

19990331

平成11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12年3月

主任研究者 春日 雅人
(神戸大学医学部 教授)

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム遺伝子治療研究事業）
総括研究報告書

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。本年度は全施設共同の共同研究として、インスリン抵抗性改善薬が結合する PPAR γ の Pro12Ala の多型について検討した。すなわち、日本人 2 型糖尿病患者約 2500 例、正常対照者約 2000 例について検討し、PPAR γ の 12 番目のアミノ酸が Ala であると糖尿病に罹患しにくいことを見出した。また、各施設で行う個別研究により、HNF-3 β 遺伝子ならびに Isl-1 遺伝子が日本人における新たな糖尿病遺伝子であることを見出した。

分担研究者

池上 博司: 大阪大学医学部加齢医学講座講師
岩崎 直子: 東京女子医科大学内科学第三講座講師
岡 芳知: 山口大学医学部内科学第三講座教授
門脇 孝: 東京大学大学院医学系糖尿病・代謝内科学講座講師
三家 登喜夫: 和歌山県立医科大学臨床検査医学講座教授
清野 進: 千葉大学大学院医学研究科統合機能学講座教授
清野 裕: 京都大学大学院医学研究科臨床生体統御医学講座教授
武田 純: 群馬大学生体調節研究所糖尿病遺伝子学講座教授
花房 俊昭: 大阪大学大学院分子制御内科学講座講師
山田 信博: 筑波大学医学部臨床医学系内科学講座教授

A. 研究目的

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。本研究は日本人糖尿病の発症に関与する遺伝子の単離ならびに同定を目的とする。日本人における糖尿病患者数は戦後増加の一途をたどっており、2010 年には 1996 年の約 2 倍の 1174 万人、40 歳以上の成人の 16.5% に達すると予測されている。現在、我が国において糖尿病患者の急増に伴い糖尿病網膜症による失明者数は年間約 3000 人以上に上っており、腎症による新規透析導入例は 9000 人を超える勢いで、本人の quality of life の障害のみならず医療経済においても糖尿病関連医療費の急増の主要因となっている。従って、日

本人糖尿病の遺伝素因を解明することにより、その発症を予知し予防することは医学的のみならず、社会的にも、さらに医療行政の面からも極めて重要な課題であり、緊急性を要すると考えられる。日本人糖尿病の発症に関与する遺伝子を明らかにすることは、そのリスクを有する者を同定し、重点的に生活指導を行い、生活習慣を是正し、糖尿病の発症を未然に防ぎ、糖尿病患者の発症を減少に導くのみならず、重篤な合併症への進展を予防することが期待される。さらに膨大になりつつある糖尿病関連医療費の抑制にも大きく貢献するものと期待される。また、糖尿病の発症に関与する新しい遺伝子の単離は、この遺伝子を標的とする特異的な薬剤あるいは治療法の開発を可能とするものであることは、論を俟たない。

B. 研究方法

本研究は、日本人における糖尿病の遺伝素因を総合的に解析するものであり、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共同研究と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個別研究よりなる。一般的に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蛋白を発見、同定し、その遺伝子をクローニングし、その遺伝子についての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。上記の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2500例、正常対照者のDNA検体を約2000例収集できており、本年度はこれらのサンプルを用いてインスリン抵抗性に関与していると考えられるPPAR γ 遺伝子について共同研究を行った。また、個別研究の一部においても候補遺伝子アプローチがとられた。

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。上記の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、個別研究としていくつかの施設で行われた。

なお、各参加施設において独自の研究方法を採用しており、それぞれの方法の詳細については、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。また、倫理面に関しては十分な配慮を払った。すなわち、本研究事業で統一したインフォームドコンセントを作成し、研究対象者から書面をもって同意を得た。また各研究計画に関しては、各施設における倫理委員会の承認を得て実行に移した。

C. 研究結果

1. 共同研究

PPAR γ (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ) に結合するチアゾリジン誘導体がインスリン抵抗性改善作用をもつことから PPAR γ はインスリン抵抗性と何らかの関係を持つのではないかと推察されている。そこで、本年度の共同研究として600例の糖尿病患者について PPAR γ 遺伝子の変異について検索した。その結果、①Pro12Ala 変異、②891番目のC \rightarrow Gの一塩基置換 (silent 変異)、③exon 6におけるC \rightarrow Tの一塩基置換 (silent 変異)、以上の3種類の変異を認めた。そこでアミノ酸変異を伴う Pro12Ala 変異について多数例で検索した。すなわち、2422名の2型糖尿病患者と1937名の正常対照者について検討した結果、12番目のアミノ酸がAlaに変異している allele frequency は2型糖尿病患者で2.47%、正常対照者で3.92%であり、有意に正常対照者で多かった。従って、この変異は

糖尿病の発症に抑制的に働くと考えられた。

2. 個別研究

(1)新しい候補遺伝子のクローニングならびに同定

膵 β 細胞からのインスリン分泌にミトコンドリアが重要な役割を果たしている。清野進らはミトコンドリアに存在するABC (ATP-binding cassette) 蛋白に注目し、*S. cerevisiae* のABC蛋白であるATM1のヒトホモログをクローニングし、MTABC3と名付けた。今後、この遺伝子の変異が糖尿病発症と関係するか非常に興味深い。脂肪細胞におけるインスリンの主な作用はグルコースの取り込みの促進作用と脂肪分解の抑制作用である。春日らは、前者にSNARE蛋白の一種であるSNAP23が、後者にセリン・スレオニンキナーゼであるAktが関与していることを見出し、これらが2型糖尿病の候補遺伝子となりうることを示した。

(2)候補遺伝子アプローチ

(i) HNF 遺伝子

HNF (Hepatocyte Nuclear Factor) 遺伝子は、膵細胞に発現している転写因子であり、常染色体優性遺伝を示す若年発症2型糖尿病であるMODYの原因遺伝子であることが明らかにされている。すなわち、MODY1はHNF-4 α 、MODY3はHNF-1 α 、MODY5はHNF-1 β 遺伝子の変異によることが明らかにされている。武田らは、これらの既知MODY遺伝子の上流転写調節因子であるHNF-3 β 遺伝子に注目し、ヒトHNF-3 β cDNAをクローニングし、この遺伝子の変異を45人のMODYと112人の成人発症2型糖尿病患者について検索し、3種類のミスセンス変異を見出した。その中でAla86Thr変異は、家系調査と機能解析の成績から耐糖能異常の原因となっている可能性が高いと考えられた。すなわち、HNF-3 β 遺伝子が日本人2型糖尿病の原因遺伝子である可能性が初めて示された。岩崎らはHNF-3 β のみでなくHNF-3 α 、HNF-4 γ についても検討したが、東京女子医科大学糖尿病センターで集めたMODY57例では有意な遺伝子変異は見い出せなかった。またHNF-1 β 遺伝子変異によるMODY5について、

泌尿生殖器系の発生異常を合併する新たな家系を見出した。MODY5は世界で6家系見い出されているが、その中の3家系で泌尿生殖器系の奇形が認められており、HNF-1 β は泌尿生殖器系の発生・分化にも重要な役割を果たしていることが示唆された。花房らは、MODY3の原因遺伝子であるHNF-1 α に注目し、変異体HNF-1 α の残存転写活性とMODY3の臨床的重症度との関係について

解析し、両者が逆相関すること、ならびにインスリン遺伝子が HNF-1 β の標的遺伝子のひとつであることを見い出した。

(ii) その他の遺伝子

三家らは、膵 β 細胞のインスリン分泌や分化・増殖に関係する3種類の遺伝子、syntaxin 1A, CDK4, Isl-1 に注目し、2型糖尿病患者77名についてその変異を検討した。その結果、Isl-1 遺伝子において Gln310X 変異を見出し、さらにこの変異が家系調査で糖尿病発症と関連していることを見い出した。すなわち、Isl-1 遺伝子が日本人2型糖尿病の原因遺伝子である可能性がはじめて示唆された。清野裕らは、肥満と関係ある β 3 アドレナリン受容体 (β 3AR)ならびに脱共役蛋白 1 (UCP1) について検討した。男子大学生を対象に β 3AR の Trp64Arg 変異及び UCP1 遺伝子の変異 (A to G-3826) と自律神経活動との関連について検討した。その結果この β 3AR 遺伝子変異 (Trp64Arg) は単独で安静時の自律神経活動低下の原因となりうること、この β 3AR 遺伝子変異に UCP1 遺伝子変異 (A to G-3826) が加わった場合には安静時および起立時の自律神経活動が低下することを明らかにした。この自律神経活動の低下と肥満の発症がどのような関係にあるのか今後の興味ある課題である。門脇らは、共同研究で検討した PPAR γ 遺伝子について検討し、まずその遺伝子欠損マウスを作製した。ホモ欠損マウスは胎生 10.5~11.5 日で致死であった。そこで、ヘテロ欠損マウスについて検討し、高脂肪食負荷により、野生型と比較し有意に脂肪重量の増加が抑制され、インスリン抵抗性の程度が軽いことを見い出した。次にヒト PPAR γ 遺伝子の Pro12Ala 変異についても検討し、この多型が2型糖尿病患者より非糖尿病患者で多いこと、この多型を持つ過体重・肥満者では持たない者と比較しインスリン感受性が高く血中レプチン濃度が高いことを見い出した。

