

20600366

厚生科学研究研究費補助金
ヒトゲノム・再生医療等研究事業

糖尿病発症に関与する遺伝子の単離・同定に関する研究

平成 12 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 春日 雅人

平成 13 (2001) 年 4 月

目 次

I. 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 1
神戸大学医学部医学科第二内科学教室教授 春日 雅人

II. 共同研究報告書

- 日本人2型糖尿病に係る遺伝子多型の研究 9
-PTP1B 遺伝子の多型解析-
神戸大学医学部医学科第二内科学教室教授 春日 雅人

III. 分担研究報告書

1. 日本人2型糖尿病におけるUCP1 遺伝子多型に関する研究 11
神戸大学医学部医学科第二内科学教室教授 春日 雅人
2. 多因子の単一因子への分割による糖尿病の遺伝解析に関する研究 13
大阪大学医学部加齢医学講座講師 池上 博司
3. 罹患同胞対法を用いたNIDDM 遺伝子の単離に関する研究 17
東京女子医科大学糖尿病センター講師 岩崎 直子
4. 糖尿病発症に関与する遺伝子の単離・同定に関する研究 21
山口大学医学部内科学第三講座教授 岡 芳知
5. 糖尿病発症に関与する遺伝子の単離・同定に関する研究 23
東京大学大学院医学系糖尿病・代謝内科学講座助教授 門脇 孝
6. 2型糖尿病患者におけるNeurogenin 3, Syntaxin 1A 遺伝子異常の検索に関する研究 27
和歌山県立医科大学臨床検査医学講座教授 三家 登喜夫
7. グルコース応答性インスリン分泌に関する研究 29
千葉大学大学院医学研究科統合機能学講座教授 清野 進
8. 糖尿病における α -グルコシダーゼ遺伝子変異の検索とその発現調節に関する研究 33
京都大学大学院医学研究科臨床生体統御医学講座教授 清野 裕
9. 日本人における連鎖解析に最適化されたマイクロサテライトマーカーパネルの作製と後縦靭帯骨化症の遺伝素因の同定研究への応用展開に関する研究 35
群馬大学生体調節研究所糖尿病遺伝子学講座教授 武田 純
10. 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 37
大阪大学大学院医学研究科分子制御内科学講座講師 宮川 潤一郎
11. 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に関する研究 39
筑波大学臨床医学系内科学講座教授 山田 信博

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
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：本年度は全施設で行う共同研究として、PTP1B 遺伝子を取りあげた。我々はこの PTP1B 遺伝子に 2 種類の SNP を見出し、両 SNPs が連鎖不平衡にあることを見出したが、糖尿病罹患との有意な相関を得ることはできなかった。また、各施設で行う個別研究として、UCP1 遺伝子、Syntaxin1A 遺伝子、HNF3 β 遺伝子、アディポネクチン遺伝子に糖尿病の発症あるいはその臨床経過と相関する SNPs を見出した。また罹患同胞対を用いた日本人 2 型糖尿病疾患感受性遺伝子座位として、1, 3, 7, 9, 15, 20 番の各染色体上に有意の連鎖を示す領域を見出した。

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：東京女子医科大学糖尿病センター講師
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・代謝内科学講座助教授
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
宮川潤一郎：大阪大学大学院医学研究科分子制御内科学講座講師
山田 信博：筑波大学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1500例収集できている。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PTP1B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

本年度は共同研究として、PTP1B遺伝子を取りあげ、SNPsを同定するとともにそれらのSNPsが糖尿病の発症に関与しているか相関解析で検討した。PTP1Bはチロシン残基特異的脱リン酸化酵素であり、インスリン受容体のチロシン脱リン酸化に関与していると想定されている。実際、この遺伝子のノックアウトマウスではインスリン作用の増強が認められている。我々はPTP1B遺伝子に2つのSNPsを同定した。すなわち、イントロン5の+37c→aの多型及びエクソン8のPro303(CCC)→Pro303(CCT)多型である。2型糖尿病患者528名とその正常対照者493名について検討した結果、両者は連鎖不平衡の関係があるが、現時点ではこのSNPの出現頻度は両群で有意差はなかった。

2. 個別研究

(1) 新しい候補遺伝子の同定

清野(進)らは、日本人2型糖尿病患者にみられるグルコース応答性分泌障害の分子基盤を明らかにする目的で、独自にサブクローニングした2種の膵β細胞株を用いて、mRNAディファレンシャル

ディスプレイ及びDNAマイクロアレイによる遺伝子発現解析を行った。その結果、グルコース反応性インスリン分泌障害の原因の一部はユビキチンプロテアソームシステム系の機能低下による可能性があることを見出した。

(2) 候補遺伝子アプローチ

(i) HNF遺伝子

HNF(Hepatocyte Nuclear Factor)遺伝子は、肝のみならず膵β細胞にも発現している転写因子であり、このファミリーの中で、HNF-1α、HNF-1β、HNF-4αの3種の遺伝子は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。

宮川、山縣らは、HNF遺伝子ファミリーに属するHNF-3βの遺伝子変異が家族歴を有する日本人2型糖尿病患者で認められること、ならびにその変異によるHNF-3βの転写活性が低下することより、HNF-3β遺伝子の異常は一部の日本人2型糖尿病患者の発症原因と考えられることを見出した。尚、同時に検索したHNF-6遺伝子については異常が認められなかった。

岩崎らは、HNF-3β、HNF-4γ、NEUROD4、Neurogenin 3の各遺伝子変異が日本人MODYにおいて認められないか検討したが、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。

(ii) その他の遺伝子

春日らは、俊約遺伝子と考えられるUCP-1遺伝子に注目してそのSNPsを明らかにするとともに、糖尿病発症に関与しているか相関解析によって検討した。その結果、開始コドンから112bp上流の5'非翻訳領域にA→C多型ならびにMet 229 Leu多型の2種のSNPsを同定し、これらが連鎖不平衡にあり、糖尿病の発症と有意に相関することを見出した。すなわち、A→C多型においてC多型を持つ者が糖尿病患者で有意に多かった。この5'非翻訳領域の多型はinsulin response sequenceに属し、A多型とC多型の転写活性を検討するとC多型はA多型の40%に低下していた。従ってC多型ではUCP1の発現が低く、エネルギー貯蔵傾向となることが想された。

門脇らは、脂肪細胞から分泌されるアディポサイトカインの一種であるアディポネクチンに注目し、その遺伝子を解析した結果10種類のSNPsを同定した。これらの中で、2つの多型と2型糖尿病発症との間に有意な相関を認めた。更に詳細に解析した結果、これらの多型は、血中アディポネクチン値ならびにインスリン抵抗性と相関を認めた。従って、アディポネクチン遺伝子の多型によりその分泌量が低下しインスリン抵抗性が惹起さ

れている可能性が示唆された。

岩崎らは、メキシコ系アメリカ人で報告された2型糖尿病疾患感受性遺伝子であるカルパイン10遺伝子に着目し、この遺伝子の3種類のSNPsを用いたハプロタイプ解析を日本人2型糖尿病患者について行った結果、本遺伝子は日本人2型糖尿病発症に有意な役割を果たさないが、日本人のインスリン分泌能には有意な影響を与えている可能性を明らかにした。

三家らは、日本人2型糖尿病患者を対象に、膵β細胞の分化・増殖あるいはインスリン分泌能に関係すると思われる Syntaxin1A ならびに Neurogenin 3 の両遺伝子に着目して、SNPsを同定するとともに、糖尿病発症との関係を検討した。その結果、Neurogenin 3 遺伝子については有意な多型を見い出さなかったが、Syntaxin 1A 遺伝子については2型糖尿病の臨床経過と関連する SNP (D68D、T→C)を見い出した。

清野(裕)らは、 α -グルコシダーゼ阻害薬が2型糖尿病の治療に有効であることから α -グルコシダーゼのひとつであるスクラーゼ・イソマルターゼの遺伝子に着目して、そのSNPsを同定するとともに、糖尿病発症との関係を検討した。その結果、この遺伝子の発現調節領域に1種類のSNPを見い出した。2型糖尿病患者と正常対照者との間でこのSNPの出現頻度に有意差は認めなかったがこの多型により転写活性が1.5倍に亢進することが明らかとなった。

岡らは、グルタミン酸脱水素酵素(GDH)遺伝子の変異を新生児低血糖症患者15人について検討し、1名で Tyr 266 Cys の変異を認めた。この変異型 GDH は常時活性型であることが明らかとなった。従って、逆に活性低下を生じる GDH 遺伝子の変異は高血糖・糖尿病をきたすことが推測される。そこで日本人2型糖尿病患者の79名について GDH 遺伝子の変異について検討したが、有意な変異は見い出せなかった。

