Ins1 の 2 つの遺伝子は正常であり、理論的には 50% のインスリン量は賄えるはずであり、著しいインスリン含量の減少が説明できない。

通常の Insulinopathy では見られない大きな生理的影響を与えた理由として以下の可能性が考えられる。Mody の突然変異は、3 つある分子内架橋部位のうち一つが消失するものである。その結果、1 つの Cys の SH 基が disulfide bond を形成せず遊離状態で存在することになる。おそらく、Mody 変異による Cys の遊離 SH 基が ER 内部で正常な proinsulin と disulfide bond を形成し、insulin を蛋白レベルでキレートするものと想像している。さらに、ホモ接合体では β-細胞の増殖抑制があったことから、mutant proinsulin が多くの重要な蛋白と disulfide bond を形成することを通じて機能的障害を与えている可能性が考えられる。これらについては今後の解明が現在進行中である。

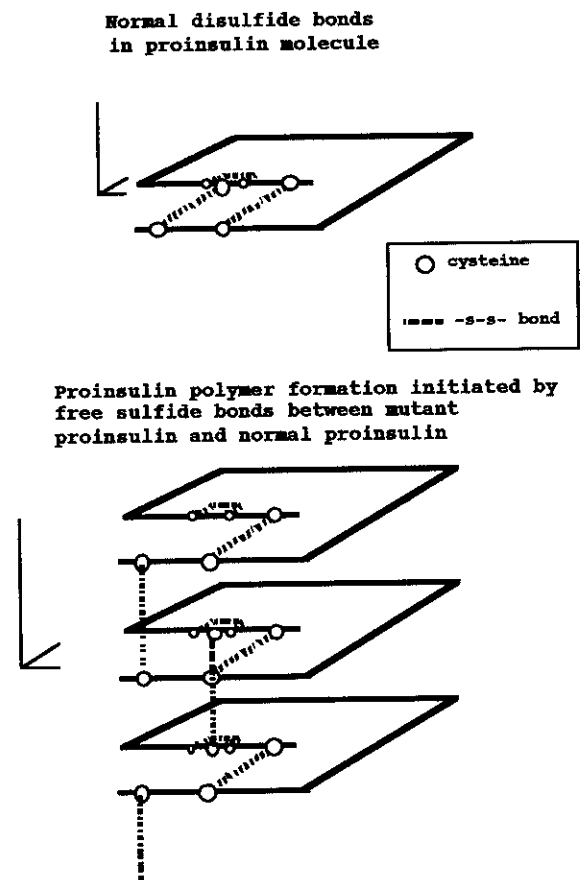


図 7 A hypothetical mechanism of protein polymer formations by free disulfide bonds of Mody insulin mutant

5. おわりに

我々の開発した Akita mouse (C57BL/6 Mody) は、当初糖尿病の臨床像の類似性から、ヒトにおける MODY 同様に、何らかの転写因子が関与するものと考えられた。しかし、その後の研究では、思わぬことに inslin 分子の

異常であることが明らかにされた。この泉らによってなされた発見は意外であり、思わぬ可能性を示唆するものである。即ち、Insulin分子内のCysの1つの消失は、単に突然変異したinsulin分子のprocessing過程を障害するのみならず、他の正常なinsulin分子や、 β -cells内部の重要な生理機能をもった蛋白をも巻添えにしている可能性が高い。このような糖尿病のメカニズムは現在まで知られておらず新しいパラダイムの存在を示唆している。さらにこのような病理過程は、myotrophic lateral sclerosisにおけるSODの役割に似ている¹⁰⁾。即ち、本来の生理機能を失う代わりに、蛋白キレータとでもいうべき機能獲得をすることになった (gain of function)。今後新しい糖尿病のメカニズムについて、さらにprotein foldingとその後の修飾の異常や protein aggregate の存在が検討され新たな展開が期待される。

