

インスリン抵抗性症候群及び2型糖尿病患者におけるLMNA遺伝子変異の検討

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/4557

インスリン抵抗性症候群および2型糖尿病患者における *LMNA* 遺伝子変異の検討

金沢大学大学院医学系研究科循環医学専攻血管分子遺伝学

(旧講座名：内科学第二講座)

(主任：馬淵 宏教授)

村 瀬 裕 子

インスリン抵抗性症候群の一因として、思春期以降に四肢や下腹部・臀部の著明な脂肪萎縮、そしてインスリン抵抗性や糖尿病、高脂血症などが引き起こされる常染色体優性遺伝の家族性部分的脂肪萎縮症が挙げられる。核膜の主要な構成タンパク質であるラミンA/Cをコードする*LMNA* 遺伝子異常がこの疾患の原因遺伝子であることが明らかになった。また、家族性複合型高脂血症の原因遺伝子座が*LMNA* 遺伝子と同じ1q21の領域に存在するとも報告されている。本研究では、*LMNA* 遺伝子変異がインスリン抵抗性症候群の原因候補遺伝子の一つと考え、最初に黒色表皮症を伴った著明なインスリン抵抗性を有する男性患者8名〔平均(±標準偏差) 年齢20.8 (±11.0) 歳、空腹時免疫反応性インスリン値35.6 (±15.9) μ U/ml〕の末梢白血球より分離した高分子DNAを用いて、*LMNA* 遺伝子の全12エクソンのそれぞれに対応したプライマーを設計しPCRによりDNA断片を増幅させ、PCR一本鎖構成体多型 (PCR-single strand conformational polymorphism, PCR-SSCP) 法および直接塩基配列決定法 (direct sequencing) を用いて遺伝子変異の確定を行った。エクソン10の1908番目の塩基がCからTへ変異 (C1908T) する一塩基変異多型 (single nucleotide polymorphism, SNP) のみが3名に認められた。ラミンAとラミンCは同一の遺伝子*LMNA* から選択的スプライシングによって作られる。1908番目の塩基はラミンAとCに共通する塩基配列の最後の塩基であるので、1908CtoTによる*LMNA* のスプライシング異常の有無を検討するため、正常型ホモ (1908 C/C) と変異型ホモ (1908 T/T) の患者それぞれの末梢白血球より分離したmRNAを用いて、ラミンAとラミンCにそれぞれに特異的なプライマーを設計し逆転写酵素-PCR (reverse transcription-PCR, RT-PCR) 法を行ったが、mRNAレベルでの明らかな異常は認められなかった。次にこの一塩基変異多型性と糖尿病、脂質代謝異常との関連について、男性2型糖尿病患者164名〔平均(±標準偏差) 年齢48.4 (±9.4) 歳〕および男性非糖尿病対照者171名〔平均(±標準偏差) 年齢53.9 (±13.2) 歳〕を対象として検討した。PCR制限酵素切断多型 (PCR-restriction length polymorphism) 法により、1908CtoT多型を解析した。1908 Tアレルを有する症例の頻度は非糖尿病群と比較して糖尿病群で有意に高値であった。1908 Tアレルを有する症例は1908 C/Cと比し、血清総コレステロール、血清中性脂肪、空腹時免疫反応性インスリン値、インスリン抵抗性指数 (homeostasis model assessment of insulin, HOMA) が有意に高値で、血清高比重リポ蛋白コレステロール (high density lipoprotein cholesterol) が低値であった。以上の結果より、*LMNA* 1908CtoT遺伝子多型は日本人男性においてインスリン抵抗性を介して糖尿病や脂質代謝異常に関連している可能性が示唆された。

Key words *LMNA*, insulin resistance, single nucleotide polymorphism, diabetes mellitus, dyslipidemia

インスリン抵抗性は一般的に肥満や脂質代謝異常、耐糖能異常と関連している^{1)~3)}。一方で、非常に稀な常染色体優性遺伝性疾患である家族性部分的脂肪萎縮症 (familial partial lipodystrophy, FPLD) は、四肢や下腹部・臀部の著明な脂肪萎縮と代償性の顔面や頸部への脂肪沈着が特徴とされるが、高率にインスリン抵抗性や糖尿病、高脂血症、早発性冠動脈硬化症が合併すると報告されている^{4)~7)}。2000年に入り、FPLDは第1番染色体長腕21の領域に存在するラミンAとラミンCをコードする*LMNA* 遺伝子の変異により発症することが発見された^{8)~11)}。ラミンは中間型フィラメントの一種で、核膜の主要な

構成タンパク質であり、核膜内面の網状の裏打ち構造 (ラミナ層) を形成している¹²⁾。ラミンA/C (ラミンAとラミンC) は同一の遺伝子*LMNA* から選択的スプライシングにより生じ、N末端より1~566番目のアミノ酸を共有するが、C末端領域は両者で異なった構造をとる¹²⁾。ラミンAとラミンCはヘテロ二量体を形成し、クロマチンや核内の多くのタンパク質と結合してDNAの複製やクロマチンの凝集、核の増殖・分裂あるいは核膜孔の形成などに関与していると考えられ、またあらゆる組織の終末分化細胞において発現している¹²⁾。同じ*LMNA* 遺伝子の異常で、FPLDとは全く異なった疾患である常染色体優性

平成13年11月6日受付、平成13年12月7日受理

Abbreviations : BMI, body mass index; FCHL, familial combined hyperlipidemia; FPLD, familial partial lipodystrophy; HDL-C, high density lipoprotein cholesterol; HOMA, homeostasis model assessment of insulin; LDL-C,

遺伝性疾患のEmery-Dreifuss型筋ジストロフィーと心伝導障害を伴った家族性拡張型心筋症が発症することも報告されているが、これらの疾患はインスリン抵抗性や代謝異常症とは関係がない¹³⁾¹⁴⁾。FPLDでインスリン抵抗性が起こるメカニズムは十分に明らかにされていないが、LMNA遺伝子異常はインスリン抵抗性症候群や糖尿病の有力な原因候補遺伝子である可能性が考えられる。

そこで本研究では、著明なインスリン抵抗性を有する男性患者についてLMNA遺伝子変異の検索を行ったところ、ラミンA/Cの構造や発現に影響をおよぼす可能性のある1つの塩基変異多型 (single nucleotide polymorphism, SNP) を見出したため、さらにその遺伝子多型の頻度およびインスリン抵抗性、糖尿病、脂質代謝異常との関連について各臨床的指標をもとに検討した。

対象および方法

I. 対 象

1995年から2000年の間に金沢大学第二内科および関連施設を受診した18歳以上の男性のうち、説明と同意後に検体採取が可能であった著明なインスリン抵抗性患者 (黒色表皮症を伴っており、75g経口ブドウ糖負荷試験上の免疫反応性インスリン最大値が500 μ U/ml以上を示した者) 8名 (平均年齢20.8 $\pm$ 11.0歳)、2型糖尿病患者164名 (平均年齢48.4 $\pm$ 9.4歳) および非糖尿病対照者171名 (平均年齢53.9 $\pm$ 13.2歳) を対象とした。2型糖尿病患者のうち、62名はスルホニル尿素剤の投与を、42名はインスリン療法を受けており、60名は食事療法のみであった。また、重篤な肝障害、腎障害、心疾患および甲状腺疾患を有する者や高脂血症、高血圧の加療をすでに受けている者は除外した。