(3) 連鎖解析アプローチ

(i) ヒトにおける解析

武田らは、白人と日本人ではマイクロサテライトのアリル頻度や heterozygosity が異なる点に注目し、日本人の連鎖解析に耐え得る独自のパネルを作製した。この新パネルは、406個のマーカーから構成され、平均間隔は9cM、平均 heterozygosity は0.76であった。このパネルを後縦靭帯骨化症の罹患同胞対解析に用いて、疾患感受性の責任遺伝子座を第21染色体上に同定した。

日本人2型糖尿病疾患感受性遺伝子座を決定するために、岩崎らは265組の罹患同胞対を収集し、

全ゲノムにわたるマイクロサテライトマーカーについてその遺伝子型を決定し、第9染色体上に統計学的に糖尿病の発症と有意に連鎖する領域(LODスコア3以上)を認めた。

門脇らも同様に250組の罹患同胞対を収集し、全染色体上約400のマイクロサテライトマーカーについて遺伝子型を決定した。その結果、第1, 3, 7, 11, 15, 20の各染色体上に日本人2型糖尿病の発症と連鎖する可能性のある領域が見い出された。

(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マウスにおいて同定した3つの主要遺伝子座(Nidd1, Nidd2, Nidd3)について、それらが存在する染色体全体を導入したコンソミックマウスを作製し、その表現型を解析した。その結果、Nidd1は肥満を介することなく、インスリン抵抗性ならびに耐糖能低下を惹起する遺伝子であること、Nidd2は肥満を介することなくインスリン抵抗性を惹起するが、耐糖能には影響しない遺伝子であることを明らかにした。

山田らは、高血圧自然発症ラット(SHR)におけるインスリン抵抗性連鎖遺伝子座位について検討しているが、昨年度はCD36がその原因遺伝子であるとする海外の報告に疑問を呈した。本年度はCD36欠失のないSHRを用いてインスリン抵抗性連鎖遺伝子座位について検討した結果、第3ならびに第4染色体上のCD36近傍に候補領域を見い出した。第3染色体上の領域に属する候補遺伝子としてKAT-1(Kynurenine aminotransferase-1)遺伝子を取りあげ検討した結果、SHRではこの遺伝子に特異的な点突然変異が生じていることを見出し、この変異がSHRのインスリン抵抗性を惹起している可能性を示唆した。

D. 考察

本年度は共同研究としてPTP1B遺伝子について検討した。PTP1B遺伝子のSNPsの同定からはじめたので、予定していた患者数の解析が年度内に終了しなかった。現時点では、PTP1B遺伝子のSNPsが糖尿病の発症と相関しているという成績は得られなかったが、解析対象者の数を増やして検討する価値があると思われる。

個別研究も各分担研究者の努力により、着実な進歩をみせた。すなわち、HNF-3 β 遺伝子、Syntaxin 1A 遺伝子 UCP1 遺伝子そしてアディポネクチン遺伝子が日本人糖尿病の発症に関与する遺伝子として新しく同定された。更に、罹患同胞対法を用いて2つのグループから日本人2型糖尿病疾患感受

性座位が明らかにされた。両グループからの発表で一致した座位はなかったが、今後より詳細に検討し疾患感受性遺伝子のクローニング迄成功することを期待したい。

E. 結論

候補遺伝子である PTP1B 遺伝子の SNPs を同定したが、現時点ではこれらの SNPs が糖尿病の発症と相関しているという成績は得られなかった。糖尿病の発症に関与する 4 種類の遺伝子を新たに同定するとともに、6 ヲ所の日本人 2 型糖尿病疾患感受性遺伝子座位をはじめて見い出した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 西郡秀和, 戸村秀明, 武田 純: HNF 転写因子カスケードの異常による糖尿病, MODY3 と MODY5 の多様な臨床像を中心に 内分泌糖尿病科 10:161-167, 2000
- 2) Okita K, Yang Q, Yamagata K, Hangenfeldt KA, Miyagawa J, Kajimoto Y, Nakajima H, Namba M, Wollheim CB, Hanafusa T, Matsuzawa Y: Human insulin gene is a target gene of hepatocyte nuclear factor-1 α (HNF-1 α) and HNF-1 β . *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 263:566-569, 1999
- 3) Yang Q, Yamagata K, Yamamoto K, Miyagawa J, Takeda J, Iwasaki N, iwahashi H, Yoshiuchi I, Namba M, Miyazaki J, Hanafusa T, Matsuzawa Y: Structure/function studies of hepatocyte nuclear factor-1 α , a diabetes-associated transcription factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 266:196-202, 1999
- 4) Mitsuhashi, N., Miki, T., Senbongi, H., Yokoi, N., Yano, H., Miyazaki, M., Nakajima, N., Iwanaga, T., Yokoyama, Y., Shibata, T. and Seino, S.: MTABC3, a novel mitochondrial ABC protein involved in iron homeostasis. 275:17536-17540 *J. Biol. Chem.* 2000
- 5) Nishimura, M., Miki, T., Yashima, R., Yokoi, N., Sato, Y. and Seino, S.: Angiopoietin-3, a novel member of the angiopoietin family. *FEBS lett.* 448:254-256, 1999
- 6) T Gotoda, Y Iizuka, N Kato, J Osuga, M Bihoreau, T Murakami, Y Yamori, H Shimano, S Ishibashi, N Yamada: Absence of Cd36 mutation in the original spontaneously hypertensive rats with insulin resistance. *Nature Genet.* 22:226-228,1999
- 7) R Tozawa, S Ishibashi, J Osuga, H Yagyū, T. Oka, Z. Chen, K. Ohashi, S. Perrey, F shionoiri, N Yahagi, K Harada, T Gotoda, Y Yazaki, N Yamada: Embryonic lethality and defective neural tube closure in mice lacking squalene synthase. *J. Biol. Chem.* 274:30843-30848, 1999
- 8) H Shimano, N Yahagi, M Amemiya, AH Hasty, J Osuga, Y Tamura, F Shionoiri, Y Iizuka, K Ohashi, K Harada, T Gotoda, S Ishibashi, N Yamada: Sterol regulatory element-binding protein-1 as a key transcription factor for nutritional induction of lipogenic enzyme genes. *J. Biol. Chem.* 274:35832-35839, 1999
- 9) T Gotoda, Y Iizuka, N Yamada: Genetic analysis of spontaneously hypertensive rats (SHR), and animal model of hypertension and insulin resistance. In *Common Disease-Genetic and Pathogenetic Aspects of Multifactorial Diseases* (H Imura, M Kasuga, K Nakao eds), *Excerpta Medica, Elsevier*, pp219-226, 1999
- 10) N. Iwasaki, T. Babazono, K. Tsuchiya, O. Tomonaga, A. Suzuki, M. Togashi, N. Ujihara, Y. Sakka, H. Yokokawa, M. Ogata, H. Nihei, Y. Iwamoto: Prevalence of the A-to-G mutation at nucleotide 3243 of the mitochondrial tRNA^{Leu} (UUR) gene in Japanese patients with diabetes mellitus and end-stage renal disease. *J Hum Genet* 46:2001 (in press)
- 11) L. del Bosque-Plata, Y. Horikawa, P.E.H. Schwarz, N, J, Cox, N. Iwasaki, 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 Proendocrine Neurogenin 3 Gene (NEUROG3) in Japanese Patients with MODY Diabetes 50:694-696, 2001
- 12) N. Iwasaki, I. Okabe, H. Ohashi, M. Ogata, M. Momoi, H. Yokokawa, Y. Iwamoto: A Novel Splice Site Mutation in the Hepatocyte Nuclear Factor-1 β Gene, IVS2nt+1G>A, Associated with Maturity-Onset Diabetes of the Young, Agenesis of the Left Kidney and Bicornuate Uterus *Diabetologia* 44:387-391, 2001
- 13) N. Iwasaki, T. Babazono, O. Tomonaga, M. Ogata, H. Yokokawa, Y. Iwamoto: Mutations in the hepatocyte nuclear factor-1 β (MODY5) gene are not a major factor contributing to end-stage renal disease in Japanese people with diabetes mellitus *Diabetologia* 44:127-128, 2001
- 14) H. Mori, H. Ikegami, S. Seino, J. Takeda, Y. Seino, T. Hanafusa, T. Awata, T. Kadowaki, N. Yamada, N. Iwasaki, T. Sanke, J. Nanjo, Y. Oka, E. Maeda, M. Kasuga: The Met416 to Val variant in the glycogen synthase gene. *Diabetes Care* 23:1709-1710, 2000
- 15) Yo. Horikawa, Yu. Horikawa, 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 Gene Encoding the Basic-Helix-Loop-Helix

