

日本透析療法学会雑誌 P-493, 2000

福岡 2000年6月16日

- 5) 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
- 6) 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 $\beta$ 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
- 7) 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 $\alpha$ 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
- 8) 尾形真規子、淡路健雄、岩崎直子、宮崎俊一、  
岩本安彦  
HNF-4 $\alpha$  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
- 9) 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

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

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：グルタミン酸脱水素酵素（GDH）遺伝子の酵素活性上昇をきたす異常により、新生児に低血糖症を生じることが報告された。我々は新生児低血糖症患者 15 人をスクリーニングし、1 名で 266 位のチロシンからシステインへのアミノ酸置換を生じる変異を同定した。これは活性ドメインで見出された変異としては世界最初のものであり、その機能解析では、GTP による活性の抑制を受けず、ADP によるさらなる活性上昇も認められず、常時活性型変異と考えられた。患者ではアンモニア値の上昇がみられ、肝での酵素活性上昇を反映していると思われたが、ジアゾキサイド投与で低血糖は阻止され、正常の発育をとげ通常の生活を送っている。本疾患が優生遺伝であることから、逆に活性低下を引き起こす遺伝子異常は高血糖、すなわち糖尿病をきたすことが推測される。しかし、2 型糖尿病患者の 79 名の検討では、GDH 遺伝子の有意な異常は見出されなかった。糖尿病における意義を明らかにするには、さらに症例数を増やして検討する必要がある。

A. 研究目的

新生児高インスリン血症性低血糖症のひとつにグルタミン酸脱水素酵素（GDH）遺伝子異常がある。この酵素は膵β細胞でのインスリン分泌に重要な役割を担っており、その酵素活性上昇をきたす変異によりインスリン分泌が促進され、低血糖症を生じると考えられる。本疾患が優生遺伝であることから、逆に活性低下を引き起こす遺伝子異常はヘテロ接合体でも高血糖、すなわち糖尿病をきたす可能性が考えられる。そこで、新生児低血糖症患者と 2 型糖尿病患者で、GDH 遺伝子異常を検討した。

新生児高インスリン血症性低血糖症

家族性

常染色体劣性遺伝

- ・ ATP感受性カリウムチャンネルの構造異常
  - スルフォニル尿素受容体(SUR1)遺伝子変異
  - Kir6.2遺伝子変異

常染色体優性遺伝

- ・ グルコキナーゼ遺伝子変異
- ・ グルタミン酸脱水素酵素遺伝子変異

孤発性

などを検索した。さらに、見出された遺伝子変異については、その変異 GDH を発現させ、機能解析を行った。また、2 型糖尿病患者 79 名でも同様に GDH 遺伝子変異の検討を行った。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 名の低血糖患者のうち 1 名で、266 位のチロシンからシステインへのアミノ酸置換（Y266C）を生じるヘテロ接合体の変異を同定した。従来の報告はすべてアロステリック調節ドメインにあり、本例は活性ドメインに見出された世界最初の変異であった。なお、この変異は 2 型糖尿病患者 79 名、健常者 94 名には見出されなかった。Y266C の機能解析では、GTP による活性の抑制を受けず、ADP によるさらなる活性上昇も認められず、常時活性型変異と考えられた。患者ではアンモニア値の上昇がみられ、肝での酵素活性上昇を反映していると思われたが、ジアゾキサイド投与で低血糖は阻止され、正常に発育し通常の社会生活を送っている。

2 型糖尿病患者の 79 名の検討では、GDH 遺伝子に糖尿病発症に関わると思われる異常は見出されなかった。

B. 研究方法

新生児低血糖症で、既に我々が SUR, Kir6.2 遺伝子変異を同定した患者を除いた 15 名につき、GDH 遺伝子のエクソンすべてで、PCR 直接シーケンシング法にて変異を検索するとともに、その臨床症状

GDH遺伝子変異及び多型性				
変異または多型	対立遺伝子頻度			
	低血糖症	2型糖尿病	対照	
<b>Exon 7</b>				
CTA (L <sup>261</sup> ) – CTG (L)	n.d.	n.d.	n.d.	
TAT (Y <sup>266</sup> ) – TGT (C)	1/30	0/158	0/188	
<b>Exon 13</b>				
GTG (V <sup>444</sup> ) – GTC (V)	1/30	0/158	n.d.	
<b>Intron 8</b>				
c* – g*	0/30	1/158	n.d.	
*c/g-tcttgcagATC (exon 9)				

#### D. 考察

GDH 遺伝子異常により酵素活性が上昇するための新生児低血糖症と考えられる。GDH 遺伝子の2型糖尿病発症における意義を明らかにするには、さらに症例数を増やして検討する必要がある。

#### E. 結論

- 1) GDH 遺伝子のヘテロ接合体変異が日本人でも高インスリン血症性低血糖をきたす。見出した変異は酵素活性ドメインでは世界最初のものであり、常時活性型変異であった。
- 2) 2型糖尿病発症に GDH 遺伝子は主要な役割を果たしていないと考えられる。

#### F. 健康危険情報

特記事項なし

#### G. 研究発表

なし

#### H. 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・再生医療等研究事業）  
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 助教授

研究要旨：罹患同胞対法による全ゲノムレベルでの検討と糖尿病モデル動物の作製と解析の結果に基づき、患者対照相関解析を行うことによって日本人2型糖尿病の多様な遺伝素因の全体像を明らかにし、そのひとつひとつを標的とした薬剤を開発することによって、日本人2型糖尿病の根本的かつ最適な治療法を確立する。

#### A. 研究目的

2型糖尿病の日本における罹患者は現在推定700万人以上と言われ、2型糖尿病の予防や根本的治療の開発が急務である。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。多因子病としての2型糖尿病原因遺伝子を同定するには、これまでの知見や糖尿病モデル動物の解析結果などから候補となる遺伝子について患者対照相関解析を行う方法や、多因子病の原因遺伝子座の同定に有用な罹患同胞対法を用いた全ゲノム的検討によって絞り込まれた染色体領域に存在する候補遺伝子について患者対照相関解析を行ったり、当該領域のSNPによるdense mapを作製し連鎖不平衡を用いて原因遺伝子を同定する方法がある。前年度までに、我々は、PPAR $\gamma$  遺伝子欠損マウスの作製と解析によってPPAR $\gamma$  遺伝子が高脂肪食によるインスリン抵抗性を媒介する儉約遺伝子であること、 $\beta$ 3 アドレナリン受容体遺伝子 Trp64Arg 多型が日本人において肥満やインスリン抵抗性に関与していることを明らかにした。また、罹患同胞対法によって日本人2型糖尿病原因遺伝子座の全ゲノムマッピングを進めてきた。