これら検体は連結可能匿名化により提供されていた既提供資料であったが、試料を匿名化することで研究結果が提供者等に影響を与えないよう考慮した。また個人情報結果に全く表現されず、保護されている。以上の点については金沢大学医学部等医の倫理委員会の承認を得た (研究許可年月日: 平成13年4月27日、許可番号: 149、課題名: インスリン抵抗性症候群および2型糖尿病におけるLMNA遺伝子変異の検討)。

II. 方 法

1. 高分子DNAの抽出

対象者の末梢静脈血10 mlをEDTA-2Naを抗凝固剤として採取し4℃にて移送し-20℃にて保存した。この末梢血を室温にて解凍後トライトンX-100融解変法¹⁵⁾にて高分子DNAを単離した。すなわち320 mM ショ糖溶液、1%トライトンX-100、5 mM MgCl₂、10 mM Tris HCl, pH 7.6を含む融解液にて赤血球を溶血させ、遠心により沈澱として白血球を集めた。これをプロテアーゼ (Sigma, St. Louis, USA) にて消化後、フェノール・クロロホルム (1:1) で1回、続いてクロロホルム-イソアミルアルコール (24:1) にて2回抽出し、最後にエタノール沈澱によりDNAを分離した。こうして得られたDNAをTris-EDTA緩衝液 (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA-2Na, pH 8.0) に溶解の上260 nmにおける吸光度測定により濃度を求めた。

2. PCR

Shackletonら⁸⁾の報告を参考に、GenBankのデータベースに登録されているヒトLMNA遺伝子配列をもとに、12エクソンすべてについて設計した18-25塩基長のプライマー計12組を作成した (表1)。

プライマーはDNA合成機モデルABI381A (Applied Biosystems, Inc., Foster, USA) を用いベータシアノエチルホスホアミダイド法¹⁶⁾にて合成した。アンモニア水に溶解し55℃で一晩静置したうえで-20℃に冷却、真空下で遠心して乾燥、再滅菌蒸留水1 mlに溶解しカラムNAP-5 (Pharmacia-LKB, Uppsala, Sweden) に通して精製した。その後200倍に希釈し260 nmでの吸光度により濃度を測定し10 μ Mになるように濃度を調整した。

DNAの断片の増幅にはSaikiら¹⁷⁾によるPCR法を用いた。高分子DNA 1 μ gを鋳型DNAとして40 μ Mのプライマー1セットと終濃度200 μ Mの各デオキシスクレオチド (dATP, dCTP, dGTP, TTP) と2.5単位のTaqポリメラーゼ (Perkin-Elmer-Cetus, Norwalk, USA) を、0.01%ゼラチンを含む緩衝液 [終濃度10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂] に加え、再滅菌蒸留水を計50 μ lとなるように加え攪拌した。遠心して反応液を集め50 μ lのミネラルオイル (Sigma) を滴下して蒸発を防ぎ、95℃ 1分、それぞれのプライマーのTmで1分、72℃ 1.5分を基本にそれぞれのセット毎に決定した温度条件のもと、30サイクルの反応を行った。

増幅したDNA断片は1.5%の通常のアガロースゲルに鎖長マーカーとして Φ X174/HaeIII消化物 (東洋紡, 東京) と共に泳動して断片長を確認した。

3. PCR一本鎖構成体多型 (PCR-single strand conformational polymorphism, PCR-SSCP) 法

泳動用緩衝液としてTris-HCl 54 g, ホウ酸27.5 g, 0.5 M EDTA 20 mlに蒸留水を加え3 Lにしたものを保存用の5 $\times$ TBE (Tris-boric acid-EDTA) 泳動用緩衝液とし泳動直前に1 $\times$ TBEの濃度に希釈した。

0.5 mM EDTA 2 μ l, 5N NaOH 10 μ l, 滅菌再蒸留水88 μ lを混合したアルカリ溶液を作り、PCR産物8 μ lにアルカリ溶液2 μ lを加え42℃ 3分、95℃ 2分加熱後、0℃に急冷し一本鎖に変性させた。そのうえで、10-20%濃度勾配ポリアクリルアミドゲル (アトー, 東京) を用いてTBE溶液中で4℃のもと40V, 24時間泳動した。染色にはBio-Rad銀染色キット (Bio-Rad Laboratories, Richmond, USA) を用い、プロトコルに従って銀染色を行った。すなわち10%エタノール、5%酢酸混合液200 mlにて15分間ゲルの固定を行い、酸化剤100 mlにて5分間酸化させた。蒸留水で15分間に3回水を換えながらすすぎ余分な酸化剤を除き、銀染色溶液を加え20分間振盪させた。その後30秒以内に洗浄し現像液を加えバンドの出現を確認した。ある程度以上バンドが濃くなった時点で蒸留水で1分間すすいだ後、5%酢酸100 mlを加え反応を停止させた。30%エタノール、5%酢酸混合液200 mlを保存液とし、30分以上保存液内にゲルを浸した後、ゲルをセルロースフィルム内に入れて保存した。

low lipoprotein cholesterol; PCR-SSCP, PCR-single strand conformational polymorphism; PCR-RFLP, PCR-restriction fragment length polymorphism; RT-PCR, reverse transcription-PCR; SNP, single nucleotide polymorphism; TBE, Tris-boric acid-EDTA; TC, total cholesterol; TG, triglyceride

Table 1. Oligonucleotide primers flanking the exons of the *LMNA* gene for PCR amplification

Exon	Oligonucleotide name	Sequence
1	1f	5'-CCCAGATCCCGAGGTCCGAC-3'
	1r	5'-CCTCTCCACTCCCCGCCA-3'
2	2f	5'-CAGACTCCTTCTCTTAAATCTAC-3'
	2r	5'-CCTAGGTAGAAGAGTGAGTGAC-3'
3	3f	5'-CCTTCAAGTTCTTGTTTCAGTGAC-3'
	3r	5'-CCTAGCCCAGCCCAAGTCTGTC-3'
4	4f	5'-GGCCTCCCAGGAATAATTCTG-3'
	4r	5'-CTCCCTGCCACCATCTGC-3'
5	5f	5'-GCTGTAGCAGTGATGCCAAC-3'
	5r	5'-CCAAAGCCCAGAGAAGTGAAG-3'
6	6f	5'-GCCAGGACTATGTTTAGAGCTTG-3'
	6r	5'-GGTCTAGTCAAGGCCAGTTG-3'
7	7f	5'-CCCCACTTGGTCTCCCTCTCC-3'
	7r	5'-CCCTGATGCAGCTGTATCCCC-3'
8	8f	5'-TCAATTGCAGGCAGGCAGAG-3'
	8r	5'-GCTCCCATCGACACCCAAGG-3'
9	9f	5'-ACTTACCGGTTCCACCAAAGT-3'
	9r	5'-ATCTTTTGGTTTCCTGCTGGGT-3'
10	10f	5'-AAAGGGCAGGCCACAAGAAAAG-3'
	10r	5'-CACAGGAATATTCATGGCATC-3'
11	11f	5'-CACAGAACCAACCTTCCTCCC-3'
	11r	5'-CTCGTCCTACCCCTCGATGACC-3'
12	12f	5'-GTTGTCTGAGCCCCAGACTGGAG-3'
	12r	5'-AGGGAAAAGGAAGGGAGGAGAAAT-3'

Oligonucleotide primers complementary to DNA sequences flanking exons of the human *LMNA* were synthesized on ABI 380A DNA synthesizer and used to amplify the intervening sequences with PCR.