(3)連鎖解析アプローチ

(i) ヒトにおける解析

Wolfram 症候群は、インスリン治療を必要とする若年発症糖尿病と視神経萎縮を主徴とし、尿崩症、感音性難聴、精神神経障害などを合併する常染色体劣性遺伝疾患である。岡らは、連鎖解析アプローチを用いて、この原因遺伝子をクローニングし、WFS-1 と名付けた。今回、岡らは臨床的に Wolfram 症候群と診断された日本人における WFS-1 遺伝子変異について解析し、約半数の患者のエクソンに変異が認められるが残りの患者には変異が認められないことを見い出した。また、小

児 IDDM 患者の1%に WFS-1 遺伝子変異が認められることを見い出した。岩崎らは、日本人2型糖尿病患者の194組の罹患同胞を集め、全ゲノムマッピングを行った。その結果、2型糖尿病の疾患感受性遺伝子座位として、17ヶ所が明らかとなった。統計学的に最も可能性の高い領域は第21番染色体長腕上に認められた。

(ii) モデル動物における解析

池上らは、2型糖尿病モデル動物である NSY マウスの3つの QTL (*Nidd1,2,3*) を第11, 14, 6 染色体上にマップした。本年度も引き続き、これらの遺伝子の同定をめざして精力的に検討を行った。また、遺伝子間の相互作用の検討を目的として、コントロール系統との正逆交配により2種類の F1 ハイブリッドを作出し、表現型を親系統と比較解析した結果、表現型により遺伝様式が異なること、インスリン抵抗性は F1 ハイブリッドにおいて親系統よりも増強されること、性染色体が表現型の発現に影響することを明らかにした。山田らは、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検討を行い、その座位が4番と12番染色体上にあることを既に報告した。4番染色体上の候補遺伝子として CD36 が海外より報告されたが、インスリン抵抗性を呈する日本のオリジナルの SHR には CD36 遺伝子の変異は認められず、CD36 遺伝子がインスリン抵抗性の重要な原因遺伝子とは考えにくいことを明らかにした。

D. 考察

日本人2型糖尿病患者の DNA サンプルは予定通り、約2500例の収集をおえた。正常対照者についても約2000例の収集をおえた。これらのサンプルを用いて本年度は PPAR γ の Pro12Ala 多型について、12番目のアミノ酸が Ala であると糖尿病に罹患しにくいこと、インスリン分泌能が低下していることなどを見い出した。2500名の2型糖尿病患者についての各種の情報が一部不十分であるため、今後情報をより完全なものとし、より詳細な解析に供したい。

E. 結論

日本人において、その PPAR γ 遺伝子の Pro12Ala 多型について、12番目のアミノ酸が Ala であると糖尿病に罹患しにくいことを明らかにした。HNF-3 β 遺伝子ならびに Isl-1 遺伝子が日本人における新たな糖尿病遺伝子であることを明らかにした。

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム遺伝子治療研究事業）
分担報告書 その1（個別研究）

インスリン作用に関与する糖尿病遺伝子の単離・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）

- (1) ヒト PPAR γ 遺伝子異常の検索
(2) PPAR γ 2 遺伝子 Pro12Ala 多型の頻度調査と臨床的特徴

研究要旨：当研究班の99年度共同研究事業として Peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) 遺伝子について全施設協力のもと解析を行った。PPAR γ はステロイドホルモン受容体スーパーファミリーに属する核内受容体であり、脂肪細胞の分化や増殖を制御する機能を持つ一方で、インスリン抵抗性改善薬であるチアゾリジン誘導体の選択的受容体であることから、糖代謝においても重要な役割を果たしていると考えられている。PPAR γ は PPAR γ 1 と PPAR γ 2 の二つの isoform からなり、これまでに脂肪細胞特異的に発現が認められる PPAR γ 2 の exon B 内の Pro12Ala 多型が同定されている。この Pro12Ala 多型の頻度は人種差があり、Pro12Ala 多型と BMI (body mass index) やインスリン感受性との関連性については報告によって見解に一定性を見ない。我々は日本人糖尿病患者を対象に PPAR γ 遺伝子の蛋白コード領域において新たな遺伝子変異の有無を検索するとともに、Pro12Ala 多型の日本人における頻度と臨床的特徴について多人数の糖尿病患者と正常対照者を対象に解析を行った。

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、ミトコンドリア遺伝子、MODY 遺伝子（グルコキナーゼ遺伝子、HNF-4 α 遺伝子、HNF1 α 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、インスリンの標的細胞である脂肪細胞の分化や増殖を制御する一方で、インスリン抵抗性改善薬であるチアゾリジン誘導体の受容体である Peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) 遺伝子の蛋白コード領域において遺伝子変異のスクリーニングを行うとともに、これまでに報告のある Pro12Ala 多型について日本人における頻度と臨床的特徴について多人数の糖尿病患者と正常対照者を対象に解析を行った。

B. 研究方法

本研究事業で統一したインフォームドコンセントを作成し、研究計画については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。PPAR γ 遺伝子は PPAR γ 1 と PPAR γ 2 に共通の exon 1 から exon 6、PPAR γ 1 に特異的な exon A1 と exon A2、および PPAR γ 2 に特異的な exon B からなるが、蛋白コード領域である exon B および exon 1 から exon 6 に関して遺伝子解析を行った。全施設で 600 例の 2 型糖尿病患者を対象に PCR-SSCP 法あるいは PCR direct sequence 法を用いて遺伝子変異を検索した。次に既に報告のある PPAR γ 2 の Pro12Ala 多型は人種によって出現頻度に差があり、BMI やインスリン感受性との関連性も報告によって結果が一定ではない。この Pro12Ala 多型に関して PCR-RFLP 法を用いて日本人糖尿病患者 2322 名、日本人正常対照者 1788 名を対象に頻度の調査を行う一方で、この変異の有無による臨床的特徴について検討した。

C. 研究結果

(1) ヒト PPAR γ 遺伝子異常の検索

全 12 の参加施設でおのおの 50 例の糖尿病患者を対象（総数 600 例）に遺伝子変異の有無を解析した。その結果①exon B の Pro12Ala 変異、②exon 5 の 891 番目 c \rightarrow g の 1 塩基置換 (silent 変異)、③exon 6 の c \rightarrow t の 1 塩基置換 (silent 変異) が頻度の高いものとして多施設で確認された。①と③は連鎖不平衡

を示していた。①に関してはさらに n 数を増やして検討を加えた。(2)参照) ②および③は silent 変異であるため病因的意義は少ないものと考えられた。その他に頻度の低い silent 変異や intron 内の変異も確認されたが、いずれも病因的意義は少ないものと考えられた。

(2) PPAR γ 2 遺伝子 Pro12Ala 多型の頻度調査と臨床的特徴

頻度

	2 型糖尿病患者	正常対照者	合計
Pro/Pro	2322	1788	4110
Pro/Ala	119	146	265
Ala/Ala	1	3	4
Total	2442	1937	4379

Allele frequency

	2 型糖尿病患者	正常対照者	odds
Pro	4763	3722	1.2797
Ala	121	152	0.7961

odds ratio: 0.622 (CI95%: 0.7929-0.4881)

CHI square 15.095, P=0.000102

以上の結果から Pro12Ala 多型は 2 型糖尿病群におけるよりも正常対照群において出現頻度が高いことが示された。このことから Pro12Ala 多型は糖尿病発症の危険が少ない因子としての性質を持つものと考えられた。

次に糖尿病患者群において Pro12Ala 多型の有無による臨床症状の差異を検討した。発症年齢や BMI には差を認めなかったが、Ala allele を有する群で総コレステロールが有意に高値を示した。また HbA1c が高い傾向を示し、合併症を有する率も高い傾向を示した。すなわち糖尿病の重症度と Ala allele との関連性が示された。インスリン感受性の指標である HOMA-R は差を認めなかったが、Ala allele を有する群でインスリン分泌能の指標である HOMA- β が低い傾向を示した。

