

- S, Akao T, Tuchiya N, Shimada N, Wasa Y, Koizumi A, Chihara J, Ogawa O, Kato T (2000) Association of vitamin D receptor gene polymorphisms with prostata cancer and benign prostatic hyperplasia in Japanese population. *Cancer Res* 60:305-308
- 4) Noguchi A, Shoji Y, Koizumi A, Takahashi T, Shoji Y, Matsumori M, Kayo T, Oohata T, Wada Y, Yoshimura I, Maisawa S, Konishi M, Takasago Y, Takada G (2000) SLC7A7 genomic structure and novel variants in three Japanese lysinuric protein intolerance families. *Human Mut* 15:367-372
- 5) Koizumi A, Shouji Y, Nozaki J, Noguchi A, Xiaofei E, Dakeishi M, Ohura H, Kayo T, Wada Y, Manabe M, Takasago Y, Takada G. Mass screeing group (2000) Excessive clustering of lysinuric protein intolerance (LPI) patients in a northern part of Japan due to a founder effect. *Human Mut.* 16:270-271
- 6) Shioya T, Hashimoto M, Koizumi A, Kawamura M, Miura M (2000) Hereditary hemorrhagic telangiectesia (HHT) in Akita, Japan *Internal Med* 39:675-676
- 7) . Hozaki J, Dakeishi M, Ohura T, Inoue K, Manabe M, Wada Y, Koizumi A (2000) Homozygosity mapping to chromosome 5p15 of a gene responsible for Hartnup disease in two Japanese pedigrees. *Human genetics.*
- 8) Takahashi M, Nozaki J, Komatsu M, Wada Y, Utunomiya M, Inoue K, Takada G, Koizumi A (2000) A new locus for a dominant form of multinodular goiter on 3q26.1-q26.3. *J Clin Endocrinol Metab* submitted.
- 9) Fujita H, Haseyama T, Kayo T, Nozaki J, Wada Y, Ito S, Koizumi A. An Increased Expression of Glutathione S-Transferases in the Renal Proximal Tubuli in the Early Stage of Diabetes: a Study in a Mouse Model of Type 2 Diabetes, Akita Mouse. *Exp Nephrol.* In press
2. 学会発表
- 1) 小泉昭夫 環境汚染物質への遺伝的感受性：ヒト健康影響のリスク評価への影響 第71回 日本衛生学会 福島 2001年
- 2) 鄂 暁飛、嶽石美和子、平澤富士子、和田安彦、小泉昭夫：全身性カルニチン欠損症原因遺伝子キャリアーにおける加齢性心肥大の動物モデル JVS マウスでの検討
- 3) 嶽石美和子、野崎潤一、井上純子、和田安彦、小泉昭夫：遺伝性出血性末梢血管拡張症の家系における Endoglin 遺伝子の変異
- H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)
- 1) 許取得 なし
- 2) 実用新案登録
なし
- 3) その他

西日本における脊髄小脳変性疾患の遺伝疫学に関する研究

分担研究者 阿部康二 岡山大学医学部神経内科教授

研究要旨 日本各地における遺伝性脊髄小脳変性症の分布を調査した結果、仙台や新潟など東日本では SCA3/MJD がもっとも高頻度に認められ、SCA6 は比較的まれな疾患であったが、岡山や鳥取など西日本では SCA6 が約 50% と半数を占め、SCA3/MJD は約 20% 程度にとどまっていた。本研究を通じ、脊髄小脳変性症には日本の地域ごとに特徴的な分布があり、各地域間でその頻度の大きな差があることが明らかとなった。また今回の研究を通じて、岡山市を中心とする山陽地域には SCA6 とは異なる Holmes 型の遺伝性脊髄小脳変性症が複数家系存在していることが新たに判明し、脊髄小脳変性症の新しい遺伝子異常の可能性も示唆された。

A. 研究目的

近年の分子生物学の発達により、従来臨床的観点から分類のなされていた遺伝性脊髄小脳変性症が CAG などの遺伝子上の 3 塩基の繰返し配列の増多によることが明らかとなり、分子遺伝子学に立脚して遺伝性脊髄小脳変性症を改めて分類する試みがなされている。その結果世界および日本各地で各疾患の分布に特徴があることが明らかとなってきた。我々は本研究で日本各地における遺伝性脊髄小脳変性症の特徴を調査することにより、本邦での遺伝性脊髄小脳変性症の頻度や地域における分布を明らかにし、また遺伝子診断にていずれの分類にも該当しない家族性の脊髄小脳変性症の家系を通して新しい遺伝性脊髄小脳変性症の発見をめざす。

B. 研究方法

日本各地の大学病院における遺伝子診断の実績をもとに、その地方ごとの遺伝性脊髄小脳変性症の分布を調査した。

（倫理面への配慮）

十分な説明と同意のもとでインフォームド

コンセントを得た上で遺伝子診断を行った。

C. 研究結果

海外（白人）では遺伝性脊髄小脳変性症の 30% を SCA/MJD が占め、SCA1 と 2 が次いで 15% を占めており SCA6 は 5% と頻度の少ない疾患であった。ところが本邦ではその頻度が大きく異なり、また各地域によって分布に大きな違いが認められた（下図）。新潟では SCA3/MJD が約 45% と最も多く約半を占め、DRPLA（20%）と SCA6（10%）の順であったが、同じ東北地方であっても仙台では SCA3/MJD はもっとも高頻度ではあったものの頻度は SCA1 と同で約 20% 程度にとどまり、DRPLA と SCA6 は約 10% であった。一方山陰に位置する鳥取では家系の半数以上（約 60%）が SCA6 で、SCA3/MJD 次いで 25% であり DRPLA は 10% に満たない頻度の低さであった。ところが同じ中国地方でも岡山市を中心とする山陽地方ではその分布は大きく変わり、SCA6 が 43% と最も頻度が高い点では鳥取と同じであったが、DRPLA も約 30% と高頻度に認められ、SCA3/MJD は 10% であった。また岡山地方では臨床的に Holmes 型と診

