

平成10年度厚生科学研究費補助金  
ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業

糖尿病発症に関与する遺伝子の単離・同定に関する研究  
研究報告書

平成11年3月

主任研究者 春日 雅人  
(神戸大学医学部 教授)

厚生省厚生科学研究補助金（ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業）  
統括研究報告書

糖尿病発症に関与する遺伝子の単離・同定に関する研究  
主任研究者 春日 雅人（神戸大学医学部医学科第二内科学教室教授）

研究要旨：糖尿病は遺伝素因を背景に環境要因の負荷が加わって発症する疾患である。本研究事業は日本人における糖尿病の遺伝素因を総合的に解析することを目的とし、①既知の糖尿病遺伝子について、多数の日本人糖尿病患者を対象としてその遺伝子変異の頻度を明らかにすること、ならびに②新規の糖尿病遺伝子を単離・同定して、その遺伝子変異の日本人糖尿病発症における役割を明らかにすることを目的として開始された。本年度は各参加施設は個別研究として独自の手法で糖尿病遺伝子について解析を進める一方で、全施設共同のもとに筋型グリコーゲン合成酵素の多型調査とインスリン受容体基質-2 の遺伝子解析を行った。現在までに新規糖尿病遺伝子の単離には至っていないが、着実に研究成果は上がっている。

A. 研究目的

近年、日本人における糖尿病患者数は増加の一途をたどっており、患者本人の quality of life の障害のみならず、糖尿病関連医療費も急増している。予測では 2010 年には 1996 年時点の約 2 倍の 1174 万人、40 歳以上の成人の 16.5% が糖尿病に罹患していると考えられ、我が国において糖尿病の発症を予防することは、社会的にも医療行政の面からも極めて重要な緊急性を要する課題となっている。糖尿病はインスリンの相対的不足が病態の根幹を形成しているが、その背景には遺伝的な要因が存在する。これまでに同定されている糖尿病発症に関与する遺伝子としてはインスリン遺伝子、インスリン受容体遺伝子、グルコキナーゼ遺伝子、ミトコンドリア遺伝子、HNFファミリー遺伝子などが同定されたが、これらの遺伝子の変異に基づく糖尿病患者は、我が国糖尿病患者全体の 1~2% にしか満たず、糖尿病発症に関与する未知の遺伝子が多数存在すると推定される。さらに糖尿病の遺伝的素因には民族差が存在すること

からも、日本人における糖尿病素因の解明が重要な課題であることを明示している。

本研究事業においては、日本人における糖尿病発症に関与する遺伝子を単離・同定することで、糖尿病発症のリスクを有する者を同定し、生活習慣を是正し、糖尿病の発症を未然に防ぎ、糖尿病患者の減少を導くことを目標にしている。このことは膨大になりつつある糖尿病関連医療費の削減にもつながることが期待される。本研究事業の研究計画として①既知の糖尿病遺伝子について、多数の日本人糖尿病患者を対象としてその遺伝子変異の頻度を明らかにすること、②新規の糖尿病遺伝子を単離・同定して、その遺伝子変異の日本人糖尿病発症における役割を明らかにすることの 2 点を上げ、日本人における糖尿病の遺伝素因を総合的に解析することを目的とした。

この目標を達成できるように、領域あるいはアプローチの方法が異なる、我が国で最適と思われる分担研究者 10 人を選出し、個別あるいは共同で糖尿病遺伝子の解析を開始した。

## B. 研究方法

遺伝素因の解析は候補遺伝子アプローチと連鎖解析アプローチの2つの方法に大別される。前者はインスリン分泌あるいはインスリン作用に重要な役割を果たしている遺伝子群について変異の有無を確認し、その変異が糖尿病の発症に関与しているかを統計学的に解析したり、変異導入実験を行うことによって病因的意義があるかを解析する方法である。研究目的において述べた、①既知の糖尿病遺伝子について、多数の日本人糖尿病患者を対象としてその遺伝子変異の頻度を明らかにすることはこの候補遺伝子アプローチによるものであり、現在までに全施設共同で十分に整備された医療情報を持つ2型糖尿病患者のDNA検体を約1500例、正常対照者のDNA検体を約1000例収集できており、これを用いてインスリン作用に重要な役割を果たしていると考えられる筋型グリコーゲン合成酵素とインスリン受容体基質-2について共同研究を行った。また各参加施設において独自に糖尿病遺伝子の解析が行われた。

連鎖解析アプローチはヒトや糖尿病モデル動物の染色体上の各種遺伝子マーカーと糖尿病発症との間の連鎖を解析し、未知の糖尿病遺伝子を単離しようという方法である。研究目的において述べた②新規の糖尿病遺伝子を単離・同定して、その遺伝子変異の日本人糖尿病発症における役割を明らかにすることはこの連鎖解析によるアプローチおよびインスリン分泌とインスリン作用の基礎的研究によって得られると考えられる。

各参加施設において独自の研究方法を採用しており、それぞれの方法論については、

各分担研究報告書に詳しく述べられているためここでは省略する。

## C. 研究結果

### 1. 共同研究

Muscle glycogen synthase (GYS1)遺伝子のMet416Val (M416V)多型はインスリン抵抗性との関連がこれまでの報告で示唆されている。本研究班では全施設で2型糖尿病患者1503名、正常対照者988名を対象にGYS1のM416V多型の頻度調査を行ったが、両群間で出現頻度に有意差を認めなかった。今後は多型の有無による糖尿病患者の臨床所見の差（インスリン抵抗性の程度や、肥満傾向の有無など）を検討し、この多型の病因的意義につき検討を加える予定である。

Insulin receptor substrate-2 (IRS-2)はインスリン作用のみならず膵β細胞の発生・分化にも関与している可能性があり、日本人2型糖尿病の候補遺伝子としてIRS-2遺伝子解析を行った。全施設で合計284名の2型糖尿病患者に対して検討した結果、すでに報告されているGly1057Asp変異が日本人においても確認された以外に、Pro1316Leu変異や多数のsilent mutationが確認された。蛋白コード領域で未だ検索されていない部位も残っており今後さらなる検討を加えていく予定である。

### 2. 個別研究

#### (1) 候補遺伝子アプローチ

##### a. MODY関連遺伝子群

花房らはHNF-1α異常型糖尿病が、日本人1型糖尿病患者の約6%に、また35歳以下の若年発症2型糖尿病患者の約2%に混在していることを明らかにした。岡らは

HNF-1 $\alpha$  遺伝子異常のうち truncated form となる P291fsinsC 変異は dominant negative 効果により内因性の HNF-1 $\alpha$  の機能を抑制することを明らかにした。岩崎らは HNF-3 $\beta$  遺伝子の変異を見出し、その機能について解析中である。さらに BETA2/NeuroD1 (NEUROD1), Nkx2.2 (NKX2B), IPF-1/MODY 4, Glucokinase/MODY2 遺伝子についても検討したがこれらについては変異は確認されなかった。