D. 考察

Caucasian において著明なインスリン抵抗性を示す糖尿病患者に PPAR γ の Val290Met, Pro467Leu 変異が見出されたことが報告されたが (Nature, 402: 880-883,1999), 今回の共同研究によって、日本人の通常の 2 型糖尿病患者において Pro12Ala 以外にはアミノ酸変異を示すような遺伝子異常は見出されなかった。

Pro12Ala 多型についてはこれまでに Ala allele とインスリン感受性の高さや BMI の低さとの関連性

が報告されている。我々の結果では、糖尿病群よりも正常対照群で Ala allele の出現頻度が高く、この多型を有する場合、糖尿病発症の危険が少なくなる可能性が示唆された。しかしながら、糖尿病群の中でこの多型を有するものは、糖尿病の状態が悪く、インスリン分泌能が障害されている可能性が示された。Pro12Ala 多型を有する糖尿病患者の管理には十分な配慮がなされるべきであると考えられた。

E 結論

日本人糖尿病患者における PPAR γ 遺伝子のスクリーニングを行ったが、Pro12Ala 多型以外に silent 変異や intron 内の塩基置換が確認されたが病因的意義はないものと考えられた。Pro12Ala 多型については糖尿病発症の危険が少ない因子と考えられるが、糖尿病患者において Pro12Ala 多型を持つものは糖尿病の状態が悪化する傾向があり、その管理には十分な注意が必要であると考えられた。PPAR γ の糖代謝における働きとして、インスリン作用機構だけではなくインスリン分泌機構にも関与している可能性が示唆された。

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム遺伝子治療研究事業）
分担報告書 その2（個別研究）

インスリン作用に関する糖尿病遺伝子の単離・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：脂肪細胞におけるインスリン依存性脂肪分解抑制作用に Akt が、またインスリン依存性糖輸送促進に SNAP23 が重要な役割を果たしていることを見出した。従って、この2つの蛋白は糖尿病遺伝子である可能性が示唆された。また、PPAR γ 遺伝子の 12 番目の Pro が Ala に置換された変異体はその機能が正常型と比較し軽度低下しており、そのため糖尿病発症に抑制的に働くと考えられた。

A. 研究目的

2型糖尿病はインスリン作用の相対的不足により発症する。その発症機構の遺伝素因を明らかにするひとつの方法は、インスリン作用あるいはインスリン分泌に重要な役目を果たしている蛋白質を同定し、その遺伝子の変異を検索する候補遺伝子アプローチである。本研究は、①インスリンによる脂肪分解抑制作用に注目して、そのインスリンシグナルについて検討した。また、②インスリンによる糖輸送促進機構に関する蛋白について検討した。さらに、③インスリン抵抗性改善薬であるチアゾリジン誘導体が結合する PPAR γ 遺伝子の変異について本研究事業の共同研究として検討しているが、そこで見いだされた Pro12Ala 変異の 3T3-L1 脂肪細胞への分化に及ぼす効果について検討した。

B. 研究方法

①インスリンによる脂肪分解抑制作用は、インスリンによって PI3-キナーゼが活性化され、その結果 PDE3B (phosphodiesterase 3B) が磷酸化され、細胞中の cyclic AMP 量が低下し cyclic AMP 依存性蛋白質磷酸化酵素 (PKA) の活性が低下し、ホルモン感受性リパーゼの活性が抑制されると考えられていた。しかしながら、PI3-キナーゼと PDE3B をつなぐ分子が不明であった。我々は PI3-キナーゼの下流で働くことが明らかになっている二種類のセリン・スレオニンキナーゼである Akt (PKB) と PKC λ について、これらが PDE3B を磷酸化しないか検討した。すなわち両者の dominant negative 変異体をアデノウイルスベクターを用いて 3T3-L1 脂肪細胞へ発現し、インスリンによる PDE3B の磷酸化について検討した。

②インスリンによる脂肪細胞での糖輸送促進作用

は、糖輸送担体である GLUT4 を含む小胞が細胞内から細胞膜へトランスロケーションし、そこで両者の融合が生じると考えられている。この時、細胞膜に存在する syntaxin4 と小胞に存在する VAMP2 が重要な働きをしている。我々は、脂肪細胞に存在する SNAP23 のこの融合過程における役割を SNAP23 の各種変異体を 3T3-L1 脂肪細胞へ発現することで検討した。

③ヒトの PPAR γ 遺伝子の多型について検討した所、最もよく検出された多型は 12 番目の Pro が Ala に置換した多型 (Pro12Ala) であった。この変異の頻度が糖尿病患者で多いか少ないかについては各種の報告があり、一定の見解が得られていないが、本研究事業の共同研究として多施設共同で行った検討では、糖尿病患者でこの多型は少ないという結果を得た。一方、この変異が PPAR γ の機能についてどのような影響を与えているかの検討も 1つの報告があるのみである。そこで、正常型 (WT) ならびにこの変異体 (Pro12Ala) を 3T3-L1 線維芽細胞にアデノウイルスベクターを用いて発現し、その発現の脂肪細胞への分化に及ぼす影響について検討した。

C. 研究結果

①3T3-L1 脂肪細胞へ PDE3B をアデノウイルスベクターを用いて発現した。インスリンにより PDE3B の磷酸化は 2 倍程度促進した。このインスリンによる磷酸化の促進は、Akt の dominant negative 変異体を発現することにより抑制されたが、PKC λ の dominant negative 変異体では抑制されなかった。Akt の恒常的活性型を発現すると PDE3B の磷酸化は 10 倍以上促進した。また、in vitro の系でも Akt により PDE3B は磷酸化された。以上より、インスリンにより活性化された Akt が PDE3B を直接磷酸化すると考えられ

た。

- ②正常型 SNAP23 は in vitro の系で syntaxin4 と VAMP2 の両者に結合した。C 末端のアミノ酸 49 個を欠失した変異体 SNAP23- Δ C49 では両者に結合しなかった。C 末端のアミノ酸 8 個を欠失した変異体 SNAP23- Δ C8 は syntaxin4 に結合したが VAMP2 には結合しなかった。この SNAP23- Δ C8 を 3T3-L1 脂肪細胞にアデノウイルスを用いて発現するとインスリンによる GLUT4 のトランスロケーションが抑制された。以上より、インスリンによる糖輸送の促進には SNAP23 が必要と考えられた。
- ③3T3-L1 線維芽細胞から脂肪細胞への分化をチアゾリジン誘導体である BRL49653 0, 50, 500, 5000 nM 存在下で検討した。その結果、少なくとも 50 nM, 500 nM BRL49653 の存在下では PPAR γ -Pro12Ala を発現すると等量の PPAR γ -WT を発現した時と比較し、分化が有意に抑制された。すなわち、Pro12Ala 変異は PPAR γ の機能を軽度ではあるが低下させると考えられた。COS 細胞における transient expression の系を用いて PPAR γ -Pro12Ala の転写活性に及ぼす影響について検討すると PPAR γ -Pro12Ala の方が正常型 (WT) と比較し、転写活性が弱い傾向がみられた。

D. 考察

- ①Akt は PI3-キナーゼの下流で働く分子であるが、今回の成績から、少なくともインスリンによる脂肪分解抑制作用には重要な働きをしていることが明らかとなった。従って、Akt は 2 型糖尿病の発症に関与する候補遺伝子であると考えられた。
- ②SNAP23 は、脂肪細胞におけるインスリンによる糖輸送の促進に重要な働きをしていることが明らかとなった。従って SNAP23 は 2 型糖尿病の発症に関与する候補遺伝子であると考えられた。
- ③PPAR γ -Pro12Ala の変異は、PPAR γ の機能に、軽度ではあるが抑制的に作用している可能性が高いと考えられた。今年度、本研究事業の共同研究として行った日本人糖尿病患者における PPAR γ 遺伝子変異の検索では、この Pro12Ala 変異のみが見い出され糖尿病患者で少ないという結果が得られた。この結果とあわせて考えると PPAR γ の機能の低下は糖尿病の発症には抑制的に働くと考えられる。

E. 結論

Akt はインスリン作用の伝達に関与しており、この遺伝子変異により、糖代謝や脂肪代謝の異常が生じる可能性が示唆された。SNAP23 はインスリンによる糖輸送の促進に関与しており、この遺伝子変異により、耐糖能の低下が生じる可能性が示唆された。PPAR γ 遺伝子の 12 番目の Pro が Ala に置換した変異により、PPAR γ の機能は軽度ではあるが低下しており、その結果、糖尿病の発症に抑制的に働いていると考えられた。

F. 研究発表

論文発表

1. Kitamura, T., Kitamura, Y., Kuroda, S., Hino, Y., Ando, M., Kotani, K., Konishi, H., Matsuzaki, H., Kikkawa, U., Ogawa, W., and Kasuga, M. Insulin-induced phosphorylation and activation of cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) 3B by the serine-threonine kinase Akt (1999) Mol. Cell. Biol. 19: 6286-6296.
2. Kawanishi, M., Tamori, Y., Okazawa, H., Araki, S., Shinoda, H., and Kasuga, M. Role of SNAP23 in insulin-induced translocation of GLUT4 in 3T3-L1 adipocytes. (2000) J. Biol. Chem. 275 : 8240-8247.
3. Masugi, J., Tamori, Y., Mori, H., Koike, T., and Kasuga, M. Inhibitory effect of a proline-to-alanine substitution at codon 12 of peroxisome proliferator-activated receptor- γ 2 on thiazolidinedione-induced adipogenesis. (2000) Biochem. Biophys. Res. Commun. 268 : 178-182.