謝辞：本研究に重要な役割を果たした、吉岡政人先生（秋田大学医学部第一外科）および共同研究者である泉哲郎先生（群馬大学生体調節研究所）に感謝します。

引用文献

- 1) Yoshioka M. et al : A Novel locus, Mody4, Distal to D7Mit189 on chromosome 7 determines early-onset NIDDM in nonobese C57BL/6 (Akita) mutant mice. Diabetes 46:887-894.1997
- 2) Kayo T. et al : Mapping of murine diabetogenic gene Mody on chromosome 7 at D7Mit258 and β -cell development during the prenatal period. J.Clin.Invest 101:2112-2118.1998
- 3) Koizumi A. et al : A new mouse model for diabetes: a defect in the Mody locus in C57BL/6 mice inhibits both insulin production and β -cell proliferation. Submitted
- 4) 小倉陽介：糖尿病作成モデル アロキサソ. 腎と透析臨時増刊 363-366
- 5) Rakieten, N., et al: Studies on the diabetogenic action of streptozotocin. Cancer Chemother. Rep, 29:91, 1963
- 6) Sibata, M., et al: New experimental congenital diabetic mice (NSY mice). Tohoku J. Exp. Med, 130; 139, 1980
- 7) 柴田昌弘ら：糖尿病性血管障害の成因に関する研究（第一

報）, KKマウスの腎病変について, 糖尿病, 16: 412, 1973

- 8) Goto, Y., et al: Production of spontaneous diabetic rats by repetition of selective breeding. Tohoku J. exp. med, 119; 85, 1976
- 9) Kawano K., et al: Spontaneous long-term hyperglycemic rat with diabetic complications. Diabetes, 41:1422-1428, 1992
- 10) Wang J. et al: A mutation of the insulin 2 at a cysteine residue, which forms an intramolecular disulfide bond, induces diabetes with severe pancreatic β -cell dysfunction in the Mody mouse. J. Clin Invest, 103, 27-37, 1999
- 11) Bruijin LI. et al. Aggregation and motor neuron toxicity of an ALS-linked SOD1 mutant independent from wild-type SOD1. Science 281, 1851-1853, 1998

B. 全身性カルニチン欠乏症の責任遺伝子 OCTN2 の発見とヘテロキャリアの遺伝疫学、及びキャリアーの健康リスク

野崎潤一、嘉陽毅、和田安彦、小泉昭夫

1. 【目的】カルニチンは脂肪酸の β 酸化に必須である。また Primary systemic carnitine deficiency は、このカルニチン輸送担体 (Fig.1)の異常によりカルニチンの腸管からの吸収と腎からの再吸収を低下させ体内のカルニチンを減少させる。そのため β 酸化不全となり心、肝、神経障害、Reye's syndrome を引き起こす。

本疾患は、劣性遺伝形式で発現する遺伝子疾患である。我々はその責任遺伝子座 *CDSP* を明らかにするとともに⁽¹⁾責任遺伝子 OCTN2 の Mutation であることを証明した⁽²⁾。今回、1家系において興味ある OCTN2 の変異を確認したので、その予防医学的有用性を報告する。

2. 【方法】我々は福島県において Primary systemic carnitine deficiency 患者とその家族を見いだした (Family TH)。そして最近クローニングされた OCTN2

の DNA sequence を用い、この家系の DNA sequence を決定した。また、マイクロサテライトマーカーを用いて Haplotype を決定しその同祖性を検討した。