断された脊髄小脳変性症のうち遺伝子診断がなされた家系は 72%であり、そのすべてが SCA6 であった。7 家系は臨床的に Holmes 型と考えられたものの既知の方法では SCA6 を含めて遺伝学的な分類のできない家系であった。

D. 考察

日本各地で遺伝性脊髄小脳変性症にはその分布に特徴があり、一般的な傾向としては東北地方など東日本では SCA3/MJD が最も多く存在し、SCA6 は比較的まれであると考えられた。一方中国地方では約半数を SCA6 が占め、同疾患の西日本での頻度の高さを示す結果となった。また今回の研究では当施設の位置する岡山市近辺に、従来遺伝子診断ではいずれの遺伝性脊髄小脳変性症とも診断できない家族性の脊髄小脳変性症が複数存在することが明らかになった。これらの家系はいずれも臨床上是 Holmes 型脊髄小脳変性症の特徴を示したものの、従来 Holmes 型脊髄小脳変性症の多くを占めると考えられる SCA6 ではなく、未知の遺伝性脊髄小脳変性症である可能性があると考えられた。

E. 結論

遺伝性脊髄小脳変性症には日本各地においてその分布に特徴があり、遺伝性脊髄小脳変性症の家系を臨床学的、あるいは遺伝学的に診断する際に参考になると考えられた。また、Holmes 型脊髄小脳変性症と診断された家系の中には既知の遺伝性脊髄小脳変性症のいずれにも該当しないものがあり、新しい遺伝子座の存在を示唆するものと考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

原著論文

1. A case of spinocerebellar ataxia accompanied by severe involvement of the motor neuron system. *Neurol. Res.* 22 (2000) 567-570

Y. Manabe, Y. Shiro, K. Takahashi, K. Kashihara, and K. Abe

2. Therapeutic potential of neurotrophic factors and neural stem cells against Ischemic brain Injury. *Flow Metabol.* 20 (2000)1393-1408

K. Abe

3. High prevalence of spinocerebellar ataxia type 1 (SCA1) in an isolated region of Japan. *J. Neurol. Sci.* 178 (2000) 153-158

Y. Onodera, M. Aoki, T. Tsuda, H. Kato, T. Nagata, T. Kameya, K. Abe, and Y. Itoyama
学会発表

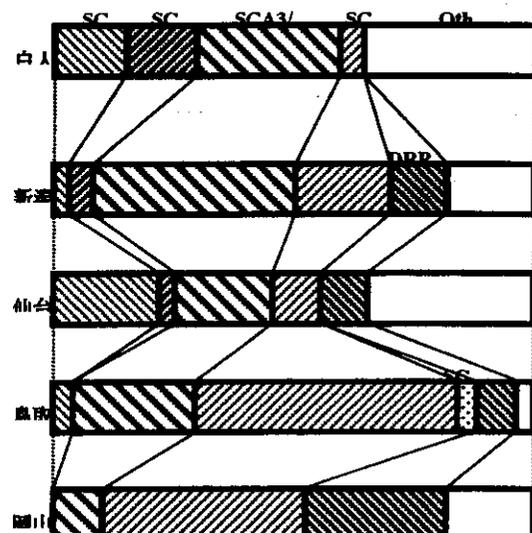
1. 東北地方の SCA1 患者出身地の集積 第 41 回日本神経学会総会、松本市、2000. 5.24
小野寺好明、青木正志、津田丈秀、加藤宏之、糸山泰人、阿部康二

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他

J. その他 研究協力者 真邊泰宏 村上哲郎
岡山大学医学部神経内科

図 1 日本の各地における脊髄小脳変性症の分布



代謝異常疾患における加齢による病態の修飾：

「成人発症 II 型シトルリン血症の発症機構解析」に関する研究

分担研究者 大浦敏博 東北大学大学院医学系研究科小児医学講座
小児病態学分野助教授

研究要旨

成人発症 II 型シトルリン血症の原因遺伝子 SLC25A13 の発見により本症の遺伝子診断が可能となった。我々は乳児期早期より高度の胆汁うっ滞、特異なアミノ酸異常、脂肪肝を呈した 3 例の患児に SLC25A13 遺伝子異常を検討したところ 2 例の姉弟は IVS11+1G>A 変異のホモ接合体、他の一例は IVS11+1G>A 変異と 851del14 変異の複合ヘテロ接合体である事が明かとなった。小児期での病態を解明することにより今後本症の発症予防への道が開かれるであろう。

A. 研究目的

成人発症 II 型シトルリン血症 (CTLN2) は突然の異常行動、見当識障害、精神不穏などの精神神経症状で発症する常染色体劣性遺伝疾患である。発症年齢は主に 20~40 歳台である。本症の原因遺伝子 SLC25A13 のクローニングおよび遺伝子解析により患者で 5 種類の変異が同定されたが、CTLN2 の小児期での病態は明らかではない。今回我々は肝内胆汁うっ滞を主訴とした 3 症例に SLC25A13 の変異を証明したので報告する。本症の小児期での病態、発症の契機を詳細に検討することにより発症の機構解明の第一歩としたい。

B. 症例報告

【症例 AH】 現在 8 歳の女兒、新生児マススクリーニングでフェニルアラニン 4mg/dl、メチオニン 1.2mg/dl、再検査にてフェニルアラニン 2mg/dl、メチオニン 2mg/dl であった為ホモシスチン尿症疑

いで当科紹介となった。黄疸は見られず、便は淡黄色、肝を 1 横指触知した。生化学的検査では総胆汁酸の上昇、HPT の低下が見られ胆汁うっ滞を伴う肝機能障害が明らかとなった。血中アミノ酸分析ではスレオニン、シトルリン、メチオニン、チロシン、アルギニン等の上昇が特徴であった。脂溶性ビタミン、MCT 含有ミルク投与を行ない、アミノ酸異常は生後 3 ヶ月より、生化学的異常は 6 ヶ月より正常化した。患児は現在 8 歳であるが発達発育に異常を認めず、肝機能障害も認めていない。食生活では甘いものを好まず、枝豆が好物という特徴がある。

