

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

HNF 異常型糖尿病の確立とそれを基盤とした日本人糖尿病遺伝子の同定に関する大規模研究

研究者 花房俊昭 大阪大学大学院分子制御内科（第二内科）

山縣和也 大阪大学大学院分子制御内科（第二内科）

研究要旨：日本人 1 型糖尿病の約 6% に、また 35 歳以下の若年発症の 2 型糖尿病患者の約 2% に HNF-1 $\alpha$  異常型糖尿病が存在していた。HNF-1 $\alpha$  異常型糖尿病はインスリン分泌不全が病態の本質であると考えられた。

#### A. 研究目的

我々は、転写因子である hepatocyte nuclear factor-1 $\alpha$  (HNF-1 $\alpha$ ), HNF-1 $\beta$ , HNF-4 $\alpha$  の遺伝子異常が、インスリン分泌不全型糖尿病(MODY)の原因であることを明らかにし、「HNF 異常型糖尿病」という成因に基づいた新しい概念を提唱した。本研究により、日本人 HNF 異常型糖尿病の頻度・病態・発症機構を解明する。

#### B. 研究方法

47 名の日本人 1 型糖尿病患者および 35 歳以下で発症している 2 型糖尿病患者 44 名の末梢血より DNA を抽出し、HNF1 $\alpha$ , HNF4 $\alpha$  遺伝子の異常の有無について PCR 直接シーケンス法にて検討した。変異を有する患者の臨床像を解析すると共に、変異体 HNF の機能についてもあわせて検討した。

#### C. 研究結果

1 型糖尿病患者において 3 種類(G415R, プロモーター A サイト, E43fsdelG) (6.4%)、2 型糖尿病患者において 1 種類(R272C) (2.1%)のいずれも新しい HNF-1 $\alpha$  遺伝子異常を同定した。HNF4 $\alpha$  遺伝子異常は同定

できなかった。これらの HNF-1 $\alpha$  異常型糖尿病患者はいずれも肥満は認めず、30 歳以下で発症しており、インスリン分泌は低下していた。1 名の患者(R272C 変異)においてアルギニン負荷テストを施行したところ、インスリンの分泌低下に加えて、グルカゴンの低反応も認められた。変異体の機能についてリポーターアッセイを施行したところ、G415R 変異は haploinsufficiency mutation、R272C 変異は dominant negative mutation、A site 変異は gain of function mutation であることが判明した。

#### D. 考察

HNF-1 $\alpha$  異常型糖尿病は、日本人 1 型糖尿病の約 6% に、また 35 歳以下の若年発症の 2 型糖尿病患者の約 2% に混在していることが判明した。特に、1 型糖尿病患者と診断されている症例において HNF-1 $\alpha$  遺伝子異常が高い頻度で同定されたことは、この遺伝子異常が単に MODY としての表現型をとるだけではなく、より severe な臨床像も呈しうることを示しているものと考えられる。更に、従来報告されているインスリン分泌不全に加えて、1 症例ではあるがグルカゴンの分泌不全も認められたこと

は、HNF-1 $\alpha$ 異常型糖尿病においては膵 $\beta$ 細胞に加えて、 $\alpha$ 細胞の機能不全も存在している可能性も示唆している。

変異体 HNF-1 $\alpha$  の機能は、haploinsufficiency, dominant negative, gain of function と多様であることが判明した。変異体の機能と臨床像の関連については今後の検討課題であると考えられる。

#### E. 結論

日本人糖尿病患者において、あらたな HNF-1 $\alpha$  遺伝子変異を同定した。HNF-1 $\alpha$  遺伝子異常を有する患者は、MODY のみならず1型糖尿病の表現型をも呈することが判明した。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- (1) Yoshiuchi I, Yamagata K, Yang Q, Iwahashi H, Okita K, Yamamoto K, Oue T, Imagawa A, 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 $\alpha$  gene in Japanese subjects with diabetes mellitus: Clinical features and functional characterization. Diabetologia (in press)

##### 2. 学会発表

- (1) 第71回内分泌学会総会 (1998.6.4. 博多) HNF 異常型糖尿病: 山縣和也、花房俊昭、松澤佑次
- (2) 58th American diabetes association (1998.6.13 Chicago) Dominant negative

and haploinsufficiency mutations in the HNF-1 $\alpha$ /MODY3 gene: K. Yamagata, Q. Yang, I. Yoshiuchi, K. Yamamoto, H. Iwahashi, J. Miyagawa, K. Okita, H. Nakajima, M. Namba, T. Hanafusa, Y. Matsuzawa