4. 自動化直接塩基配列決定法 (direct sequencing)

PCRで増幅したDNA断片を1.5%の通常のアガロースゲルに鎖長マーカーとして Φ X174/*Hae*III消化物と共に泳動し、断片長を確認した上で、目的とするDNA断片のバンドを含む部分を切り出した。マイクロビュアとマイクロコン-50 (Amicon) を組み合わせてこのDNA断片を10,000 rpmで10分間遠心した。再滅菌蒸留水25 μ lを加えて再度遠心し、濃縮すると同時に余分なプライマー、およびヌクレオチドを除去し鋳型DNAとした。これにダイ・ターミネーター・サイクル・シーケンシングキット (Perkin-Elmer) を用いサイクルシーケンシング法を行った。

自動化直接塩基配列決定法としてABI PRISM™ 377 Genetic Analyzer (Perkin-Elmer) を用いた。4%ポリアクリルアミドゲルアクリルアミド・ビス (19:1) を用い、泳動用緩衝液は1×TBEを用い、室温のもと1680 V 7時間かけて泳動した。泳動は1.25秒毎にレーザービームによって読みとり、パーソナルコンピュータ Power Macintosh 7200/120 (Apple, Cupertino, USA) 本体内部の固定ディスクに数値データとして保存された。反応終了後に塩基配列解析を自動的に行い、配列を文字データおよび波形のグラフとして出力した。

5. PCR制限酵素切断多型 (PCR-restriction length polymorphism, PCR-RFLP) 法

変異配列が決定された後、変異の存在の確認、およびスクリーニングのため、特定の制限酵素で切断部位が生じるように

プライマーを設計した。検出された1908CtoT変異の確認のため、エクソン10において一側に通常のプライマー5'-AAAGGGCAGGCCACAAGAAAAG-3'を、反対側に変異プライマー5'-GGCTCGGCCTCAGCGCGGCTACCACTCCC-3'を用いて95℃1分、56℃1分、72℃1.5分30サイクルの温度条件でのPCR法により強制的に変異配列を導入したDNA断片を増幅した。その上でピペットにてミネラルオイルの下層よりPCR産物を12 μ l取り出し、10×制限酵素 *Nco* I (東洋紡) 用反応緩衝液2 μ lと制限酵素 *Nco* I 1 μ lを加え酵素の至適温度である37℃で6時間反応させた。そして10-20%アクリルミドゲルで反応産物をサイズマーカー Φ X174/*Hae*III消化物と共に泳動して、切断の有無で変異の検出およびホモ接合体とヘテロ接合体の鑑別を行った。

6. RNAの抽出および逆転写PCR反応 (reverse transcription-PCR, RT-PCR)

末梢静脈血10 mlをヘパリンを抗凝固剤として採取し常温にて移送、フィコール-ハイパーク比重遠心法にて単核球を分離した。単核球 5×10^6 個にRNAzol (Gibco BRL, USA) 1 mlを加え細胞を融解した。0.2 mlのクロロホルムを加え攪拌し5分間氷冷却後、微量高速冷却遠心機 (トミー精工, 東京) にて12,000 rpm, 15分間, 4℃で遠心分離した。上層部を採取し、等量のイソプロパノールを加え15分間氷冷却後、RNAを析出させ12,000 rpmで8分間遠心した。沈澱 (RNA) を75%冷エタノールで洗浄後、上清を完全に除き室温にて風乾して総

RNAを抽出し、超純水にて200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に調整した。得られた総RNAを鋳型としランダムプライマーにて一本鎖cDNAを合成した。まず、総RNA 4 μg に80 mMのランダムヘキサヌクレオチドプライマー (Pharmacia-LKB) 3 μl を加え、1 $\times$ Tris-EDTA緩衝液 (pH 6.8) で総量 50 μl に調整した。次に65 $^{\circ}\text{C}$ で10分間保持後、20分かけて25 $^{\circ}\text{C}$ まで冷却し、RNAの変成とプライマーのアニーリングを行った。引き続き反応液 [100 mM Tris-HCl (pH 8.3), 200 mM KCl, 20 mM MgCl_2 , 20 mM ジチオスレイトール (dithiothreitol), 各2 mMの4種類のdNTP, 逆転写酵素 10単位 (Pharmacia-LKB)] 50 μl を加え、37 $^{\circ}\text{C}$ で60分間保持し

cDNAを合成させた後、90 $^{\circ}\text{C}$ 5分間で逆転写酵素を失活させた。

ラミンAおよびラミンCに共通のセンスプライマー 5'-AGCCTGCGTACGGCTCTCAT-3'とラミンAに特異的なアンチセンスプライマー 5'-GCTCCTGAGCCGCTGGCAGA-3', ラミンCに特異的なアンチセンスプライマー 5'-TCAGCGGCGGCTACCACTCAC-3'をそれぞれ設計し、40 μM のプライマー各1セット, 調整したcDNA 2 μl , 200 μM の4種類のdNTP, 2.5単位のTaqポリメラーゼ (Perkin-Elmer) を, PCR反応緩衝液 [10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl_2] に加え、全量 50 μl でPCR反応を行った。反応は95 $^{\circ}\text{C}$ $\times$ 1分, 58 $^{\circ}\text{C}$ $\times$ 1分, 72 $^{\circ}\text{C}$ $\times$ 1.5分で30回増幅した。

7. 臨床的測定項目

年齢, 体格指数 (body mass index, BMI) [体重 (kg) / 身長 (m)²], 収縮期血圧, 拡張期血圧を測定した。2型糖尿病の診断はWHOの診断基準¹⁸⁾に基づいて行われた。全例早朝空腹時の静脈採血を行った。血清総コレステロール (total cholesterol, TC), 血清中性脂肪 (triglyceride, TG) は酵素法で¹⁹⁾²⁰⁾, 血清高比重リポ蛋白コレステロール (high density lipoprotein cholesterol, HDL-C) は沈澱法で測定した²¹⁾, 血清低比重リポ蛋白コレステロール (low density lipoprotein cholesterol, LDL-C) はFriedewaldの式で算出した²²⁾。空腹時免疫反応性インスリン値はラジオイムノアッセイで, 血糖値はヘキソキナーゼ法で測定した。インスリン抵抗性はインスリン抵抗性指数 (homeostasis model assessment of insulin, HOMA) [fasting

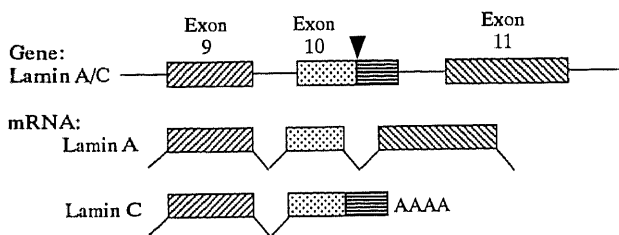


Fig. 1. Structure of the two different mRNAs resulting from the alternative splicing from the lamin A/C gene. The arrowhead indicates the codon 1908, where the alternatively used 5'-splice site in exon 10.

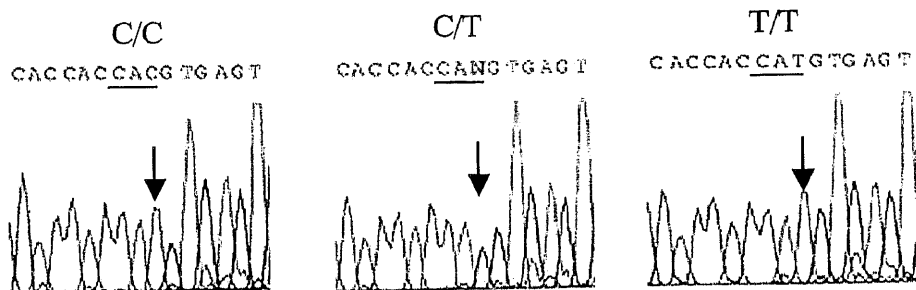


Fig. 2. Identification of the *LMNA* 1908CtoT polymorphism. Representative electropherogram of each type of 1908 polymorphisms. The arrow indicates T peak of the variant and/or C peak of the wild type.