- Transcription Factor Neurogenic Differentiation 4 (NEUROD4) in Japanese Patients with MODY Diabetes 49:1955-1957, 2000
- 16) Y. Horikawa, N. Oda, N.J. Cox, X. Lil, Marju O. Melander, M.Hara, Y. Hinokio. T.H. Lindner, H. Mashima, P.E.H. Schwarz, L. del Bosque-Plata, Yo. Horikawa, Y. Oda, I. Yoshiuchi, S. Colilla, K.S. Polonsky, S. Wei, P. Concannon, N. Iwasaki, J. Schulze, L.J. Baier, C. Bogardus, L. Groop, E. Boerwinkle, C.L. Hanis, G.I. Bell: Genetic variation in the calpain 10 gene (CAPN10) is associated with type 2 diabetes mellitus Nature Genet. 26:163-175, 2000
 - 17) Y. Hinokio, Yu. 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
 - 18) M. Hara, Wang. X, V.P. Paz, N.J. Cox, N.Iwasaki, Y. Iwamoto, G.I. Bell: No diabetes-associated mutations in the coding region of the hepatocyte nuclear factor-4 γ (HNF4G) in Japanese patients with MODY Diabetologia 43:1064-1069, 2000
 - 19) 岩本安彦, 岩崎直子: 糖尿病と遺伝子 教育と医学 48(6):54-61, 2000 慶応義塾大学出版会 東京
 - 20) 岩崎直子: “糖尿病” UP DATE 糖尿病遺伝子の現況 メビオ別冊「Multiple Risk Factor Syndrome」4 Multiple Risk Factor と高血圧 pp143-149, 2000
 - 21) 岩崎直子: 2型糖尿病疾患感受性遺伝子 医学のあゆみ 第5土曜特集 糖尿病の分子医学 ■糖尿病の分子メカニズム 医学のあゆみ 192(5):462-467, 2000
 - 22) 岩崎直子: 糖尿病 臨床病理 49:2・161-164
 - 23) Zhu Q, Yamagata K, Yu L, Tomura H, Yamada S, Yang Q, Yoshiuchi I, Sumi S, Miyagawa J, Tajeda J, Hanafusa T, Matsuzawa Y: Identification of missense mutations in the hepatocyte nuclear factor-3 β gene in Japanese subjects with late-onset Type II diabetes mellitus. Diabetologia 43:1197-1200, 2000
 - 24) Zhu Q, Yamagata K, Tsukahara, Y, Yang Q, Liu W, Hanafusa T, Miyagawa J, Matsuzawa Y: Mutation screening of the hepatocyte nuclear factor (HNF)-6 gene in Japanese subjects with diabetes mellitus. Diabetes Research and Clinical Practice (in press)
 - 25) N. Shihara, Y. Seino et al.: Synergistic effect of polymorphisms of uncoupling protein 1 and β 3-adrenergicreceptor genes on autonomic nervous system activity. Int. J. Obes.(in press)
 - 26) S. Maeda, et al.: Gender-specific haplotype association of collagen α 2 (XI) gene in ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine. J.Hum. Genet. (in press)
 - 27) S. Maeda, et al.: Functional impact of human collagen α 2 (XI) gene polymorphism in pathogenesis of ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine. J.Bone. Miner. Res. (in press)
 - 28) K. Ikari, et al.: Establishment of an optimized set of 406 microsatellite markers covering the whole genome for the Japanese population. J. Hum. Genet. (in press)
 - 29) Osuga J- I, Yamada N. et al.: Targeted disruption of hormone sensitive lipase results in male sterility and adipocyte hypertrophy, but not in obeisty. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2000 97:787-92
 - 30) Yagyu H, Yamada N. et al.: Absence of ACAT-1 attenuates atherosclerosis but causes dry eye and cutaneous xanthomatosis in mice with congenital hyperlipidemia. J Biol Chem. 2000; 275:21324-30.
 - 31) Amemiya-Kudo M, Yamada N. et al.: Promoter Analysis of the Mouse Sterol Regulatory Element-binding Protein-1c Gene. J Biol Chem, 2000;275:31078-31085.
 - 32) Hasty AH, Yamada N. et al.: Sterol Regulatory Element-binding Protein-1 Is Regulated by Glucose at the Transcriptional Level. J Biol Chem. 2000;275:31069-31077
 - 33) Gotoda T, Iizuka Y, Yamada N: Complex connection between CD36 and atherosclerosis, lipid metabolism, and insulin resistance syndromes. Current Atherosclerosis Reports 2, 453-454, 2000
 - 34) K. Tsunoda, T. Sanke, T. Nakagawa, H. Furuta, K. Kanjo: Single Nucleotide Polymorphism (D68D, T to C) in the Syntaxin 1A Gene and Its Correlation to Insulin Requirement in Type2 Diabetic Patients. Diabetologia in submission.
 - 35) Minami, K., Yano, H., Miki, T., Nagashima, K., Tanaka, H., Wang, C-Z., Miyazaki, J., and Seino, S.: Insulin secretion and differential gene expression in glucose-responsive and -unresponsive MIN6 sublines. Am. J. Physiol. Endocrinol Metab 279:E773-E781, 2000
 - 36) Gono, T. and Seino, S.: Structure and function of ATP-sensitive K⁺ channels. In Pharmacology of Ionic Channel Function: Activators and Inhibitors. In Handbook of Experimental Pharmacology. M. Endo (ed.) Springer-Verlmg, Heidelberg, p271-296, 2001
 - 37) 南幸太郎, 三木隆司, 長嶋一昭, 清野 進: 膵 β 細胞 ATP 感受性 K⁺チャンネル遺伝子操作マウス. Diabetes Frontier 11:309-313, 2000
 - 38) Hara, K., Okada, T., Tobe, K., Yasuda, K., Mori, Y., Kadowaki, H., Hagura, R., Akanuma, Y., Kimura, S., Ito, C., and Kadowaki, T.: A Pro12Ala