#### b. インスリン抵抗性に関連する遺伝子群

武田らは後縦靭帯骨化症 (OPLL) においてインスリン抵抗性糖尿病が合併する頻度が高いことを利用し、OPLL の候補遺伝子とインスリン抵抗性糖尿病との関連を検討している。三家らは PI3 kinase p85  $\alpha$  subunit 遺伝子の Met326Ile (M326I) 多型について検討し、この多型と 2 型糖尿病の発症には関連性が低いことを見出し、またこの多型を有する 2 型糖尿病患者はインスリン分泌が保たれていることを明らかにした。春日らは肥満やインスリン抵抗性に関与すると考えられる uncoupling protein (UCP) ファミリーについて検討を行った。UCP1, 2, 3 遺伝子の機能そのものを障害するような遺伝子変異は確認されなかった。UCP1 の蛋白コード領域の上流に存在する polymorphism は正常者よりも糖尿病患者において出現頻度が高く、今後この polymorphism が UCP1 の発現調節に関与しているかを検討する予定である。門脇らはエネルギー消費に関連する  $\beta$ 3 アドレナリン受容体の Trp64Arg 変異が、BMI 高値や内臓脂肪蓄積と有意な相関を有すること、 $\beta$ 2 アドレナリン受容体の Gln27Glu 変異が男性における皮下脂肪蓄積と関連するこ

と、インスリン抵抗性や脂肪分化に関与すると考えられる PPAR $\gamma$  遺伝子の Pro12Ala 変異は肥満や脂肪分布、インスリン感受性とは相関しないことを明らかにした。

#### c. その他の遺伝子群

清野 (進) らは糖尿病血管合併症の進展に関与する候補遺伝子としてアンジオポエチン遺伝子のクローニングを行った。清野 (裕) らは糖質の最終消化を行う  $\alpha$ -グルコシダーゼの活性および発現を OLETF ラットを用いて検討し、48 週齢において  $\alpha$ -グルコシダーゼ活性および発現が上昇することを明らかにした。さらに 2 型糖尿病患者において  $\alpha$ -グルコシダーゼのコンポーネントであるスクラーゼ・イソマルターゼ (SI) 遺伝子に変異を同定し、病因的意義について検討中である。

#### (2) 連鎖解析を用いたアプローチ

門脇らは 2 型糖尿病罹患同胞対 250 組を集積し、400 個前後のマイクロサテライトマーカーを用いて、全ゲノムレベルでの遺伝子マッピングを行っている。岩崎らは 2 型糖尿病罹患同胞対 194 組を用いて約 390 個のランダムマーカーのタイピングをほぼ終えた。現在結果を解析中であるがこれまでに他民族で報告されている *NIDDM1*, *NIDDM2* の両遺伝子が原因遺伝子である可能性は否定的であることを明らかにしている。一方で山田らは自然高血圧発症ラットにおけるインスリン抵抗性原因遺伝子座について検討を進めている。QTL 解析により 4 番および 12 番染色体上にインスリン抵抗性の原因となる遺伝子座の存在が示され、これらの領域に存在する複数の有力な既知候補遺伝子および新規遺伝子についてさらに検討を加えている。池上らは 2 型糖尿病

モデル動物である NSY マウスとコントロールマウスの交配実験により作り出した 300 以上の F2 マウスの耐糖能関連形質を対象に全ゲノムスクリーニングを行った結果、3つの QTL (*Nidd1*, 2, 3)を第 11, 14, 6 染色体上にマップした。各遺伝子座の局在および機能を解析し、遺伝子本体の同定を進めている。

#### D. 考察

現在までのところ日本人 2 型糖尿病患者の DNA サンプルの収集は予定どおり進行しており、また MODY 関連遺伝子においていくつかの新たな知見が得られた。さらに新規糖尿病遺伝子の可能性を持ついくつかの遺伝子座が連鎖解析を用いたアプローチから見出されてきた。本研究の性格から成果が得られるのには一定の時間が必要と考えられ、次年度からの研究成果が期待される。

#### E. 結論

各参加施設がそれぞれ異なったアプローチ方法で糖尿病遺伝子の発見を目指し順調に研究を進めている。

#### F. 研究発表

##### 論文発表

- (1) Ueda H, Ikegami H, Kawaguchi Y, Fujisawa T, Yamato E, Shibata M, Ogihara T: Genetic analysis of late-onset type 2 diabetes in a mouse model of human complex trait. *Diabetes* 1999 (in press)
- (2) Fujisawa T, Ikegami H, Yamato E, Kawaguchi Y, Ueda H, Shintani M, Nojima K, Kawabata Y, Ono M, Nishino

M, Noso S, Yamada K, Babaya N, Okamoto N, Ohguro N, Fukuda M, Ogihara T: Association of plasma fibrinogen level and blood pressure with diabetic retinopathy and of renal complications with proliferative diabetic retinopathy in Type 2 diabetes mellitus. *Diabetic Medicine* 1999 (in press)

- (3) N. Iwasaki, M. Ogata, O. Tomonaga, H. Kuroki, T. Kasahara, N. Yano, Y. Iwamoto. Liver and kidney function in Japanese patients with maturity onset diabetes of the young. *Diabetes Care* 21: 2144-2148, 1998
- (4) H. Huruta, Y. Horikawa, N. Iwasaki, M. Hara, L. Sussel, M. M. le Beau, E. M. Davis, M. Ogata, Y. Iwamoto, M.S. German, G.I. Bell:  $\beta$ -cell transcription factors and diabetes. Mutations in the coding lesion of the BETA2/NeuroD1 (NEUROD1) and Nkx2.2 (NKX2B) genes are not associated with maturity-onset diabetes of the young in Japanese. *Diabetes* 47:1356-1358, 1998
- (5) M. Hara, T.H. Lindner, V.P.Patz, X. Wang, N. Iwasaki, M. Ogata, Y. Iwamoto, G.I. Bell. Mutations in the coding lesion of the insulin promoter factor-1 gene are not a common cause of maturity onset diabetes of the young in Japanese subjects. *Diabetes* 47:845-846, 1998
- (6) Tanizawa Y, Ohta Y, Nomiyama J, Tanabe K, Inoue H, Matsutani A, Okuya S, Oka Y: Overexpression of dominant negative mutant hepatocyte nuclear factor (HNF) - 1  $\alpha$  inhibits arginine - induced insulin