【症例 TH】 AH の弟、胎児仮死により緊急帝王切開にて出生。新生児仮死、四肢の硬直を認め日齢 3 に某院小児科入院となった。GOT130 IU/l、GPT394 IU/l、LDH 3000 IU/l 以上、BUN 61.4mg/dl、Cr 1.74mg/dl、HPT 10%以下と重度肝機能障害、脱水を認めた為補液、経静脈的ビタミン K 投与が行なわれ日齢 14 に

退院となった。退院時のスクリーニングでガラクトース 16mg/dl、メチオニン 1.5mg/dl、再検査にてメチオニン 3mg/dl であった為当科紹介となった。来院時黄疸は認めず、便は淡黄色、肝1横指触知した。姉と同様胆汁うっ滞、アミノ酸異常を認めたが、尿還元糖反応は陰性であった。脂溶性ビタミン、MCT含有ミルク投与を開始によりアミノ酸異常は生後1ヶ月には改善したが、生化学的異常は4ヶ月以降まで持続した。患児は現在4歳、発達発育は正常であるが、近医にて発熱に伴いトランスアミナーゼの上昇(300台)を指摘されている。

[症例 ME] スクリーニングにてガラクトース高値であった為当科紹介となった。黄疸は認めず、肝も触知しなかったが、検査上胆汁うっ滞を認め、血中ガラクトース 16.9mg/dl、尿還元糖反応強陽性であった。乳糖除去ミルク開始後体重増加は40g/日と良好となったが、血中アミノ酸分析ではシトルリン、トレオニン、メチオニン、チロシン、アルギニンの上昇を認めた。脂溶性ビタミンを開始し、アミノ酸異常は3ヶ月以降正常化した。生化学的異常は1歳まで持続した。患児は現在1歳6ヶ月であるが、発達発育は正常、肝機能障害も認めていない。

C. 研究結果

1. 検査成績

主な検査成績を表に示す。高度の胆汁うっ滞があり、スレオニン、シトルリン、メチオニン、チロシン、リジン、アルギニンの上昇が特徴的であった。

2. 肝生検

日齢54で行なわれた肝生検では脂肪変性が著明で、巨細胞性肝炎の像は認めない。組織学的には脂肪変性が特徴的で、肝細胞内には多数の小～中脂肪滴の沈着を認めた。

3. 遺伝子診断

特異なアミノ酸パターンより CTLN2 を疑い、既知の5種類の変異に対する遺伝子診断を行なったところ AH、TH は IVS11+1G>A 変異のホモ接合体、ME は

IVS11+1G>A 変異と 851del4 変異の複合ヘテロ接合体であった。以上の結果より患児は CTLN2 であると確定診断された。遺伝子診断を行なうにあたっては、東北大学倫理委員会の指針に則り、十分に説明した後保護者より書面にて同意を得た。

D. 考察

CTLN2 は臨床的には成人期以降に突然発症する行動異常、意識障害、見当識障害などを特徴し、患者はしばしば豆類への異常食癖を示す。生化学的には肝特異的にアルギニノコハク酸合成酵素が低下しているが、アルギニノコハク酸合成酵素遺伝子に異常は無く長らく真の原因は不明であった。1999年 Kobayashi ら (Nature Genetics 22: 159-163, 1999) により原因遺伝子 SLC25A13 がクローニングされ、始めて遺伝子診断が可能となった。

我々は新生児マススクリーニングを契機に発見され、特異なアミノ酸異常を伴った新生児肝炎7例を既に報告した(大浦他 日本小児科学会雑誌 101巻 1522-1525、1997年)。今回の姉弟例もこの7例に含まれており、その特徴は①スクリーニングでメチオニンやガラクトースの高値、②高度の胆汁うっ滞、③スレオニン、シトルリンなどのアミノ酸の一過性の上昇、④肝脂肪変性であった。今回我々はその特徴的なアミノ酸パターンより CTLN2 を疑い SLC25A13 遺伝子の変異を検索したところ2種の変異が検出された。本症例は乳児期早期に CTLN2 と診断された世界で初めての症例である。

CTLN2 の発症頻度は従来約10万人に1人と推定されていたが、一般集団での遺伝子変異の検索によると2～4万人と想像される。すなわち、多くの症例は発症しないか、発症しても精神神経疾患、慢性肝炎などと診断され適切な治療を受けていない可能性がある。CTLN2 は一旦発症すると予後不良で数年以内に死亡するが、肝移植が有効であり早期診断が重要である。今回の我々の研究により CTLN2 の一

部の症例はこのような特異な新生児肝炎として発症していることが初めて明かとなった。今後、一旦肝機能が改善してもこれらの症例の経過を注意深く観察する必要がある。また、何が発症の契機となるかが明らかにされれば本症の発症予防への手掛かりとなるであろう。

E. 結論

従来不明であった CTLN2 の乳児期での病態が初めて明かとなった。原因不明の新生児肝炎に遭遇した場合は CTLN2 も念頭において原因検索をする必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Toshihiro Ohura, Keiko Kobayashi, Yusaku Tazawa, Ikumi Nishi, Daiki Abukawa, Osamu Sakamoto, Kazuie Iinuma, and Takeyori Saheki.

Neonatal presentation of adult-onset type II citrullinemia.

Human Genetics 108 (in press)

Human Genetics Published online: 31 January 2001

2. 学会発表

大浦敏博、田澤雄作、西育美、小林圭子、虻川大樹、飯沼一字、佐伯武頼：

特異なアミノ酸異常、脂肪肝を伴った新生児肝炎例における SLC25A13 遺伝子異常-成人発症 II 型シトルリン血症の小児期の病態。日本先天代謝異常学会雑誌 16 巻 2 号 96、2000 年

Table: Biochemical data on the three patients.