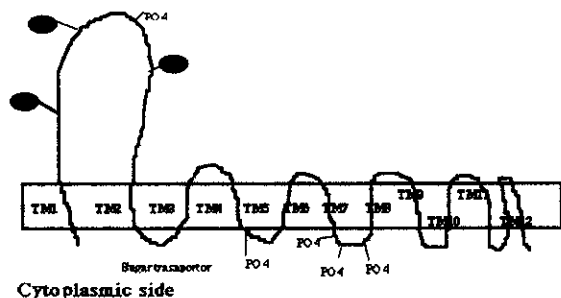


Fig. 1 Putative Structure of OCTN2

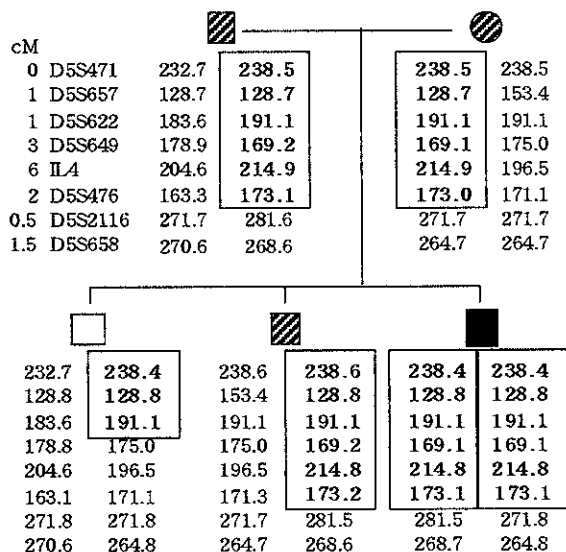


Fig. 2 Haplotypes and recombinations in the Family TH.

3. 【結果】 マイクロサテライトマーカーを用い Haplotype を決定した。患者は D5S471 から D5S476 までの 13cM の範囲で同様の Haplotype を持った Homo であった。また Hetero である両親からこの遺伝子を受け継いだことが証明された(Fig.2)。このことから、この疾患は Founder effect によるものであり Compound hetero ではなかった。更に OCTN2 の DNA sequence では Intron8 の Acceptor site に変異が見られた(Fig.3)。

4. 【考察】 近親婚の確証は得られなかったが、マイクロサテライトマーカーを用いた Haplotype の検討では同祖的であった。また地域の遺伝的隔離があったと考えられた。

DNA sequence の検討では Intron 8 の Acceptor site

の Sequence をこの地域での Primary systemic carnitine deficiency のマーカーとして用いることが出来ると考えられた。



Fig.3 A missense mutation found in the Family TH.

5. 【文献】

- (1) Y. Shoji, A. Koizumi, T. Kayo, T. Ohata, T. Takahashi, K. Harada, and G. Takada, Am. J. Hum. Genet. 63:101-108, 1998
- (2) J. Nezu, et al., Nature Genetics, 21, 91-94, 1999

本研究は大浦敏博講師（東北大）との共同研究である。

C. Lysinuric protein intolerance (LPI)のヘテロキャリアについての遺伝疫学

小泉昭夫¹、野崎潤一¹、嘉陽毅¹、和田安彦¹、立身政信²、小野田敏行²、角田文男²

1.秋田大・医・衛生 2.岩手医科大学・衛生・公衆衛生

1. 目的： リジン尿性蛋白不耐症(LPI)は、常染色体劣性遺伝疾患である。塩基性アミノ酸である lysine, arginine, histidine の輸送担体の異常であり、腎からの再吸収が障害されるため尿中に大量に排泄される。主要症状は、arginine 欠乏による尿素サイクルの異常であり、蛋白の摂取により生じたアンモニアを尿素へ変換できないことによる。罹患者は、そのため蛋白嫌いを示し、蛋白食を敬遠する。その他の症状として、発育・発達遅延、骨粗鬆症、呼吸器障害などがある。日本における頻度は不明であるが、多発地帯として有名なフィンランドでは、出生8万に1名の頻度と報告されている。本疾患は、幼児期早期に citrullin 投与による治療を開始することにより完治可能であるが、この時期を逃すと障害を残す。

今回、我々は、本疾患が8千出生に1例と見積もられる高頻度地域を見出し、連鎖解析および、Haplotype analysisを行った。LPIのclusteringがについて知見を得たので報告する。

2. 対象と方法

対象：岩手、秋田両県 of 患者2名とその家系を対象とした。発端者の年齢は2歳から27歳である。調査対象者54名全員からInformed consentを得て遺伝的解析を行った。

遺伝的解析：末梢血からDNAを抽出し、Finlandの家系で連鎖が報告されている14番染色体長腕の8つの macrosatellite markers を用いてタイピングを行った。