- polymorphism in PPAR γ 2 may confer resistance to type II diabetes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 271:212-216, 2000
- 39) Miki, H., Yamauchi, T., Suzuki, R., Kubota, N., Terauchi, Y., Kamon, J., Kaburagi, Y., Matsui, J., Akanuma, Y., Kimura, S., Tobe, K., and Kadowaki, T.: Essential role of IRS-1 and IRS-2 in adipocyte differentiation. *Moll. Cell. Biol.* 21:2521-2531, 2000
- 40) Hara, K., Kubota, N., Tobe, K., Terauchi, Y., Okada, T., Miki, H., Komeda, K., Tamemoto, H., Yamauchi, T., Hatura, R., Ito, C., Akanuma, Y., and Kadowaki, T.: The role of PPAR γ as a thrifty gene in both in mice and humans. *Brit. J. Nutr.* 84:235-239, 2001
- 41) H. Mori, H. Okazawa, K. Iwamoto, E. Maeda, M. Hashiramoto, M. Kasuga: A polymorphism in the 5' untranslated region and a Met²²⁹→Leu variant in exon 5 of the human UCP1 gene are associated with susceptibility to type 2 diabetes mellitus. *Diabetologia*, 44:373-376, 2001
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: 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 45 回日本透析医学会日本透析療法学会雑誌 P-493, 2000 福岡 2000 年 6 月 16 日
- 2) 岩崎直子, 堀川幸男, 本田正志, 尾形真規子, 岩本安彦: インスリン分泌における Calpain10 遺伝子の関与について 第 43 回日本糖尿病学会年次学術集会 名古屋市 2000 年 5 月 25-27 日 糖尿病 Vol 43 Supple 1:s-175
- 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 97 回日本内科学会総会日本内科学会雑誌 89:supple p-145, 2000 京都 2000 年 4 月 6-8 日
- 4) 尾形真規子, 淡路健雄, 岩崎直子, 岩本安彦, 宮崎俊一: 正常・変異 HNF-4 α 蛋白の核内局在における相互作用 日本生理学会大会予稿集 p-87 第 77 回日本生理学会大会 東京 2000 年 3 月
- 5) 尾形真規子, 淡路健雄, 岩崎直子, 宮崎俊一, 岩本安彦: HNF-4 α 変異蛋白の細胞内局在からみた MODY1 発症の分子機構の検討 第 23 回日本分子生物学会年会プログラム・講演要旨集 p-754 第 23 回日本分子生物学会年会 神戸 2000 年 12 月
- 6) 尾形真規子, 淡路健雄, 岩崎直子, 宮崎俊一, 岩本安彦: 変異蛋白の細胞内局在からみた MODY1 発症の分子機構の検討 第 43 回日本糖尿病学会年次学術集会 名古屋市 2000 年 5 月 25-27 日 糖尿病 Vol 43 Supple 1:s-91
- 7) 志原伸幸, 清野 裕, 他: スクラーズ・インソマルターゼ遺伝子変異とその発現調節に及ぼす影響 (I-A-27) 糖尿病 43 Supple. 1 S-107 2000
- 8) 足達哲也, 清野 裕, 他: 2 型糖尿病モデル GK ラットの Voglibos 長期投与による食後過血糖抑制作用 (I-D-01) 糖尿病 43 Supple. 1 S-117 2000
- 9) 安田浩一郎, 清野 裕, 他: 肥満関連遺伝子変異と自律神経活動 (II-5-15) 糖尿病 43 Supple. 1 S-181, 2000
- 10) 山縣和也, 宮川潤一郎, 花房俊昭, 松澤佑次: 糖尿病遺伝子 第 43 回日本糖尿病学会総会 (2000.5.24-26, 名古屋)
- 11) 朱 倩, 山縣和也, 塚原弥生, 楊 勤, 花房俊昭, 宮川潤一郎, 松澤佑次: 日本人糖尿病患者における HNF-6 遺伝子異常の検討 第 37 回日本糖尿病学会近畿地方会 (2000.11.18, 大津)
- 12) Yamagata K, Moriwaki M, Nammo T, Tochino Y, Li M, Yang Q, Uehara R, Iwahashi H, Imagawa A, Hanafusa T, Miyagawa J, Matsuzawa Y: Dominant negative HNF-1 α mutant affects the normal development of pancreatic β cells. 60th Annual Meeting and Science Sessions of American Diabetes Association (2000.6.9-13, Texas, USA)
- 13) Yamagata K, Moriwaki M, Nammo T, Tochino Y, Li M, Yang Q, Uehara R, Iwahashi T, Imagawa A, Okita K, Hanafusa T, Miyagawa J, Matsuzawa Y: Overexpression of dominant negative hepatocyte nuclear factor-1 alpha in pancreatic B-cells leads to diabetes mellitus. 11th International Congress of Endocrinology (2000.10.29-11.2, Sydney, Australia)
- 14) 猪狩勝則, 他: 21 番染色体上での後縦靱帯骨化症の疾患感受性遺伝子解析 第 45 回日本人類遺伝学会, 福岡, 2000
- 15) 角田圭子, 中川貴之, 古田浩人, 南條輝志男, 三家登喜夫: 日本人糖尿病患者における Neurogenin3 遺伝子変異の検討 第 37 回日本糖尿病学会近畿地方会 2000 年 11 月 18 日 (大津)・角田圭子, 三家登喜夫, 中川貴之, 古田浩人, 南條輝志男: 2 型糖尿病患者のインスリン治療必要性に関する検討 —発症年齢, 家族歴及び遺伝子多型との関連— 第 35 回日

- 本成人病学会 2001年1月12,13日(東京)
- 16) 清野 進:教育講演 インスリン分泌機構—過去・現在・未来— 第43回日本糖尿病学会年次学術集会(横浜)
 - 17) 南幸太郎, 矢野秀樹, 三木隆司, 長嶋一昭, 清野 進:細胞内カルシウム濃度の異常がインスリン分泌に及ぼす影響:サブクローン化したMIN6細胞を用いた検討 第43回日本糖尿病学会年次学術集会(横浜)
 - 18) 矢野秀樹, 王 長征, 長嶋一昭, 清野 進:膵β細胞 Na⁺-driven Cl₃⁻/HCO₃⁻-exchanger cDNAの機能解析 第43回日本糖尿病学会年次学術集会(横浜)
 - 19) 王 長征, 矢野秀樹, 長嶋一昭, 清野 進:膵β細胞 bicarbonate transporter のクローニングと機能解析 第73回日本内分泌学会学術総会(京都)
 - 20) 横井伯英, 安田和基, 尾崎信暁, 清野 進:cAMP結合タンパク質 CAMPS と相互作用する新たな分子の同定 第73回日本内分泌学会学術総会(京都)
 - 21) 三木隆司, 南幸太郎, 蓑越靖彦, 矢野秀樹, 清野 進:シンポジウム「糖尿病—インスリン合成・分泌から作用まで—」K_{ATP} チャンネルによる血糖調節機構とその破綻 第73回日本生化学会大会(横浜)
 - 22) 千本木裕, 三橋 登, 三木隆司, 凌 楓, 清野 進, 柴田武彦:ワークショップ「ミトコンドリアゲノムの維持と障害の分子論」ミトコンドリア呼吸能の消失を引き起こす酵母 atm1-1 変異とそのヒトオースロング MTABC3 第23回日本分子生物学会(神戸)
 - 23) 矢野秀樹, 王 長征, 長嶋一昭, 横山裕司, 清野 進:膵β細胞 Na⁺-driven Cl⁻/HCO₃⁻ exchanger のクローニングおよび機能解析 第23回日本分子生物学会(神戸)
 - 24) Symposium: Physiology of Ion Channels 「Diverse roles of ATP-sensitive K⁺ channels: studies in mice lackin Kir6.2」 Canadian Physiological Society (Canada)
 - 25) 「ATP-sensitive K⁺ channels: structure, function, and pathophysiology learned from cloning and knockout」 International Seminar at Karolinska Institute (Sweden)
 - 26) Symposium 「ATP-sensitive K⁺ channels: structure, function, and physiological roles」 The 8th Federation Meeting of Korean Basic Medical Scientists 2000 (Korea)
 - 27) Symposium 「Diverse roles of K_{ATP} channels in endocrine pancreas」 17th International Diabetes Federation Congress (Mexico)
 - 28) Plenary Lecture 「A novel mechanism of cAMP-dependent insulin secretion」 中華民国糖尿病学会 Symposium on Molecular and Cellular Diabetology (Taiwan)
 - 29) 久保田孝則, 森 啓行, 田守義和, 荒木 悟, 馬杉治郎, 仁木敏晴, 岡澤秀樹, 川西正敏, 篠田弘昭, 小池隆史, 春日雅人, 飯塚 孝, 西川哲男:ヒト UCP1 遺伝子および UCP2 遺伝子のクローニングと肥満患者, NIDDM 患者における遺伝子異常の解析 第18回日本肥満学会
 - 30) 森 啓行, 久保田孝則, 田守義和, 春日雅人:ヒト UCP1 遺伝子および UCP2 遺伝子のクローニングと肥満患者, NIDDM における遺伝子異常の解析 第34回日本糖尿病学会近畿地方会
 - 31) 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
 - 32) 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
 - 33) 久保田孝則, 森 啓行, 田守義和, 春日雅人, 福田恒夫, 三木正敏: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
 - 34) 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
 - 35) The Role of PPAR γ in Insulin Resistance 第1回 International Forum on Progressive Endocrinology 平成12年2月11日 神戸
 - 36) PPAR γ 遺伝子—儉約遺伝子としての役割 第37回日本臨床分子医学会学術総会 平成12年3月10日 東京
 - 37) PPAR γ 遺伝子の糖代謝における役割 第97回日本内科学会学術総会 平成12年4月6日 京都
 - 38) PPAR γ 遺伝子 Pro12Ala 多型と2型糖尿病の関連 第43回日本糖尿病学会学術総会 平成12年5月 名古屋
 - 39) PPAR γ の儉約遺伝子としての役割 第28回薬物活性シンポジウム 平成12年11月9日 八カ岳
 - 40) The role of PPAR γ as a thrifty gene バイオジャ