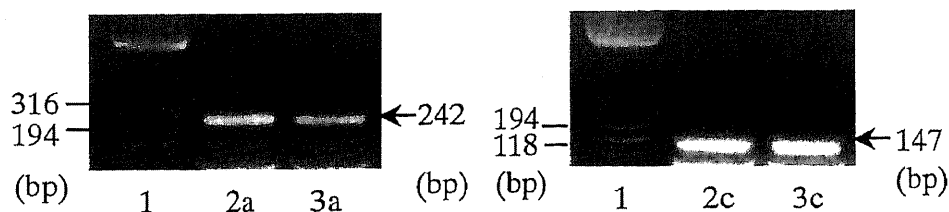


Fig. 3. RT-PCR analysis of normal (C/C) and mutated (T/T) cDNA-PCR fragments for both lamin A and lamin C. The expected product size are; normally spliced lamin A mRNA, 242 bp, and normally spliced lamin C mRNA, 147 bp, respectively. Lane 1, molecular marker; lane 2a, lamin A transcripts from C/C homozygote; lane 3a, lamin A transcripts from T/T homozygote; lane 2c, lamin C transcripts from C/C homozygote; lane 3c, lamin C transcripts from T/T homozygote.

insulin (μ U/ml) $\times$ glucose (mmol/l) / 22.5] で評価した²⁰⁾.

Ⅲ. 統計学的検討

各遺伝子変異群における臨床指標の測定値は平均値(標準偏差)で示し、群間の比較は二標本t検定を用いた。アレル頻度は、Hardy-Whitneyの平衡を用いて算出した。遺伝子多型に関する対応のない2群の検討にはロジスティック回帰分析を用いてオッズ比と95%信頼区間を求め、危険率の計算は χ^2 検定を用いた。統計学的有意水準は $P < 0.05$ とした。

成 績

Ⅰ. LMNA遺伝子解析結果

著明なインスリン抵抗性患者8名に対してLMNA遺伝子解析を行った。PCR-SSCP法によるスクリーニングにおいて、エクソン1から9, 11, 12には異常バンドは認められなかった。エクソン10に1種類の異常バンドが3名において検出され、引き続き直接塩基決定法による変異の同定を行ったところ、ラミンAとラミンCに共通する最後の1908番目の塩基(図1)をCからTへ変える一塩基変異多型SNP (1908CtoT) が同定された(図2)。なお、本塩基置換は566番目のアミノ酸であるヒスチジンの変異を伴わなかった。

Ⅱ. LMNA 1908CtoT多型のRT-PCR法によるmRNA解析結果

1908CtoTがラミンAとCのmRNAにおよぼす影響を検討するため、正常型ホモ(1908 C/C)と変異型ホモ(1908 T/T)の患者それぞれの末梢白血球より分離したmRNAを用いて、ラミン

AとラミンCにそれぞれ特異的なプライマーを設計しRT-PCR法を行ったが、変異型ホモにおいて明らかなスプライシング異常産物は認められなかった(図3)。

Ⅲ. LMNA 1908CtoT多型と糖尿病との関係

男性2型糖尿病患者164名および男性非糖尿病対照者171名に対してPCR-RFLP法を行い、遺伝子型を決定した(図4)。全335名中での1908 Tアレル頻度は0.2であり、遺伝子型別では正常型ホモ(1908 C/C)が62.1%、変異型ヘテロ(1908 C/T)が35.5%、変異型ホモ(1908 T/T)が2.4%であった。1908 Tアレルを有する症例の割合は、糖尿病群で43.9%と非糖尿病対照群の32.2%と比較して有意に高値であった($P = 0.027$) (表2)。1908 Tアレル頻度は糖尿病群と非糖尿病群とで有意差が認められなかった($P = 0.068$) (表2)。一方で1908CtoT多型と糖尿病は、1908 Tアレルの1908 C/Cに対するオッズ比、95%信頼区間がそれぞれ1.65, 1.06~2.58で、さらに年齢とBMIで調整後もそれぞれ1.21, 1.00~1.50であり、本SNPの有無と疾患の関連は軽度だが認められた。1908 C/Cの症例のうち44.2%が糖尿病患者であり、1908 C/Tでは57.1%、1908 T/Tでは50.0%が糖尿病患者であった。

Ⅳ. LMNA 1908CtoT多型と各臨床指標との関係

前述の335名における1908CtoT多型と各臨床指標との関係を検討した。非糖尿病群において1908 Tアレルを有する症例は、1908 C/Cの症例と比較して空腹時インスリン値およびHOMAが有意に高値であった(表3)。また糖尿病群および非糖尿病群のいずれにおいても、1908 Tアレルを有する症例は、1908 C/C

Table 2. Genotype and allelic distribution of the LMNA 1908C/T polymorphism in type 2 diabetic and non-diabetic subjects

Subjects	C/C (%)	C/T+T/T (%)	Allelic frequency of 1908T
Type 2 diabetic patients (n=164)	92 (56.1)	72 (43.9)	0.232
Non-diabetic subjects (n=171)	116 (67.8)	55 (32.2)	0.173

* $P = 0.027$ (< 0.05 by χ^2 test). ^{a)} Not significant ($P = 0.068$).

Table 3. Characteristics of non-diabetic and type 2 diabetic subjects according to the LMNA 1908C/T genotype

Variable	Non-diabetic subjects (n=171)			Diabetic subjects (n=164)		
	C/C	C/T+T/T	P value	C/C	C/T+T/T	P value
No. of case	116	55		92	72	
Age (yrs)	48.9 $\pm$ 9.0	47.1 $\pm$ 10.4	0.27	54.7 $\pm$ 14.2	53.0 $\pm$ 11.9	0.42
Body mass index (kg/m ²)	23.4 $\pm$ 2.8	23.6 $\pm$ 2.6	0.62	23.2 $\pm$ 3.2	24.0 $\pm$ 4.1	0.28
Systolic blood pressure (mmHg)	123.4 $\pm$ 14.2	125.4 $\pm$ 10.4	0.57	123.2 $\pm$ 15.6	128.3 $\pm$ 16.2	0.07
Diastolic blood pressure (mmHg)	70.7 $\pm$ 8.9	67.9 $\pm$ 7.3	0.25	71.1 $\pm$ 10.3	74.6 $\pm$ 11.3	0.07
Total cholesterol (mg/dl)	185.0 $\pm$ 27.3	200.7 $\pm$ 30.3	0.002	182.3 $\pm$ 31.1	201.9 $\pm$ 39.6	0.001
HDL-cholesterol (mg/dl)	50.3 $\pm$ 13.1	45.0 $\pm$ 11.2	0.02	48.5 $\pm$ 12.7	43.8 $\pm$ 12.7	0.02
LDL-cholesterol (mg/dl)	110.8 $\pm$ 29.2	152.4 $\pm$ 28.8	0.004	109.6 $\pm$ 32.7	124.6 $\pm$ 38.1	0.01
Triglyceride (mg/dl)	125.7 $\pm$ 77.9	153.1 $\pm$ 101.8	0.04	127.4 $\pm$ 72.6	166.4 $\pm$ 134.5	0.04
Fasting glucose (mg/dl)	94.1 $\pm$ 8.8	97.0 $\pm$ 9.4	0.07	164.0 $\pm$ 53.8	151.9 $\pm$ 43.9	0.18
Fasting insulin (μ U/ml)	7.3 $\pm$ 1.8	8.5 $\pm$ 2.1	0.02	8.0 $\pm$ 2.6	10.5 $\pm$ 5.6	0.06
HOMA ^{a)}	1.70 $\pm$ 0.48	2.05 $\pm$ 0.55	0.01	3.01 $\pm$ 1.78	4.11 $\pm$ 3.44	0.21

Data are $\bar{X} \pm SD$.