- secretion in MIN6 cells. *Diabetologia* in press, 1999.
- (7) Kubota T., Mori H., Tamori Y., Okazawa H., Fukuda T., Miki M., Ito C., Freury C., Bouillaud F., Kasuga M.: Molecular screening of uncoupling protein 2 gene in patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus or obesity. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 83: 2800-2804, 1998
- (8) Mori, Y., Kim-Motoyama, H., Ito, Y., Katakura, T., Yasuda, K., Ishiyama, S., Yamada, K., Akanuma, Y., Ohashi, Y., Kimura, S., Yazaki, Y., and Kadowaki, T.: The Gln27Glu  $\beta$ 2-adrenergic receptor variant is associated with obesity due to subcutaneous fat accumulation in Japanese men. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* In press, 1999
- (9) 島尻 佳典, 三家 登喜夫, 上田 量也, 中川 貴之, 下村 裕子, 辰田 仁美, 南條 輝志男: PI3-kinase p85  $\alpha$  調節サブユニット遺伝子変異 (M326I) 保有者のインスリン分泌能の検討. *Peptide hormones in pancreas* 17: (in press), 1999.
- (10) Nishimura M, Miki T, Yashima R, Yokoi N, Sato Y, Seino S: Angiopoietin-3, a novel member of the angiopoietin family. *FEBS lett.* (in press)
- (11) Adachi T, Seino Y et. al.: Disordered expression of the sucrase-isomaltase complex in the small intestine in otsuka long-evans tokushima fatty rats, a model of non-insulin-dependent diabetes mellitus with insulin resistance. *Biochim Biophys Acta* 1999 Jan 4;1426(1):126-32
- (12) S. Maeda, J. Takeda et al.: Gender-specific haplotype association of collagen 11A2 in ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine. (manuscript in preparation).
- (13) Yoshiuchi I, Yamagata K, Yang Q, Iwahashi H, Okita K, Yamamoto K, Oue T, Imagawa, Hamaguchi T, Yamasaki T, Horikawa Y, Satoh T, Nakajima H, Miyazaki J, Higashiyama S, Miyagawa J, Namba M, Hanafusa T, Matsuzawa Y: Three new mutations in the hepatocyte nuclear factor-1 gene in Japanese subjects with diabetes mellitus: Clinical features and functional characterization. *Diabetologia* (in press)

#### 学会発表

- (1) Ikegami H: Genetic dissection of insulin-dependent diabetes mellitus gene, *idd3*: application of a novel strategy for pinpointing candidate mutations of complex traits. Joslin Diabetes Center 100<sup>th</sup> anniversary symposium on diabetes mellitus: from patients to genes and back. Oct 21, 1998
- (2) Ikegami H, Makino S, Kawaguchi Y, Ogihara T: Marker-assisted congenic strategy in combination with historical recombinants for pinpointing candidate genes for complex traits: application for an insulin-dependent susceptibility gene (*idd3*) of the nonobese diabetic (NOD) mouse. 12<sup>th</sup> International Mouse Genome Conference. Oct 2, 1998

- (3) 岩崎直子, 高橋良当, 井上幸子, 尾形真規子, 岩本安彦: 糖尿病性有痛性神経障害におけるミトコンドリア遺伝子異常の頻度とその臨床像 第 95 回日本内科学会総会 平成 10 年 4 月 9-11 日 福岡市 内科学会雑誌 87 巻臨時増刊号 303 (1998)
- (4) 岩崎直子, 織田直久, 古田浩人, 堀川幸男, 尾形真規子, 矢野伸樹, 岩本安彦: HNF-1 $\alpha$ , 1 $\beta$  および 4 $\alpha$  遺伝子異常を有する糖尿病の臨床的特徴に関する検討 第 41 回日本糖尿病学会学術総会 平成 10 年 5 月 14-16 日 和歌山市 糖尿病 48:Supple 1:184
- (5) 岩崎直子: NIDDM の発症分子機構 第 71 回日本内分泌学会学術総会 シンポジウム 平成 10 年 6 月 6 日 福岡市
- (6) N.Iwasaki, M.Ogata, Y. Iwamoto.: Clinical characteristics of MODY in Japanese. 58th Annual Scientific Meetings and Sessions of American Diabetes Association. June 13-16, 1998 Chicago, Diabetes 47:Supple (1) A177
- (7) 岩崎直子: A search for type 2 diabetes susceptibility genes in Japanese. 第 10 回内藤カンファランス「難病の分子生物学[1]」平成 10 年 10 月 29 日-11 月 1 日 葉山町
- (8) 岩崎直子: Clinical characteristics of MODY in Japanese 文部省国際シンポジウム"International Symposium on New Horizon in the Pathogenesis of Diabetes Mellitus" 平成 10 年 11 月 3-4 日 京都市
- (9) N. Iwasaki, M.Ogata, Y.Iwamoto Clinical characteristics of MODY in Japanese. Wakayama Forum "A Significance of Transcriptional factors as a Pathogenesis in NIDDM" November, 20, 1998 Osaka
- (10) 檜尾好徳, 堀川幸男, 岩崎直子, 豊田隆謙, G.I. Bell. Human hepatocyte nuclear factor-3 $\alpha$  遺伝子構造の決定とその異常~日本人 MODY 患者におけるスクリーニングおよび機能解析~第 10 回分子糖尿病学シンポジウム 平成 10 年 12 月 5 日 松山市
- (11) 久保田 孝則, 森 啓行, 田守 義和, 春日 雅人: UCPI, 2, 3 遺伝子の構造決定と NIDDM, 肥満患者における遺伝子異常の検索: 第 35 回日本臨床代謝学会総会
- (12) 森 啓行, 久保田 孝則, 田守 義和, 春日 雅人: ヒト UCPI 遺伝子, UCP2 遺伝子のスクリーニングと NIDDM 患者, 肥満患者における遺伝子異常の検索: 第 9 5 回日本内科学会総会
- (13) 久保田 孝則, 森 啓行, 田守 義和, 福田 恒夫, 三木 正敏, 春日 雅人: UCPI, UCP2, UCP3 遺伝子の構造決定と NIDDM, 肥満患者における遺伝子異常の検索: 第 41 回日本糖尿病学会年次学術集会
- (14) 森 啓行, 小池 隆史, 岩本 和也, 田守 義和, 春日 雅人: NIDDM 患者, 肥満患者における UCPI, 2, 3 遺伝子多型の検索: 第 19 回日本肥満学会総会
- (15) 島尻佳典, 三家登喜夫, 上田量也, 下村裕子, 辰田仁美, 中川貴之, 南條輝志男: PI3-Kinase p85 $\alpha$  調節サブユニット遺伝子変異(M326I)保有者の臨床的検討. 第 35 回日本糖尿病学会近畿地方会 奈良 1998 年 11 月 28 日

- (16) 島尻佳典, 三家登喜夫, 上田量也, 中川貴之, 南條輝志男: PI3-kinase p85  $\alpha$  調節サブユニット遺伝子変異(M326I) 保有者のインスリン分泌能. 第 19 回 膝ホルモン研究会 東京 1998 年 11 月 30 日
- (17) 前田真吾, 猪狩勝則, 古賀公明, 井ノ上逸朗, 武田 純. 「脊椎後縦靭帯骨化症の遺伝解析—コラーゲン 11A2 の変異とハプロタイプの男女差」第 43 回日本人類遺伝学会, 1998.
- (18) 山縣和也, 花房俊昭, 松澤佑次: HNF 異常型糖尿病 第 71 回内分泌学会総会 (1998.6.4. 博多)
- (19) K. Yamagata, Q. Yang, I. Yoshiuchi, K. Yamamoto, H. Iwahashi, J. Miyagawa, K. Okita, H. Nakajima, M. Namba, T. Hanafusa, Y. Matsuzawa: Dominant negative and haploinsufficiency mutations in the HNF-1  $\alpha$  /MODY3 gene. 58<sup>th</sup> American diabetes association (1998.6.13 Chicago)
- (20) K. Yamagata: Diabetes mellitus associated with mutations of HNF genes. International symposium on new horizon in the pathogenesis of diabetes mellitus (1998. 11.3 Kyoto)
- (21) 楊 勤, 山縣和也, 沖田考平, 山本浩司, 岩橋博見, 吉内一正, 難波光義, 宮川潤一郎, 花房俊昭, 松澤佑次: HNF-1  $\alpha$  の標的遺伝子としてのインスリン遺伝子の意義 第 10 回分子糖尿病学シンポジウム (1998.12.5. 松山)
- (22) 後藤田 貴也, 山田 信博: SHR (自然高血圧発症ラット) の脂肪細胞でのインスリン抵抗性発現遺伝子座位の QTL 解