連鎖解析およびhaplotype analysisは、GenehunterおよびLinakge Packageを用いて行った。

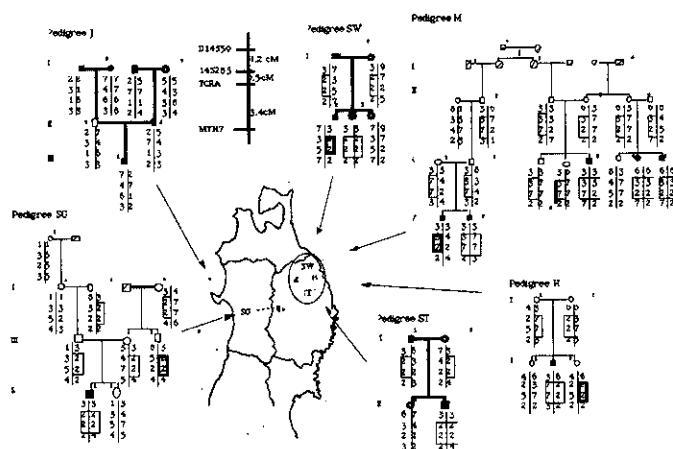
3. 結果及び考察

連鎖解析の結果、D14S50, D14S28, TCRAに連鎖を認めた (Two-point LOD score ≥ 2.66)。図1に強い連鎖を認めた microsatellite markers の haplotype を家系の一部のメンバーについて示す。親の世代における出身地域は、図1に示すように、4家系 (SW, M, H, ST) が岩手県北部に集中していた。haplotype analysisの結果、疾患遺伝子は、D14S28, TCRAのhaplotypeが、22, 32, 37, 77の4つであり、これらマーカーと連鎖不平衡にあることがTrasnmission disequilibrium test ($\chi^2 = 33.001, p < 0.0001$)で証明された。平成7年度における人口動態統計を基に、発生頻度を算出したところ7287出生に1名と推定された。この結果、保因者は43名に1名の頻度と推定された。

岩手県北部にはリジン尿性蛋白不耐症の多発地帯であることが判明した。また、その原因として、この地域での遺伝的隔離によるFounder effectの温存が考えられる。また、本疾患は早期発見により治療可能であり、罹患者は早期よりLDHの高値を示し、尿中のアミノ酸分析でLysineの高値を示す。1次スクリーニングをLDHを指標に行えば、現時点でもマススクリーニングは経済的にも技術的に可能であり、早急なマススクリーニング

の確立が望まれる。

本研究は、盛岡子供病院院長の高砂子祐平博士、秋田大学医学部小児科学高田五郎教授との共同研究である。



D. Wolfram Syndrome ヘテロ保因者の健康リスク

鄂 暁飛, 和田安彦, 野崎潤一, 嘉陽 毅,
平澤富士子, 小泉昭夫

1. 目的：Wolfram syndrome は小児期から発症するインスリン依存型糖尿病、視神経萎縮に加え、尿崩症、難聴などの随伴症状を呈する、常染色体劣性遺伝性の疾患である。患者の頻度は10万人~77万人に一人、ヘテロ保因者は100~354人に一人と報告されている。最近、責任遺伝子座が第4染色体短腕上にあり¹⁾、さらにWFS1という新規に同定された遺伝子の突然変異が原因であることが解明された²⁾。

我々は東北地方におけるWolfram syndrome家系の調査により、ヘテロ保因者で、老化過程における糖尿病と感音性難聴の発症リスクが高いことを見出した¹⁾。一方、この家系が居住する地域において患者発生頻度が高いこと(二次医療圏約10万人あたり患者4人,2家族)から、この地域全体のヘテロ保因者頻度も高い可能性がある。以上から、この原因遺伝子がこの地域における糖尿病など老化関連疾患発生に一部関与していることが

推測される。そこで今回この遺伝子の同地域内における頻度を、糖尿病多発家系、糖尿病患者、一般住民のそれぞれについて算出することを試みた。

2. 対象と方法：

対象：1. 糖尿病多発家系：7人兄弟中5名に1人非依存型糖尿病または耐糖能異常を認める兄弟とその子孫、計3世代のうち、血液提供の協力を得られた13~86歳（平均年齢51.7歳）の男女34名（配偶関係にある者14名含む）。