^{a)} indicates homeostasis model assessment of insulin.

Table 4. Genotype and allelic distribution of the *LMNA* 1908C/T polymorphism in obese and non-obese subjects

Subjects	C/C (%)	C/T+T/T (%)	Allelic frequency of 1908T
BMI < 25 kg/m ² (n = 249)	153 (61.4)	96 (38.6)	0.203
BMI ≥ 25 kg/m ² (n = 86)	53 (61.6)	33 (38.4)	0.192

a) Not significant.

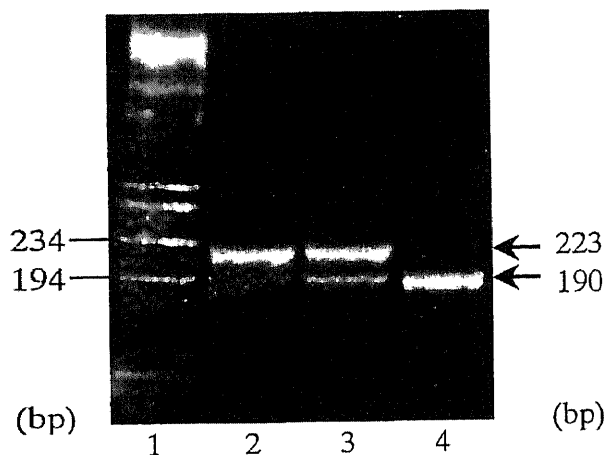


Fig. 4. Representative PCR-RFLP assays to confirm the *LMNA* 1908C/T variants. The expected product sizes are: C/C homozygote, 223 bp; T/T homozygote, 190 and 33 bp; C/T heterozygote, 223, 190, and 33 bp, respectively. Lane 1, molecular marker; lane 2, C/C homozygote; lane 3, C/T heterozygote; lane 4, T/T homozygote. The 33-bp fragments are not visualized.

と比較してTG, TC, LDL-Cが有意に高値, HDL-Cが低値であった (表3)。これらの違いは年齢およびBMIで調整後も認められた。特に1908 T/Tの症例は, 1908 C/Tと比較していずれも高い空腹時インスリン値 ($11.0 \pm 7.2 \mu\text{U/ml}$), TG ($166.3 \pm 149.6 \text{ mg/dl}$) およびTC ($213.8 \pm 51.2 \text{ mg/dl}$) と, 低いHDL-C ($43.7 \pm 23.8 \text{ mg/dl}$) を示す傾向にあったが, 有意差は認められなかった。またBMI, 空腹時血糖値, 収縮期および拡張期血圧は本遺伝子多型間で有意差はなかった。さらに肥満の有無で2群に分けて, 1908CtoT多型の頻度を調べたが, 1908 Tアレルの症例の割合は肥満群と非肥満群で比較しても有意差が認められなかった (表4)。

考 察

虚血性心疾患発症の原因として, 耐糖能異常や糖尿病に加えて, 高血圧や脂質代謝異常あるいは肥満といった複数の危険因子の重複が重要視されている^{1)~3)}。この場合, 個々の危険因子の程度は軽度でもその重複により虚血性心疾患発症の危険度が相加・相乗的に増加するという点が特徴的である。このような複数の危険因子は互いに独立したものではなく密接に関連しあい, またインスリン抵抗性や高インスリン血症が根本的な原因と考えられることより, こうした病態は近年「インスリン抵抗性症候群」と呼ばれている²⁾。本症候群は環境因子と複数の遺伝因子による影響を受けるいわゆる複合形質であり, 遺伝子解

析があまり進んでいないのが現状である。

インスリン作用臓器である末梢組織 (筋肉および脂肪) そして肝臓でインスリン作用不全すなわちインスリン抵抗性が生じると, 末梢組織では糖取り込みの低下, 肝臓では糖利用の低下・糖新生の増強により血中への糖放出が増加する。これまで筋肉がインスリン抵抗性の最も大きな責任臓器だと考えられてきたが, 実際の臨床において, 正常の骨格筋筋肉量の減少する種々の筋萎縮症ではインスリン抵抗性は著明でなく, また筋特異的インスリン受容体欠損マウスでは糖代謝は比較的正常に保たれる²⁰⁾。それに対し, 正常脂肪組織量の減少する脂肪萎縮症では重篤なインスリン抵抗性・糖尿病を呈する²⁰⁾。これは全身の糖代謝の恒常性を保つ上で脂肪組織が極めて重要であることを示唆する。2000年に入り, 著明なインスリン抵抗性の亢進が特徴とされる比較的稀な脂肪萎縮症が, 核膜の構成タンパク質であるラミンA/Cをコードする *LMNA* という遺伝子の異常で引き起こされることが明らかになった^{9)~11)}。遺伝性の脂肪萎縮症は, 先天的に全身性の脂肪萎縮を呈する Berardinelli-Seip 型²⁰⁾と, 身体の部分的な脂肪萎縮を特徴とする Dunnigan 型に大別され, Dunnigan 型はまた FPLD とも呼ばれている⁴⁾。FPLDは, 思春期以降に四肢や臀部などの著明な脂肪萎縮と代償性の顔面から頸部への脂肪沈着, インスリン抵抗性の亢進を呈する常染色体優性遺伝疾患であり, しばしばクッシング症候群と誤診されたり, また男性では外観からは判別できないこともある^{4)~7)}。1998年に, 患者家系を対象としたマイクロサテライトマーカーを用いた全ゲノムスクリーニング連鎖解析により, FPLDの原因遺伝子座が第1染色体長腕 (1q21) に存在することが示されていたが²⁷⁾, 当該領域に存在するラミンA/C遺伝子 (*LMNA*) の異常が骨格筋や心筋の萎縮症を引き起こすことが次々と明らかになり, *LMNA* 遺伝子異常が本疾患の有力な原因候補遺伝子として注目された。結局, Shackletonら⁸⁾やCaoら⁹⁾により, 現在までに合計12家系のFPLD患者 *LMNA* 遺伝子に計7種類のミスセンス変異 (G465D, R482Q, R482W, R482L, K486L, K482N [G-C], K486N [G-T], R582H) が同定され¹⁰⁾¹¹⁾, *LMNA* 遺伝子異常が脂肪萎縮とそれに伴うインスリン抵抗性亢進にも関与していることが明らかとなった。

著者は, *LMNA* 遺伝子における SNP 1908CtoT を同定し, これが日本人男性のインスリン抵抗性, 高脂血症, 糖尿病に関連することを示した。このSNPは部位的にスプライシング異常などによってラミンA/Cの構造を変化させる可能性が考えられたが, 変異型ホモにおいてもmRNAレベルでの構造異常は認められなかったため, 末梢組織でのラミンAとラミンCの発現する比率を変える等の影響を及ぼすと想定される。しかしながら, 1908CtoT多型がその他の糖ならびに脂質代謝に影響を与える遺伝子の連鎖不均衡である可能性を念頭におくべきであろう。1908CtoTの変異アレル頻度は今回の検討では0.2であり, この