本年度では我々の PPAR $\gamma$  欠損マウスの解析結果に基づき(1) ヒト PPAR $\gamma$  遺伝子の日本人2型糖尿病原因遺伝子としての意義を検討し、(2)PPAR $\gamma$  を標的とした2型糖尿病治療薬の開発を行った。また、 $\beta$ 3 アドレナリン受容体遺伝子 Trp64Arg 多型の解析結果に基づき(3) $\beta$ 3 アドレナリン受容体を標的とした2型糖尿病治療薬の開発を行った。更に(4)罹患同胞対法による全ゲノムマッピングにより日本人2型糖尿病と連鎖が示唆される領域を複数の染色体上に認めたこと、更に(5)その中で染色体3q27領域に含まれるアディポネクチン遺伝子の多型が2型糖尿病と有意に相関していること、アディポネクチンの補充療法が2型糖尿病の新規治療

法となり得る結果を得たので報告する。

#### B. 研究方法

- (1) 2型糖尿病患者 415 人と 60 歳以上で糖尿病の家族歴を有しない糖代謝正常者 541 人から文書によるインフォームドコンセントを得た上で DNA を採取し、direct sequence 法によって PPAR $\gamma$  遺伝子多型の検索を行った。同定された Pro12Ala 多型の遺伝子型を RFLP 法によって決定し、本多型と 2 型糖尿病との相関を検討した。
- (2) 核内受容体であり PPAR $\gamma$  とヘテロダイマーを形成する RXR に結合し、PPAR $\gamma$ ・RXR のアンタゴニストとして作用する新規化合物を糖尿病のモデル動物である KKAY マウスに投与し、体重や糖代謝に対する生理的作用を検討した。
- (3)
- (4) 日本人2型糖尿病罹患同胞対 250 組についてインフォームドコンセントをとった上で採血と DNA の抽出を行い、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。各マーカーの遺伝子型の同胞対間での共有の割合を、統計学的に処理し、糖尿病との連鎖を検討した。
- (5) アディポネクチン遺伝子を含む染色体領域を direct sequence 法によって多型・変異のスクリーニングを行った。同定された多型について糖尿病 384 人、非糖尿病患者 480 人について遺伝子型を決定し、2 型糖尿病、インスリン抵抗性指標(HOMA)、血中アディポネクチン値との相関を解析した。

#### (倫理面への配慮)

患者対照相関解析に使用した DNA は全て、先に策定されたヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針を遵守し、文書による同意によって採取された。また、個人情報漏洩しないよう、個人情報管理者による厳重な管理を行っている。

#### C. 研究結果

(1) 肥満群で PPAR $\gamma$  Pro12Ala 多型保持者は非保持者に比してインスリン抵抗性が軽度であった。PPAR $\gamma$  Pro12Ala 多型頻度は非糖尿病群で 0.043, 糖尿病群で 0.018 と糖尿病群で低かった。PPAR $\gamma$ 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。

(2) 新規化合物はチアゾリジン誘導体による PPAR $\gamma$  RXR ヘテロダイマー転写活性上昇作用を抑制し、PPAR $\gamma$ ・RXR 複合体の antagonist として働くことが分かった。新規化合物は KKAY マウスにおいて高脂肪食下での体重増加と脂肪細胞の肥大化、インスリン抵抗性の惹起を抑制した。RXR の antagonist は脂肪細胞における lipoprotein lipase の発現を抑制し、エネルギー消費量を増大させることが分かった。

(3)  $\beta$ 3 アゴニスト AJ-9677 の投与により KKAY マウスの白色脂肪細胞組織重量とサイズが減少するとともに血中 TNF $\alpha$  や遊離脂肪酸値が正常化した。また、白色脂肪細胞での UCP-1 の発現が 20 倍から 80 倍と著明に亢進した。

(4) 染色体 1 番、3 番、7 番、11 番、15 番、20 番上に日本人 2 型糖尿病との連鎖の可能性がある領域を認めた。更に対象を BMI や発症年齢で層別化した検討を行ったところ、染色体 15 番上のマーカーにおいて発症年齢 45 歳未満の群で、LOD スコア 3.62 と有意な連鎖を、染色体 1 番のマーカーにおいて BMI27 未満の群では、LOD スコア 3.17、染色体 7 番のマーカーで 3.51 と LOD スコアの上昇を認め、2 型糖尿病原因遺伝子座として有望であることが示された。

(5) アディポネクチン遺伝子を含む 16kb の領域に計 10 個の比較的頻度の高い多型を同定した。そのうち 2 つの多型(SNP45, SNP276)と 2 型糖尿病との間に有意な相関を認め、SNP45G/G,G/T 並びに SNP276G/G 遺伝子型保持者は 2 型糖尿病発症リスクの有意な上昇を認めた。SNP276G/G 遺伝子型保持者は T/T 遺伝子型保持者に比して HOMA の指標が高値でインスリン抵抗性が強いこと、血中アディポネクチンが低値であることが示された。

#### D. 考察

(1) PPAR $\gamma$  Pro12Ala 多型頻度は非糖尿病群で低く糖尿病抵抗性因子として働いていると考えられた。また、本多型保持者は血中レプチン値が高いことによりインスリン感受性が良い可能性が示唆された。日本人で欧米人に比してインスリン抵抗性・2 型糖尿病感受性アリルである Pro12 頻度が高いことから、日本人が欧米型の生活習慣にさらされた場合 2 型糖尿病を発症しやすい可能性が示唆さ

れた。

(2) PPAR $\gamma$  活性を低下させる薬剤は新たなインスリン抵抗性改善薬として用いることが出来る可能性が示唆された。

(3)  $\beta$ 3 アゴニスト AJ-9677 は白色脂肪細胞での UCP-1 の発現の亢進を介して脂肪細胞の肥大化を改善し、インスリン抵抗性惹起物質である TNF- $\alpha$  や遊離脂肪酸の血中レベルを低下させることによって、インスリン抵抗性を改善させることが明らかとなった。現在臨床治験の段階であり、近い将来 2 型糖尿病の治療薬として期待される。

(4) 染色体 1、3、15、20 番に関しては欧米においても 2 型糖尿病との連鎖が報告されている領域であり、民族を越えた普遍的な糖尿病原因遺伝子が存在している可能性が示唆された。これに対して染色体 7 番は多民族での報告がなく、我々日本人固有の原因遺伝子の存在が示唆された。

(5) アディポネクチン遺伝子は日本人 2 型糖尿病の原因遺伝子であることが示唆された。

また、アディポネクチンの補充療法は新たな 2 型糖尿病治療薬となりうることが示された。

#### E. 結論

PPAR $\gamma$  遺伝子、 $\beta$ 3 アドレナリン受容体遺伝子、アディポネクチン遺伝子が日本人 2 型糖尿病の主要な原因遺伝子であることが示唆された。これらの遺伝子の多型による 2 型糖尿病発症リスクの評価を行うことで、生活習慣への重点的な介入による一次予防を行うことや、これらの原因遺伝子をターゲットとした新規治療薬の開発によって日本人 2 型糖尿病のテーラーメイド医療に道が開かれたものと考えられる。