- パン 2000 シンポジウム 平成 12 年 12 月 東京
- 41) IRS-2 欠損マウスの糖尿病の糖尿病発症における肝臓でのインスリン抵抗性の関与 第 43 回日本糖尿病学会学術総会 平成 12 年 5 月 名古屋
- 42) IRS-1 は主に個体の大きさに関与し IRS-2 は主に糖代謝に関与する 第 43 回日本糖尿病学会学術総会 平成 12 年 5 月 名古屋
- 43) SREBP/PPAR γ による脂肪細胞分化の調節 第 43 回日本糖尿病学会学術総会 平成 12 年 5 月 名古屋
- 44) RXR アンタゴニストは新規抗肥満, 抗糖尿病薬となり得る 第 43 回日本糖尿病学会学術総会 平成 12 年 5 月 名古屋
- 45) 脂肪細胞分化における IRS-1, IRS-2, p85 α の役割 第 43 回日本糖尿病学会学術総会 平成 12 年 5 月 名古屋
- 46) 山内敏正, 脇 裕典, 米田嘉重郎, 土田温子, 三木啓司, 戸辺一之, 木村 哲, 影近弘之, 首藤紘一, 門脇 孝: RXR アンタゴニストは新規抗肥満, 抗糖尿病薬となり得る 3 月 日本臨床分子医学会
- 47) 山内敏正, 脇 裕典, 米田嘉重郎, 土田温子, 三木啓司, 戸辺一之, 木村 哲, 影近弘之, 首藤紘一, 門脇 孝: RXR アンタゴニストは新規抗肥満, 抗糖尿病薬となり得る 4 月 日本内科学会
- 48) 山内敏正, 脇 裕典, 米田嘉重郎, 土田温子, 三木啓司, 戸辺一之, 木村 哲, 影近弘之, 首藤紘一, 門脇 孝: RXR アンタゴニストは新規抗肥満, 抗糖尿病薬となり得る 6 月 日本内分泌学会
- 49) 山内敏正, 脇 裕典, 米田嘉重郎, 土田温子, 三木啓司, 戸辺一之, 木村 哲, 影近弘之, 首藤紘一, 門脇 孝: RXR アンタゴニストは新規抗肥満, 抗糖尿病薬となり得る 7 月 代謝コロキウム
- 50) 山内敏正, 脇 裕典, 米田嘉重郎, 土田温子, 三木啓司, 戸辺一之, 木村 哲, 影近弘之, 首藤紘一, 門脇 孝: RXR アンタゴニストは新規抗肥満, 抗糖尿病薬となり得る 8 月 アデイポサイエンス研究会
- 51) 山内敏正, 加門淳司, 脇 裕典, 米田嘉重郎, 土田温子, 戸辺一之, 木村 哲, 影近弘之, 首藤紘一, 門脇 孝: RXR アンタゴニストは新規抗肥満, 抗糖尿病薬となり得る 10 月 日本肥満学会
- 52) 山内敏正, 加門淳司, 脇 裕典, 米田嘉重郎, 土田温子, 戸辺一之, 木村 哲, 尾池雄一, 山村研一, 門脇 孝: CBP ヘテロ欠損マウスは著明な白色脂肪組織量の低下と良好なインスリン感受性を呈する 10 月 日本肥満学会
- 53) 山内敏正, 加門淳司, 脇 裕典, 米田嘉重郎, 土田温子, 戸辺一之, 木村 哲, 影近弘之, 首藤紘一, 門脇 孝: RXR アンタゴニストは新規抗肥満, 抗糖尿病薬となり得る 10 月 日本糖尿病合併症学会
- 54) 山内敏正, 加門淳司, 脇 裕典, 米田嘉重郎, 土田温子, 戸辺一之, 木村 哲, 影近弘之, 首藤紘一: RXR アンタゴニストは新規抗肥満, 抗糖尿病薬となり得る 10 月 日本生化学会

H. 知的所有権の出願・取得状況

無し

日本人2型糖尿病に関係する遺伝子多型の研究
—PTP1B 遺伝子の多型解析—

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：日本人2型糖尿病に関連する疾患感受性遺伝子多型を同定する目的で、Protein Tyrosine Phosphatase-1B (PTP1B)遺伝子の多型を検索し、同定された遺伝子多型に関して Case-Control Study による2型糖尿病との相関の有無を解析した。PTP1B 遺伝子においては2個の SNPs (single nucleotide polymorphisms)が同定された。イントロン5内+37 c⇒aとエクソン8内 Pro³⁰³(CCC)⇒Pro(CCT)の両 SNPs とも2型糖尿病との相関は認めなかった。両者は連鎖不平衡にあった。また後者の多型に関して、minor allele である T 多型を有するものは2型糖尿病患者群において高血圧および低コレステロール血症と相関を呈した。また両多型に関して正常対照群において、minor allele(前者で a 多型、後者で T 多型)を有するものは HbA1c 値が低い傾向が認められた。

A. 研究目的

これまでに1遺伝子の異常により2型糖尿病が発症するケースとして、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、HNF1α 遺伝子、HNF4α 遺伝子、HNF1β 遺伝子）などの遺伝子異常によるものがあるがその頻度は低く、一般の2型糖尿病は複数の遺伝的要因に環境要因が組み合わさって発症すると考えられている。2型糖尿病の疾患感受性遺伝子多型を数多く同定し、糖尿病発症リスクを有すると考えられる未発症の個人に対して生活習慣改善を適切に指導することにより、糖尿病発症を抑制することが期待できる。これまでに、2型糖尿病との相関が確認された遺伝子多型として、Calpain10 遺伝子のイントロン内の多型やヤペルオキシゾーム増殖薬応答性受容体γ 遺伝子の Pro12Ala 多型などがあり、両遺伝子における遺伝子多型が糖尿病の発症に関与していることが知られている。我々は既報のノックアウトマウスの成績から、糖代謝に影響を与えらる Protein Tyrosine Phosphatase-1B (PTP1B)遺伝子における遺伝子多型を検索し、同定された遺伝子多型における疾患感受性の有無を検討した。

B. 研究方法

データベースで報告されている PTP1B 遺伝子の genomic DNA の配列を元に、全参加施設によって PCR-SSCP (Polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism)法あるいは PCR direct sequence 法を用いてエクソンイントロン境界を含めた蛋白コード領域に関して遺伝子多型の同定を試みた。見い出された遺伝子多型に関しては n 数

を増やして Case-Control Study を行った。

(倫理面での配慮)

今回その DNA を遺伝子解析に用いた糖尿病患者と正常対照者の全員について、研究の目的や性質を説明し、書面による同意を得た。また対象者の個人を特定できる情報については外部に漏洩しないように、他と遮断されたコンピューターでのデータベース管理を行っている。今後の学会や論文での発表の際には個人を特定できる情報は完全に匿名化する。

C. 研究結果

イントロン5の+37 c⇒a 多型およびエクソン8内に silent mutation である Pro³⁰³(CCC)⇒Pro(CCT)多型を同定した。それぞれの SNPs に関して糖尿病患者528名、正常対照者493名の genotyping をおこなった。結果を以下の表に示す。

イントロン5 +37 c ⇒ a 多型

	cc	ac	aa	total
2型糖尿病患者	215	236	77	528
正常対照者	209	224	60	493
total	424	460	137	1021

エクソン8 Pro³⁰³(CCC) ⇒ Pro(CCT)多型

	CC	CT	TT	total
2型糖尿病患者	320	177	31	528
正常対照者	304	169	20	493
total	624	346	51	1021

これら2個の多型は連鎖不平衡を示した

($P < 0.000001$)。両多型における変異アリの出現頻度は2型糖尿病群と正常対照群において有意差を認めなかった($P = 0.336$ 、 $P = 0.433$)。臨床的指標の比較では2型糖尿病群において Pro³⁰³(CCC) ⇒ Pro(CCT)多型の T 多型を有するものは有さないものに比して血圧が高く($P = 0.0022$)、コレステロール値が低い($P = 0.0326$)傾向を示した。また正常対照群においてイントロン 5 +37 c ⇒ a 多型の a 多型を有するものと Pro³⁰³(CCC) ⇒ Pro(CCT)多型の T 多型を有するものは有さないものに比して HbA1c 値が低い($P = 0.0010$ 、 $P = 0.0370$)傾向を示した。

D. 考察

PTP1B 遺伝子に2個の SNPs を同定し、両者は連鎖不平衡にあることが確認された。両 SNPs とも糖尿病との相関を示さなかった。また臨床的指標で多型の有無にて差を示したものもあったが、多くの検定を行っているため、統計学的および病因的意義についてはさらなる検討が必要と思われる。

E. 結論

PTP1B 遺伝子は糖尿病の疾患感受性遺伝子である可能性は低いと考えられた。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
分担研究報告書