結果はピマインディアン (0.43)²⁸, カナダのOji-Cree民族 (0.77)²⁹, カナダのInuit民族 (0.48)³⁰より低頻度であった。*LMNA* 遺伝子と「インスリン抵抗性」の因果関係を直接証明した報告は今のところない。近年, *LMNA* 遺伝子が脂肪代謝において様々な役割を果たすことを示唆する報告が相次いでなされた。第一に, *LMNA* ノックアウトマウスにおいて白色脂肪組織はほぼ完全に欠落するという報告がされ, 白色脂肪細胞にラミンA/Cの存在が必須であることが証明された³¹。第二に, lipin という新しい核の構成タンパクが発見された。これは脂肪細胞が分化する際に発現が誘導されるタンパクであり, この遺伝子を変異させることでマウスに脂肪萎縮症を発症させた³²。この報告は, 同じ核の構成タンパクであるラミンA/Cも, 脂肪細胞の分化に関わる可能性を示唆している。第三に, 脂肪前駆細胞から成熟脂肪細胞へと分化する過程においてラミンA/C mRNAの含有量は漸増し, また皮下の成熟脂肪細胞においてはラミンCに対するラミンAの割合が内臓の成熟脂肪細胞に比してより高くなったと報告された³³。このことはラミンA/Cが脂肪細胞の分化に関わるのみならず, 皮下脂肪と内臓脂肪とでラミンAとラミンCの発現する比率が異なることを示している。第四に, 同じ1908CtoT多型が, カナダのOji-Cree民族においては肥満や血中レプチン濃度と²⁹, カナダのInuit民族においては肥満と関連する種々の身体所見と³⁰, そしてピマインディアンにおいては腹部の皮下脂肪細胞の大きさ²⁸, それぞれ相関することが報告された。以上の報告より, *LMNA* 遺伝子変異は単にFPLDのような特殊な脂肪萎縮症に伴ったインスリン抵抗性や糖・脂質代謝異常をもたらすだけでなく, 脂肪細胞の性質の変化を介して一般的なインスリン抵抗性症候群に關与する可能性が考えられた。

今回の検討では, 1908 Tの遺伝子型 (1908 C/Tと1908 T/T) は糖尿病, インスリン抵抗性, 高TG血症, 高LDL-C血症, 低HDL-C血症といったインスリン抵抗性症候群に特徴的な所見と有意な相関を示した。これらの相関が種々の環境因子によって強調されたり弱められたりする可能性も考えられ, 非常に興味深い。カナダのOji-Cree民族とInuit民族では, 1908 T変異型群は正常型ホモ群に比べより高いBMI, 血中レプチン濃度, ウエスト/ヒップ比, 皮下脂肪厚を示した, と報告されたが^{29,30}, 一方でピマインディアンでは, 1908CtoT多型とBMI, 血中レプチン濃度, 糖尿病, 血清脂質とは関連がなかったと報告された³⁴。本研究の一つの限界として, 体脂肪率や脂肪の分布を表すような身体所見の検討をしていない点が挙げられる。本研究ではBMIと1908CtoT多型とで相関が認められなかったが, 近年インスリン抵抗性症候群は単なる肥満ではなく, 内臓脂肪型肥満に起因すると考えられており³⁵, 本遺伝子多型と内臓脂肪量との相関がある可能性も推測される。したがって, 今回の検討よりラミンA/Cは体重とは独立して, 脂肪組織の性質変化に影響を与える因子という可能性が示唆された。最近, *LMNA* 遺伝子R482W変異の1家系の脂質異常のパターンが, 家族性複合型高脂血症 (familial combined hyperlipidemia, FCHL) の表現型を呈していることが報告された³⁶。FCHLは同一家系内に高TC血症 (IIa型), 高TG血症 (IVまたはV型) および両方の異常 (IIb型) がおよそ1/3ずつ混在することを特徴とする, 常染色体優性遺伝形式の遺伝性高脂血症である³⁷⁻³⁹。FCHLの原因遺伝子座は*LMNA*と同じ第1染色体領域 (1q21) であることがフィンランド人において既に報告されているが, 原因遺伝子は

特定されていない^{40,41}。したがって, Schmidtら³⁶は, *LMNA* 遺伝子がFCHLの発症にも関わっていると提唱している。またFCHLもしくは複合型高脂血症はインスリン抵抗性をしばしば伴い, 危険因子の重複によって高率に冠動脈心疾患を発症することで知られる⁴²⁻⁴⁸。今回の検討では, FCHLの病態をさらに詳しく説明する超低比重リポ蛋白 (very low density lipoprotein), 低濃度LDL粒子 (small dense LDL particles) やアポ蛋白B等は測定されていないが, 1908 Tを有する群では正常型ホモに比べて高TC血症かつ高TG血症であり, 複合型高脂血症のパターンを示していた。

今回の検討で, *LMNA* 1908CtoT多型は日本人男性の糖尿病群で非糖尿病群に比し, より高頻度に認められた。またインスリン抵抗性や複合型高脂血症との関連も認められたため, インスリン抵抗性を介して糖尿病の発症に関わる可能性が示唆された。今後, 腹部コンピューター断層撮影による内臓脂肪/体脂肪比の測定やウエスト/ヒップ比の測定など対象例の体脂肪分布を評価したり, 脂肪分解や熱産生の調節に關与する β_3 -アドレナリン受容体 (β_3 -adrenergic receptor, β_3 -AR) 遺伝子変異⁴⁹や, 脂肪分化の主要調節因子であるペルオキシソーム増殖型応答性レセプター γ (peroxisome proliferator activated receptor- γ , PPAR γ) 遺伝子多型など肥満との関与が既に報告されている遺伝子多型⁵⁰と本*LMNA* 遺伝子多型の相互作用に關しても検討すべきと思われる。同時に*LMNA* 遺伝子の発現や調節機構ならびにラミンA/Cの構成タンパク以外の種々の役割, 中でも脂肪細胞における脂質代謝に關する主要な役割を明らかにすることも, 今後の検討課題である。

結 論

著明なインスリン抵抗性患者において*LMNA* 遺伝子変異をPCR-SSCP法, 直接塩基配列決定法およびPCR-RFLP法を用いて検索し, さらに日本人男性を糖尿病群と非糖尿病群に分けて, 見出した1塩基遺伝子多型性と各臨床指標との関係を検討した結果, 以下の結論を得た。

1. 著明なインスリン抵抗性患者において, *LMNA* 遺伝子1908番目の塩基をCからTへと変化する1塩基遺伝子多型を検出した。
2. 1908T/Tにおいて, ラミンAおよびラミンCのmRNAレベルでの構造異常は認められなかった。
3. 日本人男性において1908CtoTの変異アレル頻度は0.2であった。
4. 1908CtoTの変異型群の頻度は, 非糖尿病群に比し糖尿病群で有意に高値であった。
5. 非糖尿病群において, 1908CtoTの変異型群で, 血中インスリン値ならびにHOMAが有意に高値であった。
6. 1908CtoTの変異型群で, TC, TG, LDL-Cが有意に高値で, HDL-Cが有意に低値であった。

以上の結果より, *LMNA* 1908CtoT 遺伝子多型は日本人男性においてインスリン抵抗性を介して糖尿病や脂質代謝異常に關連している可能性が示唆された。

謝 辞

稿を終えるに臨み, 御指導, 御校閲を賜りました恩師 馬淵 宏教授に深甚なる謝意を表します。また本研究を直接御指導, 御教示頂きました金沢大学大学院医学系研究科血管分子遺伝学 糖尿病研究室の八木邦公博士に心から謝意を表します。また, 御助言, 御協力を戴きました金