厚生省厚生科学研究費ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業「糖尿病」  
分担研究報告書その1（共同研究）  
神戸大学第二内科学教室教授：春日 雅人

(1) Muscle Glycogen Synthase Gene Polymorphism M416V 多型の頻度調査

(2) IRS-2 遺伝子異常の検索

研究要旨：当研究班の共同研究事業として2種類の遺伝子について全施設協力のもと解析を行った。

(1) Muscle glycogen synthase (GYS1) は非酸化的糖代謝における重要な酵素であり、インスリン刺激により骨格筋におけるグリコーゲン合成を行う。これまでに2型糖尿病患者の骨格筋においてインスリン刺激による GYS1 活性の低下や、GYS1 の mRNA レベルの低下が報告されている。GYS1 遺伝子にはこれまでにいくつかの多型が報告されている。その中で Met416Val (M416V)多型は正常対照者群と比較した場合、2型糖尿病患者群においてやや出現頻度が高く (allele frequency, control: 9.7% vs DM: 13.7%), 2型糖尿病患者において M416V 多型を有するものは有さないものと比較して insulin sensitivity index が有意に低く、インスリン抵抗性との関連が示唆された。本研究班では全施設で2型糖尿病患者 1503 名、正常対照者 988 名を対照に GYS1 の M416V 多型の頻度調査を行ったが、両群間で出現頻度に有意差を認めなかった。今後は多型の有無による糖尿病患者の臨床所見の差（インスリン抵抗性の程度や、肥満傾向の有無など）を検討し、この多型の病因的意義につき検討を加える予定である。

(2) insulin receptor substrate-2 (IRS-2)は IRS-1 と同様にインスリン受容体からのシグナルを下流の effector molecule に伝達するドッキング蛋白であり、インスリンの作用機構において重要な働きをすることが予想される。IRS-1 ノックアウトマウスが軽度のインスリン抵抗性と成長障害きたすのみであったのに対し、IRS-2 ノックアウトマウスは予想されたインスリン抵抗性以外に膵β細胞の量が減少しており明らかな糖尿病を呈した。IRS-2 はインスリン作用のみならず膵β細胞の発生・分化にも関与している可能性があり、日本人2型糖尿病の候補遺伝子として IRS-2 遺伝子解析を行った。全施設で合計 284 名の2型糖尿病患者に対して検討した結果、すでに報告されている Gly1057Asp 変異が日本人においても確認された以外に、Pro1316Leu 変異や多数の silent mutation が確認された。蛋白コード領域で未だ検索されていない部位も残っており今後さらなる検討を加えていく予定である。

A. 研究目的

2型糖尿病はインスリン作用が相対的に不足したために生じる病態であり、複数の遺伝素因と複数の環境要因が関与して発症すると考えられている。単一の遺伝子異常で糖尿病を引き起こすものとして、これまでにインスリン遺伝子、インスリン受容体遺伝子、グルコキナーゼ遺伝子、ミトコンドリア遺伝子などが報告されているが、その頻度は少ない。現時点では2型糖尿病はいくつかの因子の異常（単一の異常でははっきりした糖尿病を発症しえない）が重なり合って発症する多因子疾患であろうと考えられている。今回本研究班の共同研究事業として、インスリン抵抗性との関与が示唆されている Muscle glycogen synthase (GYS1)の Met416Val (M416V)多型およびインスリン抵抗性のみならずインスリン分泌不全にも関与している可能性がある insulin receptor substrate-2 (IRS-2)遺伝子の解析を行った。

B. 研究方法

本研究班でインフォームドコンセントを作成し、各施設の倫理委員会の承諾を得た。インフォームドコンセントの要旨を対象者に示し同意を得た後に、末梢血を採血し DNA を抽出した。DNA および対象者の医療情報は各施設で厳密に管理している。GYS1 の M416V 多型については PCR-RFLP 法を用いて genotyping を行った。IRS-2 遺伝子に関しては蛋白コード領域を 22 部位に分割するように PCR プライマーを設定し、PCR-SSCP 法あるいは PCR direct sequence 法にて遺伝子変異のスクリーニングを行った。

C. 研究結果

(1) Muscle Glycogen Synthase Gene Polymorphism M416V 多型の頻度調査

[2型糖尿病患者]

	homozygote	heterozygote	Wild type	total
大阪2内DM	0	23	77	100
大阪4内DM	1	18	65	84
京都DM	0	17	83	100
群馬DM	1	14	70	85
神戸DM	4	65	247	316
埼玉4内DM	1	12	87	100
千葉DM	1	21	93	115
東京女子DM	4	28	68	100
東大3内DM	2	18	80	100
東大代謝DM	2	17	81	100
山口3内DM	1	18	81	100
和歌山DM	8	44	151	203
総数	25	295	1183	1503

[正常対照]

	homozygote	heterozygote	Wild type	total
大阪4内NC	1	15	65	81
大阪2内NC	1	16	83	100
京都NC	0	16	84	100
群馬NC	2	14	60	76
神戸NC	3	24	104	131
埼玉4内NC	0	25	75	100
東京女子NC	3	17	80	100
東大3内NC	0	20	80	100
東大代謝NC	1	12	87	100
山口3内NC	0	20	80	100
総数	11	179	798	988

・ genotypes	Met/Met	Met/Val	Val/Val
type 2 DM (n=1503)	25 (1.7 %)	295 (19.6 %)	1183 (78.7 %)
normal control (n=988)	11 (1.1 %)	179 (18.1 %)	798 (80.8 %)

$\chi^2$  検定, P=0.319

・ allele frequency	Met	Val
type 2 DM (n=3006)	2661 (88.5%)	345 (11.5%)
normal control (n=1976)	1775 (89.8%)	201 (10.2%)

$\chi^2$ -検定, P=0.149

genotype および allele frequency とも糖尿病群, 正常群において有意な差を認めなかった.