	AH	TH	ME
	35 days	25 days	26 days*
T. bil (mg/dl)	5.9	3.7	2.4
D. bil (mg/dl)	1.8	2.4	1.3
Alp (IU/L)	859	1306	1439
γGTP (IU/L)	191	253	220
GOT (IU/L)	74	75	64
GPT (IU/L)	42	43	42
TEA (μmol/L)	256	196	230
Threonine (mg/dl)	8.11	7.37	4.94
Citrulline (mg/dl)	9.59	5.01	8.49
Methionine(mg/dl)	6.94	3.41	3.58
Tyrosine(mg/dl)	4.78	2.59	3.35
Lysine(mg/dl)	5.07	3.22	5.61
Arginine(mg/dl)	4.57	2.57	5.48

*: age at examination.

H. 知的財産件の出願・登録状況

なし

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
分担研究報告書

健康指標への影響の検討：岩手県東部の
健康マクロ指標に関する研究

分担研究者 中屋重直 岩手医科大学医学部衛生学公衆衛生学講座 助教授

研究要旨 岩手県59市町村別の人工透析受療患者の有症率の地域分布に関する検討をおこない、地域的偏りを検討したが岩手県北部に偏重した傾向はみられなかった。

A. 研究目的

加齢に伴い腎不全の発症にいたる遺伝的素因が、岩手県北部地域に偏在する可能性があることから、地域の健康度を比較する目的で疾病有病ならびに死亡の状況について疫学的に解析することを目的とした。

B. 研究方法

岩手県内59市町村を第2次保健医療圏の9地区にわけて、性別年齢調整死亡率ならびに人口透析受療患者割合を調査した。

人口は1990年10月1日の国勢調査人口を用い、死亡は1990～1994年の5ヶ年の合計を岩手県衛生年報からもとめた。腎不全および人口透析受療者数は、岩手県難病対策事業ならびに岩手県国保連合会の受療状況調査票より、市町村別1995年と2000年の性年齢階級別受療数を調査した。

C. 研究結果

岩手県全域の年齢階級別死亡率を基準に、標準化死亡比（SMR）でみた岩手県

二次医療圏の特徴は、男性で両磐保健医療圏が1.33と最も高く、次いで久慈保健医療圏の1.10、二戸保健医療圏の1.08となった。

女性では、やはり全県の90～94年の年齢階級別死亡率を基準にしてSMRを算出すると、釜石保健医療圏の1.06を最高に、胆江保健医療圏と両磐保健医療圏の1.02であり、地域格差は男性よりずっと小さかった。

慢性腎不全に着目して人口透析患者割合を市町村別に年齢調整した標準化有病割合で表わすと次頁の表のごとくであった。1995年及び2000年の性年齢階級別受療割合を標準に、市町村間の年齢構成の差による影響を除去して全県を100とした場合の比で表現している。

これを保健医療圏ごとに比較すると、男性では盛岡、気仙、宮古、久慈で高く、女性では盛岡、花巻、気仙、釜石、宮古、久慈で高い傾向が見られた。

表. 人口透析年齢標準化受療割合
(各年度・男女毎に全県を 100 とし
て)

保健医療圏	市町村名	男 1995年	男 2000年	女 1995年	女 2000年
盛岡	盛岡市	85	112	111	106
	雫石町	154	155	122	45
	滝沢村	188	124	135	103
	玉山村	136	132	56	22
	紫波町	83	95	91	115
	矢巾町	107	43	43	82
	葛巻町	158	130	177	82
	岩手町	144	134	65	105
	西根町	143	150	43	154
	松尾村	65	83	110	81
安代町	205	170	47	0	
岩手中部	花巻市	62	74	103	97
	大迫町	58	112	133	56
	石鳥谷町	129	111	174	176
	東和町	38	111	177	166
	北上市	91	87	70	33
	湯田町	42	0	0	72
	沢内村	142	31	0	0
	胆江	水沢市	105	110	199
金ヶ崎町	47	71	25	87	
前沢町	58	67	113	129	
胆沢町	40	51	63	100	
衣川村	218	113	0	0	
江刺市	84	100	141	102	
両磐	一関市	76	77	98	73
	花泉町	95	80	84	124
	平泉町	51	33	0	30
	大東町	78	88	17	87
	藤沢町	57	38	62	24
	千厩町	64	83	26	104
	東山町	102	66	40	31
	室根村	31	142	101	41
	川崎村	0	27	0	0
気仙	大船渡市	140	128	125	146

	陸前高田市	205	151	182	158
	住田町	177	133	78	114
	三陸町	52	67	80	64
釜石	遠野市	24	61	148	133
	宮守村	36	116	57	152
	釜石市	122	98	78	117
	大槌町	158	93	41	59
宮古	宮古市	117	138	105	166
	田老町	94	30	292	118
	山田町	152	119	133	181
	新里村	101	66	166	109
	川井村	140	90	219	120
	岩泉町	140	150	24	79
	田野畑村	48	123	77	0
	久慈	久慈市	99	54	58
善代村	0	42	0	0	
種市町	53	45	0	43	
野田村	415	136	224	110	
山形村	59	114	180	71	
大野村	0	109	0	96	
二戸	二戸市	132	80	149	91
	軽米町	131	98	116	65
	九戸村	0	109	0	35
	浄法寺町	37	236	58	45
	一戸町	124	80	79	82

D. 考察

老化性遺伝性疾患が地域的偏りを示した場合に、健康情報のマクロ指標にその影響が認められるかを検討した。現在までのところ、総死亡の地域格差が生じている点について、過去約20年にさかのぼって死亡原因別に検討を加えている。

慢性疾患の有病状況の調査は、診断誤差、受診率、住居地の移動など多くの不確定要素をはらんでいるので難しいが、近年、医療機関の増加から慢性腎不全に対する人口透析が普及し、高齢患者においてもQOLが向上しつつある。今年度の国保患者に限定した調査からは、地域格差の存在は認められたものの、その裏づけが十分ではない。今後さらに患者数の把握と経年的観察の精度を高めて、遺伝的要因の影響の有無を論じていきたい。