- (3) International symposium on new horizon in the pathogenesis of diabetes mellitus (1998. 11.3 Kyoto) Diabetes mellitus associated with mutations of HNF genes: K. Yamagata
- (4) 第10回分子糖尿病学シンポジウム (1998.12.5. 松山) HNF-1 $\alpha$  の標的遺伝子としてのインスリン遺伝子の意義: 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

#### G. 知的所有権の取得状況

シカゴ大学の Graeme I. Bell により、HNF に関連する patent が米国において申請中である。

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

自然高血圧発症ラット(SHR)におけるインスリン抵抗性原因遺伝子座位の解析  
分担研究者 山田 信博 東京大学医学部附属病院助教授

研究要旨：インスリン抵抗性の新たな原因遺伝子の同定を目標として、SHR のインスリン抵抗性原因遺伝子座位を QTL 解析により 4 番および 12 番染色体上に同定し、さらに cDNA の解析を通じて多数の既知および新規候補 cDNA をクローニングした。cDNA クローンの染色体上での局在も決定し、その塩基配列を調べた。その結果、SHR のインスリン抵抗性の QTL 領域には複数の有力な既知および新規候補遺伝子があることが判明した。

A. 研究目的

インスリン抵抗性の新たな原因遺伝子の同定を目標として、高血圧症とインスリン抵抗性のモデル動物である自然高血圧発症ラット(SHR)を用いた研究を続けた。既に、脂肪細胞での糖取り込み能を指標として、いわゆる QTL(Quantitative Trait Loci)解析により SHR のインスリン抵抗性原因遺伝子座位を 4 番および 12 番染色体上に同定していたが、平成 10 年度は mRNA を用いたアプローチを行った。

B. 研究方法

SHR およびそのコントロールである WKY ラットの脂肪細胞より mRNA を単離し、cDNA subtraction 法により SHR でその発現に特異的な変化を生じる多数の既知および新規 cDNA をクローニングした。それらの cDNA クローンの染色体上での局在は、ラット、マウス、ヒト染色体間の synteny および radiation hybrid panel を用いて決定した。また、各遺伝子の cDNA の塩基配列を調べ、SHR と WKY 間で比較した。

C. 研究結果

4 番染色体の当該領域にはインターロ

イキン 6 (IL-6)、内皮由来一酸化窒素合成酵素(eNOS)、L 型カルシウムチャンネル(Cchl-2a)、脂肪酸輸送担体(FAT)遺伝子などが、また 12 番染色体の当該領域には、インスリン受容体(INS-R)、インスリン受容体基質-3 (IRS-3)遺伝子などの局在が明らかとなった。cDNA の coding 領域の塩基配列の比較では、SHR では 1 塩基置換により Cchl-2a 遺伝子でサイレント変異が、また IRS-3 遺伝子ではミスセンス変異 (Met430Thr) が同定された。Met430Thr 変異は他のラットの strain 間でも認められ、その機能的影響は不明であるが、一種の多型と考えられた。一方、FAT 遺伝子には SHR の substrain 間でスプライシング変異を含む複数の相違が認められ、また Northern blot 解析でも mRNA の長さの異常と発現量の減少が認められたことより、このスプライシング変異が FATmRNA の構造や発現異常の原因と考えられた。

D. 考察

IRS-3 遺伝子の Met430Thr 変異は一種の多型と考えられるが、その機能的影響は不明であり、培養細胞などでの機能解析が必要である。米国 NIH コロニー由来の SHR

の FAT(CD36)遺伝子には複数の相違が見られ、これが SHR のインスリン抵抗性発現にどの程度関与しているのか明らかにする必要がある。

#### E. 結論

SHR のインスリン抵抗性の QTL 領域には複数の有力な既知候補遺伝子があり、その他の新規遺伝子も含めて今後詳細な検討が必要である。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

後藤田貴也、山田信博他 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 解析。第 41 回日本糖尿病学会 (和歌山) で発表。

#### G. 知的所有権の取得状況

なし