(2) IRS-2 遺伝子異常の検索

[対象]

施設 (50 音順)	対象	方法
大阪大学第二内科	2 型糖尿病患者 20 名	PCR direct sequence
大阪大学第四内科	2 型糖尿病患者 20 名	PCR-SSCP
京都大学臨床生体統御医学	2 型糖尿病患者 20 名	PCR-SSCP
群馬大学生体調節研究所	2 型糖尿病患者 32 名	PCR direct sequence
神戸大学第二内科	2 型糖尿病患者 28 名	PCR-SSCP
千葉大学分子機能制御学	2 型糖尿病患者 20 名	PCR direct sequence
東京女子医大糖尿病センター	2 型糖尿病患者 20 名	PCR direct sequence
東京大学第三内科	2 型糖尿病患者 20 名	PCR direct sequence
東京大学糖尿病代謝内科	2 型糖尿病患者 20 名	PCR-SSCP
山口大学第三内科	2 型糖尿病患者 20 名	PCR-SSCP
和歌山医大第一内科	2 型糖尿病患者 64 名	PCR-SSCP

全施設で 2 型糖尿病患者 284 名を対象に解析中

[解析結果]

(1) 大阪大学第二内科 (分子制御医学)

2 型糖尿病患者 20 名を対象に解析中.

Primer sets	nucleotide position	amino acid position	nucleotide change	amino acid change	frequency (type 2 DM: 20)
P1S⇔P1A	175	59	ΔAG to GAG	K to E	1.00
	180	60	GCC to GCG	no	1.00
	231	77	GAA to GAG	no	1.00
	237	79	GAA to GAG	no	1.00
	243	81	AAT to AAG	N to K	1.00
P2S⇔P2A	312	104	CGC to CGT	no	c/c: 18, c/t: 2, t/t: 0
	319	107	CCC to GCC	P to A	1.00
P3S⇔P3A	511	171	G <del>T</del> G to C <del>T</del> G	V to L	1.00
	519	173	GGT to GGC	no	1.00
T1S⇔T1A	1617	539	TTT to TTC	no	1.00
T2S⇔T2A	nothing				
T3S⇔T3A	1986	662	CTT to CTC	no	1.00
T4S⇔T5A	2067	689	ATT to ATC	no	1.00
	2111	704	TTF to TCT	F to S	1.00
	2141	714	TTF to TCT	F to S	1.00
	2169	723	AGT to AGC	no	t/t: 15, t/c: 5, c/c: 0
T6S⇔T7A	2448	816	TGT to TGC	no	t/t: 5, t/c: 13, c/c: 2
	2487	829	CCC to CCT	no	c/c: 14, c/t: 1, t/t: 5
	2532	844	ACC to ACG	no	1.00
	2543	848	ACC to AGC	T to S	1.00
T8S⇔T8A	2673	891	ACG to ACC	no	g/g: 19, g/c: 1, c/c: 0
T9S⇔T9A	2838	946	TCA to TCC	no	1.00)
	2844	948	CTA to CTC	no	1.00
	2867	956	TIG to TCG	L to S	1.00
	2872	958	TTG to CTG	no	1.00
T10S⇔T11A	3099	1033	CCA to CCG	no	a/a: 17, a/g: 3, g/g: 0

	<b>3170</b>	<b>1057</b>	<b>GGC to GAC</b>	<b>G to D</b>	<b>g/g: 7, g/a: 7, a/a: 6</b>
T12S⇔T13A	nothing				
T14S⇔T14A	3738	1246	GGT to GGC	no	1.00
T15S⇔T15A	3907	1303	CGC to GGC	R to G	1.00

(2) 大阪大学第四内科 (加齢医学)

2型糖尿病患者20名を対象に解析中.

Primer sets	nucleotide position	amino acid position	nucleotide change	amino acid change	frequency (type 2 DM: 20)
T5S⇔T5A	2169	723	AGT to AGC	no	t/t: 2, t/c: 6, c/c: 3
T6S⇔T6A	2343	781	CCC to CCT	no	c/c: 13, c/t: 2, t/t: 0
T6S⇔T6A	2448	816	TGT to TGC	no	t/t: 5, t/c: 8, c/c: 2
T7S⇔T7A	2487	829	CCC to CCT	no	
T9S⇔T9A	sequencing 中				
T10S⇔T10A	3099	1033	CCA to CCG	no	a/a: 13, a/g: 2, g/g: 0
<b>T10S⇔T10A</b>	<b>3170</b>	<b>1057</b>	<b>GGC to GAC</b>	<b>G to D</b>	<b>g/g: 8, g/a: 6, a/a: 1</b>
T12S⇔T12A	sequencing 中				
T15S⇔T15A	sequencing 中				

(3) 京都大学臨床生体統御医学

糖尿病患者20名を対象に解析終了.

Primer sets	nucleotide position	amino acid position	nucleotide change	amino acid change	frequency (type 2 DM: 20)
T5S⇔T5A	2169	723	AGT to AGC	no	t/t: 3, t/c: 9, c/c: 8
T6S⇔T6A	2343	781	CCC to CCT	no	c/c: 18, c/t: 2, t/t: 0
T6S⇔T6A	2448	816	TGT to TGC	no	t/t: 11, t/c: 7, c/c: 2
T7S⇔T7A	2487	829	CCC to CCT	no	c/c: 13, c/t: 3, t/t: 4
T7S⇔T7A	2532	844	ACC to ACQ	no	1.00
T7S⇔T7A	2543	848	ACC to AGC	T to S	1.00
T8S⇔T8A	2673	891	ACQ to ACC	no	g/g: 19, g/c: 1, c/c: 0
<b>T10S⇔T10A</b>	<b>3170</b>	<b>1057</b>	<b>GGC to GAC</b>	<b>G to D</b>	<b>g/g: 10, g/a: 9, a/a: 1</b>

(4) 群馬大学生体調節研究所

P6, P7を除く20部位につき PCR direct sequence にて screening

Primer sets	nucleotide position	amino acid position	nucleotide change	amino acid change	frequency (type 2 DM: 32)
T4S⇔T4A	2067	689	ATT to ATC	no	1.00
T5S⇔T5A	2169	723	AGT to AGC	no	t/t: 11, t/c: 16, c/c: 5
T6S⇔T6A	2343	781	CCC to CCT	no	c/c: 28, c/t: 4, t/t: 0
T6S⇔T6A	2448	816	TGT to TGC	no	t/t: 12, t/c: 13, c/c: 7
T7S⇔T7A	2487	829	CCC to CCT	no	c/c: 16, c/t: 1, t/t: 5
T9S⇔T9A	2982	994	GCC to GCA	no	c/c: 28, c/a: 2, a/a: 0
T10S⇔T10A	3099	1033	CCA to CCG	no	a/a: 2, a/g: 7, g/g: 21

T11S⇔T11A	3303	1101	CCG to CCA	no	g/g: 31, g/a: 1, a/a: 0
-----------	------	------	------------	----	-------------------------

(5) 神戸大学第二内科

2 2 部位につき PCR-SSCP にて screening. Abnormal band pattern につき PCR direct sequence

Primer sets	nucleotide position	amino acid position	nucleotide change	amino acid change	frequency (type 2 DM: 28)
T5S⇔T5A	2169	723	AGT to AGC	no	t/t: 8, t/c: 10, c/c: 10
T6S⇔T6A	2343	781	CCC to CCT	no	c/c: 27, c/t: 1, t/t: 0
T6S⇔T6A	2448	816	TGT to TGC	no	t/t: 10, t/c: 10, c/c: 8
T7S⇔T7A	2487	829	CCC to CCT	no	c/c: 26, c/t: 2, t/t: 0
T7S⇔T7A	2532	844	ACC to ACG	no	c/c: 0, c/g: 0, g/g: 28
<b>T10S⇔T11A</b>	<b>3170</b>	<b>1057</b>	<b>GGC to GAC</b>	<b>G to D</b>	
<b>T15S⇔T15A</b>	<b>3947</b>	<b>1316</b>	<b>CCC to CTC</b>	<b>P to L</b>	

G1057D, P1316L 変異に関しては PCR-RFLP にて DM 群と Normal control 群における出現頻度を検討.