#### F. 健康危険情報

特記事項なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. 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 $\gamma$ 2 may confer resistance to type II diabetes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 271: 212-216, 2000
2. 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. *Mol. Cell. Biol.* 21:2521-2531, 2000

3. Hara, K., Kubota, N., Tobe, K., Terauchi, Y., Okada, T., Miki, H., Komeda, K., Tamemoto, H., Yamauchi, T., Hagura, R., Ito, C., Akanuma, Y., and Kadowaki, T. : The role of PPAR $\gamma$  as a thrifty gene in both in mice and humans.  
Brit. J. Nutr. 84: 235-239, 2001
2. 学会発表
1. The Role of PPAR $\gamma$  in Insulin Resistance:第1回 International Forum on Progressive Endocrinology  
平成12年2月11日 神戸
  2. PPAR $\gamma$  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
  3. PPAR $\gamma$  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
  4. PPAR $\gamma$  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
  5. PPAR $\gamma$  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 八ヶ岳
  6. The role of PPAR $\gamma$  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
  7. 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
  8. 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
  9. SREBP/PPAR $\gamma$  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
  10. 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
  11. 脂肪細胞分化における IRS-1,IRS-2、p85  $\alpha$  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
  12. RXR アンタゴニストは新規抗肥満、抗糖尿病薬となり得る  
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  
3月 日本臨床分子医学会
  13. RXR アンタゴニストは新規抗肥満、抗糖尿病薬となり得る  
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  
4月 日本内科学会
  14. RXR アンタゴニストは新規抗肥満、抗糖尿病薬となり得る  
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  
6月 日本内分泌学会
  15. RXR アンタゴニストは新規抗肥満、抗糖尿病薬となり得る  
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  
7月 代謝コロキウム
  16. RXR アンタゴニストは新規抗肥満、抗糖尿病薬となり得る  
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  
8月 アデイポサイエンス研究会
  17. RXR アンタゴニストは新規抗肥満、抗糖尿病薬となり得る  
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  
10月 日本肥満学会
  18. 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  
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  
10月 日本肥満学会
  19. RXR アンタゴニストは新規抗肥満、抗糖尿病薬となり得る  
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  
10月 日本糖尿病合併症学会
  20. RXR アンタゴニストは新規抗肥満、抗糖尿病薬となり得る  
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

10月 日本生化学会

21. RXR アンタゴニストは新規抗肥満、抗糖尿病薬となり得る

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

11月 レチノイド研究会

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

2型糖尿病患者における Neurogenin 3、Syntaxin 1A 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）、Neurogenin 3(ngn3)（分化／増殖）]の変異の有無を検索した結果、ngn3 遺伝子には糖尿病と関連すると思われる変異は存在しなかったが、Syntaxin 1A 遺伝子に2型糖尿病の臨床経過（発症年齢、インスリン治療必要性）と関連する SNP（D68D, T→C）を検出した。

A. 研究目的

膵β細胞のインスリン分泌(Syntaxin 1A)や、分化／増殖(ngn3)に関係する2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 186名、非糖尿病患者 181名の genomic DNA を用いて、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クローンをを用いて、Exon-intron 構造を決定した結果、本遺伝子の翻訳部位は少なくとも 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結果、Exon 3 に1ヶ所、Intron 7 に2個の SNP を検出した。それぞれ糖尿病群と非糖尿病群間に出現頻度 (genotype allele 共) に有意差を認めなかったが、Exon 3 の SNP (D68D, T/C)では、CC genotype は糖尿病群で 16.1%と非糖尿病群の 11.0%に比し高い傾向を認めた。糖尿病群における本 SNP と臨床像との検討にて、CC genotype は他 (TT, TC) に比し、発症年齢 (40.10±1.48 vs 44.19±0.57, Mean±SE) が有意に若かった。また、CC genotype は他 (TT, TC) に比し、発症 10 年後および 15 年後におけるインスリン治療患者の頻度が有意に高かった。また、CC genotype を有する患者では他の者に比し、インスリン治療になるまでの期間が有意に短かった。

2) ngn3 遺伝子

PCR/SSCP 法 (2型糖尿病患者 88名、非糖尿病患者 102名)にて変異の有無を検索したが、1個の

SNP (S199F) を検出したが、糖尿病との関連は認められなかった。

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。本遺伝子の構造は昨年度の本研究にて明かとなり PCR 法による変異の検索が可能となった。今回の検討では2型糖尿病患者の臨床像と関連する SNP を検出したが、本 SNP の CC genotype を保有する患者では発症年齢が若く、より早期にインスリン治療が必要となるものが多いことから、本 SNP はβ細胞の疲弊と関係することが示唆された。その機序に関しては現時点では不明であるが、Syntaxin 1A 遺伝子の調節領域に本 SNP と連鎖し、発現に関連する変異が存在する可能性が考えられる。従って、今後は、プロモーター領域の検索が必要であろう。

E. 結論

Syntaxin 1A 遺伝子に2型糖尿病のインスリン治療必要性 (β細胞の疲弊) と関連する SNP を検出した。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. K.Tsunoda, T.Sanke, T.Nakagawa, H.Furuta, K.Nanjo. 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

2. 学会報告

1. 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)

2. 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)

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案特許  
なし
3. その他  
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

グルコース応答性インスリン分泌に関する研究

分担研究者 清野 進 千葉大学大学院医学研究科・教授

研究要旨：日本人を含むアジア人ではグルコースに対する選択的なインスリン分泌障害が発症の初期から認められるが、その成立の機序は必ずしも明らかでない。そこで我々は、グルコース応答性インスリン分泌障害成立の分子的基盤を明らかにするため、独自にサブクローニング化した2つの膵β細胞株を用いて mRNA ディフェレンシャルディスプレイおよび DNA マイクロアレイによる遺伝子発現解析を網羅的に行なった。グルコース応答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明らかにした。ヒト以外の糖尿病モデルからの情報はヒトゲノムデータベースが充実したことによって容易にヒトへ利用可能であり、本研究で得られたグルコース応答性インスリン分泌に関与する遺伝子について、今後糖尿病患者において遺伝子変異の有無や多型を検索する予定である。グルコース応答性インスリン分泌障害の分子メカニズムを解明する上で極めて有用である。

A. 研究目的

グルコース反応性膵β細胞株 MIN6 細胞を限界希釈して得られたコロニーを単離し、グルコース反応性インスリン分泌が良好な m9 株と、不良な m14 株をサブクローン化した。この2つのサブクローン化した MIN6 細胞を用いて、グルコース応答性インスリン分泌機構とその破綻に関与する遺伝子を網羅的に同定し、それぞれの遺伝子のインスリン分泌における役割を解析する。

B. 研究方法

m9 株と m14 株から total RNA を抽出し、DNase 処置後 mRNA ディフェレンシャルディスプレイ法を行なった。発現量に大きな差を認める PCR 産物をプラスミドにサブクローニングし塩基配列を決定するとともに、データベース検索を行なった。同定したクローンの遺伝子発現量の差はノザン法により検討した。さらに Affymetrix 社製の GeneChip を用いて m9 株と m14 株の遺伝子発現解析を行ない、予測される機能をもとに遺伝子を分類し、さらに一部についてはインスリン分泌に及ぼす影響を検討した。