学会発表

1. 北村 忠弘, 小川 渉, 北村 ゆかり, 黒田 祥二, 安藤 美和, 吉川 潮, 春日 雅人: インスリンによるホスホジエステラーゼ 3B (PDE3B) 活性化機構の解析: 第 42 回日本糖尿病学会年次学術集会 (1999)
2. 川西 正敏, 田守 義和, 岡澤 秀樹, 荒木 悟, 篠田 弘昭, 春日 雅人: 3T3-L1 脂肪細胞の GLUT4 トランスロケーションにおける SNARE 分子 SNAP23 の役割: 第 42 回日本糖尿病学会年次学術集会 (1999)
3. 森 啓行, 馬杉 治郎, 田守 義和, 柱本 満, 春日 雅人: ヒト PPAR γ 遺伝子変異とインスリン抵抗性: 第 36 回日本糖尿病学会近畿地方会 (1999)

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

ヒトとモデル動物の染色体対応を用いた糖尿病の遺伝解析

分担研究者：大阪大学加齢医学 池上博司
研究協力者：大阪大学加齢医学 川口義彦

研究要旨：多因子疾患である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、ヒト糖尿病に極めて近い病態を示す近交系モデルマウスを用いて遺伝子解析を行うとともに、ヒト糖尿病へのフィードバックを進めた。1型糖尿病のモデル NOD マウスにおいて class I MHC 領域にマップした *Idd16* のヒト対応遺伝子の同定を目的として、ヒト class I HLA 領域に新たに同定された遺伝子 MICA と 1型糖尿病の関連を検討した結果、発症年齢の若年化に有意に関与することを見出した。2型糖尿病のモデル NSY マウスにおいて遺伝子間の相互作用の検討を目的として、コントロール系統との正逆交配により 2種類の F1 ハイブリッドを作成し、表現型を親系統と比較解析した結果、表現型により遺伝様式が異なること、インスリン抵抗性は F1 ハイブリッドにおいて親系統よりも増強されること、性染色体が表現型の発現に影響することが明らかとなった。糖尿病の遺伝解析における遺伝子間相互作用の重要性を示唆する結果である。

A. 研究目的

多因子疾患である糖尿病の遺伝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。そこで、ヒト糖尿病に極めて近い病態を示す近交系モデルマウスを用いて遺伝子解析を行うとともに、ヒト糖尿病へのフィードバックを進めた。

B. 研究方法

・ 1型糖尿病：モデル動物 NOD マウスにおいてマップした *Idd16* (Ikegami H et al. J Clin Invest 96:1936, 1995) のヒト対応遺伝子同定を目的として、ヒト class I HLA 領域に新たに同定された MICA (MHC-class I chain-related gene A) の多型と 1型糖尿病の関連を検討した。

・ 2型糖尿病：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 マウスと正逆交配して 2種類の F1 ハイブリッドマウス作製し、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・脂肪肝ならびにインスリン負荷試験 (ITT) で判定したインスリン感受性などの表現型を両親系統と比較検討し、遺伝子間の相互作用ならびに性染色体の関与を検討した。

・ 倫理面への配慮：本研究は大阪大学倫理委員会ならびに動物実験施設の規定を遵守し、倫理面に配慮して行った。

C. 研究結果

・ 1型糖尿病：

1型糖尿病の疾患感受性と MICA の A4 アリルとの間に正の相関、A6 アリルと負の相関を認めた。フレームシフト変異を有する A5.1 アリルは若年発症の患者において有意に高頻度であった。A4, A6 アリルは DR4-DQB1*0401, DR2-DQB1*0601 ハプロタイプとそれぞれ連鎖不平衡にあったが、A5.1 アリルはいずれの class II HLA とも連鎖不平衡を示さず、class I の B7, Cw7 と強い連鎖不平衡を示した。

・ 2型糖尿病：

F1 ハイブリッドは正逆いずれの交配においても著明な耐糖能異常を示し、耐糖能が常染色体優性遺伝様式を示すことが明らかとなった。脂肪肝も常染色体優性遺伝様式を示したが、精巣上体脂肪量およびインスリン分泌不全は常染色体劣性遺伝様式を示した。体重・BMI は共優性遺伝様式を示した。インスリン抵抗性は F1 ハイブリッドにおいて NSY よりもさらに増強していた。大部分の表現型は正逆交配で差を認めなかったが、体重・アドリブ血糖・負荷後血糖は NSY が父親の場合に逆交配に比し有意に高値を示した。

D. 考察・結論

・ 1型糖尿病：

1型糖尿病のモデル動物 NOD マウスにおいて

我々が以前にマップした *Idd16* は1型糖尿病の発症頻度を著明に抑制すると共に、発症年齢を遅延させる遺伝子座である (J Clin Invest 96:1936,1995)。その後、*Idd16* のヒト対応遺伝子座の同定を目的として class I HLA と1型糖尿病の疾患感受性ならびに異質性の関連を検討し、class I HLA 領域の近傍に発症年齢を規定する遺伝子が存在することを報告してきた (Diabetologia 38:1493,1995)。今回、class I 領域に新たに同定された MICA 遺伝子のコーディング領域の多型が発症年齢と有意の関連を示したことから、この領域に *Idd16* の対応遺伝子が存在し、1型糖尿病の疾患感受性、特に発症年齢に強く関与することが裏付けられた (論文業績5)。今回、有意の関連を示した A5.1 アリルはフレームシフトを生じ、細胞膜貫通領域で早期ストップコドンが出現した変異分子をコードする。MICA は δT 細胞や NK 細胞の活性化に関わる分子であることから、1型糖尿病の強力な候補遺伝子であり、この変異そのものが疾患感受性アリルである可能性も考えられる。A5.1 アリルは以前に我々が発症年齢との関連を報告した B7, Cw7 と強い連鎖不平衡にあったことから、MICA (A5.1)-B7-Cw7 ハプロタイプ上に疾患感受性 (発症年齢規定) 遺伝子が存在することが強く示唆される。さらに、今回の結果により NOD マウスで同定された疾患感受性遺伝子に関してヒト対応遺伝子の存在が確認されたことから、モデル動物とヒトの染色体対応によるアプローチが多因子疾患の遺伝解析において極めて有用で強力なアプローチ法であることが示された。

・2型糖尿病

2型糖尿病は1型糖尿病以上に異質性が強く、遺伝解析に際して困難が予想されることから、モデル動物からのアプローチが不可欠である。我々が従来より解析を進め、ゲノムスキャンにより遺伝子マッピングもしてきた2型糖尿病のモデル動物 NSY マウス (論文業績1) において、コントロールとの F1 ハイブリッドマウスを作出し、両親系統からの遺伝子の相互作用ならびに性染色体の関与を検討した結果、表現型により遺伝様式が異なること、インスリン抵抗性に関しては F1 においてより形質が増強されること (ヘテロシス)、体重・負荷後血糖に関しては modifier として作用することが明らかとなった (論文業績2, 8)。今回の結果は、2型糖尿病における遺伝の複雑性を示すと共に、中間表現型も含めて各表現型を詳細に検討し、それぞれについての遺伝的な関与を個別に解析することの必要性を示すものと

