

学位論文題名

小児発症非肥満糖尿病患者における病因としての
Hepatocyte Nuclear Factor (HNF)-1 α , HNF-4 α ,
HNF-1 β 遺伝子解析に関する研究

学位論文内容の要旨

緒言

若年発症の非肥満糖尿病は様々な病態の糖尿病を含んでいる。ほとんどの患者はインスリン治療を必要とする1型糖尿病患者であるが、少数の2型糖尿病患者も含まれる。1型糖尿病患者の多くは慢性、進行性に自己免疫学的機序により膵 β 細胞の破壊の結果発症するが、5-10%の患者は glutamic acid decarboxylase (GAD) 抗体、Islet cell antibody (ICA) 等の自己抗体を認めない1B型糖尿病である。Maturity onset diabetes of the young (MODY) は早期発症 (25才以下)、常染色体優性遺伝、インスリン分泌の低下を特徴とする疾患群である。MODY 関連遺伝子は6つ同定されているが hepatocyte nuclear factor-4 α (HNF-4 α)、HNF-1 α の変異で生じる MODY1, MODY3 は徐々にインスリン分泌が低下し最終的にインスリン治療が必要となる場合が多い。HNF-1 β 遺伝子変異でおこる MODY5 はインスリン治療を必要とする糖尿病の他に腎奇形、腎のう胞性疾患等の合併を認めることが多い。小児期発症非肥満糖尿病患者のなかにインスリン分泌低下を引き起こす HNF 遺伝子変異が混在している可能性がある。そこで申請者は 82 人の日本人小児期発症非肥満糖尿病患者で HNF 遺伝子の解析を行い疾患との関連を調べた。

方法・結果

対象は経口ブドウ糖負荷テスト (OGTT) で空腹時血糖 126mg/dl 以上、2時間値 200mg/dl 以上のもので、発症時 18 才未満であり、BMI が 25kg/m² 未満である日本人糖尿病患者とした。インフォームドコンセントを得たのち末梢血白血球から genomic DNA を抽出し既報のプライマーを用いて HNF-1 α , -4 α , -1 β 遺伝子を PCR 法で増幅した。single-strand conformation polymorphism (SSCP) でスクリーニングをしたのち直接シーケンス法を行った。HNF-1 α 遺伝子で認められたアミノ酸置換を伴う多型 I27L (ATC \rightarrow CTC) と S487N (AAC \rightarrow AGC) については RFLP 法を用いて解析し、その頻度を 40 名の耐糖能異常を指摘されたことのない健康成人と比較したが有意差を認め

られなかった (I27L P=0.6483、S487N P=0.6667)。HNF-1 α 遺伝子の解析では exon 4 に R271W (CGG \rightarrow TGG) と R272C (CGC \rightarrow TGC)、プロモーター領域に+95+96insTTGGGG の 3 種類の変異をそれぞれヘテロで有する 3 例を同定した。R271W はフランスの MODY 家系で、R272C は日本の家系で報告されている。Promoter +95+96 insTTGGGG は未報告例で 40 名のコントロール、他の 81 名の患者群にも認めなかった。HNF-4 α 遺伝子の exon 1 に未報告の N29T (AAT (Asn) \rightarrow ACT (Thr)) の 1 塩基置換をヘテロでもつものを患者とコントロールにそれぞれ一名見出した。HNF-1 β は変異、多型ともに認められなかった。未報告の HNF-1 α promoter +95+96 insTTGGGG と HNF-4 α N29T はヒト肝臓細胞系列の HepG2、ラット膵臓細胞系列の INS-1 を用いてその発現をレポーターアッセイで解析した。HepG2 ではその発現が wild type の 160%、INS-1 で 180%を示した。N29T の発現は wild type と有意差を認めず稀な多型と考えられた。HNF-1 α R271W 変異を持つ患者は 10 才に学校検尿で尿糖が指摘され 12 才時よりインスリン治療を開始されている。糖尿病の家族歴はなく ICA は陰性。R272C の変異を持つ患者は 9 才時学校検尿で尿糖を指摘され 11 才時より経口血糖降下薬の内服を開始、13 才よりインスリン治療を開始された。GAD 抗体は陰性で母、父方祖父に 2 型糖尿病を認める。promoter+95+96 ins TTGGGG をもつ患者は 9 才時多飲、多尿、体重減少で発症し直ちにインスリン治療を開始された。GAD 抗体は陰性で父方祖父に 2 型糖尿病がある。