E. 結論

年齢調整死亡率の地域比較では男女間で相違が認められた。慢性腎不全の有症率を人口透析受療患者統計から把握したところ、市町村間格差が大きく見られたが、保健医療圏にまとめた上で、岩手県県北部への偏重は明らかでなかった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

- 1) 特許取得 なし
- 2) 実用新案登録
なし
- 3) その他

糖尿病候補遺伝子の検索：糖尿病遺伝素因に関する研究

分担研究者 山田 祐一郎 京都大学医学研究科病態代謝栄養学

研究要旨 TSC-22 と糖尿病遺伝素因との関連を検索した。

A. 研究目的

わが国において糖尿病患者は激増している。糖尿病は、大血管や細小血管の動脈硬化を惹起し、脳梗塞や心筋梗塞、腎不全などの危険因子となる。これらを未然に防ぐためには、糖尿病を発症させる遺伝素因を明らかにすることが必要である。わが国の糖尿病患者では、膵β細胞の分泌能が低いことが特徴である。したがって、膵β細胞に発現する因子が遺伝素因として重要と考えられる。そこで、糖尿病モデル動物の膵ラ氏島で特異的に発現量の変化する因子に着目し、この遺伝子構造の決定と糖尿病との関連を検索した。

B. 研究方法

①糖尿病モデル動物ラ氏島から、発現量の異なるクローンの同定

糖尿病モデル動物 GK ラットおよび対照の Wistar ラットより膵ラ氏島を単離し、mRNA を抽出した。これらを用いて蛍光 differential display 法で、発現量の異なるクローンを検索した。簡単には、dT プライマーを用いて cDNA を合成し、蛍光 anchor-dT プライマーと任意のプライマーで PCR を行い、自動シーケンサーを用いて電気泳動に供した。シグナル強度の異なるバンドがあれば、もう一度電気泳動し、シグナルの出現とともに中断し、ゲルを切

り抜いた。これから DNA を抽出し、再び PCR 法で増幅後、サブクローニングを行い、塩基配列を決定した。

②ヒト TSC-22 遺伝子構造の決定

ヒト TSC-22 の cDNA 配列は既に報告されている。そこで、3'非翻訳領域の塩基配列をもとに 1 対のオリゴプライマーを設定した。ヒト BAC ライブラリーをスクリーニングし、1 種類の陽性 BAC クローンを同定した。次に TSC-22 の cDNA を用いてサザン解析を行いサブクローニング後、遺伝子配列を決定することによって、TSC-22 遺伝子構造を決定した。

③糖尿病患者におけるヒト TSC-22 遺伝子の解析

118名の糖尿病患者と58名の正常耐糖能者から抽出した DNA と、②で決定した TSC-22 遺伝子配列をもとに作製した蛍光オリゴプライマーを用いて、PCR-SSCP 法で遺伝子変異を決定した。

（倫理面への配慮）

遺伝子変異の検索に関して、各患者および対照者に、検索の目的等を記載したインフォームドコンセントを用いて説明し、納得いただけた方には署名をいただいた。

また、動物実験に関しては、京都大学に定められた規定に基づき、十分配慮の上研究を遂行した。

C. 研究結果

①GK ラットおよび Wistar ラットの膵ラ氏島より得られた mRNA を蛍光 differential display 法で検索したところ、Wistar ではほとんど発現しないが、GK ラットで発現の認められるクローン TSC-22 を同定した。

②TSC-22 の遺伝子構造を決定し、蛋白翻訳領域は 3 つのエクソンから構成されていることを明らかにした。

③PCR-SSCP 法によって、蛋白翻訳領域に 2 つの遺伝子変異を認めた。1 つは 23 番目のイソロイシンがバリンに置換 (ATT → GTT)、もう 1 つは 38 番目のアルギニンのサイレント変異 (AGA → CGA) であり、それぞれ 2 型糖尿病患者に各 1 症例認めた。また、プロモータ領域には A/G の SNP を認めた。アリル頻度は、2 型糖尿病患者では A が 0.864、G が 0.136 であり、正常耐糖能者では A が 0.836、G が 0.136 であり、有意な差異を認めなかった。

D. 考察

GK ラットでは、糖尿病の進展とともに膵ラ氏島の線維化が進行し、膵β細胞の数の減少が認められる。TSC-22 は、このような膵ラ氏島で発現が増強する転写因子であり、もともと TGF-β によって発現が増強されることが報告されていたため、TSC-22 遺伝子の量的質的違いが膵β細胞の傷害から糖尿病の発症に関与すると考え、TSC-22 遺伝子変異を検索した。その結果、糖尿病患者 118 名中 1 名にミスセンス変異を認めた。本症例では家族歴は濃厚であるが、発症は 56 歳と若年発症ではなく、またインスリン分泌も食事負荷試験で保たれていることを

確認しており、この遺伝子変異と糖尿病発症の確認には、家系調査や変異蛋白の機能解析が必要と考えられた。

また、TSC-22 遺伝子の発現調節も解析するため、プロモータ領域も PCR-SSCP 法および PCR-RFLP 法で検索したが、糖尿病と関連するアリルは見出せなかった。

E. 結論

糖尿病遺伝素因の解析の一環として、TSC-22 遺伝子を解析したが、糖尿病との有意な相関は見出せなかった。しかし、I23V 変異は今後症例を増やして解析する必要があると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) F Sugawara, Y Yamada et al., Human TSC-22 gene: no association with type 2 diabetes. (submitted)

2) Y Ihara, Y Yamada, et al. Antioxidant α -tocopherol ameliorates glycemic control of GK rats, a model of type 2 diabetes. FEBS lett 473(1): 24-26 (2000)

3) K Miyawaki, Y Yamada, et al. Glucose intolerance caused by a defect in the entero-insular axis: A study in gastric inhibitory polypeptide receptor knockout mice. Proc Natl Acad Sci USA 96(26): 14843-14847 (1999)