本研究には、材料としてマウス培養細胞 cDNA ライブラリーを使用しているが、それ以外のヒトおよび実験動物は用いていない。従って倫理面への配慮は特に必要ないと判断する。

C. 研究結果

mRNA ディフェレンシャルディスプレイ法により両細胞株の mRNA の差異を調べ、108 個の差の

あるバンドを検出した。さらにノザン法で5倍以上の差を認める遺伝子を10個同定した。DNA マイクロアレイによる解析の結果、m9 株と m14 株の間で82個の遺伝子発現が異なることが明らかとなり、これらの遺伝子を機能的に転写、タンパク合成・分解、代謝、細胞増殖などに関与する遺伝子群に分類した。このうちタンパク分解に関して、ATP 依存性経路であるユビキチンプロテアソームシステム系にかかわる複数の因子が m14 で発現が低下しており、実際に ATP 依存性のタンパク分解速度が低下していることを確認した。さらにインスリン分泌良好な m9 株をプロテアソーム阻害薬である MG-132 で処置するとグルコース反応性インスリン分泌が障害されることを見出した。MG-132 はグルコース濃度 5mM 以下での基礎インスリン分泌に影響しなかった。

D. 考察

グルコース応答性インスリン分泌障害のメカニズムを解明するためのひとつの方法として、インスリン分泌障害を有する2型糖尿病患者のβ細胞の遺伝子発現と健常者のβ細胞の生理学的特性や遺伝子発現を比較することが考えられる。しかし、ヒトのβ細胞は入手困難であり、実用的な方法ではない。一方、糖尿病モデル動物のβ細胞と健常動物のβ細胞を比較するという方法はより現実的であり、株化細胞をこの目的に用いることができればさらに研究は容易となる。本研究において樹立したインスリン分泌特性の異なる2つの細胞株はグルコース応答性インスリン分泌障害の分子メカニズムを解明するための材料として、有用であ

ることを示した。m14 株でみられる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。またこの経路を抑制すると m9 細胞でもグルコース応答性インスリン分泌が低下したことから正常なグルコース応答性を維持するためには、ユビキチンプロテアソーム系を介した ATP 依存性のタンパク分解経路が必須であると考えられた。ヒト以外の糖尿病モデルからの情報はヒトゲノムデータベースが充実したことによって容易にヒトへ利用可能となった。本研究で得られたグルコース応答性インスリン分泌に関する遺伝子について、今後糖尿病患者において遺伝子変異の有無や多型を検索する予定である。

#### E. 結論

MIN6 細胞からサブクローン化した m9 株と m14 株間で多くの遺伝子の発現が異なっていることが明らかとなった。特にユビキチンプロテアソーム系は膵β細胞においてグルコース応答性インスリン分泌反応の維持に関与し、その破綻はインスリン分泌障害を引き起こす可能性がある。2型糖尿病の発症機構を解明する方法として、本研究で用いたアプローチは非常に有用であると考えられた。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. 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 ATP-binding cassette protein involved in iron homeostasis. *J. Biol. Chem.* 275:17536-17540, 2000
2. 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
3. Gonoj, T. and Seino, S. Structure and function of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. In *Pharmacology of Ionic Channel Function: Activators and Inhibitors*. In *Handbook of Experimental Pharmacology*. M. Endo (ed.) Springer-Verlag, Heidelberg, p271-296, 2000
4. 南幸太郎、三木隆司、長嶋一昭、清野 進. 膵

β細胞 ATP 感受性 K<sup>+</sup>チャネル遺伝子操作マウス. *Diabetes Frontier* 11:309-313, 2000

##### 2. 学会発表

1. 第 43 回日本糖尿病学会年次学術集会 (横浜) 教育講演  
インスリン分泌機構—過去・現在・未来—  
清野 進

##### 一般演題

- 1) 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  
南幸太郎、矢野秀樹、三木隆司、長嶋一昭、清野 進
- 2) 膵β細胞 Na<sup>+</sup>-driven Cl<sub>3</sub><sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>exchanger cDNA の機能解析  
矢野秀樹、王 長征、長嶋一昭、清野 進
2. 第 73 回日本内分泌学会学術総会 (京都)
  - 1) 膵β細胞 bicarbonate transporter のクローニングと機能解析  
王 長征、矢野秀樹、長嶋一昭、清野 進
  - 2) cAMP 結合タンパク質 CAMPS と相互作用する新たな分子の同定  
横井伯英、安田和基、尾崎信暁、清野 進
3. 第 73 回 日本生化学会大会 (横浜)  
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<sub>ATP</sub> チャネルによる血糖調節機構とその破綻  
三木隆司、南幸太郎、蓑越靖彦、矢野秀樹、清野 進
4. 第 23 回日本分子生物学会 (神戸)  
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ソログ MTABC3  
千本木 裕、三橋 登、三木隆司、凌 楓、清野 進、柴田武彦

##### 一般演題

- 1) 膵β細胞 Na<sup>+</sup>-driven Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>exchanger のクローニングおよび機能解析  
矢野秀樹、王 長征、長嶋一昭、横山裕司、清野 進

## 海外の口頭発表

1. Canadian Physiological Society (Canada)  
Symposium: Physiology of Ion Channels  
「Diverse roles of ATP-sensitive  $K^+$  channels: studies in mice lacking Kir6.2」
2. International Seminar at Karolinska Institute (Sweden)  
「ATP-sensitive  $K^+$  channels: structure, function, and pathophysiology learned from cloning and knockout」
3. The 8<sup>th</sup> Federation Meeting of Korean Basic Medical Scientists 2000 (Korea) Symposium  
「ATP-sensitive  $K^+$  channel: structure, function, and physiological roles」
4. 17<sup>th</sup> International Diabetes Federation Congress (Mexico) Symposium  
「Diverse roles of  $K_{ATP}$  channels in endocrine pancreas」
5. 中華民国糖尿病学会 Symposium on Molecular and Cellular Diabetology (Taiwan)  
Plenary Lecture  
「A novel mechanism of cAMP-dependent insulin secretion」