日本人 2 型糖尿病における UCP1 遺伝子多型に関する研究

分担研究者 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：日本人 2 型糖尿病に関連する疾患感受性遺伝子多型を同定する目的で，uncoupling protein-1 (UCP1) 遺伝子を解析した。5' 非翻訳領域と蛋白コード領域に 2 種類の多型（開始コドンから 112 bp 上流の A⇒C 変異および Met²²⁹(ATG)⇒Leu(TTG)）を見出した。両者は連鎖不平衡にあった。さらに 2 型糖尿病患者 320 名と正常対照者 250 名において両多型の頻度を比較したところ，2 型糖尿病群において変異型多型の出現頻度が高かった。また，5' 非翻訳領域の A⇒C 変異により同部位に存在する cis-element である insulin response sequence の配列が変化し，C 型の 5' 非翻訳領域の転写活性は A 型の 40% に低下していた。以上より，UCP1 遺伝子上の 2 種類の多型は糖尿病感受性多型と考えられ，UCP1 の転写活性に影響を与えていることが予想された。

A. 研究目的

一般の 2 型糖尿病は複数の遺伝的要因に環境要因が組み合わさって発症すると考えられている。2 型糖尿病の疾患感受性遺伝子多型を数多く同定し，糖尿病発症リスクを有すると考えられる未発症の個人に対して生活習慣改善を適切に指導することにより，糖尿病発症を抑制することが期待できる。ヒトの体内において摂取したカロリーをエネルギー貯蔵の方向へ傾ける節約遺伝子として $\beta 3$ アドレナリン受容体遺伝子やペルオキシゾーム増殖薬応答性受容体 γ 遺伝子などがあり，両遺伝子における遺伝子多型が糖尿病の発症に関与していることが知られている。我々は節約遺伝子となりうる UCP1 遺伝子について遺伝子解析を行い，同定された遺伝子多型における疾患感受性の有無を検討した。

B. 研究方法

UCP はミトコンドリア内膜に存在し，エネルギーを熱に変換し (thermogenesis)，体温の恒常性やエネルギー代謝を調節している。UCP には現在 4 つのサブグループが報告されており，UCP1 は主に齧歯類の褐色脂肪細胞で発現し，エネルギー代謝に重要な役割を果たすことが報告されている。ヒトにおいては多臓器に発現する UCP2 や骨格筋に発現する UCP3 が重要であると考えられるが，白色脂肪組織に UCP1 が発現していることが知られている。我々は節約遺伝子の一つとしてこの UCP1 を取り上げ，UCP1 遺伝子の遺伝子構造を決定し，PCR-SSCP (Polymerase chain reaction - single strand conformation polymorphism) 法および PCR-RFLP (PCR - restriction fragment length polymorphism) 法を用いて 5' 非翻訳領域を含む蛋白コード領域に関し

て遺伝子多型の同定を試み，見い出された遺伝子多型に関して糖尿病患者 320 名と正常対照者 250 名において多型の頻度を比較検討した。また，5' 非翻訳領域に確認された遺伝子多型の病因的意義を検討する目的で遺伝子多型の有無による転写活性の差異をルシフェラーゼアッセイを用いて比較した。

(倫理面での配慮)

今回その DNA を遺伝子解析に用いた糖尿病患者 320 名と正常対照者 250 名の全員について，研究の目的や性質を説明し，書面による同意を得た。また対象者の個人を特定できる情報については外部に漏洩しないように，他と遮断されたコンピューターでのデータベース管理を行っている。学会や論文での発表の際には個人を特定できる情報は完全に匿名化されている。

C. 研究結果

UCP1 遺伝子の開始コドンから 112 bp 上流の 5' 非翻訳領域に A⇒C 多型および蛋白コード領域内に Met²²⁹(ATG)⇒Leu(TTG)多型を同定した。A⇒C 多型の頻度は糖尿病患者群において 10.2% (320 名中 AA: 257 名，AC: 61 名，CC: 2 名)，正常対照者において 6.2% (250 名中 AA: 220 名，AC: 29 名，CC: 1 名) であり，糖尿病群において有意に出現頻度が高かった ($P = 0.017$)。また Met²²⁹(ATG) ⇒ Leu(TTG)多型に関しては糖尿病患者群において 10.8% (320 名中 AA: 254 名，AC: 63 名，CC: 3 名)，正常対照者において 7.2% (250 名中 AA: 214 名，AC: 36 名，CC: 0 名) であり，糖尿病群において有意に出現頻度が高かった ($P = 0.038$)。両多型は連鎖不平衡にあった ($P < 0.00001$)。以上から UCP1 遺伝子の 5' 非翻訳領域の A⇒C 多型および蛋白コ

ード領域内の Met²²⁹(ATG)⇒Leu(TTG)多型は糖尿病感受性遺伝子多型であることが示された。

UCP1 遺伝子のコードする 229 番目のアミノ酸はマウスでは Leu であることから Met²²⁹(ATG)⇒Leu(TTG)多型の病因的意義は少ないものと考えられた。そこで 5'非翻訳領域の A⇒C 多型の有無による転写活性の差をルシフェラーゼアッセイにより検討した。同多型を含むプロモーター領域を PCR を用いて増幅し、C 型 (変異型) のプロモーターと A 型 (野生型) のプロモーターの転写活性を測定したところ、C 型では A 型に比して 40%に活性が低下していた。以上から UCP1 の 5'非翻訳領域の A ⇒ C 多型を有する個体は、UCP1 の発現レベルが低下している可能性が示唆され、そのためエネルギー貯蔵傾向となり、2 型糖尿病の発症要因になっている可能性が示された。

D. 考察

5'非翻訳領域の A⇒C 多型の存在する部位には insulin response sequence (IRS: T(G/A)TTT(T/G) (G/T) が存在する。これまでにインスリンが生理的濃度で培養褐色脂肪細胞における UCP1 の発現を増加させることが報告されている。この多型によりこの IRS が変化を受けることとなり、UCP1 の転写活性が低下することが予想された。同多型による UCP1 の発現レベルの低い個体においては、エネルギーを熱に変換するメカニズムが障害されており、エネルギー貯蔵傾向となることが予測された。A⇒C 多型が糖尿病群において高い出現頻度を呈したことから、UCP1 遺伝子は儉約遺伝子として糖尿病の発症に関与する可能性が示唆された。

E. 結論

UCP1 遺伝子は儉約遺伝子として、2 型糖尿病の発症に関与している可能性がある。UCP1 遺伝子の 5'非翻訳領域の A⇒C 多型を有する未発症者は、肥満や過食などの生活習慣により糖尿病発症のリスクが高くなる可能性があるため、適切な生活習慣を指導するべきであると考えられる。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) H. Mori, H. Okazawa, K. Iwamoto, E. Maeda, M. Hashiramoto, M. Kasuga: A polymorphism in the 5' untranslated region and a Met²²⁹⇒ Leu variant in exon 5 of the human UCP1 gene are associated with susceptibility to type 2 diabetes mellitus.

Diabetologia, 44:373-376, 2001

2. 学会発表

- 1) 第 18 回日本肥満学会
ヒト UCP1 遺伝子および UCP2 遺伝子のクローニングと肥満患者、NIDDM 患者における遺伝子異常の解析：久保田孝則，森 啓行，田守義和，荒木 悟，馬杉治郎，仁木敏晴，岡澤秀樹，川西正敏，篠田弘昭，小池隆史，春日雅人，横浜労災病院：飯塚 孝，西川哲男
- 2) 第 34 回日本糖尿病学会近畿地方会
ヒト UCP1 遺伝子および UCP2 遺伝子のクローニングと肥満患者、NIDDM における遺伝子異常の解析：森 啓行，久保田孝則，田守義和，春日雅人
- 3) 第 35 回日本臨床代謝学会総会
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：久保田孝則，森 啓行，田守義和，春日雅人
- 4) 第 95 回日本内科学会総会
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：森 啓行，久保田孝則，田守義和，春日雅人
- 5) 第 41 回日本糖尿病学会年次学術集会
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：久保田孝則，森 啓行，田守義和，春日雅人，西脇病院：福田恒夫，三木正敏
- 6) 第 19 回日本肥満学会総会
NIDDM 患者，肥満患者における UCP1, 2, 3 遺伝子多型の検索：森 啓行，小池隆史，岩本和也，田守義和，春日雅人

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
分担研究報告書

多因子の単一因子への分割による糖尿病の遺伝解析

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 マウスにおいて第3染色体にマップされている *Idd3* の候補遺伝子 *I12* の同定を目的として、*I12* 領域の組換え染色体を導入したコンジュニックマウスの表現型を詳細に解析した結果、*I12* が *Idd3* そのものである可能性が強く示唆された。2型糖尿病のモデル NSY マウスにおいて同定した3つの主要遺伝子座 (*Nidd1*, *Nidd2*, *Nidd3*) をそれぞれ単独で有するコンソミックマウスを作製した結果、それぞれ異なる表現型を規定する遺伝子であることが明らかとなった。*Nidd1* の候補遺伝子である *Tcf2* (*Hnf1b*) のプロモーターには変異を認めず、遺伝子発現量にも有意の変化を認めなかった。ヒト対応遺伝子 *TCF2* の解析を進めた結果、2型糖尿病の主要遺伝子ではないことが示された。