考えられる。既にマップしている複数の2型糖尿病遺伝子座 (論文業績1) に関しても、この点を考慮しながら現在遺伝子の同定を進めているところである。

E.研究発表

1. 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* 48:1168-1174, 1999
- (2) Ueda H, Ikegami H, Kawaguchi Y, Fujisawa T, Nojima K, Babaya N, Yamada K, Shibata M, Yamato E, Yamato E, Ogihara T: Age-dependent changes in phenotypes and candidate gene analysis in a polygenic animal model of type II diabetes, NSY mouse. *Diabetologia* 2000 (in press)
- (3) Yamada K, Ikegami H, Yoneda H, Miki T, Ogihara T: All patients with Werner's syndrome are insulin resistant, but only those who also have impaired insulin secretion develop overt diabetes. *Diabetes Care* 22:2094-2095, 1999
- (4) Fujisawa T, Ikegami H, Tsutsui T, Kawaguchi Y, Ueda H, Shintani M, Nojima K, Kawabata Y, Ono M, Nishino M, Noso S, Yamada K, Babaya N, Ogihara T: Renal tubular function affects glycosuria-related urinary excretion of 1,5-anhydroglucitol. *Diabetes Care* 22:863-864, 1999
- (5) Kawabata Y, Ikegami H, Kawaguchi Y, Fujisawa T, Hotta M, Ueda H, Shintani M, Nojima K, Ono M, Nishino M, Taniguchi H, Noso S, Yamada K, Babaya N, Ogihara T: Age-related association of MHC class I chain-related gene A (MICA) with type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Human Immunology* 2000 (in press)
- (6) Fujisawa T, Ikegami H, Kawaguchi Y, Yamato E, Nakagawa Y, Shen G-Q, Fukuda M, Ogihara T: Length rather than a specific allele of dinucleotide repeat in the 5' upstream region of the aldose reductase gene is associated with diabetic retinopathy. *Diabetic Medicine* 16:522-526, 1999
- (7) 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 16:522-526, 1999

- (8) Ueda H, Ikegami H, Kawaguchi Y, Fujisawa T, Nojima K, Babaya N, Yamada K, Shibata M, Yamato E, Ogihara T:
Paternal-maternal effects on phenotypic characteristics in spontaneously diabetic Nagoya-Shibata-Yasuda mice.
Metabolism 2000 (in press)

2. 学会発表

- (1) Ueda H, Ikegami H et al.: Genetic analysis of late-onset type 1 diabetes in spontaneously diabetic NSY mice. The 59th Scientific sessions of American Diabetes Association, San Diego, USA, June 20, 1999
- (2) Hotta M, Ikegami H et al.: Overexpression of an antioxidative and antiapoptotic protein, thioredoxin, protects pancreatic b-cells in autoimmune diabetes. The 59th Scientific sessions of American Diabetes Association, San Diego, USA, June 20, 1999

厚生科学研究補助金（ヒトゲノム遺伝子治療研究事業「糖尿病」）
（分担）研究報告書

罹患同胞対を用いた 2 型糖尿病遺伝子の単離に関する研究

研究者 岩崎直子 東京女子医科大学 糖尿病センター 講師
岩本安彦 東京女子医科大学 糖尿病センター 所長

研究要旨

糖尿病の遺伝解析においては単一遺伝ならびに多因子遺伝の両側面を考慮する必要がある。前者の遺伝解析には MODY を、また後者に関しては罹患同胞対を対象として研究を継続している。2 型糖尿病の疾患感受性遺伝子座位の検討では 17 箇所の連鎖の可能性の否定できない領域をピックアップした。MODY の原因遺伝子の解析では、今年度は候補遺伝子である HNF-3 β , HNF-3 α , HNF-4 γ , Neurogenin 3 の 4 種類の転写因子遺伝子について検討したが MODY の原因と考えられる変異は認めなかった。新規の MODY5/HNF-1 β 遺伝子の遺伝子変異を有し、泌尿生殖器系の発生異常を合併する家系を見出した。MODY1/HNF-4 α 遺伝子変異の細胞レベルでの機能解析においては、Q268X 変異蛋白が特異的に核小体に局在する現象を認め糖尿病発症との関連が示唆された。

A. 研究目的

日本の糖尿病患者数は全人口の 7% であり、さらに増加すると予測されている。日本人糖尿病患者のおよそ 95% は 2 型糖尿病であるが、2 型糖尿病は一般に無症状であるため、約半数の患者は未診断、未治療であると推定されている。また、自覚的症状に乏しいことから治療中断例も少なくない。そのため、糖尿病網膜症により成人で中途失明する者は年間約 3000 人、また糖尿病性腎症により新規に透析に導入される者は年間 10000 人を超し、さらに増加が見込まれている。これに伴い新規医療費負担が生じ、単に患者自身の Quality of life の低下に留まらず、糖尿病に関連した医療費が急増する原因となっている。従って、糖尿病の予知、予防の実現化は重要な課題である。糖尿病は遺伝素因を有する個体に発症するため、糖尿病にかかりやすい体質に関連した何らかの遺伝マーカーを明らかにし、疾患感受性を有する者に対して適切な生活指導等の介入を行って発症を予防することは極めて現実的かつ効果的であると考えられる。

このような遺伝マーカーを同定すること、また、単一遺伝による糖尿病の遺伝解析は発症機構の解明において重要であるため、新たな原因遺伝子を見出し、その発症機構を解析することを目的とする。

B. 研究方法

(1) 多因子遺伝としての糖尿病の遺伝解析は罹患

同胞対法を用いて検討を行っている。今年度より ABI377 自動シークエンサーによる蛍光色素を用いたタイピングシステムが稼動するようになった。マーカーパネルは Dye-labeled Human Map Pairs, Version 9/9aRG (Research Genetics 社) を使用。現在のサンプル数は約 500 例である。

(2) 単一疾患としての糖尿病の原因遺伝子の解析は MODY および正常対照について HNF-3 β , HNF-3 α , HNF-4 γ , Neurogenin 3 の 4 種類の転写因子遺伝子を直接塩基配列決定法により検討した。

(3) 我々が既に報告した MODY1/HNF-4 α 遺伝子変異(R127W)および最初に見い出された Q268X 変異について解析した。COS7, MIN6, CHO の各培養細胞に変異遺伝子を transient に導入し、生細胞内での変異蛋白の局在を蛍光で標識することにより観察した。さらに、変異蛋白が正常蛋白と 2 量体を形成し得るか否かを 2 種類の蛍光で標識することにより検討した。

(倫理面への配慮) 1998 年 10 月以降は倫理委員会の承認を得た書式による同意を徹底している。ただし、それ以前においても 1993 年より糖尿病の遺伝研究という主旨を説明し、署名を得て患者より DNA を収集するよう配慮してきた。

C. 研究結果

(1) 2 型糖尿病の疾患感受性遺伝子座位の検討では

17 箇所の連鎖の可能性の否定できない領域をピックアップし、2nd Research Symposium on the Genetics of Diabetes. (San Jose)において発表した。最も統計学的に可能性の高い領域は第 21 番染色体長腕上に認められたが、このマーカーの特定のアレルを持つ者と持たない者に分けて、他の候補領域との相互作用を検討した結果、第 21 番染色体長腕上のマーカーの関与が改めて確認された（未発表データ）。現在さらに、関心領域について fine mapping を施行している。

(2) 転写因子でかつ膵β細胞の分化に関連する 4 種類の以下の候補遺伝子について MODY の原因遺伝子の可能性を検討した。HNF-3β, HNF-3α, HNF-4γ, Neurogenin 3 のいずれにおいても病因と考えられる変異は認められなかった。新規の MODY5/HNF-1β遺伝子の遺伝子変異を有し、泌尿生殖器系の発生異常を合併する家系を見出した。

(3) MODY1/HNF-4α 遺伝子 R127W 変異では変異蛋白の細胞内局在は対照と同様であったが、Q268X 変異では核内の特に核小体に局在することを認めた。また、ヒトではすべて hetero 変異で糖尿病が発症していることから、Q268X 変異蛋白が dominant negative に作用するには正常 HNF-4α蛋白に結合すると予想される。EGFP および EBFP で正常および変異蛋白を標識し、両者が 2 量体を形成して核内に移行することを確認した。

D. 考察

(1) 最近、メキシコ系アメリカ人およびフィンランド人 2 型糖尿病同胞対を用いた解析の成績が続いて報告されたが、これらの結果から、[1] 2 型糖尿病の疾患感受性遺伝子座位の解析において罹患同胞対法が高い有用性を示すこと、[2] 2 型糖尿病の発症に比較的大きな効果を持つ Major gene が存在しうること、[3] 2 型糖尿病の遺伝素因には人種により不均一性が認められること、の 3 点が確認された。従って今後このプロジェクトを完結させることが重要であり、これにより日本人 2 型糖尿病原因遺伝子について知見が得られると期待される。

(2) MODY の原因遺伝子として HNF-3β, HNF-3α, HNF-4γ, Neurogenin 3 の各転写因子遺伝子の関与はさほど高くないと考えられる。日本人 MODY パネル 57 例を対象にこれまでに 15 種類以上の候補遺伝子の検索を終了したが、現在でも 80% の MODY の原因遺伝子は不明であ

り、今後もさらに解析を継続する必要がある。なお、最も高頻度に変異が認められた遺伝子は MODY3/HNF-1α である。また、MODY5/HNF-1β遺伝子の遺伝子変異を有する家系は今回の症例を含め、世界で 6 家系となるが、うち 3 家系(50%)で泌尿生殖器系の奇形の合併を認めており、HNF-1β遺伝子が泌尿生殖器系の発生異常をもたらす可能性が強く示唆された。