2. 学会発表

1) 第 97 回日本内科学会講演会

2) 第 23 回日本分子生物学会年会

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

原発性全身性カルニチン欠乏症ヘテロ保因者における加齢性心肥大の
動物モデル（JVS マウス）に関する研究

分担研究者 和田安彦 秋田大学医学部助教授

研究要旨 原発性全身性カルニチン欠乏症のモデルマウスのヘテロ個体を用い、加齢に伴うヘテロ保因者の心肥大のリスクを動物実験で確認し、発生機序を探るため、長期にわたる飼育実験を施行した。その結果、電子顕微鏡的には1歳時のヘテロでもホモ個体同様の心筋細胞の変化を認め、加齢に伴い将来的に心肥大発生リスクが高まる可能性が示唆された。これは人の家系調査によって得られた高齢者の心肥大のリスクの結果を支持するものである。

A. 研究目的

カルニチンは脂肪酸をミトコンドリア内に輸送するのに必須の物質である。Primary systemic carnitine deficiency は、このカルニチン輸送体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、骨格筋の障害、Reye's syndrome 等を引き起こす。本疾患は、劣性遺伝形式で発現する小児期に発症する遺伝性疾患である。我々はその責任遺伝子座 *CDSB* を明らかにするとともに責任遺伝子 *OCTN2* の Mutation であることを証明した。さらに患者家系におけるヘテロ保因者の健康リスクについて調査した。その結果、加齢に関係すると考えられる心筋肥大発生のリスクが保因者でないものに比べて高いことが判明した。その発生メカニズムを解明するため、動物モデルである JVS (Juvenile Visceral Steatosis) マウスのヘテロ個体を長期間に渡って飼育し、経時的に観察した。今回、コホートは21ヶ月齢まで経過を追跡し、屠殺群では1歳時の測定を行った。心臓の組織学的検討、生化学的検討を行った結果、心肥大と関連する所見を見いだした。

B. 研究方法

JVS マウスと C3H マウスを交配して得たオスのヘテロ個体とワイルドタイプである C3H マウスのメスを交配し、オス、メスの子供を得た。それらの遺伝子型（ヘテロか

ワイルドタイプか）を同定するため、尾から微量の血液を採取し、DNA を抽出した。*OCTN2* 遺伝子配列の一部 205bp を PCR 法で増幅し、制限酵素 *Aci*I で切断されるかどうかでヘテロかワイルドタイプかを同定した (Fig 1)。その後オス、メスのヘテロ (Het)、オス、メスのコントロール (Ct) の計 4 グループを同じ条件で飼育し、体重変化と死亡発生の経過を観察した。

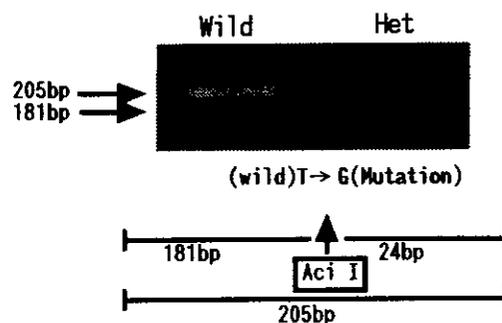


Fig. 1 DNA pattern of *OCTN2* digested with *Aci*I

1年の時点で一部のマウスを屠殺し、血清、心臓その他の臓器を採取した。血清の遊離カルニチン濃度を酵素サイクリング法により測定した。血清総コレステロール、トリグリセリドを測定した。心臓をホルマリン固定後、心室横断面の切片に HE 染色と Azan 染色を施し、組織計測を行った。また、電顕標本を作成した。

（倫理面への配慮）秋田大学医学部動物実験施設の動物愛護の倫理規定に従って動物の飼育と実験を行った。

C. 研究結果

Fig2 に1ヶ月齢から19ヶ月齢までの成長曲線(体重の経時変化)を示す。オスメスとも、ヘテロとワイルドタイプで有意の差は認められなかった。

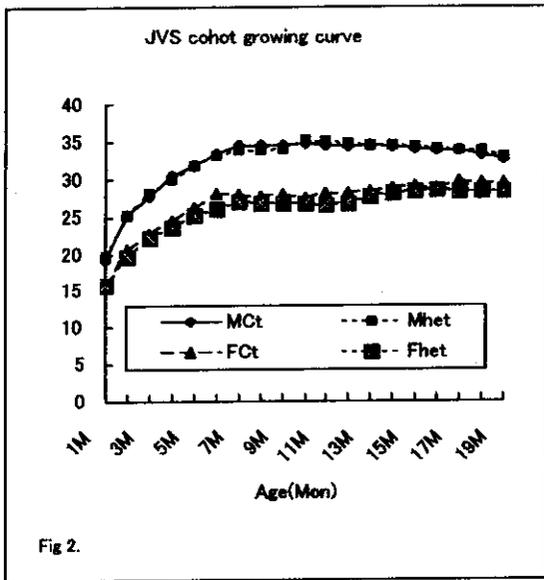


Fig 2.

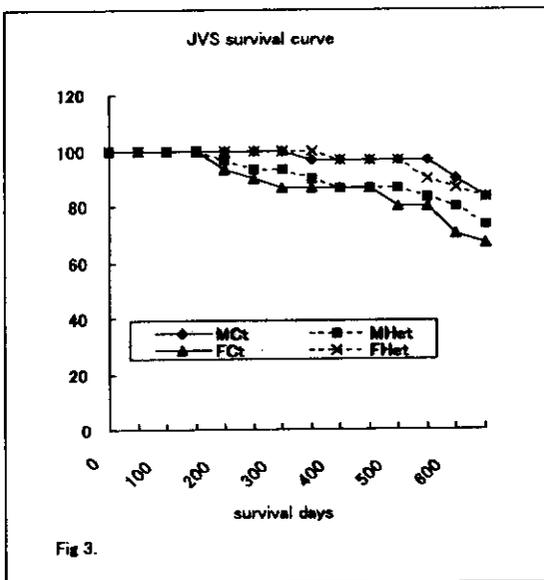


Fig 3.