2. 糖尿病患者：同地域内の診療所に通院中の1人非依存型糖尿病患者で血液提供の協力が得られた46~84歳（平均年齢70.1歳）の男女30名。

3. 一般住民：1998年6/8~11/18の住民健診の受診者489名中、血液提供の協力の得られた男137、女321、計458人（年齢幅29~81歳、平均年齢56.8歳）。

方法：1. 試料収集：すべてインフォームドコンセントを得たのち、全血の提供を受けた。さらに、糖尿病多発家系の未発症者については糖負荷試験を行ない、一般住民についてはHbA1c検査を施行し、それぞれ耐糖能異常の有無を調べた。

2. ヘテロ保因者の同定：この地域内のWolfram syndrome家系で同定されているWFS1遺伝子の第8エクソン内の15塩基対の欠失(1685 del(CCTGC TCTAT GTCTA))²⁾を検出するため、全血からDNAを抽出し、PCR法によりその部分を増幅した。2% MetaPhor agaroseゲル電気泳動で分離同定した。

3. 結果：（電気泳動の結果の例を下図に示す。）

1. 糖尿病多発家系：34名中、15名に糖尿病または耐糖能異常を認めた（配偶関係にある者の異常者2名含む）。（異常を認めた者の平均年齢は63.7歳であった。）いずれも遺伝子の欠失を認めなかった。

2. 糖尿病患者：30名全員に遺伝子変異を認めなかった。

3. 住民健診受診者：HbA1cが5.6%以上（要指導または要医療）の者は、男17人(12.4%)、女16人(5.0%)、男

女計33人(7.2%)であった。しかし458人のいずれの者も遺伝子の欠失を認めなかった。

4. 考察：地域における糖尿病の2集団および耐糖能異常者を7.2%含む500名弱の一般住民の集団のいずれにおいても、これまでのところWolfram syndromeヘテロ保因者を見出すことができなかった。地域における1人非依存性糖尿病発症に果たすこのヘテロの遺伝子異常は大きくないと推測される。

この地域の人口約10万人あたり患者が2家族から出ていることから、推定されるヘテロ保因者は111人に一人と計算される。この頻度より今回の調査での頻度は低いようである。この理由として1)健診受診者の片寄り、2)地域においてランダムな結婚が行われていなかったこと、3)遺伝子の突然変異が起こってからの世代数が少ないこと、などの可能性が考えられる。

いずれにしても対象をさらに増やして頻度を明らかにする必要がある。また今後すでに抽出したDNAを用いて地域の遺伝子的特徴を明らかにし、疾病予防につなげていきたい。

5. 引用文献

- 1) Ohata T, Koizumi A, et al. Evidence of an increased risk of hearing loss in heterozygous carriers in a Wolfram syndrome family. *Hum Genet* 103, 470-474, 1998.
- 2) Inoue H, et al. A gene encoding a transmembrane protein is mutated in patients with diabetes mellitus and optic atrophy (Wolfram syndrome). *Nature Genetics* 20,143-148, 1998.



Fig. PCR products of exon 8 of the WFS1 gene.

PC: positive control of a heterozygote from the Wolfram syndrome family.

E. 障害高齢者の膝関節屈曲拘縮予防のための自己ストレッチング法の効果

進藤伸一（秋田大学医療技術短期大学部）

1. [目的] 歩行可能な障害高齢者の歩行能力の低下をできるだけ予防するには、歩行阻害因子の一つである膝関節屈曲拘縮の進行をくい止めるアプローチを、現在のケアに加えることが効果的と考えられる。今回、膝関節屈曲拘縮予防のための2種類の自己ストレッチング法を実施し、その効果について検討した。

2. [対象と方法] 対象は、老人保健施設に入所している歩行可能な障害高齢者36名(男11名、女25名、平均年齢 80.8 ± 7.1 歳)である。これを、性別、年齢、障害などできるだけ同じになるよう3群に分け、ハムストリングストレッチング群12名は、治療台に軽く腰かけ、前方に置いた台に片脚をのせ、台上の足部に両手を近づけるようにしてハムストリングスを伸展する。膝関節伸展ストレッチング群12名は、治療台に軽く腰かけ、片脚を伸ばして前方床に置き、膝の上に両手を置いて力を加えて膝関節を伸展する。両群とも、ハムストリングスや膝関節は突っ張るが我慢できる程度の強さで、時間は片足30秒ずつで交互に2回行い、これを1日1回、週4回、6週間実施した。コントロール群12名は、通常のプログラムのみ実施した。開始時と6週後に、長座位での床と膝下間距離(cm)、長座位での足底と指先間距離(sit and reach) (cm)を測定し、効果を検討した。期間中、ストレッチングを中断したり、疼痛が出現した者はいなかった。