## H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

糖尿病における  $\alpha$ -グルコシダーゼ遺伝子変異の検索とその発現調節

分担研究者 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

研究要旨：2型糖尿病と糖質の消化に注目し、糖質の最終消化を演じる  $\alpha$ -グルコシダーゼの遺伝子異常とその発現調節につき検討した。日本人 200 名について  $\alpha$ -グルコシダーゼの主要なコンポーネントであるスクラーゼ・イソマルターゼ (SI) 遺伝子の変異の有無を検討した。PCR-SSCP による SI 遺伝子変異の検討にて 200 名中 30 名に異なった泳動像がみられ、直接シーケンス法にて転写開始部より 59 塩基上流の G が A に置換したアリルであることが明らかになった。この変異型では正常型に比べて SI 転写活性が約 1.5 倍の高値を示した。さらに若年発症型家族性糖尿病 (MODY) の原因遺伝子である HNF-1 の正常型および 15 種の変異型が SI 遺伝子の発現に与える影響について検討した。CHO 細胞において L12H, T539fsdel を除く 13 種の変異型は正常型と比較して SI 転写活性抑制効果が有意に減弱した。Caco-2 細胞において L12H を除く 14 種の変異型は正常型と比較して SI 転写活性促進効果は有意に減弱した。これらの遺伝子変異は  $\alpha$ -グルコシダーゼ発現調節の異常を介して、糖尿病の成因、病態に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

A. 研究目的

2型糖尿病治療の大規模スタディーである UKPDS のデータが示すように (Diabetes Care 22 (6))、 $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害剤は長期間において糖尿病のコントロールに有用な効果をもたらす。このことから  $\alpha$ -グルコシダーゼが糖尿病の発症、および進展に関与していることが示唆される。また、日本人は欧米人に比べて糖質中心の食生活であることと、2型糖尿病の頻度が高いことの間には何らかの関連があると思われる。そこで我々は  $\alpha$ -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 (SI) 遺伝子の発現調節に関する遺伝的素因を検索し、その分布と SI 遺伝子の発現におよぼす影響を検討した。一方、若年発症型家族性糖尿病 (MODY) の原因遺伝子である HNF-1 は、肝、膵、小腸、腎などに発現する転写調節因子であるが、小腸における HNF-1 の機能に関する研究は少なく未だ不明な点が多い。そこで、HNF-1 が SI 遺伝子の 5' 上流に結合する (Biochem J; 336: 115-123, 1998) ことに注目し、HNF-1 の正常型および 15 種の変異型が SI 遺伝子の発現に与える影響について検討した。

B. 研究方法

(1) SI の 5' 上流およびエクソン 1 にプライマーを設定し、(sense: aacttagattcccagagaga, antisense: ctctttgctatgtgtacca; 209bp) 2型糖尿病患者 40 名を対象に PCR-SSCP 法により遺伝子変異を検索した。  
(2) (1)によって得られた各泳動パターンについて Direct Sequence 法により塩基配列を決定した。(3)

2型糖尿病患者 100 名および正常コントロール群 100 名を対象に PCR-SSCP 法によって変異保有頻度を検討した。(4) SI 上流の 1244bp およびエクソン 1 の 46bp を含むルシフェラーゼ発現ベクターを各遺伝子型について作製し、CHO 細胞にトランジェントに遺伝子導入し、その細胞溶解液をルミノメーターを用いて転写活性を測定した。(5) HNF-1  $\alpha$  の正常型と 13 種の変異型 (L12H, R13W, K158Q, R159Q, R200Q, R203C, R229X, V233L, A239V, R271G, R272H, P379fsdel, T539fsdelC) および HNF-1  $\beta$  の正常型と 2 種の変異型 (R177X, A263fsinsGG) の翻訳領域全長を pCMV6b ベクターに組み込んだ発現プラスミドを作成し CHO 細胞または Caco-2 細胞にリポフェクション法を用いてトランジェントに遺伝子導入し、その細胞溶解液をルミノメーターを用いて転写活性を測定した。

(倫理面への配慮)

本研究は本学の倫理委員会に内容を報告し承認されたものであり、検体提供者に十分な説明を行い承諾を得られた者のみより検体の採取を行った、また検体の採取法は静脈よりの少量の採血のみであり危険性の極めて少ない方法であると考えられる。さらに匿名化ののち検体を保存しており、研究目的以外の用途での利用は行わない。

C. 研究結果

(1) PCR-SSCP 法により 3 種類の泳動パターンが認められた。(2) 塩基配列を決定したところ、エクソン 1 より上流 59bp の G が A に置換している 1 塩基置換 (SNP) が発見された。(3) 2型糖尿

病患者と正常コントロール群では変異保有頻度に有為な差は認められなかった (17 vs 13 %)。しかし、ホモ変異保有者は2型糖尿病患者でのみ認められた (3名)。(4) 変異型では正常型に比べて転写活性が約 1.5 倍の高値を示した。(5) ①CHO細胞において正常 HNF-1 導入群は SI 上流の転写活性をベクタープラスミドのみをもちいた群に比し約 1/15 に(p<0.001)抑制した。また Caco-2 細胞において正常 HNF-1 導入群はベクタープラスミドのみをもちいた群に比し転写活性を 10 倍に(p<0.001)促進した。②HNF-1 の変異型を用いた検討では、CHO 細胞において L12H, T539fsdel を除く 13 種の変異型は正常型と比較して SI 転写活性抑制効果が有意に減弱した。Caco-2 細胞において L12H を除く 14 種の変異型は正常型と比較して SI 転写活性促進効果は有意に減弱した。

#### D. 考察

SI 遺伝子の発現調節領域に変異が存在し、転写活性を亢進させることが認められた。このことから遺伝素因の一つとして  $\alpha G$  の発現が亢進し、これが糖尿病の成因や病態に役割を果している可能性が示唆された。また HNF-1 は、SI 転写活性の調節機能を持つこと、この調節効果は細胞特異的であり、発現増強、減弱どちらにも働き得ると思われた、さらに HNF-1 変異型は、正常型に比しその機能が減弱することも認められた。

#### E. 結論

日本人に比較的高頻度に存在する SNP を SI 遺伝子の転写調節領域に発見した。この変異により  $\alpha G$  の発現が亢進し、糖代謝に影響を与えている可能性が示唆された。さらにさらに HNF-1 変異遺伝子は、正常型に比しその機能が減弱しておりこれが  $\alpha G$  の転写調節異常を介して糖尿病の発症、進展に役割を果たしている可能性が示唆された。

#### F. 健康危険情報

なし

#### D. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Synergistic effect of polymorphisms of uncoupling protein 1 and  $\beta 3$ -adrenergic receptor genes on autonomic nervous system activity. N. Shihara, Y. Seino et. al. Int. J. Obes. (in press)
- 2) Wortmannin, PI3-kinase inhibitor: Promoting effect on insulin secretion from pancreatic beta cells through a cAMP-dependent pathway. K. Nunoi, Y. Seino et. al.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 270 798-805, 2000

- 3) The association between Trp64Arg polymorphism of the  $\beta 3$ -adrenergic receptor and autonomic nervous activity.

N. Shihara, Y. Seino et. al.

J.Clin.Endocrinol & Metab 84(5): 1623-1627 1999

- 4) Disordered expression of the sucrase-isomaltase complex in the small intestine in otsuka long-evans tokushima fatty rats, a model of non-insulin-dependent diabetes mellitus with insulin resistance., Adachi T, Seino Y et. al.