沢大学医学部保健学科稲津明広助教授，金沢大学医学部附属病院総合診療部小泉順二教授に厚く御礼申し上げます。また，多大なる御協力を頂きました金沢大学大学院医学系研究科血管分子遺伝学講座の各位，ならびに高分子DNAの採取等に際し御協力を頂いた山本幸夫氏，水野美保子氏に感謝いたします。

本研究の一部は第44回日本糖尿病学会年次学術集会（2001年，京都）およびthe 61st Scientific Sessions of the American Diabetes Association（2001年，Philadelphia, USA）において発表した。

文 献

- 1) Reaven GM. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 37: 1595-1607, 1988
- 2) DeFronzo RA. Insulin resistance - a multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia and atherosclerosis. *Neth J Med* 50: 191-197, 1997
- 3) Landsberg L. Obesity and the insulin resistance syndrome. *Hypertens Res* 19: 551-555, 1996
- 4) Kobblerling J, and Dunnigan MG. Familial partial lipodystrophy. *J Med Genet* 23: 120-127, 1986
- 5) Burn J, Baraitser M. Partial lipodystrophy with insulin resistant diabetes and hyperlipidemia (Dunnigan syndrome). *J Med Genet* 23: 128-130, 1986
- 6) Garg A, Peshock RM, Fleckenstein JL. Adipose tissue distribution pattern in patients with familial partial lipodystrophy (Dunnigan variety). *J Clin Endocrinol Metab* 84: 170-174, 1999
- 7) Hegele RA, Anderson CM, Wang J, Jones DC, Cao H. Association between nuclear lamin A/C R482Q mutation and partial lipodystrophy with hyperinsulinemia, dyslipidemia, hypertension, and diabetes. *Genome Res* 10: 652-658, 2000
- 8) Shackleton S, Lloyd DJ, Jackson SN, Evans R, Niermeijer MF, Singh BM, Schmidt H, Brabant G, Kumar S, Durrington PN, Gregory S, O'Rahilly S, Trembath RC. *LMNA*, encoding lamin A/C, is mutated in partial lipodystrophy. *Nat Genet* 24: 153-156, 2000
- 9) Cao H, Hegele RA: Nuclear lamin A/C R482Q mutation in Canadian kindreds with Dunnigan-type familial partial lipodystrophy. *Hum Mol Genet* 9: 109-112, 2000
- 10) Speckman RA, Garg A, Du F, Bennett L, Veile R, Arioglu E, Taylor SI, Lovett M, Bowcock AM. Mutational and haplotype analyses of families with familial partial lipodystrophy (Dunnigan variety) reveal recurrent missense mutations in the globular C-terminal domain of lamin A/C. *Am J Hum Genet* 66: 1192-1198, 2000
- 11) Genschel J, Schmidt HH. Mutations in the *LMNA* gene encoding lamin A/C. *Hum Mutat* 16: 451-459, 2000
- 12) Lin F, Worman HJ: Structural organization of the human gene encoding nuclear lamin A and nuclear lamin C. *J Biol Chem* 368: 16321-16326, 1993
- 13) Bonne G, DiBarletta MR, Varnous S, Bécane HM, Hammouda EH, Merlini L, Muntoni F, Greenberg CR, Gary F, Uritzbera JA, Duboc D, Fardeau M, Toniolo D, Schwartz K. Mutations in the gene encoding lamin A/C cause autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Nat Genet* 21: 285-288, 1999
- 14) Fatkin D, MacRae C, Sasaki T, Wolff MR, Porcu M,

- Frenneaux M, Atherton J, Vidaillet HJ, Spuduch S, Girolami UD, Seidman JG, Seidman CE. Missense mutations in the rod domain of the lamin A/C causes of dilated cardiomyopathy and conduction system disease. *N Engl J Med* 341: 1715-1724, 1999
- 15) S, Wild I, Rabie AG, Brebner K, Ricketts M, Wallis G, Bester A, Boyd C, Mathew C. Blot hybridization analysis of genomic DNA. *J Med Benet* 21: 164-172, 1984
 - 16) Beaucage SL, Caruthers MH. Deoxynucleoside phosphoramidites- a new class of key intermediates for deoxypolynucleotide synthesis. *Tetrahedron Lett* 22: 1859-1862, 1982
 - 17) Saiki RK, Bugawan TL, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Analysis of enzymatically amplified β -globin and HLA-Dqa DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature* 324: 163-166, 1986
 - 18) World Health Organization Study Group. Diabetes mellitus. *World Health Organ Tech Rep Ser* 727: 1-113, 1985
 - 19) Allain CC, Poon LS, Chan SG, Richmond CW, Fu PC. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin Chem* 20: 470-475, 1974
 - 20) Bucolo G, David H. Quantitative determination of serum triglycerides by the use of enzymes. *Clin Chem* 19: 476-482, 1973
 - 21) Bursterin M, Scholnich HR. Lipoprotein-polyanionmetal interactions. *Adv Lipid Res* 11: 67-108, 1973
 - 22) Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 18: 499-502, 1972
 - 23) Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: Insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 28: 412-419, 1985
 - 24) Bruning JC, Michael MD, Winnay JN, Hayashi T, Horsch D, Accili D, Goodyear LJ, Kahn CR. A muscle-specific insulin receptor knockout exhibits features of the metabolic syndrome of NIDDM without altering glucose tolerance. *Mol Cell* 2: 559-569, 1998
 - 25) Seip M, Trygstad O. Generalized lipodystrophy, congenital and aquired (lipodystrophy). *Acta Paediatr Suppl* 413: 2-28, 1996
 - 26) Gedde-Dahl T Jr, Trygstad O, Van Maldergem L, Magre J, van der Hagen CB, Olaisen B, Stenersen M, Mevag B. Genetics of the Berardinelli-Seip syndrome (congenital generalized lipodystrophy) in Norway: epidemiology and gene mapping. Berardinelli-Seip Study Group. *Acta Paediatr Suppl* 413: 52-58, 1996
 - 27) Peters JM, Barnes R, Bennett L, Gitomer WM, Bowcock AM, Garg A. Localization of the gene for familial partial lipodystrophy (Dunnigan variety) to chromosome 1q21-22. *Nat Genet* 18: 292-295, 1998
 - 28) Weyer C, Wolford JK, Hanson RL, Foley JE, Tataranni PA, Bogardus C, Pratley RE. Subcutaneous abdominal adipocyte size, a predictor of type 2 diabetes, is linked to chromosome 1q21-23 and is associated with a common polymorphism in *LMNA* Pima