3. [結果] 1.長座位での床と膝下間距離の変化：ハムストリングストレッチング群は、開始時、平均 3.2 ± 1.7 cmから終了時 3.0 ± 1.6 cmと0.2cm改善し($p < 0.05$)、膝関節伸展ストレッチング群も、 3.7 ± 2.2 cmから 3.1 ± 1.8 cmと0.6cm改善した($p < 0.05$)。コントロール群は、 3.7 ± 1.9 cmから 3.6 ± 1.8 cmと0.1cm改善したが有意差はみられなかった。2.長座位での足底と指先間距離：ハムストリングストレッチング群は、開始時、平均 -7.8

± 8.5 cmから終了時 -4.6 ± 7.0 cmと3.2cm改善した($p < 0.01$)が、膝関節伸展ストレッチング群は -7.2 ± 11.5 cmから -7.5 ± 11.7 cm、コントロール群は -7.7 ± 8.8 cmから -7.6 ± 9.8 cmとほとんど変化しなかった。

4. [考察] 従来、ハムストリングストレッチングは、ハムストリングの短縮予防を介して膝関節屈曲拘縮の予防にも有効とされてきた。今回の結果でも、長座位での床と膝下間距離は0.2cm改善していたが、膝関節伸展ストレッチングは0.6cm(膝伸展角度では約2度に相当)とハムストリングストレッチングの3倍改善しており、膝関節屈曲拘縮予防のための自己ストレッチング法としては、膝関節伸展ストレッチングが優れていることが明らかとなった。コントロール群では変化はみられず、老人保健施設の通常プログラムは下肢拘縮の改善に寄与していなかったことから、今回の膝関節伸展ストレッチングを高齢者ケアの現場に導入することで、間接的に歩行能力の低下をある程度抑制できるのではないかと考えられた。

F. 結語

我々は、動物及びヒトの疫学調査から以下の2点を明らかにした：

1) 劣性疾患のヘテロ保因者は、加齢により健康リスクを有すること。

2) Gain-of-Function mutationでは、蛋白の高次構造の異常により細胞機能不全を来す事の証明。

通常、常染色体劣性遺伝疾患は、何らかの責任遺伝子の突然変異を伴う。これら突然変異の異常は、生理的予備能の低下を引き起こすものと我々は考えていえる。そのため、加齢という生理的予備能の低下した場合、標的臓器の機能不全を生じ、疾病へと結び付き、Wolfram syndromeで認められた加齢により難聴、糖尿病が増加したものと考えられる。また、生理的予備能の低下の分子的機序として、我々のモデルマウスで証明されたように、突然変異による蛋白の高次構造の変化による細胞へ

のストレス、ER stress (Endoplasmic reticulum stress) を与えると考えている。

さらにSyndrome Xの結果である障害高齢者の社会復帰のため、老人保健施設等でも膝関節伸展ストレッチングを通常の訓練プログラムに加えることが重要であることを明らかにした。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kayo T and Koizumi A. Mapping of murine diabetogenic Mody on chromosome 7 at D7Mit258 and its involvement in pancreatic islet and b-cell development during the perinatal period. *J. Clin. Invest.* 101, 1998: 2112-2118
- 2) Y. Shoji, A. Koizumi, T. Kayo, Tomoaki Ohata, Tsutomu Takahashi, K. Harada, G. Takada. Evidence for linkage of human primary systemic carnitine deficiency with D5S436; a novel gene locus on chromosome 5q. *Am J Hum. Genet.* 63; 1998: 101-108
- 3) Ohata T, Koizumi A, Kayo T, Shoji Y, Watanabe A, Monoh K, Higashi K, Ito S, Ogawa O, Wada Y, Takada G. Evidence of an increased risks of hearing loss in heterozygous carriers in a Wolfram syndrome family. *Human Genet.* 103; 1998: 470-474.
- 4) Wada Y, Tsukada M, Koizumi A. Diabetes and hypertension (Syndrome X) as an increasing risk factor for cerebrovascular aging in Japan. *J Anti-aging Medicine.* 1998, 1, 45-52.
- 5) Nezu J, Tamai I, Oku A, Ohasha R, Yabuuchi H, Hashimoto N, Nikaido H, Sai Y, Koizumi A, Shoji Y, Takada G, Matsuishi T, Yoshino M, Kato H, Ohoura T, Tsujimoto G, Hayakawa J, Shimane M, Tsuji A. Primary carnitine deficiency is caused by mutations in a sodium-ion dependent carnitine transporter OCTN2. *Nature Genet.* 1999, 21: 91-94