考察

小児期発症非肥満糖尿病患者 82 名中 3 例 (3.75%) はそれぞれ異なる 3 種類の HNF-1 α 遺伝子変異のヘテロ接合体であった。3 例の変異のうち R271W と R272C はそれぞれフランスと日本の MODY 家系で同定された変異であったが、HNF-1 α プロモーターの +95+96 ins TTGGGG 変異は今回新に同定されたものである。変異を持つ 3 人の患者はすべて膵臓に対する自己抗体をもっていなかったが、臨床経過や家族歴は異なっていた。R271W 変異の患者では糖尿病の家族歴もない。このことは MODY の概念にあてはまらない糖尿病患者のなかにも HNF-1 α 変異を持つ患者が含まれていることを示している。未報告の+95+96 ins TTGGGG 変異は wild type の 1.6~1.9 倍のプロモーター活性を認め、Yoshiuchi らの+102 G \rightarrow C 変異の 1.8 倍に近似する。+102 G \rightarrow C 変異と我々が同定した+95+96 insTTGGGG 変異は DNase I foot printing assay で同定された A-site に位置する。A-site に結合する蛋白は未だ同定されていないがこの部位に結合する何らかの蛋白が HNF-1 α 活性を調節している可能性が示唆される。HNF-1 α 、HNF-4 α 、HNF-1 β 、IPF-1、NeuroD-1 の転写因子はカスケードを作りお互いを調節している。このカスケード上、HNF-1 α は HNF4 α の下流に位置し HNF-4 α に転写活性の調節をうけているが、HNF4 α のプロモーター領域に HNF1 α の binding site があることが判明しており、HNF1- α が HNF-4 α の転写活性を調節するメカニズムがあるとの報告がある。+95+96 insTTGGGG 変異例で認めたプロモーター活性の亢進は HNF-1 α の転写活性を亢進させ、HNF-4 α の転写活性を減弱させ、HNF-4 α 遺伝子依存の遺伝子の活性を低下させ、結果として HNF-4 α 遺伝子の変異で生じる MODY1 と同様の機序で糖尿病を発症させると考えられた。結語 HNF-1 α 遺伝子で既知の 2 種類の変異と新規のブ

ロモーター領域の変異を同定した。本研究から小児期発症非肥満糖尿病患者のなかに MODY の診断基準を満たさない HNF-1 α 遺伝子変異が原因の患者が含まれていることを示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 林 邦 彦
副 査 教 授 小 池 隆 夫
副 査 教 授 石 橋 輝 雄

学 位 論 文 題 名

小児発症非肥満糖尿病患者における病因としての Hepatocyte Nuclear Factor (HNF)-1 α , HNF-4 α , HNF-1 β 遺伝子解析に関する研究

若年発症の非肥満糖尿病は様々な病態の糖尿病を含む。1型糖尿病の多くは自己免疫学的機序により膵 β 細胞の破壊の結果発症する1A型であるが、5~10%は自己抗体を認めない1B型糖尿病である。後者に属するmaturity onset diabetes of the young (MODY)は早期発症(25才以下)、常染色体優性遺伝、インスリン分泌の低下を特徴とする疾患群である。MODY関連遺伝子は6つ同定されているがhepatocyte nuclear factor-4 α (HNF-4 α)、HNF-1 α の変異で生じるMODY1、MODY3は徐々にインスリン分泌が低下し最終的にインスリン治療が必要となる場合が多い。HNF-1 β 遺伝子変異でおこるMODY5はインスリン治療を要する糖尿病の他に腎奇形、腎のう胞性疾患等の合併を認める。小児期発症非肥満糖尿病のなかにインスリン分泌低下を引き起こすHNF遺伝子変異が混在している可能性がある。そこで申請者は82人の日本人小児期発症非肥満糖尿病患者でHNF遺伝子の解析を行い疾患との関連を調べた。

対象は経口ブドウ糖負荷テスト(OGTT)で空腹時血糖126mg/dl以上、2時間値200mg/dl以上のもので、発症時18才未満であり、BMIが25kg/m²未満である日本人糖尿病患者とした。末梢血白血球からgenomic DNAを抽出し既報のプライマーを用いてHNF-1 α 、-4 α 、-1 β 遺伝子をPCR法で増幅し、single-strand conformation polymorphism (SSCP)でスクリーニングをしたのち直接シーケンス法を行った。HNF-1 α 遺伝子の解析ではexon 4にR271W (CGG→TGG)とR272C (CGC→TGC)、プロモーター領域に+95+96insTTGGGGの3種類の変異をそれぞれヘテロで有する3例を同定した。R271WはフランスのMODY家系で、R272Cは日本の家系で報告されている。Promoter +95+96 insTTGGGGは未報告例で40名のコントロール、他の81名の患者群にも認めなかった。その他HNF-1 α 遺伝子でI27L(ATC→CTC)とS487N(AGC→AAC)の変異を認め、その頻度を40名の耐糖能異常を指摘されたことのない健康成人と比較したが有意差を認められなかった(I27L P=0.6483、S487N P=0.6667)ことから、多型と判断した。HNF-4 α 遺伝子のexon 1に未報告のN29T(AAT(Asn)→ACT(Thr))の1塩基置換をヘテロでもつものを患者