Table 1. Cause of death by the age of 21 months.

gender	Male		Female	
	Ct	Het	Ct	Het
lung tumor		1	2	
liver tumor	1			1
lymphoma	2	2		2
mammary tumor			3	1
pancreas tumor		1		
rough surface of kidney		2	2	
pneumonia		1	2	
lymphadenopathy and/or splenomegaly			1	1
unclear	1	1		
total death*	4	8	10	5

* 20 mice per each group at the start.

Fig3に、経過を見ているコホート80匹(1群20匹)の21ヶ月齢までの生存曲線を示す。オスではヘテロの生存率低下が早い傾向にあり、逆にメスではワイルドタイプの方が生存率低下の早い傾向にあり、遺伝子型がヘテロの場合に寿命が短いとは現時点では言えない。

Table 1に、21ヶ月齢までの死亡原因を示す。リンパ腫、乳癌、肺腫瘍、腎臓の表面不整所見が多かったが、特に遺伝子型での特徴は認めなかった。

Table 2. Body weight(BW), heart weight(HW), heart wall area(HWA) and myocyte diameter of left ventricle(LV) for mice

		BW(g)	HW(g)	HWA(mm ²)	LV(μm)
Male	Ct	31.5±1.1(5)	0.128±0.013(5)	13.4±0.5(5)	17.2±1.5(5)
	Het	33.4±3.0(9)	0.136±0.027(9)	14.0±1.4(5)	18.8±1.7(5)
Female	Ct	29.8±7.5(8)	0.101±0.010(8)	10.8±1.5(5)	17.5±0.4(5)
	Het	26.4±1.5(10)	0.098±0.008(10)	10.9±0.7(5)	17.2±0.9(5)
genotype	p	NS	NS	NS	NS
gender	p	<0.01	<0.0001	<0.0001	NS

Results are presented as mean±SD. Tested by two-way ANOVA. The number of mice used is shown in parenthesis.

1年時点で屠殺した一部マウスの体重、心臓重量、心室横断面積、左心室心筋細胞直径に性差を認めたが、遺伝子型では差を認めなかった(Table 2)。

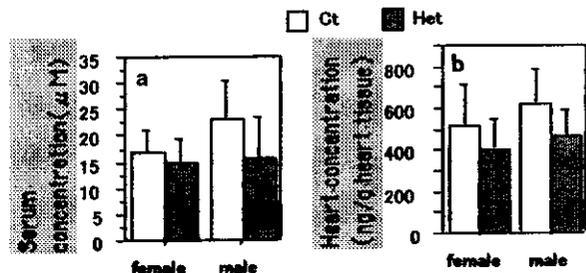


Fig 4. Free carnitine concentration in serum (a) and heart (b) of mice (n=5).

By two-way ANOVA, both (a) and (b), genotype: p<0.05; gender: NS.

血清中と心筋組織中のヘテロにおける遊離カルニチン濃度はそれぞれワイルドタイプの約76%、77%と有意に低かった(Fig 4.)が、ホモマウスの場合(10%程度)よりは高かった。血清総コレステロール、トリグリセリドは遺伝子型で差がなかった(Table 3)。

Table 3. Total cholesterol and triglyceride in serum of 1 year-old mice.

gender	genotype	T-Chol(mg/dl)	TG(mg/dl)
male	Ct	115.32±9.3	105.43±17.8
	Het	124.96±7.9	118.33±37.0
Female	Ct	93.31±18.0	111.02±37.6
	Het	86.45±7.01	117.06±22.3
gender		p<0.0001	N.S
genotype		N.S	N.S

電子顕微鏡所見として、ヘテロでは 10 匹中 6 匹に脂肪滴の数とサイズの増加、ミトコンドリアの異常所見を認めたとに対し、ワイルドタイプではほとんどそのような所見は認めなかった。ヘテロで認められたミトコンドリアの異常は様々な程度のもので、膨隆、不整なあるいは一部消化されたクリスタ、器質的な高密度の斑、膜状の空胞、断裂したクリスタなどであった

(Fig 4)。これはホモで認められる電子顕微鏡所見と同じで、程度の軽いものであった。

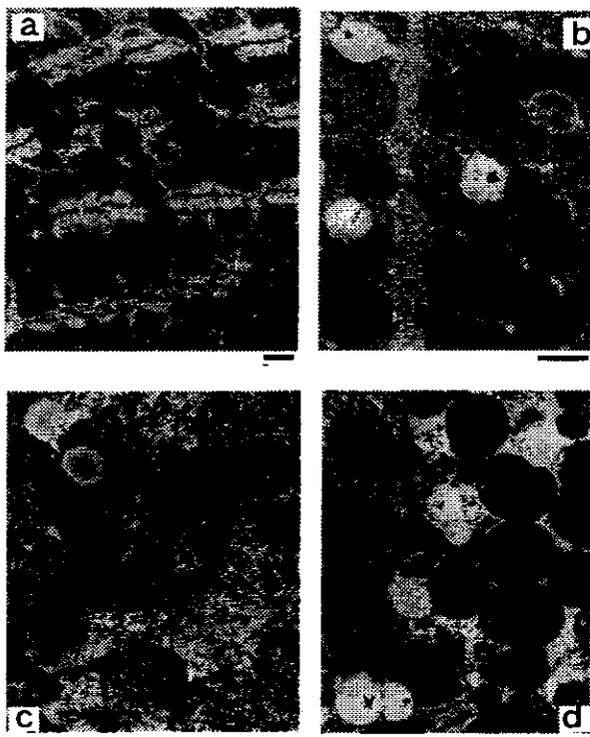


Fig.3 Electron micrographs of myocytes of hearts from 1Y control(a) and heterozygous(b-d) mice. (Scale bar=1 μ m).