・ G1057D 変異

	wild type	heterozygote	homozygote	allele frequency
type 2 DM	104	88	32	33.9
normal control	99	83	29	33.4

・ P1316L 変異

	wild type	heterozygote	homozygote	allele frequency
type 2 DM	169	1	0	0.3
normal control	114	0	0	0

proband は 3 世代にわたる糖尿病多発家系の構成員. しかしながら家系内で糖尿病の発症と P1316L 変異との間に cosegregation は認められなかった.

(6) 千葉大学分子機能制御学

Primer sets	nucleotide position	amino acid position	nucleotide change	amino acid change	frequency (type 2 DM: 20)
P1S_P2A	180	60	GCC to GCG	no	1.00
	231	77	GAA to GAG	no	1.00
	237	79	GAA to GAG	no	1.00
	243	81	AAT to AAG	N to K	1.00
	319	107	CCC to GCC	P to A	1.00
P3S⇔P4A	511	171	GTG to CTG	V to L	1.00
	519	173	GGT to GGC	no	1.00
P5S⇔P7A	not detected				
T1S⇔T1A	1617	539	TTT to TTC	no	1.00
T2S⇔T3A	not detected				
T4S⇔T5A	2067	689	ATT to ATC	no	1.00
	2111	704	TTT to TCT	F to S	1.00
	2141	714	TTT to TCT	F to S	1.00
T6S⇔T7A	2343	781	CCC to CCT	no	c/c: 19, c/t: 1, t/t: 0
	2448	816	TGT to TGC	no	t/t: 5, t/c: 9, c/c: 6
	2532	844	ACC to ACG	no	1.00

	2543	848	ACC to AGC	T to S	1.00
T9S⇔T9A	2838	946	TCA to TCC	no	1.00
	2844	948	CTA to CTC	no	1.00
	2867	956	TTG to TCG	L to S	1.00
	2872	958	TTG to CTG	no	1.00
T10S⇔T11A	3099	1033	CCA to CCG	no	a/a: 17, a/g: 3, g/g: 0
	<b>3170</b>	<b>1057</b>	GGC to GAC	G to D	g/g: 9, g/a: 7, a/a: 4
T12S⇔T13A	not detected				
T14S⇔T15A	3738	1246	GGT to GGC	no	1.00
	3756	1252	AAG to AAC	K to N	1.00

(7) 東京女子医科大学・糖尿病センター

Primer sets	nucleotide position	amino acid position	nucleotide change	amino acid change	frequency (type 2 DM: 20)
P1S⇔P1A	175	59	ΔAG to GAG	K to E	1.00
	180	60	GCC to GCG	no	1.00
	231	77	GAA to GAG	no	1.00
	237	79	GAA to GAG	no	1.00
	243	81	AAT to AAG	N to K	1.00
P2S⇔P2A	312	104	CGC to CGT	no	c/c: 18, c/t: 2, t/t: 0
	319	107	CCC to GCC	P to A	1.00
P3S⇔P3A	511	171	GTG to CTG	V to L	1.00
	519	173	GGT to GGC	no	1.00
P4S⇔P5A	nothing				
P6S⇔P7A	not done				
T1S⇔T1A	1617	539	TTT to TTC	no	1.00
T2S⇔T2A	nothing				
T3S⇔T3A	1986	662	CTT to CTC	no	1.00
T4S⇔T5A	2067	689	ATT to ATC	no	1.00
	2111	704	TTF to TCT	F to S	1.00
	2141	714	TTF to TCT	F to S	1.00
	2169	723	AGT to AGC	no	t/t: 8, t/c: 12, c/c: 0
T6S⇔T7A	2448	816	TGT to TGC	no	t/t: 3, t/c: 12, c/c: 5
	2532	844	ACC to ACG	no	1.00
	2543	848	ACC to AGC	T to S	1.00
T8S⇔T8A	2673	891	ACG to ACC	no	g/g: 18, g/c: 2, c/c: 0
T9S⇔T9A	2838	946	TCA to TCC	no	1.00)
	2844	948	CTA to CTC	no	1.00
	2867	956	TTG to TCG	L to S	1.00
	2872	958	TTG to CTG	no	1.00
T10S⇔T11A	3099	1033	CCA to CCG	no	a/a: 17, a/g: 3, g/g: 0
	<b>3170</b>	<b>1057</b>	GGC to GAC	G to D	g/g: 8, g/a: 0, a/a: 12
T12S⇔T13A	nothing				
T14S⇔T14A	3738	1246	GGT to GGC	no	1.00
T15S⇔T15A	3907	1303	CGC to GGC	R to G	1.00
	Single base insertion (4points) いずれも homo				1.00

(8) 東京大学第三内科

coding sequence を 5 分割し, 約 1Kb の PCR 産物を direct sequence にて解析中

Primer sets	nucleotide position	amino acid position	nucleotide change	amino acid change	frequency (type 2 DM: 20)
	2169	723	AGT to AGC	no	t/t: 14, t/c: 0, c/c: 6
	2448	816	TGT to TGC	no	t/t: 14, t/c: 0, c/c: 6
	2487	829	CCC to CCT	no	c/c: 19, c/t: 1, t/t: 0
	<b>3170</b>	<b>1057</b>	<b>GGC to GAC</b>	<b>G to D</b>	<b>g/g: 9, g/a: 2, a/a: 9</b>

(9) 東京大学糖尿病代謝内科

2 型糖尿病患者 20 名を対象に解析中.

PCR-SSCP にてスクリーニング中.

Gly1057Asp 変異以外に C783T, T1617C, T2169C, T2448C の silent mutation が確認された.

(10) 山口大学第三内科

P6P7 を除く 20 部位につき PCR-SSCP にて screening

Primer sets	nucleotide position	amino acid position	nucleotide change	amino acid change	frequency (type 2 DM: 20)
T5S_T5A	2169	723	AGT to AGC	no	t/t: 3, t/c: 10, c/c: 2
T6S_T6A	2343	781	CCC to CCT	no	c/c: 3, c/t: 2, t/t: 0
T6S_T6A	2448	816	TGT to TGC	no	t/t: 1, t/c: 3, c/c: 1
T10S_T10A	3099	1033	CCA to CCQ	no	a/a: 17, a/g: 2, g/g: 0
<b>T10S_T11A</b>	<b>3170</b>	<b>1057</b>	<b>GGC to GAC</b>	<b>G to D</b>	<b>g/g: 5, g/a: 12, a/a: 2</b>

(11) 和歌山県立医科大学第一内科

PCR-SSCP にて 64 名の 2 型糖尿病患者に関して解析中. 現在までのところ以上バンドは認められない.