(3) MODY1/HNF-4α Q268X 変異蛋白で認められた現象は新知見であり、その解釈および意義については細胞周期との関連などからさらに検討する必要がある。また、Q268X 変異蛋白が正常蛋白と結合することを証明できたことは本変異による糖尿病の発症を考える上で重要な成績である。

E. 結論

以上のような手法による糖尿病の遺伝解析の継続により、今後さらに情報が集積され、将来的には糖尿病の予防に寄与できる可能性が高いと考えらる。

F 研究発表

1. 論文発表

- (1) K. Yanagisawa, N. Iwasaki, M. Sanaka, S. Minei, M. Kanamori, Y. Omori, Y. Iwamoto
Polymorphism of the β 3-adrenergic receptor gene and weight gain in pregnant diabetic women..
Diab. Res. Clin. Pract. 44: 41-47, 1999
- (2) Y. Hinokio, Y. Horikawa, H. Furuta, N. J. Cox, N. Iwasaki, M. Honda, M. Ogata, Y. Iwamoto, G. I. Bell
β-Cell Transcription Factors and Diabetes: No Evidence for Diabetes Associated Mutations in the Hepatocyte Nuclear Factor-3 β Gene (HNF3B) in Japanese Patients with MODY.
Diabetes 49: 302-305, 2000
- (3) L. Bosque-Plata, Y. Horikawa, P. Schwarz, N. J. Cox, N. Iwasaki, M. Ogata, Y. Iwamoto, M. S. German, G. I. Bell
β -Cell Transcription Factors and Diabetes: No Evidence for Diabetes-Associated Mutations in the Coding Region of the Pro-endocrine Neurogenin 3 Gene (NEUROG3) in Japanese Patients with MODY.
Diabetes (submitted)
- (4) M. Hara, X. Wang, V.P. Paz, N. J. Cox, N. Iwasaki, M. Ogata, Y. Iwamoto, G. I. Bell
No diabetes-associated mutations in the coding region of the hepatocyte nuclear factoe- 4γ (HNF4G) in Japanese patients with MODY.

2. 学会発表

- (1) 岩崎直子、尾形真規子、横川博英、朝長修、馬場園哲也、宇治原典子、高橋千恵子、岩本安彦
HNF 遺伝子変異を有する糖尿病の臨床的特徴について
第 96 回日本内科学会総会
1999 年 3 月 30 日-4 月 1 日 東京
日本内科学会雑誌 87(臨時増刊号):303, 1999
- (2) 尾形真規子, 岩崎直子, 織田直久,
古田浩人, 堀川幸男, 岩本安彦
転写因子遺伝子変異の日本人 MODY における頻度.
第 36 回日本臨床分子医学会学術総会
1999 年 4 月 23 日 福岡
日本臨床分子医学会記録 36:34, 1999
- (3) 岩崎直子、尾形真規子、横川博英、朝長修、馬場園哲也、宇治原典子、高橋千恵子、岩本安彦
糖尿病に合併した腎障害における HNF-1 β 遺伝子および 3243 ミトコンドリア遺伝子変異の関与について
第 42 回日本糖尿病学会年次学術集会
1999 年 5 月 13-15 日 横浜市
糖尿病 Vol 42 Supple 1 : s-256
- (4) 尾形真規子, 岩崎直子, 横川博英, 岩本安彦,
淡路健雄, 宮崎俊一
変異 HNF-4a 蛋白の細胞内局在の変化に関する検討
第 42 回日本糖尿病学会年次学術集会
1999 年 5 月 13-15 日 横浜市
糖尿病 Vol 42 Supple 1 : s-256
- (5) N. Iwasaki, M. Ogata, H. Yokokawa, O. Tomonaga, T. Babazono, N. Ujihara, Y. Iwamoto.
Mutations in the HNF-1b and Mitochondrial tRNA^{Leu(UUR)} genes and kidney dysfunction in Japanese patients with diabetes.
59 th Annual Scientific Meetings and sessions of American Diababetes Association
San Diego, June19-22, 1999
Diabetes 48:Supple (1) A146 No. 0630
- (6) N. Iwasaki, Wang Y-Q, N.J. Cox, M. Ogata, Y. Iwamoto.
A Genome -wide Screen for Type 2 diabetes susceptibility genes in Japanese.
2nd Research Symposium on the Genetics of Diabetes.
San Jose, Ocober, 16-18, 1999
2nd Research Symposium on the Genetics of

- (7) 岩崎直子, 岡部一郎, 尾形真規子, 岩本安彦
Splicing-donor site に変異を認めた MODY5 家系
第 37 回日本臨床分子医学会学術総会
2000 年 3 月 10-11 日 東京
第 37 回日本臨床分子医学会学術総会抄録集 34:02
- (8) 尾形真規子, 淡路健雄, 岩崎直子, 岩本安彦, 宮崎俊一.
細胞内局在からみた MODY1 発症の分子メカニズムの検討.
第 37 回日本臨床分子医学会学術総会
2000 年 3 月 10-11 日 東京
第 37 回日本臨床分子医学会学術総会抄録集 34:01

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

糖尿病発症に関与する遺伝子の単離・同定に関する研究

分担研究者：岡 芳知 山口大学第3内科

研究要旨:

Wolfram 症候群と臨床診断された日本人症例の約半数に、WFS-1 遺伝子のエクソンに変異が認められた。変異は多種にわたっており、我が国に特有の変異はない。約半数では WFS-1 遺伝子変異が認められず、このような例では臨床像にも非典型的なものがしばしば認められ、WFS-1 以外の遺伝子異常の関与が考えられた。大学病院小児糖尿病専門外来では、小児インスリン依存型糖尿病の約 1% に WFS-1 遺伝子変異が認められ、いずれも視神経萎縮を伴っていた。視神経萎縮を有する糖尿病では、WFS-1 遺伝子変異の検索をすすめるべきと思われる。

A. 研究目的

Wolfram 症候群 (別名 DIDMOAD 症候群) は、インスリン治療を必要とする若年発症糖尿病と視神経萎縮を主徴とし、尿崩症、感音性難聴、精神神経障害などを合併する常染色体劣性遺伝疾患である。我々は、日本人 3 家系を主要な解析家系とした positional cloning により、この原因遺伝子を世界に先駆けて同定し、WFS-1 と名付けた (Inoue, Tanizawa et al. Nature Genetics 1998)。

そこで本研究では、我が国における Wolfram 症候群における WFS-1 遺伝子変異の頻度、種類、WFS-1 遺伝子変異と臨床像との関係などを明らかにする。

B. 研究方法

WFS-1 遺伝子の 8 エクソンすべてについて、PCR 直接シーケンス法にて遺伝子変異を検索するとともに、その臨床症状などを検索した。担当医がインフォームドコンセントを得て遺伝子検索を依頼してきており、また患者情報の漏洩のないよう検体は無作為の一連番号とした。

C. 研究結果

15 家系のうち 7 家系 12 症例で WFS-1 遺伝子変異が同定された。変異の種類は、frameshift, in-frame deletion, missense, insertion とさまざまであった。いずれの症例も、変異の homozygote あるいは compound heterozygote であり、変異の 1 つが第 5 エクソンの missense 変異であった以外は、すべて第 8 エクソンに変異が認められた。

日本人 Wolfram 症候群患者での WFS-1 遺伝子変異

Nucleotide Change	Type of mutations	Amino Acid Change	Exon/ Intron	Families/ Status
2642del(TC)	Frameshift	Del882fs/ter937	Exon 8	WS-1J / Hom
1515del15bp	In-frame deletion	Del508 YVYLL	Exon 8	WS-2J / Hom
2171C→T	Missense	P724L	Exon 8	WS-3J / Hom
1295T→G	Missense	L432R	Exon 8	WS-4J / Het
1552A→G	Missense	M518V	Exon 8	WS-4J / Het
563C→G	Missense	N188S	Exon 5	WS-5J / Het
1359del(C)	Frameshift	Del453fs/ter475	Exon 8	WS-5J / Het
908T→C	Missense	L303P	Exon 8	WS-11J / Het
1254ins3bp	Insertion	Ins419L	Exon 8	WS-11J / Het
796C→T	Missense	Q266X	Exon 8	WS-12J / Hom

臨床像では、糖尿病が 12 症例すべてに認められ、平均発症年齢は 8.5 歳であった。11 例に視神経萎縮を認め、その平均発症年齢は 11.3 歳と、糖尿病発症の約 3 年後であった。