- Indians. *Mol Genet Metab* 72: 231-238, 2001
- 29) Hegele RA, Cao H, Harris SB, Zinman B, Hanley AJ, Anderson CM. Genetic variation in *LMNA* modulates plasma leptin and indices of obesity in aboriginal Canadians. *Physiol Genetics* 3: 39-44, 2000
 - 30) Hegele RA, Huff MW, Young TK. Common genetic variation in *LMNA* modulates indexes of obesity in Inuit. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 2747-2751, 2001
 - 31) Sullivan T, Escalante-Alcalde D, Bhatt H, Anver M, Bhat N, Nagashima K, Stewart CL, Burke B. Loss of A-type lamin expression compromises nuclear envelop integrity leading to muscular dystrophy. *J Cell Biol* 147: 913-919, 1999
 - 32) Peterfy M, Phan J, Xu P, Reue K. Lipodystrophy in the *fln* mouse results from mutation of a new gene encoding a nuclear protein, lipin. *Nat Genet* 27: 121-124, 2001
 - 33) Lelliott CJ, Logie L, Sewter C.P. Analysis of lamin A mRNA and protein in human omental, subcutaneous, and neck adipose depots and during adipocyte differentiation. *Lipoatrophic Diabetes and other syndromes of lipodystrophy* 1: 49-50, 2001.
 - 34) Wolford JK, Hanson RL, Bogardus C, Prochazka M. Analysis of the lamin A/C gene as a candidate for type 2 diabetes susceptibility in Pima Indians. *Diabetologia* 44: 779-782, 2001
 - 35) Matsuzawa Y, Shimomura I, Nakamura T, Keno Y, Kotani K, Tokunaga K. Pathophysiology and pathogenesis of visceral fat obesity. *Obes Res* 3 (Suppl 2): 187-194, 1995
 - 36) Schmidt HH, Genschel J, Baier P, Schmidt M, Ockenga J, Tietge UJ, Propsting M, Buttner C, Manns MP, Lochs H, Brabant G. Dyslipidemia in familial partial lipodystrophy caused by an R482W mutation in the *LMNA* gene. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 2289-2295, 2001
 - 37) Goldstein JL, Schrott HG, Hazzard WR, Bierman EL, Motulsky AG. Hyperlipidemia in coronary heart disease. II. Genetic analysis of lipid levels in 176 families and delineation of a new inherited disorder, combined hyperlipidemia. *J Clin Invest* 52: 1544-1568, 1973
 - 38) Nikkila EA, Aro A. Family study of serum lipids and lipoproteins in coronary heart-disease. *Lancet* 5: 954-959, 1973
 - 39) Brunzell JD, Albers JJ, Chait A, Grundy SM, Groszek E, McDonald GB. Plasma lipoproteins in familial combined hyperlipidemia and monogenic familial hypertriglyceridemia. *J Lipid Res* 24: 147-155, 1983
 - 40) Pajukanta P, Nuotio I, Terwilliger JD, Porkka KV, Ylitalo K, Pihlajamaki J, Suomalainen AJ, Syvanen AC, Lehtimäki T, Viikari JS, Laakso M, Taskinen MR, Ehnholm C, Peltonen L. Linkage of familial combined hyperlipidemia to chromosome 1q21-q23. *Nat Genet* 18: 369-373, 1998
 - 41) Pei W, Baron H, Muller-Myhsok B, Knoblauch H, Al-Yahyaee SA, Hui R, Wu X, Liu L, Busjahn A, Luft FC, Schuster H. Support for the linkage of familial combined hyperlipidemia to chromosome 1q21-q23 in Chinese and German families. *Clin Genet* 57: 29-34, 2000
 - 42) Hunt SC, Wu LL, Hopkins PN, Stults BM, Kuida H, Ramirez ME, Lalouel JM, Williams RR. Apolipoprotein, LDL subfraction, and insulin associations with familial dyslipidemic hypertension. *Arteriosclerosis* 9: 335-344, 1989
 - 43) Aitman TJ, Godsland IF, Farren B, Crook D, Wong HJ, Scott J. Defects of insulin action on fatty acid and carbohydrate metabolism in familial combined hyperlipidemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17: 748-756, 1997
 - 44) Bredie SJ, Tack CJ, Smits P, Stalenhoef AF. Nonobese patients with familial combined hyperlipidemia are insulin resistant compared with their nonaffected relatives. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17: 1465-1471, 1997
 - 45) Ascaso JF, Lorente R, Merchante A, Real JT, Priego A, Carmena R. Insulin resistance in patients with familial combined hyperlipidemia and coronary artery disease. *Am J Cardiol* 80: 1484-1487, 1997
 - 46) Ascaso JF, Merchante A, Lorente RI, Real JT, Martinez-Valls J, Carmena R. A study of insulin resistance using minimal model in nondiabetic familial combined hyperlipidemic patients. *Metabolism* 47: 508-513, 1998
 - 47) Karjalainen L, Pihlajamäki J, Karhapää P, Laakso M. Impaired insulin-stimulated glucose oxidation and free fatty acid suppression in patients with familial combined hyperlipidemia: a precursor defect for dyslipidemia? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18: 1548-1553, 1998
 - 48) Pihlajamäki J, Karjalainen L, Karhapää P, Vauhkonen I, Laakso M. Impaired free fatty acid suppression during hyperinsulinemia is a characteristic finding in familial combined hyperlipidemia, but insulin resistance is observed only in hypertriglyceridemic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20: 164-170, 2000
 - 49) Widen E, Lehto M, Kanninen T, Walston J, Shuldiner AR, Groop LC. Association of a polymorphism in the (3-adrenergic receptor gene with features of the insulin resistance syndrome in Finns. *N Engl J Med* 333: 348-351, 1995
 - 50) Ristow M, Müller-Wieland D, Pfeiffer A, Krone W, Kahn CR. Obesity associated with a mutation in a genetic regulator of adipocyte differentiation. *N Engl J Med* 339: 953-959, 1998

Analysis of *LMNA* as a Candidate for Insulin Resistance and Type 2 Diabetes Susceptibility Yuko Murase
Department of Molecular Genetics of Cardiovascular Disorders, Graduate School of Medical Science, Kanazawa University,
Kanazawa 920-8640 — J. J. J. Med Soc., **110**, 360 — 369 (2001)

Key words *LMNA*, insulin resistance, single nucleotide polymorphism, diabetes mellitus, dyslipidemia

Abstract

A rare genetic form of insulin resistance, autosomal dominant familial partial lipodystrophy (FPLD), exists and is characterized by loss of subcutaneous fat from the extremities, trunk, and gluteal region after puberty, and often by insulin resistance, dyslipidemia, and type 2 diabetes. Some patients with FPLD were discovered to have alterations in the *LMNA* gene on chromosome 1q21, which encodes nuclear lamins A and C. In addition, familial combined hyperlipidemia (FCHL) has also been shown to be linked with 1q21. The aim of this study was to investigate whether genetic variations in *LMNA* can influence the risk of type 2 diabetes in a Japanese cohort. First, we performed mutational screening of *LMNA* by PCR-SSCP and sequence analysis in 8 insulin-resistant males with acanthosis nigricans [mean age ($\bar{X} \pm SD$), 20.8 ± 2.8 yrs; fasting insulin levels, $35.6 \pm 15.9 \mu\text{U/ml}$]. One single nucleotide polymorphism, 1908C/T, was found in exon 10. Since this affected residue is located at nucleotide 1908, the alternative splicing donor site in exon 10, we performed RT-PCR on leukocyte transcripts in order to check the consequences of this substitution at the RNA level of lamin A and lamin C. The results showed the presence of the same spliced *LMNA* mRNA in such affected (1908T homozygotes) subjects as in the normal 1908C homozygotes. We subsequently screened samples of 171 non-diabetic [mean age ($\bar{X} \pm SD$), 48.4 ± 9.4 yrs] and 164 type 2 diabetic male subjects [53.9 ± 13.2 yrs] for the presence of the 1908C/T polymorphism by PCR-RFLP. The frequency of subjects with the 1908T allele was significantly higher in the diabetic group than in the non-diabetic group. Carriers of the 1908T allele showed significantly higher fasting insulin, homeostasis model assessment of insulin (HOMA), triglyceride, total cholesterol, and lower HDL-cholesterol levels than those of the 1908C/C subjects. These results suggest the *LMNA* 1908C/T SNP may be a factor predisposing to the development of type 2 diabetes and dyslipidemia in some male Japanese through insulin resistance.