Biochim Biophys Acta 1426(1):126-32 1999

#### 2. 学会発表

第 43 回日本糖尿病学会年次学術集会

- 1) スクララーゼ・イ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)  
志原伸幸、清野裕 他  
糖尿病 43 Supple.1 S-107 2000
- 2) 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)  
足達哲也、清野裕 他  
糖尿病 43 Supple.1 S-117 2000
- 3) 肥満関連遺伝子変異と自律神経活動 (II-5-15)  
安田浩一朗、清野裕 他  
糖尿病 43 Supple.1 S-181 2000

#### H. 知的所有権の取得状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

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成と  
後縦靭帯骨化症の遺伝素因の同定研究への応用展開

分担研究者 武田 純 群馬大学生体調節研究所 調節機構部門遺伝情報分野 教授

研究要旨：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 は異なる。白人向けの市販マーカーセットを日本人について検討し、日本人の連鎖解析に耐え得る独自のパネルを作成した。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 9 cM、平均 heterozygosity は 0.76 の精度となった。後縦靭帯骨化症（OPLL）は、約半数が軽度のインスリン抵抗性の糖尿病を合併することが知られる多因子遺伝疾患である。本研究が作成した最適化マーカーパネルを OPLL の罹患同胞対解析に導入することによって、疾患感受性の責任遺伝子座を第 21 番染色体上に同定することができた。同領域に含まれる原因遺伝子の同定は、後縦靭帯骨化の機構の解明のみならず、糖尿病発症機構の解明と病態の理解においても重要である。

#### A. 研究目的

2 型糖尿病は、膵β細胞のインスリン分泌不全と末梢でのインスリン抵抗性に基づく。従って、これらの病態の関連を総合的に理解することが重要である。本研究の目的はインスリン抵抗性糖尿病の遺伝素因の解明である。しかし、痩せ型インスリン分泌不全を主病変とする日本人糖尿病患者では、インスリン抵抗性の患者を集めることは容易ではない。そこで、視点を変えて検討してみた。後縦靭帯骨化症（OPLL）は靭帯骨化により頸椎症をきたす、整形外科領域で最も頻度の高い疾患のひとつである。糖尿病患者で OPLL を合併している例が多く、それらは高インスリン血症である。特に肥満傾向の女性で顕著である。糖尿病と OPLL を合併する分画に、インスリン抵抗性糖尿病のサンプルプールがあると予想されるので、この分画に対して分子遺伝学的戦略によりアプローチを試みた。

多因子遺伝疾患の感受性遺伝子座の同定には、ノンパラメトリックな連鎖解析（罹患同胞対解析）が有効である。しかし、本法を効率良く展開するためには、情報量の多いマイクロサテライトマーカーを用いることが必須である。民族間ではマイクロサテライトのアリル頻度や heterozygosity は異なることが知られる。そこで本研究では先ず、日本人の連鎖解析に耐え得る独自のパネルを作成した。次いで、日本人の最適化マーカーパネルを OPLL の罹患同胞対解析に導入することによって、疾患感受性の責任遺伝子座をゲノム上に求めた。

#### B. 研究方法

##### 1. マーカーパネルの作成

64 人の無作為に選択した日本人を対象とした。研究内容を理解してもらった上で、DNA は抽出された。個人名と DNA は全く非連結であるので、個人のプライバシーは 100%守られる。この配慮は倫理委員会の承認も得た。白人情報をもとにして作成された ABI PRISM Linkage Mapping Set-MD10 (Applied Biosystems) を鋳型として用いた。先ず、日本人におけるアリル頻度を知るために、セットに含まれる 400 個のマーカーについて上記の日本人を対象に遺伝子タイピングを行った。Heterozygosity が低いマーカーについては、新たに対応する領域から新規マーカーを求めた。マーカー間隔が広い領域についても同様に、マーカー補充を行った。

##### 2. OPLL の罹患同胞対解析

前記で作成された最適化マーカーセットと 141 組の OPLL 罹患同胞対を用い、ゲノム全域にわたって遺伝子タイピングを行うことによって有意の感受性遺伝子座を求めた。これらの症例についても、上記と同様にインフォームドコンセントを得た上で研究を実施しており、厚生省の指針を厳守した。疾患とマーカーとの連鎖は、SIBPAL と GENE HUNTER を用いて検定した。

#### C. 研究結果

##### 1. 日本人における連鎖解析に最適化されたマーカーパネルの作成

日本人と白人との間で、heterozygosity が 0.2 以上異なるマーカーが 9.3%あった。日本人における平均 heterozygosity は 0.73 (0.11-0.93)であり、40 マーカー (10.8%) が 0.6 以下であった。連鎖解析に不適当なこれらのマーカーと PCR 反応が困難なマ

ーカーについて、新たなマーカーを補充した。4部位において間隔が20 cM以上(最大26.1 cM)であったので、6マーカーを用いて狭めた。最終的に、平均間隔が9 cM(最大17 cM)、最低heterozygosity ~0.6(平均0.76)の406マーカーセットを完成させた。

## 2. OPLL感受性遺伝子座の同定

8つの座位において有意の連鎖を認めた。第6番染色体上HLA領域における有意の連鎖は以前に報告された成績と完全に合致した。第21番染色体上のD21S263において最も有意の連鎖を認めた( $p=0.000009$ )。この座位が、別計画による日本人の糖尿病患者を用いた連鎖解析で示唆された座位と一致することは興味深い。現在、本領域のSNPを網羅し大規模関連解析を展開することによって目的遺伝子の同定を目指している。

## D. 考察

日本人に最適化させたマーカーセットは、糖尿病を含め日本人の遺伝性疾患の原因遺伝子の同定作業を推進する上で有用なツールである。そこで、日本人を含めたアジア人を扱う遺伝学研究者が広くこの分子情報資源を使用できるように群馬大学のホームページ上にデータベースを構築した(<http://imcr.gunma-u.ac.jp/lab/genetics/suppl>)。次いでこのマーカーセットの使用により、効率的にOPLLの感受性遺伝子座が同定された。第一次ヒトゲノム計画は既に終了したので、塩基配列および多型性情報は容易に入手できるようになったので、この関心領域から近く原因遺伝子が特定されるものと期待される。その結果、コード蛋白情報はインスリン抵抗性の機序の解明に大きく寄与するであろう。

## E. 結論

OPLLの解析を通じ、インスリン抵抗性糖尿病の分画を得ることができた。これらqの症例を用い、さらに遺伝解析を行うことにより、インスリン抵抗性に関与する遺伝子を同定することが可能となろう。本成績によって、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有用性が実証された。

## F. 健康危険情報

第21番染色体上の遺伝子情報は、疾患の発症前の遺伝子診断を可能にするものであり、生活習慣の改善を含めたオーダーメイドの予防法の確立において重要である。

## G. 研究発表

### 論文発表:

1. S. Maeda, et al.  
Gender-specific haplotype association of collagen  $\alpha 2$  (XI) gene in ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine.  
J. Hum. Genet. 46:1-4, 2001
2. S. Maeda, et al.  
Functional impact of human collagen  $\alpha 2$  (XI) gene polymorphism in pathogenesis of ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine.  
J. Bone Miner. Res. (In press)
3. 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)
4. L. Yu, et al.  
Genetic variation in the hepatocyte nuclear factor (HNF)-3 $\alpha$  gene does not contribute to maturity-onset diabetes of the young in Japanese.  
Horm. Metab. Res. (In press)