WFS-1 遺伝子変異を有する患者の臨床像

Patients (M/F)	12 (6M/6F)	
Families	7	
Consanguinity	9 / 12 (0.75)	
Family History	8 / 12 (0.67)	Ave. Age of Onset
Diabetes Mellitus	12/12 (1.00)	8.5y (1-27, n=12)
Optic Atrophy	11/12 (0.92)	11.3y (5-27, n=8)
Deafness	6 / 12 (0.50)	10.3y (9-12, n=3)
Diabetes Insipidus	4 / 12 (0.33)	15.5y (12-19, n=4)
Renal Tract	6 / 12 (0.50)	16.5y (10-27y, n=6)

臨床像がよく収集され、しかも WFS-1 遺伝子変異が認められない (厳密には、WFS-1 のエクソン

部分には変異が認められない) 7 症例では、痙性麻痺や低身長など、通常の Wolfram 症候群では認められない症候がいくつか認められた。

大学病院専門外来に通院した小児インスリン依存型糖尿病 250 例で検討すると、7 例で視神経萎縮があり、そのうち 3 例で WFS-1 遺伝子変異が認められた (大阪市立大医学部小児科との共同研究)。

D. 考察

- 1) Wolfram 症候群と臨床診断された日本人症例の約半数に、WFS-1 遺伝子のエクソンに変異が認められた。
- 2) Wolfram 症候群と臨床診断された日本人症例の約半数では WFS-1 遺伝子変異が認められず、臨床像にも非典型的なものがしばしば認められた。
- 3) 大学病院の専門外来という特殊性はあるが、小児インスリン依存型糖尿病の約 1% に WFS-1 遺伝子変異が認められ、いずれも視神経萎縮を伴っていた。

E. 結論

- 1) WFS-1 遺伝子変異は多種にわたっており、我が国に特有の変異はない。遺伝子変異の種類により臨床像が異なる可能性については、さらに多数数での検討が必要である。
- 2) 視神経萎縮を有する小児期発症のインスリン依存型糖尿病では、WFS-1 遺伝子変異の検索をすすめるべきと思われる。

F. 研究発表

なし (投稿論文準備中)

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

糖尿病発症に関与する遺伝子の単離・同定に関する研究

分担研究者 門脇 孝 東京大学大学院医学系糖尿病・代謝内科 講師

研究要旨

わが国における糖尿病人口は現在 690 万人と推定され急速な増加を示しておりその原因を究明することが急務となっている。一般の 2 型糖尿病はインスリン分泌不全やインスリン抵抗性の遺伝因子と肥満や運動不足などの環境因子が重なって発症する多因子病である。我々は多因子病としての 2 型糖尿病の原因遺伝子の解析にさいし、発生工学的手法を用いて遺伝因子の明確なモデル動物を作製し環境因子の負荷により一般の 2 型糖尿病の成因に迫るとともに、我々日本人で糖尿病が急増している原因を明らかにするため候補遺伝子の手法を用いて検討を行った。

A. 研究目的

転写因子で核内受容体である PPAR γ は脂肪細胞の分化に必須の役割を担っている。インスリン抵抗性改善薬のチアゾリジン誘導体は PPAR γ の活性を亢進させ、脂肪細胞の分化が促進し小型の脂肪細胞が増加することにより、インスリン抵抗性が改善することを先に明らかにしている。しかしながら、分化が活発には生じていないと考えられる成人の脂肪組織が高脂肪食などの環境因子により肥大しインスリン抵抗性が惹起される際 PPAR γ がどのような役割を担っているかは不明であった。そこで脂肪細胞の肥大化やそれに伴うインスリン抵抗性の惹起における PPAR γ の役割を明らかにするため、PPAR γ 欠損マウスを作製し表現型を解析するとともにヒト PPAR γ 遺伝子多型の意義について検討を行った。

B. 研究方法

- (1) 発生工学的手法を用いて PPAR γ 欠損マウスを作製しその表現型を解析した。
- (2) 2 型糖尿病患者 415 人と 60 歳以上、HbA1c6% 未満でかつ家族歴を持たない非糖尿病患者 541 人を対象に PPAR γ Pro12Ala 多型の頻度やと臨床的諸指標との関連につき Case-Control Study を行った。
(倫理面への配慮)
- (2) に関しては、文書による同意が取られた方のみ DNA を採取し、かつ研究に関して学内の倫理委員会から了承されている。

C. 研究結果

- (1) PPAR γ ホモ欠損マウスは胎生 10.5 日から 11.5

日にかけて死亡が確認された。この時期の胎仔には PPAR γ は発現せず、胎盤組織でのみ発現が認められることなどから、PPAR γ 欠損によって胎盤の機能が障害されるためであると考えられた。これに対してヘテロ欠損マウスでは成長や生殖能力は正常で、耐糖能も普通食の下では異常を認めなかった。ところが高脂肪食を负荷した条件下では野生型は普通食下に比較して著明な体重増加を示したが、ヘテロ欠損マウスでは体重増加の程度が著明に抑制されていた。また、ヘテロ欠損マウスでは野生型に比べ白色脂肪組織重量の増加が 70% 程度減少しており、高脂肪食による脂肪の蓄積が抑制されていることが明らかとなった。更に、高脂肪食下では野生型は著明な脂肪肝を来すがヘテロ欠損マウスでは部分的に抑制されていた。次に個々の脂肪細胞の大きさについて検討した。高脂肪食では両方のマウスで径の大きい脂肪細胞の数が増加しており高脂肪食による脂肪細胞の肥大化が認められた。しかし細胞径の平均値を比較すると、ヘテロ欠損マウスでは野生型に比して脂肪細胞の径が小さいことが分かり高脂肪食下で普通なら起きるであろう脂肪細胞の肥大化や肥満が部分的に抑制されることが明らかとなった。次にインスリン感受性についての検討をインスリン負荷試験で行った。高脂肪食負荷前では野生型とヘテロ欠損マウスでインスリンの血糖を後下させる作用に差を認めなかったが、15 週間高脂肪食を负荷した後では野生型に比べヘテロ欠損マウスでのインスリンの血糖後下作用が高く、インスリン抵抗性の出現が見ら

れなかった。このことよりヘテロ欠損マウスは野生型に比しインスリン感受性が高いことが分かった。高脂肪食下では、ヘテロ欠損マウスは野生型に比して摂餌量が少なく、また直腸の温度が高いため基礎代謝率が高いことが分かった。PPAR γ ヘテロ欠損マウスで高脂肪食下での摂餌量の減少と基礎代謝率の上昇にレプチンが関与している可能性があると考え、両マウスにおけるレプチン動態につき検討を行った。ヘテロ欠損マウスでは脂肪細胞が小型であるにもかかわらず脂肪細胞でのレプチン発現が亢進し、脂肪組織重量が少ないにもかかわらず野生型に比べて血中レプチン濃度が高いことが分かった。また、ヘテロ欠損マウスでは一定量のレプチンを外部から投与したときの摂餌量や体重の減少は野生型と差がないことから、レプチンの発現や分泌が高くレプチンの作用が亢進していることによって、摂餌量が少なく体温が高いことが推測された。チアゾリジン誘導体を投与すると脂肪細胞でのレプチンの発現が低下することが報告されている。やはり転写因子で脂肪細胞の分化に重要である C/EBP α はレプチンのプロモーター領域に結合しレプチン遺伝子の発現を亢進させることが分かっているが PPAR γ はその C/EBP α のレプチン遺伝子転写活性作用を抑制すると考えられている。そこでヘテロ欠損マウスのレプチン発現の亢進は PPAR γ のレプチン発現の抑制が一部解除されたためであるという仮説が成り立つため、EF 細胞を脂肪細胞へと分化させるシステムでレプチンの発現につき検討を行った。PPAR γ が全く欠如したホモの EF 細胞は、脂肪細胞へ分化しないためレプチンの発現も全くなかった。ところが二つのアレルのうち一方がなくなった状態のヘテロの EF 細胞は、脂肪細胞への分化が野生型の約 50% と低下していたにもかかわらず、レプチンの発現が野生型由来に比べて高く、また、分泌されたレプチン濃度も高いことが認められた。このことから PPAR γ の一方のアレルが欠損すると、PPAR γ がレプチン発現を抑える作用が一部解除されることによってレプチンの発現や分泌が亢進することが分かった。

- (2) 脂肪細胞に特異的な PPAR γ 2 遺伝子の変異や多型をスクリーニングし 12 番目のアミノ酸のプロリンがアラニンに代わった多型を同定した。この変異体ではチアゾリジン誘導体による PPAR γ 転写活性上昇作用が低下しており、