6) Jie Wang, Toshiyuki Takeuchi, Shigeyasu Tanaka, Suely-Kunimi Kubo, Tsuyoshi Kayo, Danhong Lu, Kuniaki Takata, Akio Koizumi, and Tetsuro Izumi. A mutation in the insulin 2 gene induces diabetes with severe pancreatic a-cell dysfunction in the Mody mouse. *J. Clin. Invest.* 1999 103: 27-37.

7) 小泉 昭夫 自然環境と老化. 折茂 肇 (編集代表) 新老年学 第2版. 東京大学出版会、東京、pp 209-215 平成11年1月.

2. 学会発表

- 1) 大島智明、嘉陽毅、和田安彦、小泉昭夫. 日本人3家系におけるWolfram症候群に対する家系調査. 第68回日本衛生学会総会, 1998年3月24日, 岡山市
- 2) 小泉昭夫、嘉陽毅、大島智明、和田安彦. 症候性若年発症糖尿病 Wolfram syndrome 家系の連鎖解析. 第68回日本衛生学会総会, 1998年3月24日, 岡山市
- 3) 嘉陽毅、大島智明、和田安彦、小泉昭夫. 疾患家系を用いた遺伝マーカーの heterogeneity. 第68回日本衛生学会総会, 1998年3月24日, 岡山市
- 4) 吉岡政人、堀内和之、長谷山俊之、和田安彦、嘉陽毅、塚田三香子、平澤富士子、小泉昭夫. 糖尿病モデルマウス: Akita Mouse における糖尿病性腎症 (水腎症) の臨床像. 第68回日本衛生学会総会, 1998年3月24日, 岡山市
- 5) 堀内和之、吉岡政人、長谷山俊之、和田安彦、嘉陽毅、塚田三香子、平澤富士子、小泉昭夫. 糖尿病モデルマウス: Akita Mouse にみられた水腎症の病理学的特徴. 第68回日本衛生学会総会, 1998年3月24日, 岡山市
- 6) 長谷山俊之、嘉陽毅、塚田三香子、堀内和之、吉岡政人、平澤富士子、小泉昭夫. 常染色体優性遺伝形式をとる若年発症糖尿病マウスを用いた糖尿病性腎症の糸球体の経時的観察. 第68回日本衛生学会総会, 1998年3月24日, 岡山市
- 7) 塚田三香子、嘉陽毅、小泉昭夫. 若年発症糖尿病を支