### 学会発表:

1. 猪狩勝則、他。「21番染色体上での後縦靭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.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

特記すべきものなし



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

分担研究者 宮川潤一郎 大阪大学大学院分子制御内科学  
山縣 和也 大阪大学大学院分子制御内科学

研究要旨：家族歴の濃厚な日本人 2 型糖尿病の一家系において HNF-3 $\beta$  の遺伝子異常を同定し、HNF-3 $\beta$  遺伝子異常も糖尿病の疾患感受性遺伝子の一つである可能性が示された。一方、HNF-6 遺伝子異常は認められず、糖尿病発症における HNF-6 の関与は少ないものと考えられた。

A. 研究目的

増加する一方である糖尿病の遺伝素因を明らかにすることは、個々の患者に応じた予防法・治療法を確立する上で必須であると考えられる。我々は、転写因子である hepatocyte nuclear factor-1 $\alpha$  (HNF-1 $\alpha$ ), HNF-1 $\beta$ , HNF-4 $\alpha$  の遺伝子異常が、インスリン分泌不全型糖尿病(MODY)の原因であることを明らかにし、「HNF 異常型糖尿病」という成因に基づいた新しい概念を提唱した。HNF-3 $\beta$  や HNF-6 などの他の HNF の異常によっても、糖尿病が発症するか明らかにする目的で以下の検討を行った。

B. 研究方法

- (1) 57 名の家族歴を有する 2 型糖尿病患者に対して HNF-3 $\beta$  および HNF-6 遺伝子 coding region における異常の有無を PCR 直接シーケンス法を用いて検討した。HNF-6 については MODY と考えられる症例 20 例についても検討を行った。遺伝子解析をおこなうに際しては、詳細な説明を行った上で、文書でインフォームドコンセントを得、倫理面に十分な配慮を払った。
- (2) 遺伝子解析により、異常が認められたものについては、変異体 cDNA を作製し、培養細胞に遺伝子導入し、リポーターアッセイを行い変異体活性の検討を行った。

C. 研究結果

- (1) HNF-6 の遺伝子異常は今回検討した範囲で認められなかった。一方、HNF-3 $\beta$  遺伝子に関しては、57 例中、3 例において 2 種類のミスセンス変異 (A86T; 2 例、G114E; 1 例) を認めた。これらの変異は 225 名の正常健康人においては認められなかった。
- (2) A86T 変異体の転写因子活性は正常の 83.4% であり、正常 HNF-3 $\beta$  に比して有意に低下してい

た。一方、G114E の機能は正常と同等であった。

D. 考察

我々は、昨年までの検討により、日本人の若年発症の糖尿病患者の一部において HNF-1 $\alpha$  遺伝子が認められることを報告した。今回の検討により、家族歴を有する 2 型糖尿病患者において、HNF-3 $\beta$  遺伝子異常が同定されたことから、本遺伝子も日本人糖尿病の疾患感受性遺伝子の一つである可能性が示された。

E. 結論

HNF-3 $\beta$  遺伝子の異常は一部の 2 型糖尿病患者の発症素因であると考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) 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 $\beta$  gene in Japanese subjects with late-onset Type II diabetes mellitus. *Diabetologia* 43: 1197-1200, 2000
- (2) 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)

2. 学会発表

- (1) 第 43 回日本糖尿病学会総会(2000.5.24-26, 名古屋) 糖尿病遺伝子: 山縣和也、宮川潤一郎、花房俊昭、松澤佑次
- (2) 第 37 回日本糖尿病学会近畿地方会(2000.11.18,

大津)日本人糖尿病患者における HNF-6 遺伝子異常の検討：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

- (3) 60th Annual Meeting and Science Sessions of American Diabetes Association (2000.6.9-13, Texas, USA) Dominant negative HNF-1 $\alpha$  mutant affects the normal development of pancreatic  $\beta$  cells: Yamagata K, Moriwaki M, Nammo T, Tochino Y, Li M, Yang Q, Uenaka R, Iwahashi H, Imagawa A, Hanafusa T, Miyagawa J, Matsuzawa Y
- (4) 11th International Congress of Endocrinology (2000.10.29-11.2, Sydney, Australia) Overexpression of dominant negative hepatocyte nuclear factor-1alpha in pancreatic B-cells leads to diabetes mellitus: Yamagata K, Moriwaki M, Nammo T, Tochino Y, Li M, Yang Q, Uenaka R, Iwahashi T, Imagawa A, Okita K, Hanafusa T, Miyagawa J, Mtsuzawa Y

G. 知的所有権の取得状況

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

自然高血圧発症ラット(SHR)におけるインスリン抵抗性原因遺伝子座位の解析

分担研究者 山田 信博 筑波大学臨床医学系内科教授

研究要旨：SHR のインスリン抵抗性連鎖遺伝子座位(QTL)を再評価する目的で、*Cd36* 欠失のない SHR に由来する F2 群(SHR/Izm x WKY/Izm)を作製して解析した。方法としては、12 週齢の F2(雄、n=150)の体重、血圧、血清脂質、血糖、IRI、臓器重量、および単離脂肪細胞でのインスリン刺激後の糖の取り込み(G)とカテコラミン刺激後の NEFA の産生(N)を測定し、それらに連鎖を示す QTL を調べた。その結果、4 番染色体の *Cd36* 近傍に、(G)と(N)に連鎖する QTL を確認した。また、4 番染色体の *NPY* 近傍と 3 番染色体近位端にも、血圧や(G)と(N)に強く連鎖する QTL の集族を認めた。3 番染色体の QTL 領域に位置する候補遺伝子、KAT-1 (Kynurenine aminotransferase-1)遺伝子に SHR に特異的な点突然変異(E61G)を同定した。この変異は、SHR を用いた F2 cross において体重、血圧、および(G)と(N)に有意な連鎖を示すことが確認され、SHR の高血圧を含む多様な異常に関与している可能性が示唆された。

A. 研究目的

糖尿病や高血圧症などの生活習慣病の発症に深く関わる「インスリン抵抗性」の原因遺伝子の同定を目標として、そのモデル動物である高血圧自然発症ラット(SHR)を用いた研究を続けた。われわれはこれ迄の研究で、SHR がいわゆるインスリン抵抗性症候群のモデル動物であること、および SHR には *Cd36* 遺伝子欠失のある SHR と欠失のないオリジナルの SHR(SHR/Izm)があり、SHR/Izm の方がより強いインスリン抵抗性を示すことを報告してきた。一方で、Aitman らは、*Cd36* 遺伝子欠失のある SHR の交配集団を用いた解析により、単離脂肪細胞でのインスリン刺激後の糖の取り込みとカテコラミン刺激後の NEFA の産生に連鎖する遺伝子座位(QTL)がいずれも 4 番染色体の *Cd36* 遺伝子座位近傍に位置することから、*Cd36* 遺伝子を SHR の主要なインスリン抵抗性原因遺伝子と提唱している。