マウスでも 12 番目のアミノ酸がヒトと同じくプロリンであることを考えると、12 番目がアラニンであるヒトは PPAR γ ヘテロ欠損マウスと同じ様な表現型を持っている可能性があると考えられた。そこで、この PPAR γ 遺伝子 Pro12Ala 多型の影響を検討するため、2 型糖尿病と非糖尿病者につき本多型と臨床的な諸指標の関連につき検討を行った。空腹時インスリン値や、インスリン抵抗性を比較的良く表すとされる HOMA の指標は全体を含めた比較では有意差を認めなかった。しかし、BMI22 未満のやせ型、22 から 25 未満の正常者、25 以上の過体重及び肥満者の 3 群に層別化した検討では、過体重および肥満者において本多型をもつものは持たないものに比べて空腹時 IRI (57.4 ± 5.23 vs. 70.6 ± 2.53 pmol/l, $p = 0.03$) と HOMA の指標 (1.89 ± 0.18 vs. 2.35 ± 0.09 , $p = 0.03$) が有意に低く、インスリン感受性が高いことが示唆された。また PPAR γ Pro12Ala 多型保持者は非保持者に比して血中レプチン濃度が高い傾向にあった (8.02 ± 1.04 vs. 6.27 ± 0.20 ng/ml, $p = 0.08$)。次に 2 型糖尿病と非糖尿病で Pro12Ala 変異の頻度を検討した。糖尿病では Ala12 のアレル頻度は 1.8% であるのに対して非糖尿病で 4.3% と、非糖尿病者の方で有意に高頻度であった。また、オッズ比が 0.413 (95% 信頼区間; 0.220-0.735) と Ala 多型保持者は 2 型糖尿病の発症リスクが低いことが分かった。年齢、性別、BMI で調整したオッズ比も 0.324 (95% 信頼区間; 0.152-0.658) と低く、Ala 多型を有するものは有しないものに比べて糖尿病を発症しにくいという結果となった。

D. 考察

高脂肪食下でヘテロ欠損マウスでは脂肪細胞の肥大化やインスリン抵抗性の出現が野生型に比べ抑制されていることから、野生型 PPAR γ は高脂肪食での脂肪細胞肥大化やインスリン抵抗性を媒介しているのと考えられる。飢餓の時代にはエネルギーを節約、蓄積する傾向のある遺伝的素因を持つ個体が生存に有利であったが、現代の飽食の時代では、その様な遺伝的素因を持つ個体はエネルギー効率が良好なために肥満や脂肪の蓄積を来しやすく、糖尿病をはじめとする生活習慣病を発症しやすいという儉約遺伝子 (thrifty gene) 仮説が提唱されている。PPAR γ はレプチンの発現を抑制し脂肪細胞の肥大化を媒介することからまさに儉約遺伝子であると考えられた。ヒトにおいても、肥満群で Ala 多型保持者は非保持者に比べてインス

リン感受性が高くヘテロ欠損マウスでの結果と非常に良く合致していること、Ala 多型頻度が非糖尿病群の方で有意に高いことから PPAR γ Pro12Ala 多型は糖尿病抵抗性因子として働いていると考えられた。PPAR γ Pro12Ala 多型頻度が欧米人と比し日本人で低いことは日本人が欧米型の生活習慣にさらされた時に糖尿病を発症しやすい一つの原因である可能性がある。

E. 結論

PPAR γ 遺伝子はヒトでもマウスでも俊約遺伝子と考えられ、その活性や量の部分的低下は高脂肪食による肥満や2型糖尿病の発症を抑制する可能性がある。PPAR γ 遺伝子 Pro12Ala 多型の有無による糖尿病発症リスクの同定と、生活習慣への介入による一次予防を行うことが期待できる。

F. 研究発表

1. 論文発表

Kubota, N., Terauchi, Y., Miki, H., Tamemoto, H., Yamauchi, T., Komeda, K., Satoh, S., Nakano, R., Ishii, C., Sugiyama, T., Eto, K., Tsubamoto, Y., Okuno, A., Murakami, K., Sekihara, H., Hasegawa, G., Naito, M., Toyoshima, Y., Tanaka, S., Shiota, K., Kitamura, T., Fujita, T., Ezaki, O., Aizawa, S., Nagai, R., Tobe, K., Kimura, S., and Kadowaki, T. : PPAR γ mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance.

Mol.Cell 4: 597-609, 1999

2. 学会発表

1. Kadowaki, T. : The Role of PPAR γ in High-Fat Diet -Induced Obesity and Insulin Resistance
2nd Research Symposium on the Genetics of Diabetes(American Diabetes Association) 1999年10月18日
2. Hara, K., Kadowaki, T., et al. : The Role of PPAR γ in Insulin Resistance
1st International Forum on Progressive Endocrinology 平成12年2月11日
3. 原一雄、門脇 孝 : PPAR γ 遺伝子の糖尿病発症における役割
第37回日本臨床分子医学会学術総会 平成12年3月10日

2型糖尿病患者における Syntaxin 1A、CDK4 および Isl-1 遺伝子異常の検索

分担研究者 三家登喜夫 和歌山県立医科大学臨床検査医学 教授

研究要旨：2型糖尿病患者を対象に、膵β細胞のインスリン分泌やβ細胞の分化/増殖に関係すると思われる遺伝子[Syntaxin 1A（分泌）、cyclin dependent kinase 4(CDK4)、islet1-1 (Isl-1)（分化/増殖）]の変異の有無を検索した結果、Syntaxin 1A 遺伝子と CDK4 遺伝子には糖尿病と関連すると考えられる変異は存在しなかったが、Isl-1 遺伝子では、nonsense 変異(Q310X)を有する糖尿病患者1名を発見した。本患者は比較的若年発症であり濃厚な糖尿病の家族歴を有していた。また、本変異を導入した Isl-1 蛋白の転写活性は低下しており、糖尿病発症との関連性が考えられた。

A. 研究目的

膵β細胞のインスリン分泌(syntaxin 1A)や、分化/増殖(CDK4、Isl-1)に関係する3個の遺伝子に焦点をあて、2型糖尿病患者における変異の有無をスクリーニングした。

B. 研究方法

2型糖尿病患者77名、非糖尿病患者180名の genomic DNA を対象に、Polymerase Chain Reaction(PCR)/Single Strand Conformational Polymorphism(SSCP)法にて遺伝子変異の有無を検索した。異常バンドを検出した際には、直接 sequencing 法にて塩基配列を決定した。

C. 研究結果：

1) Syntaxin 1A 遺伝子

PCR 法にて BAC をスクリーニングして得た clone を用いて、Exon-intron 構造を決定した結果、本遺伝子は合計10個のエクソンより構成されていた。SSCP 法にて全エクソンにつき変異の有無をスクリーニングしたが、糖尿病と関連する変異は認められなかった。

2) CDK4 遺伝子

PCR/SSCP 法（20例では直接 sequencing 法）にて変異の有無を検索したが、糖尿病と関連する変異は認められなかった。

3) Isl-1 遺伝子

本遺伝子の調節領域と全エクソンを PCR/SSCP 法により変異の有無を検索した結果、1例の糖尿病患者にノンセンス変異(Q310X)を発見した。本変異（ヘテロ接合体）を有する患者（49才男性、SU剤治療）は、32才発症の非肥満者であり、発症時と42才時に一時的なインスリン治療の既往を有していた。家系調査の結果、糖尿

病である母と14才の次女[OGTTでは正常型であるが、変異を有さない17才の長女に比しOGTT時の血糖(BS)とインスリン(IRI)の比： Σ (IRI/BS)は明らかに低値]が変異をヘテロ接合体で有していた。変異体を用いた発現実験にて、変異体の転写活性は野生体に比し明かに低下していた。

D. 考察

Syntaxin 1A は開口分泌に関与する蛋白であり膵β細胞で発現しておりインスリン分泌に関与していると考えられている。本遺伝子の構造は明確にはされていなかったが、本研究にて Exon-intron 構造が明かとなり PCR 法による変異の検索が可能となった。しかし、今回の検討では2型糖尿病患者で特異的な遺伝子変異は存在しなかった。CDK4 は細胞周期の調節に関与する蛋白であるが、本遺伝子の knockout mice は糖尿病を発症することや、本遺伝子を過剰に発現する target mice では膵β細胞の過形成が観察されるなど、CDK4 がβ細胞の増殖に関与している可能性が考えられていた。しかし、今回の検討では2型糖尿病患者における本遺伝子の異常は見い出せなかった。Isl-1 は膵の形成に関与する転写因子であるが、今回の検討にて機能低下が存在すると思われる本遺伝子変異 Q310X をヘテロ接合体で持つ2型糖尿病患者を発見した。本変異は非糖尿病患者には存在せず、家系調査にて本変異と糖尿病との関連性が示唆された。以上より、本変異は2型糖尿病の成因としての多遺伝子異常のうちの一つである可能性が考えられた。

E. 結論

Syntaxin 1A 遺伝子および CDK4 遺伝子は2型糖尿病の候補遺伝子としての可能性は少ないが、Isl-