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い、得られた結果の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 マウスにおいて第3染色体にマップされている *Idd3* の候補遺伝子 *I12* が責任遺伝子であるか否かを解明する目的で、NOD と同一の *I12* シークエンスを有し、周辺のフランキングマーカーが異なる組換え染色体を導入したコンジュニック NOD マウスを作製し、表現型を詳細に NOD と比較解析した。

・2型糖尿病：NSY でマップした3つの主要 QOL の局在する染色体をそれぞれ単独で有するコンソミックマウスをマーカーアシスト法を用いて作製した。作製したコンソミックマウスの表現型をコントロールマウスならびに NSY マウスと詳細に比較解析した。

3つの主要 QOL のなかで最も強力な *Nidd1* 領域に存在する候補遺伝子 *Tcf2* (*Hnf1b*) のプロモーターを含む全塩基配列を決定するとともに、NSY とコントロールマウスにおける遺伝子発現量を比較検討した。

・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：

NOD マウスと同一の *I12* シークエンスを有し、周辺のフランキングマーカーが異なる組換え染色体を導入したコンジュニック NOD マウスは、発症頻度、発症年齢、組織像のいずれに関しても NOD マウスと同等の表現型を示した。

・2型糖尿病：

マーカーアシスト法を用いることにより、通常法と比較して倍のスピードでコンソミックが完成した。NSY でマップした3つの主要 QOL の局在する染色体のうち、*Nidd1* の存在する第11染色体のコンソミックマウスはコントロールマウスに比し、空腹時血糖値、負荷後血糖値、空腹時インスリン値が有意に上昇、糖負荷後のインスリン反応は低下傾向を示したが、体重・体脂肪には有意の変化を認めなかった。一方、*Nidd2* の存在する第14染色体のコンソミックマウスは空腹時インスリン値には有意の増加を認めたが、耐糖能には有意の変化を認めず、体重・体脂肪もコントロールマウスと同等であった。*Nidd1* の候補遺伝子 *Tcf2* のプロモーターには有意の変異を認めず、遺伝子発現量にも有意の変化を認めなかった。

ヒト2型糖尿病と HNF1 β 遺伝子多型との間には有意の関連を認めなかった。

D. 考察 ・ E. 結論

糖尿病は疾患としても遺伝的にも異質性が強く、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糖尿病のモデル動物（1型糖尿病：NOD マウス、2型糖尿病：NSY マウス）を用いることにより、ヒトの complex な trait を遺伝的に均一で環境因子のコントロールも可能な simple な trait に変換するとともに、複数の遺伝子よりなる遺伝因子をコンジェニック・コンソミックを用いることで polygenic な trait を monogenic な trait に分割し、多因子疾患の遺伝解析を効率よく進めるというストラテジーで研究を進めた

・ 1型糖尿病：

NOD マウスと同一の *Il2* シークエンスを有し、周辺のフランキングマーカーが異なる組換え染色体を導入したコンジェニック NOD マウスが NOD マウスと同等の表現型を示したことから、NOD の *Il2* が *Idd3* の責任遺伝子であることが強く示唆された。

・ 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てきた2型糖尿病のモデル動物 NSY マウスを対象に施行したゲノムスキャンによりマッピングしてきた *Nidd1*、*Nidd2* はいずれも連鎖を示す領域が極めて広いことから、単一の遺伝子効果ではなく、同一染色体上に存在する複数の遺伝子効果の総和である可能性が高い。そこで、本研究では各 QOL が局在する染色体全体を導入したコンソミックマウスをまず作製し、その表現型を解析した後、各構成要素に分解したコンジェニックマウスの解析を進めるストラテジーを用いた。

Nidd1 のマップされた第 11 染色体のみを NSY から導入したコンソミックマウスにおいて、空腹時血糖値、負荷後血糖値ともに有意に上昇し、空腹時インスリン値も有意に上昇したことから、この染色体上に耐糖能に強く影響する QOL が存在することが証明された。体重・腹腔内脂肪量には有意の変化を与えることなく空腹時インスリン値を有意に上昇させたことから、*Nidd1* は肥満を介することなく、インスリン抵抗性ならびに耐糖能低下を惹起する遺伝子であることが明らかとなった。

一方、*Nidd2* のマップされた第 14 染色体のみを NSY から導入したコンソミックマウスにおいては、空腹時インスリン値は有意に上昇したが、耐糖能には全く変化を認めず、体重・腹腔内脂肪にも有意の変化を認めなかったことから、*Nidd2* は肥満を介することなく、インスリン抵抗性を惹起するが耐糖能には影響しない遺伝子であることが明らか

となった。*Nidd1* と *Nidd2* がともにインスリン抵抗性を惹起しながら、前者のみが耐糖能に影響した理由として、前者がインスリン分泌にも影響する可能性が考えられた。今後、両遺伝子をとともに有するダブルコンソミックを作製し、遺伝子相互作用を含め解析を進める予定である。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Ueda H, Ikegami H, Kawaguchi Y, Fujisawa T, Nojima K, Babaya N, Yamada K, Shibata M, 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* 43:932-938, 2000
- (2) 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 NSY mice. *Metabolism* 49:651-659, 2000
- (3) Kawabata Y, Ikegami H, Kawaguchi Y, Fujisawa T, Hotta M, Ueda H, Shintani M, Nojima K, Ono M, Nishino M, Taniguchi H, Noso S, Kazunori Y, Babaya N, Ogihara T: Age-related association of MHC class I chain-related gene A (MICA) with type I (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Hum Immunol* 61:624-629, 2000
- (4) Nishino, M, Ikegami H, Kawaguchi Y, Fujisawa T, Kawabata Y, Shintani M, Ono M, Horiki M, Kawasaki E, Ogihara T: Polymorphism in gene for islet autoantigen, IA-2, and type 1 diabetes in Japanese subjects. *Hum Immunol* 2001 (in press)
- (5) Ikegami H, Fujisawa T, Makino S, Ogihara T: Genetic dissection of type 1 diabetes susceptibility gene, *Idd3*, by ancestral haplotype congenic mapping. *Ann NY Acad Sci* 2001 (in press)
- (6) Babaya N, Ikegami H, Kawaguchi Y, Fujisawa T, Ueda H, Fukuda M, Makino S, Ogihara T: Congenic mapping and functional analysis of second component of MHC-linked diabetogenic gene (*Idd16*). *Int J Diabetes* 8:1-7, 2000
- (7) Yamada K, Ikegami H, Kawaguchi Y, Fujisawa T, Hotta M, Ueda H, Shintani M, Nojima K, Kawabata Y, Ono M, Nishino M, Itoi M, Babaya N, Shibata M, Makino S, Ogihara T: Sequence analysis of candidate genes for common susceptibility to type 1 and type 2 diabetes in mice. *Endocrine J* 2001 (in press)

- (8) Ueda H, Ikegami H, Kawaguchi Y, Fujisawa T, Nojima K, Babaya N, Yamada K, Shibata M, Yamato E, Ogihara T: Mapping and promoter sequencing of HNF-1 β gene in diabetes-prone and -resistant mice.
Diab Res Clin Prac 2001 (in press)
- (9) Babaya N, Ikegami H, Kawaguchi Y, Fujisawa T, Hotta M, Ueda H, Shintani M, Nojima K, Kawabata Y, Ono M, Nishino M, Itoi-Babaya M, Taniguchi H, Noso S, Horiki M, Yamada K, Fukuda M, Ogihara T: Lack of association between hepatocyte nuclear factor-1b gene and common forms of type 2 diabetes in the Japanese population.
Diab Nutr Metab 14, 2001 (in press)
- (10) Shen GQ, Ikegami H, Kawaguchi Y, Fujisawa T, Hotta M, Ueda H, Shintani M, Nojima K, Kawabata Y, Ono M, Yamada K, Babaya N, Ogihara T: Insulin receptor substrate-1 polymorphism in non-insulin-dependent diabetes mellitus and essential hypertension: association study and meta-analysis. *Diabeties Res* 35:77-86, 2001