〔現時点で見出された IRS-2 遺伝子多型のまとめ〕

(1) 1 塩基置換による missense mutation

	確認した施設数	allele frequency
Gly1057Asp	9	36.7 %
Pro1316Leu	1	0.3 %

(2) silent mutation

	確認した施設数	allele frequency
C312T	2	5.0 %
T2169C	9	41.0 %
C2343T	6	5.4 %
T2448C	10	42.3 %
C2487T	6	17.5 %
G2673C	3	3.3 %
C2982A	1	3.3 %
A3099G	6	25.0 %
G3303A	1	1.5 %

#### D. 考察

##### (1) Muscle Glycogen Synthase Gene Polymorphism M416V 多型について

2型糖尿病患者 1503 名，正常対照者 988 名を対照に GYS1 の M416V 多型の頻度調査を行ったが，両群間で出現頻度に有意差を認めなかった．今後は多型の有無による糖尿病患者の臨床所見の差（インスリン抵抗性の程度や，肥満傾向の有無など）を解析する目的で各施設の患者データの集積を行っていくつもりである．

##### (2) IRS-2 遺伝子解析について

今回 Genbank から採用した IRS-2 遺伝子の sequence の一部が Morris F. White らの報告したアミノ酸配列と一致しない．このため本来正常であるものも変異として同定されていると考えられる．解析した対象者全例で認められている遺伝子変異は Genbank の sequence と比較して同定されたもので，これらは正常であると予測される．これまでに報告のあった missense mutation (Gly1057Asp, Gly879Ser) (Diabetes, 47: 976-979, 1998)のうち Gly1057Asp の allele frequency はデンマーク人と日本人でほぼ一致した．Gly879Ser は日本人では見出されなかった．今回初めて同定された Pro1316Leu 変異については頻度が少ないが，病因的意義について今後検討を加える必要があると考えられる．

IRS-2 遺伝子の sequence の 5'上流および 3'下流の sequence が不明であるため，今回解析されていない 5'側および 3'側末端の蛋白コード領域についても解析を行う必要がある．さらに IRS-2 遺伝子のプロモーター部位の sequence も現在解析中であり，今後は IRS-2 の組織特異的な発現調節の機構や，プロモーター部位の遺伝子異常の検討も進めていく必要があると考えられる．

#### E. 結論

Muscle Glycogen Synthase Gene Polymorphism M416V 多型については，糖尿病患者と正常者においてその出現頻度に有意差を認めなかった．今後は患者の臨床所見の解析を行い，この多型の病因的意義について検討を加える予定である．

IRS-2 遺伝子については現時点で，糖尿病を引き起こす可能性のある遺伝子変異の同定には至っていないが，さらなる検討を行っていく予定である．

厚生省厚生科学研究費ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業「糖尿病」  
分担研究報告書 その2 (個別研究)

2型糖尿病患者, 単純性肥満患者における UCP1, 2, 3 遺伝子異常の検索  
神戸大学第二内科学教室教授: 春日 雅人

研究要旨: UCP ファミリー(UCP1, 2, 3)はミトコンドリア内膜に発現する蛋白で, 酸化的リン酸化の効率を低下させエネルギーを熱として放出させる働きを持つ. 齧歯類の肥満モデル動物において, 褐色脂肪活性の低下や UCP1 の発現レベルの低下が観察されている. さらに UCP2 と UCP3 はヒトにおける非ふるえ熱産生の主たる部位である骨格筋に発現が見られ, UCP2 遺伝子と UCP3 遺伝子はマウスで chromosome 7, ヒトで chromosome 11q13 にマップされ, これらの遺伝子座は肥満や高インスリン血症あるいは基礎代謝率との関連が示されている. 我々はヒト UCP1, 2, 3 遺伝子を肥満およびインスリン抵抗性の候補遺伝子として, そのクローニングを行い肥満患者, 2型糖尿病患者を対象に遺伝子異常の検索を行った.

#### A. 研究目的

食生活の欧米化に伴い, 日本における2型糖尿病患者数は増加の一途をたどっている. 糖尿病発症の原因としてインスリン分泌不足(インスリン分泌不全)とインスリン作用不足(インスリン抵抗性)が挙げられる. 一方, 過食・運動不足などにより発症する肥満も増加傾向にあり, 肥満はインスリン作用不足と深く関係している. 脱共役蛋白(uncoupling protein, UCP)はエネルギーを熱として放出し, 体重バランスの自立的コントロールを行う因子のひとつと考えられる. 我々は UCP 遺伝子を肥満やインスリン抵抗性の候補遺伝子と考え, 遺伝子異常の有無を2型糖尿病患者や肥満患者を対象に解析した.

#### B. 研究方法

ヒトゲノム DNA ライブラリーから UCP1, 2, 3 遺伝子をクローニングし, そのエクソン・イントロン構造を決定した. 蛋白コード領域を含む全エクソンとそのエクソン・イントロン境界を増幅できるよう

に PCR プライマーを設定した. BMI が 30.0kg/m<sup>2</sup> 以上の単純性肥満患者 25 名, BMI が 28.0kg/m<sup>2</sup> 以上の肥満傾向を示す 2型糖尿病患者 25 名に対し, PCR-SSCP 法および PCR direct sequence 法を用いて遺伝子異常のスクリーニングを行った. 同定された遺伝子変異については PCR-RFLP 法を用いて対象数を増やして出現頻度を調べた.

#### C. 研究結果

PCR-SSCP 法および PCR direct sequence 法にて以下の遺伝子変異を同定した.

##### (1) UCP1 遺伝子

(a) Met(ATG)229 Leu(TTG)の missense mutation

(b) Exon1 の 5'側の非翻訳部位に A→C の 1塩基置換

##### (2) UCP2 遺伝子

(c) Ala(GCC)55Val(GTC)の missense mutation

(d) Ala(GCC)232Thr(ACC)の missense

mutation

(3) UCP3 遺伝子

(e)Tyr(TAC)99Tyr(TAT)の silent mutation

(f)Tyr(TAT)210Tyr(TAC)の silent mutation

上記の遺伝子変異のうち(e)(f)は silent mutation であり病因的意義はないものと考えられた。(a)(b)(c)(d)については対象数を増やし、mismatch primer を用いた PSR-RFLP 法を用いて、糖尿病患者群、単純性肥満群、正常対照群における遺伝子変異の出現頻度を比較した。(a)については糖尿病患者 190 名、単純性肥満患者 40 名、正常対照者 120 名において、allele frequency がそれぞれ 11.2%, 12.0%, 9.5%。(c)についてはそれぞれ 46.1%, 48.8%, 47.3%と出現頻度に差を認めなかった。(b)については糖尿病患者 341 名、単純性肥満患者 37 名、正常対照者 221 名において、それぞれ allele frequency が 10.1%, 8.1%, 6.3%であり糖尿病群における出現頻度は正常対照群よりも有意に高かった。(P<0.05) このことから UCP1 の Exon 1 の 5'側の非翻訳部位に存在する A→C の 1塩基置換が UCP1 の発現調節などに関わって、糖尿病の発症に関与している可能性が示唆された。(d)については糖尿病患者 245 名、単純性肥満患者 41 名、正常対照者 118 名において糖尿病患者においてのみ 3 例認められた。しかしながら 1 名の発端者の家系を調査したところ、Ala 232 Thr 変異の有無と糖尿病や肥満の相関は確認されなかった。次いで Ala 232 Thr 変異について、酵母を用いた発現実験を行った。Ala 232 Thr 変異を有する UCP2 を発現させた