本年度の研究では、*Cd36* 遺伝子欠失をもたない SHR/Izm を用いた交配集団を新たに作製して同様な QTL 解析を行うことにより、SHR のインスリン抵抗性原因遺伝子の再評価を行うとともに、その原因遺伝子の同定を目指す。

B. 研究方法

SHR/Izm と WKY/Izm の交配に由来する F2 群(雄、n=150)を作製して、12 週齢時に体重、脈拍、血圧、血清脂質、血糖、インスリン値を測定した。次いで、麻酔下で屠殺後に各臓器重量を測定し、また副睾丸周囲脂肪組織より脂肪細胞を単離し、*in vitro* でのインスリン刺激後の糖の取り込み、およびイソプロテレノール刺激後の NEFA の産生を調べた。

これらの値に有意な連鎖を示す QTL をマイクロサテライトマーカーを用いた部分的ゲノムスクリーニングにより調べた。KAT-1 遺伝子の染色体上での局在は radiation hybrid mapping にて決定し、DNA の単離および塩基配列決定は常法にて行った。

(倫理面への配慮) 実験動物への処置(麻酔・採血・組織採取・屠殺)に当っては、動物に与える苦痛を最小限に抑えるべく Helsinki 宣言に従って行った。

C. 研究結果

1) 4 番染色体の *Cd36* 近傍にピークをもつ、イソプロテレノール刺激後の NEFA の産生に有意な連鎖を示す QTL を認めた。2) 同じく 4 番染色体にインスリン刺激後の糖の取り込みに連鎖する QTL を認めたが、その連鎖は広範囲に及び、連鎖のピークはむしろ *NPY* 近傍にみられた。3) 4 番染色体の *NPY* 近傍と 3 番染色体近位端には、血圧上昇や体重減少、およびインスリン刺激後の糖の取り込みとイソプロテレノール刺激後の NEFA の産生に強く連鎖する QTL の集族を認めた。4) 3 番染色体の QTL 領域に位置する候補遺伝子として KAT-1 (Kynurenine aminotransferase 1)遺伝子が考えられ、radiation hybrid mapping にてその遺伝子座位が 3 番染色体近位端(D3Rat54 近傍)に存在することを示した。5) ゲノム DNA の塩基配列決定の結果、SHR の KAT-1 遺伝子にミスセンス 変異(Glu61Gly)を同定した。6) この Glu61Gly 変異は SHR に特異的な変異であり、SHR の全ての subline で認めたが、他のラットでは全く認められなかった。7) F2 交配集団でこの変異は、血圧上昇( $P<0.05$ )、体重減少( $P<0.001$ )、およびインスリン刺激後の糖の取り込

み( $P < 0.01$ )とイソプロテレノール刺激後の NEFA の産生( $P < 0.0005$ )に有意な連鎖を示すことを確認した。

#### D. 考察

世界的に現在、糖尿病や高血圧症などの多因子性疾患の原因遺伝子の解明が大きな課題となっており、またインスリン抵抗性の亢進がこれらの疾患発症とその結果生ずる虚血性心疾患発症への関与で特に危険因子重複症候群として注目されている。しかし現在迄の所、所謂 candidate gene approach を用いたこれらの多因子性疾患の原因遺伝子の探索は成功しておらず、新たな手法の導入が必要とされている。

われわれは、QTL 解析により SHR の脂肪細胞におけるインスリン抵抗性の QTL を 4 番、12 番、16 番および 3 番染色体上に同定し、その後 cDNA subtraction と radiation hybrid mapping を中心とした解析により、*Cd36* 遺伝子が 4 番染色体 QTL の有力な原因候補遺伝子として浮上した。しかし、*Cd36* 遺伝子変異をもつ SHR/NCrj は変異をもたない SHR/Izm よりもむしろ糖の取り込みは有意に亢進し、血中インスリン値も低い傾向が見られ、この *Cd36* 遺伝子変異は SHR に見られるインスリン抵抗性の主要な原因ではないものと考えられた。今回、*Cd36* 遺伝子欠失をもたないオリジナルの SHR である SHR/Izm を用いた交配集団を作製して同様に行った QTL 解析にて、4 番染色体 QTL の原因遺伝子は *Cd36* 遺伝子ではないことが証明された。今回あらたに同定された 3 番染色体 QTL を糸口として、SHR の高血圧を含む多様な代謝異常に強く連鎖するミスセンス (Glu61Gly) 変異を KAT-1 遺伝子に同定した。KAT-1 は 458 アミノ酸よりなり、Kynurenine から Kynurenic acid (KA) への変換を担う酵素であり、脳や腎臓で高発現していることが知られている。KA はグルタミン酸の内因性拮抗物質であり、脳内ではグルタミン酸の NMDA 型受容体への結合に競合阻害的に働き、グルタミン酸の神経興奮的・神経毒性的作用を抑制する働きがあるものと考えられている。SHR では血圧調節中枢のある延髄腹外側野でのグルタミン酸感受性亢進が報告されており、今回の結果ともよく一致する。KAT-1 はまた脂肪組織でも発現しており、今回示された SHR の体重や脂肪分解異常との強い連鎖も、KAT-1 遺伝子の変異が直接原因となっている可能性が考えられる。

#### E. 結論

既報の SHR の 4 番染色体 QTL は、*Cd36* とは別個に存在することが示された。また今回、インス

リン抵抗性を含む SHR における多様な異常に連鎖する QTL を 3 番染色体に新たに見出し、その原因候補遺伝子として KAT-1 遺伝子を同定し、その遺伝子の染色体上での局在を決定・確認した。SHR の KAT-1 遺伝子には、ミスセンス変異 (Glu61Gly 変異) が SHR strain に特異的に存在し、本変異は高血圧を含む SHR の多様な異常の発症の根幹に関わる重要な変異である可能性が示唆された。

#### F. 健康危険情報 なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- (1) Osuga J-I, Yamada N. 他 Targeted disruption of hormone sensitive lipase results in male sterility and adipocyte hypertrophy, but not in obesity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2000 97:787-92.
- (2) Yagyu H, Yamada N. 他 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.
- (3) Amemiya-Kudo M, Yamada N. 他 Promoter Analysis of the Mouse Sterol Regulatory Element-binding Protein-1c Gene. J Biol Chem. 2000; 275 :31078-31085.
- (4) Hasty AH, Yamada N. 他 Sterol Regulatory Element-binding Protein-1 Is Regulated by Glucose at the Transcriptional Level. J Biol Chem. 2000; 275:31069-31077.
- (5) 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

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 なし