- 配するMody4遺伝子のC3H/Heマウスを遺伝的背景とした発現. 第68回日本衛生学会総会, 1998年3月24日, 岡山市
- 8) 和田安彦, 塚田三香子, 進藤伸一, 小泉昭夫. 一般住民におけるインスリン抵抗性症候群 Syndrome X の頻度とそれによる脳卒中発症リスク. 第68回日本衛生学会総会, 1998年3月24日, 岡山市
- 9) 進藤伸一, 和田安彦, 小泉昭夫. 障害老人に対する起立運動を用いた筋力トレーニングの効果. 第68回日本衛生学会総会, 1998年3月25日, 岡山市
- 10) 大島智明, 嘉陽毅, 伊藤正毅, 小泉昭夫. マイクロサテライト遺伝子を用いた Wolfram syndrome の連鎖解析 (linkage analysis). 第41回日本糖尿病学会年次学術集会, 1998年5月21日, 和歌山市
- 11) 嘉陽毅, 吉岡政人, 小泉昭夫. 糖尿病発症の責任遺伝子マウス Mody4 の生理的影響. 第41回日本糖尿病学会年次学術集会, 1998年5月22日, 和歌山市
- 12) 小泉昭夫, 嘉陽毅, 伊藤正毅, 白田里香, 梅津正矩. 若年発症で遺伝的負荷が濃厚な NIDDM 患者の IPF1 遺伝子異常の検索. 第41回日本糖尿病学会年次学術集会, 1998年5月22日, 和歌山市
- 13) 長谷山俊之, 嘉陽毅, 堀内和之, 吉岡政人, 小泉昭夫. 若年発症糖尿病マウス(Akita Mouse)の糖尿病性腎症糸球体病変の経時的観察. 第41回日本糖尿病学会年次学術集会, 1998年5月22日, 和歌山市
- 14) 堀内和之, 長谷山俊之, 吉岡政人, 嘉陽毅, 小泉昭夫. 常染色体優性遺伝形式をとる若年発症型糖尿病マウス(Akita mouse)にみられた水腎症の発生について. 第41回日本糖尿病学会年次学術集会, 1998年5月22日, 和歌山市
- 15) 小泉昭夫, 嘉陽毅, 和田安彦. 老化の遺伝的要因: 劣性遺伝性疾患遺伝子のキャリアの老化を例として. 日本基礎老化学会第21回大会, 1998年6月19日, 東京
- 16) 和田安彦, 嘉陽毅, 小泉昭夫. 職域における血中カルニチン濃度測定. 第57回日本産業衛生学会東北地方会, 1998年7月11日, 山形市
- 17) Koizumi A. A Mechanism of Neonatal Diabetes and Its Prevention: A Lesson from the Human MODY4 and Mouse Model, *Mody Mutant*. 第9回福岡国際周産期シンポジウム(教育講演), 1998年9月5日, 福岡市
- 18) 小泉昭夫, 野崎潤一, 嘉陽毅, 和田安彦. 人口移動の少ない地域での責任遺伝子の検出法としての homozygosity mapping の有効性. 第9回日本疫学会学術総会, 1999年1月21日, 名古屋市
- 19) 小泉昭夫. Akita mouse—その糖尿病モデル動物としての有用性. 第13回日本糖尿病動物研究会(特別講演), 1999年2月5日, 京都市
- 20) 嘉陽毅, 小泉昭夫. 耐糖能を決定する遺伝子のマッピング. 第13回日本糖尿病動物研究会, 1999年2月6日, 京都市
- 21) 嘉陽毅, 小泉昭夫. 量的形質の連鎖解析(QTL)を用いたマウス耐糖能異常遺伝子座のマッピング. 第69回日本衛生学会総会, 1999年3月25日, 千葉市
- 22) 小泉昭夫, 野崎潤一, 嘉陽毅, 和田安彦, 立見政信, 小野田敏行, 角田文男. 稀な常染色体劣性疾患であるリジン尿性蛋白不耐症の地域集積性とそのメカニズム. 第69回日本衛生学会総会, 1999年3月26日, 千葉市
- 23) 野崎潤一, 嘉陽毅, 和田安彦, 小泉昭夫. 劣性遺伝性疾患 Systemic carnitine deficiency 家系における Transporter 変異の確認. 第69回日本衛生学会総会, 1999年3月26日, 千葉市
- 24) 鄂 曉飛, 和田安彦, 野崎潤一, 嘉陽毅, 平澤富士子, 長谷山俊之, 大島智明, 小泉昭夫. 常染色体劣性疾患 Wolfram syndrome の家系および地域におけるヘテロ保因者の同定. 第69回日本衛生学会総会, 1999年3月26日, 千葉市
- 25) 平澤富士子, 長谷山俊之, 小泉昭夫. 有機化学物質のマウス血清および組織中カルニチン濃度への影響. 第69回日本衛生学会総会, 1999年3月27日, 千葉市