D. 考察

今回、カルニチン欠乏症のモデルマウスのヘテロ個体を用い、加齢影響の有無を確かめるべく、コホートは 21 ヶ月齢までの観察結果、屠殺郡では 1 歳時の計測結果等をまとめた。その結果、成長、死亡、カルニチン以外の生化学所見、心臓のマクロ、光学顕微鏡所見では遺伝子型による差は認められなかったが、電子顕微鏡的検索で

はホモマウスに認められる所見を認めた。このことから、ヘテロマウスでもホモと同様、心筋細胞中での脂肪の β 酸化が障害され、何らかの組織への負荷がかかっているものと推測された。これが、加齢に伴う生体予備能の低下によって、心肥大のリスクを高めることは容易に想像できる。人の家系調査によって得られた高齢者の心肥大のリスクの証拠を今回の研究は実験的に補強するものである。今後、2 年時点での心臓の計測等、種々の検索の結果が待たれ、現在その準備を進めている。

E. 結論

原発性全身性カルニチン欠乏症のモデルマウスの 1 歳のヘテロ個体を用い、ヘテロ保因者の加齢に伴う健康リスク、特に心肥大の危険性について検討した結果、電子顕微鏡的にはヘテロでもホモ個体同様の心筋細胞の変化を認め、加齢に伴い将来的に心肥大発生リスクが高まる可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

学会発表

鄂曉飛、嶽石美和子、平澤富士子、和田安彦、小泉昭夫。原発性全身性カルニチン欠乏症ヘテロ保因者における加齢性心肥大の動物モデル JVS マウスでの検討。第 71 回日本衛生学会総会、2001 年 4 月、福島市

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル	書籍全体の 編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル	発表雑誌	巻号	ページ	出版年
Kubota T, Hara M, Nozaki J, Manabe M, Koizumi A	Probable involvement of a germ-line mutation of an unknown mismatch repair gene in a Japanese Muir-Torre syndrome phenotype.	J Dermatol Sci	23	117-125	2000
Kayo T, Fujita H, Nozaki J, Xiaofei E, Koizumi A	Identification of two chromosome loci determining glucose intolerance in a C57BL/6 mouse strain	Comparative M	50	296-302	2000
Habuchi T, Suzuki T, Sasaki R, Sato S, Akao T, Tuchiya N, Shimada N, Wasa Y, Koizumi A, Chihara J, Ogawa O, Kato T	Association of vitamin D receptor gene polymorphisms with prostata cancer and benign prostatic hyperplasia in a Japanese population.	Cancer Res	60	305-308	2000

Noguchi A, Shoji Y, Koizumi A, Takahashi T, Shoji Y, Matsumori M, Kayo T, Ohata T, Wada Y, Yoshimura I, Maisawa S, Konishi M, Takasago Y, Takada G	SLC7A7 genomic structure and novel variants in three Japanese lysinuric protein intolerance families	Human Mutation	15	367-372	2000
Koizumi A, Shouji Y, Nozaki J, Noguchi A, Xiaofei E, Dakeishi M, Ohura T, Kayo T, Wada Y, Manabe M, Takasago Y, Takada G.	Mass screening group (2000) Excessive clustering of lysinuric protein intolerance (LPI) patients in a northern part of Japan due to a founder effec	Human Mutation	16	270-271	2000
Shioya T, Hashimoto M, Koizumi A, Kawamura M, Miura M	Hereditary hemorrhagic telangiectasia (HHT) in Akita, Japan	Internal Med	39	675-676	2000

Nozaki J, Dakeishi M, Ohura T, Inoue K, Manabe M, Wada Y, Koizumi A	Homozygosity mapping to chromosome 5p15 of a gene responsible for Hartnup disease in two Japanese pedigrees.	Human Genetics	Submitted		
Takahashi M, Nozaki J, Komatsu M, Wada Y, Utunomiya M, Inoue K, Takada G, Koizumi A	A new locus for a dominant form of multinodular goiter on 3q26.1-q26.3.	J Clin Endocrinol Metab	Submitted		
Fujita H, Haseyama T, Kayo T, Nozaki J, Wada Y, Ito S, Koizumi A.	Increased Expression of Glutathione S-Transferases in Renal Proximal Tubules in the Early Stage of Diabetes: a Study of Type-2 Diabetes in the Akita Mouse Model	Exp Nephrol	In press		
Y. Manabe, Y. Shiro, K. Takahashi, K. Kashihara, and K. Abe	A case of spinocerebellar ataxia accompanied by severe involvement of the motor neuron system.	Neurol Res	22	567-570	2000
K. Abe	Therapeutic potential of neurotrophic factors and neural stem cells against ischemic brain injury.	Flow Metabol.	20	1393-1408	2000

Y. Onodera, M. Aoki, T. Tsuda, H. Kato, T. Nagata, T.Kameya, K. Abe, and Y. Itoyama.	High prevalence of spinocerebellar ataxia type 1 (SCA1) in an isolated region of Japan.	J Neurol Sci	178	153-158	2000
T Ohura, K Kobayashi, Y Tazawa, I Nishi, D Abukawa, O Sakamoto, K Iinuma, T Saheki	Neonatal presentation of adult-onset type II citrullinemia.	Human Genetics.	In press		
O Sakamoto E Ogawa T Ohura Y Igarashi Y Matsubara K Narisawa And K Iinuma	Mutation Analysis of The GLUT2 Gene in Patients with Fanconi -Bickel Syndrome	Pediatric Research	48	586-589	2000
F Sugawara, Y Yamada et al.,	Human TSC-22 gene: no association with type 2 diabetes.	Diabetes	Submitted		
Y Ihara, Y Yamada, et al.	Antioxidant α -tocopherol ameliorates glycemic control of GK rats, a	FEBS lett	473	24-26	2000

	model of type 2 diabetes.				
K Miyawaki, Y Yamada, et al.	Glucose intolerance caused by a defect in the entero-insular axis: A study in gastric inhibitory polypeptide receptor knockout mice.	Proc Natl Acad Sci USA	96	14843-14847	2000