とコントロールにそれぞれ一名見出した。HNF-1 β は変異、多型ともに認められなかった。未報告の HNF-1 α promoter +95+96 insTTGGGG と HNF-4 α N29T はヒト肝臓細胞系列の HepG2、ラット膵臓細胞系列の INS-1 を用いてその発現をレポーターアッセイで解析した。+95+96 insTTGGGG 導入 HepG2 ではその発現が wild type の 160%、INS-1 で 190%を示した。N29T の発現は wild type と有意差を認めず稀な多型と考えられた。HNF-1 α R271W 変異を持つ患者は 10 才に学校検尿で尿糖が指摘され 12 才時よりインスリン治療を開始されている。糖尿病の家族歴はなく ICA は陰性。R272C の変異を持つ患者は 9 才時学校検尿で尿糖を指摘され 11 才時より経口血糖降下薬の内服を開始、13 才よりインスリン治療を開始された。GAD 抗体は陰性で母、父方祖父に 2 型糖尿病を認める。promoter+95+96 ins TTGGGG をもつ患者は 9 才時多飲、多尿、体重減少で発症し直ちにインスリン治療を開始された。GAD 抗体は陰性で父方叔父に 2 型糖尿病がある。

小児期発症非肥満糖尿病患者 82 名中 3 例 (3.75%) はそれぞれ異なる 3 種類の HNF-1 α 遺伝子変異のヘテロ接合体であった。3 例の変異のうち R271W と R272C はそれぞれ既知の変異であったが、HNF-1 α プロモーターの+95+96 ins TTGGGG 変異は今回新たに同定されたものである。変異を持つ 3 人の患者はすべて膵臓に対する自己抗体をもっていなかったが、臨床経過や家族歴は異なっていた。R271W 変異の患者では糖尿病の家族歴もない。このことは MODY の概念にあてはまらない糖尿病患者のなかにも HNF-1 α 変異を持つ患者が含まれていることを示している。未報告の+95+96 ins TTGGGG 変異は wild type の 190%のプロモーター活性を認め、Yoshiuchi らの+ 102 G>C 変異の 180% に近似する。+ 102 G>C 変異と我々が同定した+95+96 insTTGGGG 変異は DNase I foot printing assay で同定された A-site に位置する。A-site に結合する蛋白は未だ同定されていないがこの部位に結合する何らかの蛋白が HNF-1 α 活性を調節している可能性が示唆される。HNF-1 α 、HNF-4 α 、HNF-1 β 、IPF-1、NeuroD-1 の転写因子はカスケードを作りお互いを調節している。このカスケード上、HNF-1 α は HNF4 α の下流に位置し HNF-4 α に転写活性の調節をうけているが、HNF4 α のプロモーター領域に HNF1 α の binding site があることが判明しており、HNF1- α が HNF-4 α の転写活性を調節するメカニズムがあるとの報告がある。+95+96 insTTGGGG 変異例で認めたプロモーター活性の亢進は HNF-1 α の転写活性を亢進させ、HNF-4 α の転写活性を減弱させ、HNF-4 α 遺伝子依存の遺伝子の活性を低下させ、結果として HNF-4 α 遺伝子の変異で生じる MODY1 と同様の機序で糖尿病を発症させると考えられた。

公開発表に際し、副査の石橋教授から、A-site に結合する蛋白について、3 つの変異と臨床像との関係、変異体分子の分子会合について、副査の小池教授から、挿入変異の機能解析における結果の解釈について、この疾患における組織変化についてと治療法について質問があった。最後に主査の小林教授から、家族内遺伝子検索のできなかつた理由、プロモーター領域の変異で発現減少する場合と、発現亢進する場合の病態との関係などの質問があったが、申請者は何れの質問に対しても、自らの実験と文献を引用しほぼ妥当な回答を行った。

本研究は本邦の小児期発症非肥満糖尿病患者に MODY の原因遺伝子の一つである HNF-1 α 遺伝子変異を 3 種類見出し、その内の一つは新規のプロモーター領域の変異であることを明らかにした。これは小児期発症非肥満糖尿病の中に HNF-1 α 遺伝子変異が原因の患者が存在することを示唆し、今後の小児糖尿病患者の診断、治療に貢献することが期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。