変異株は野生型 UCP2 を発現させた野生株と比較して、uncoupling protein としての機能には差を認めなかった。このことから Ala 232 Thr 変異は病因的意義を持たないものと考えられた。また African American で同定され脂肪酸化に影響を与えることが報告されている UCP3 の exon 6 の splice junction の変異は日本人においては 40 例中 1 例も確認されず、人種差があることが示された。

#### D. 考察

インスリン抵抗性や肥満に関与する候補遺伝子として、UCP1, 2, 3 遺伝子異常の有無を肥満傾向を持つ糖尿病患者および単純性肥満患者を対象に解析した。いくつかの polymorphism が確認され、その中で正常者と比較して糖尿病患者において出現頻度の高かった UCP2 の Ala 232 Thr 変異について家系調査や変異導入実験を行ったが病因的意義はないものと考えられた。UCP1 遺伝子の exon 1 の 5'側の非翻訳部位に存在する A→C の 1塩基置換については正常者に比し糖尿病患者においてその出現頻度が高かった。蛋白コード領域ではないのでその病因的意義については不明であるが、今後は同部位の変異の有無により転写活性にどのような影響を与えるかについて検討を加える予定である。

#### E. 結論

UCP1, 2, 3 遺伝子の異常が糖尿病や肥満の発症と関係しているかを調べるため、分子生物学的手法を用いて検討した。UCP1, 2, 3 遺伝子の機能そのものを障害するような遺伝子変異は確認されなかった。

UCP1 の蛋白コード領域の上流に存在する polymorphism は正常者よりも糖尿病患者において出現頻度が高く、今後この polymorphism が UCP1 の発現調節に関与しているかを検討する予定である。さらに UCP2, UCP3 についてもその発現調節に関与するような変異が存在する可能性も残されており、今後の研究課題としたい。

#### F. 研究発表

##### 論文発表

1. Kubota T., Mori H., Tamori Y., Okazawa H., Fukuda T., Miki M., Ito C., Freury C., Bouillaud F., Kasuga M.: Molecular screening of uncoupling protein 2 gene in patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus or obesity. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 83: 2800-2804, 1998

##### 学会発表

1. 久保田 孝則, 森 啓行, 田守 義和, 春日 雅人: UCP1, 2, 3 遺伝子の構造決定と NIDDM, 肥満患者における遺伝子異常の検索: 第 35 回日本臨床代謝学会総会
2. 森 啓行, 久保田 孝則, 田守 義和, 春日 雅人: ヒト UCP1 遺伝子, UCP2 遺伝子のスクリーニングと NIDDM 患者, 肥満患者における遺伝子異常の検索: 第 95 回日本内科学会総会
3. 久保田 孝則, 森 啓行, 田守 義和, 福田 恒夫, 三木 正敏, 春日 雅人: UCP1, UCP2, UCP3 遺伝子の構造決定と NIDDM, 肥満患者における遺伝子異常の検索: 第 41 回日本糖尿病学会年次学術集会

4. 森 啓行, 小池 隆史, 岩本 和也, 田守 義和, 春日 雅人: NIDDM 患者, 肥満患者における UCP1, 2, 3 遺伝子多型の検索: 第 19 回日本肥満学会総会

#### G. 知的所有権の取得状況

なし

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業）  
分担研究報告書

2型糖尿病の遺伝解析：近交系モデル動物からのアプローチ

分担研究者：池上博司 大阪大学加齢医学

研究協力者：川口義彦 大阪大学加齢医学

研究要旨：多因子疾患である2型糖尿病の遺伝子解析を単一遺伝子疾患を中心に開発されてきた従来の解析法で行うことには困難がともなう。この点を解消するにはヒト2型糖尿病の優れたモデルとなる近交系マウスの存在が不可欠である。多因子遺伝を示し、年齢依存性に2型糖尿病を発症する近交系 NSY マウスはこのような目的に合致する優れたモデル動物である。NSY マウスとコントロールマウスを用いた交配実験により作出した300以上のF2マウスの耐糖能ならびに関連する量的形質を対象に、全ゲノムスクリーニングを行った結果、糖尿病関連形質を規定する3つの遺伝子を異なる染色体上にマップした。このうち *Nidd1* は耐糖能とインスリン分泌、*Nidd2* は耐糖能とインスリン抵抗性に強く連鎖し、*Nidd3* はインスリン抵抗性と内臓脂肪蓄積に強く連鎖することが示された。これらの遺伝子をクローニングし、ヒト対応遺伝子を同定することにより、ヒト2型糖尿病の遺伝解析が大きく促進されることが期待される。

A. 研究目的

多因子疾患である2型糖尿病の遺伝子解析を効率よく進めることを目的として、ヒト2型糖尿病の優れたモデル動物である近交系マウスを用いて遺伝子解析を進め、ヒト2型糖尿病へとフィードバックする。

B. 研究方法

独自のコロニーを選択交配により維持し、形質の解析を進めてきた2型糖尿病モデル動物 NSY マウスをコントロールの C3H/He マウスと交配して作製した F2 マウス(n=307)を対象に、経時的(12, 24, 36, 48週齢)に測定した体重・耐糖能ならびに48週齢におけるインスリン基礎分泌量・腹腔内脂肪量を表現型として、マイクロサテライトマーカーを用いた全ゲノムスクリーニングを行った。

連鎖解析は MAPMAKER/QTL プログラムを用いて行い、Lander らの提唱したゲノムワイドの有意水準に従い、 $LOD > 4.3$

( $p=5 \times 10^{-5}$ )を有意の連鎖、 $LOD > 2.8$  ( $p=1.6 \times 10^{-3}$ )を連鎖が示唆される領域として同定した。

C. 研究結果

耐糖能ならびに関連形質を規定する3つのQTL (*Nidd1*, 2, 3)を第11, 14, 6染色体にマップした。*Nidd1* は耐糖能と有意の連鎖(MLS=9.5)、*Nidd2* は耐糖能(MLS=4.9)および基礎インスリン (MLS=4.5) と有意の連鎖、*Nidd3* は基礎インスリン (MLS=4.7) および精巣上体脂肪量 (MLS=6.8) と有意の連鎖を認めた。*Nidd1* と *Nidd2* 領域のマーカーを NSY のホモで有する個体は NSY マウスに近い耐糖能障害を認めるのに対し、C3H のホモで有する個体は C3H と同程度の耐糖能を有していた。

D. 考察・結論

モデル動物 NSY マウスを用いた交配実験により耐糖能に関連する遺伝子座が少