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
分担研究報告書

罹患同胞対法を用いた NIDDM 遺伝子の単離

分担研究者 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 糖尿病センター教授

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 265 組の罹患同胞対法を用い、multipoint analysis で染色体 9 番上に 1 箇所の統計学的に有意な領域をピックアップした。今後原因遺伝子のクローニングを進めるとともにこの領域に存在する候補遺伝子についても association study 等により解析を行う。メキシコ系アメリカ人で報告された 2 型糖尿病原因遺伝子である *Calpain 10* の日本人 2 型糖尿病の発症に対する影響を 3 種類の SNP を用いたハプロタイプ解析により検討した。その結果、本遺伝子は日本人 2 型糖尿病発症に有意な作用は及ぼさないが、インスリン分泌には有意に影響することが認められ、major gene ではなくむしろ minor gene としての意義が確認された。

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 、NEUROD4、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。糖尿病合併症、特に末期腎不全に関連した遺伝素因についても解析を行った。若年で糖尿病を発症し、50 歳未満で透析に導入された末期腎不全患者 54 例について MODY5/HNF-1 β 遺伝子のスクリーニングを行ったが、変異を有する者は認められなかった。また、ミトコンドリア遺伝子 3243 位変異は一般の糖尿病患者と比較して糖尿病と末期腎不全を有する患者において有意に高頻度に認められた。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、自覚的症狀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) 多因子疾患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。現在は ABI377 自動シークエンサー、およびソフトウェア Gene Scan、Genotyper を用い、蛍光色素を用いたタイピングシステムを採用している。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 、NEUROD4、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 変異蛋白の機能解析を行っている。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) 本研究は大学の倫理委員会の承認を得ており、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従来17箇所の連鎖の可能性の否定できない領域をTwo-point analysisによりピックアップしていたが、さらにMultipoint analysisでは、染色体9番上にLOD score=3.5と統計学的に有意の領域を見出した。また、次にLOD scoreの高かった領域は第21番染色体長腕上に認められた。この領域はOPLL(後縦靭帯骨化症)の疾患感受性座位と一致しているようである。OPLL患者では2型糖尿病を有するサンプルが多かったという情報もあり、この領域にも何らかの2型糖尿病に関連した遺伝子が存在する可能性は否定できない。

(2) メキシコ系アメリカ人で報告された2型糖尿病原因遺伝子である*Calpain 10*の日本人2型糖尿病の発症に対する影響を3種類のSNPを用いたハプロタイプ解析により検討した。その結果、本遺伝子は日本人2型糖尿病発症に有意な作用は及ぼさないが、インスリン分泌には有意に影響することが認められた。

(3) 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, NEUROD4, 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。

(4) 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) 先進国を中心として2型糖尿病の全ゲノム解析が次々と報告されつつある。我々も第1段階の解析を終了し、統計学的に有意の領域を認めたが、この成績は約400サンプルから得られた結果であり、現在は全500サンプルを用いて、さらに関心領域に

ついてfine mappingを施行している。今後は[1]このデータの再現性を確認すること、[2]この領域に存在する候補遺伝子について検討すること、[3]原因遺伝子のクローニングを行うことを中心に研究をさらに進める予定である。

2型糖尿病の遺伝素因には人種差が存在することが確認されているが、我々の検討では*Calpain 10*は、メキシコ系アメリカ人2型糖尿病ではmajor geneとして、日本人2型糖尿病ではminor geneとして作用していることが確認された点が興味深い。

(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20種類程度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、日本人MODYで最も高頻度に変異が認められる遺伝子は依然としてMODY3/HNF-1αであるという結論は不変である。

(3) MODY1/HNF-4α Q268X 変異蛋白で認められた現象は新知見であり、その解釈や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し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

今後さらに現在の研究を推進することにより、ゲノム解読情報の利用、国際コンソーシアムにおけるデータの比較なども相まって、さらに有用な情報が集積され、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. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) N. Iwasaki, T. Babazono, K. Tsuchiya, O. Tomonaga, A. Suzuki, M. Togashi, N. Ujihara, Y. Sakka, H. Yokokawa, M. Ogata, H. Nihei, Y. Iwamoto
Prevalence of the A-to-G mutation at nucleotide 3243 of the mitochondrial tRNA^{Leu}(UUR) gene in Japanese patients with diabetes mellitus and end-stage renal disease
J Hum Genet 46: 2001 (in press)
- 2) L. del Bosque-Plata, Y. Horikawa, P.E.H. Schwarz, N.J. Cox, N. Iwasaki, 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 Proendocrine Neurogenin 3 Gene (NEUROG3) in Japanese Patients with MODY
Diabetes 50:694-696, 2001
- 3) N. Iwasaki, I. Okabe, H. Ohashi, M. Ogata, M. Momoi, H. Yokokawa, Y. Iwamoto
A Novel Splice Site Mutation in the Hepatocyte Nuclear Factor-1 β Gene, IVS2nt+1G>A, Associated with Maturity-Onset Diabetes of the Young, Agenesis of the Left Kidney and Bicornuate Uterus
Diabetologia 44: 387-391, 2001
 - 4) N.Iwasaki, T. Babazono, O. Tomonaga, M. Ogata, H. Yokokawa, Y. Iwamoto
Mutations in the hepatocyte nuclear factor-1 β (MODY5) gene are not a major factor contributing to end-stage renal disease in Japanese people with diabetes mellitus
Diabetologia 44: 127-128, 2001
 - 5) H. Mori, H. Ikegami, S. Seino, J. Takeda, Y. Seino, T. Hanafusa, T. Awata, T. Kadowaki, N. Yamada, N. Iwasaki, T. Sanke, K. Nanjo, Y. Oka, E. Maeda, M. Kasuga.
The Met416 to Val variant in the glycogen synthase gene.
Diabetes Care 23:1709-1710, 2000
 - 6) Yo. Horikawa, Yu. Horikawa, 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 Gene Encoding the Basic-Helix-Loop-Helix Transcription Factor Neurogenic Differentiation 4 (NEUROD4) in Japanese Patients with MODY
Diabetes 49:1955-1957, 2000
 - 7) Y. Horikawa, N. Oda, N. J. Cox, X. Li1, Marju O. Melander, M. Hara, Y. Hinokio, T. H. Lindner, H. Mashima, P.E.H. Schwarz, L. del Bosque-Plata, Yo. Horikawa, Y. Oda, I. Yoshiuchi, S. Colilla, K. S. Polonsky, S. Wei, P. Concannon, N. Iwasaki, J. Schulze, L. J. Baier, C. Bogardus, L. Groop, E. Boerwinkle, C. L. Hanis, G. I. Bell
Genetic variation in the calpain 10 gene (CAPN10) is associated with type 2 diabetes mellitus
Nature Genet. 26: 163-175, 2000
 - 8) Y. Hinokio, Yu. 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
 - 9) M. Hara, Wang, X, V.P. Paz, N.J. Cox , N. Iwasaki, Y. Iwamoto, G.I. Bell
No diabetes-associated mutations in the coding region of the hepatocyte nuclear factor-4 γ (HNF4G) in Japanese patients with MODY
Diabetologia 43:1064-1069, 2000
 - 10) 岩本安彦, 岩崎直子
糖尿病と遺伝子
教育と医学 48(6):54-61, 2000
慶應義塾大学出版会 東京
 - 11) 岩崎 直子
"糖尿病" UP DATE
糖尿病遺伝子の現況
メビオ別冊「Multiple Risk Factor Syndrome」4
Multiple Risk Factor と高血圧 pp 143-149, 2000
 - 12) 岩崎 直子
2型糖尿病疾患感受性遺伝子
医学のあゆみ 第5土曜特集
糖尿病の分子医学
■糖尿病の分子メカニズム
医学のあゆみ 192(5) : 462-467, 2000
 - 13) 岩崎直子
糖尿病
臨床病理 49:2・161-164
2. 学会発表
 - 1) N. Iwasaki
Maturity-onset diabetes of the young (MODY) in Japanese
Endocrine Update 2000, Annual synposium of Korean Endocrine Society Tejon, Korea
November 24-25, 2000
 - 2) 岩崎直子
糖尿病
シンポジウム S3:遺伝子多型
臨床病理 48(Suppl.): 48, 2000
第47回日本臨床病理学会総会
福島県郡山市 2000年11月2-4日
 - 3) 岩崎直子、尾形真規子、岩本安彦
2型糖尿病疾患感受性遺伝子座位の解析
日本人類遺伝学会第45回大会プログラム・抄録集 p-106, 0-38
第45回日本人類遺伝学会
福岡市 2000年10月25-27日
 - 4) 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45回日本透析医学会