

日本人2型糖尿病患者における肝細胞核因子-1 α 遺伝子変異に関する分子遺伝学的研究

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/2297/4537

日本人2型糖尿病患者における肝細胞核因子-1 α 遺伝子変異 に関する分子遺伝学的研究

金沢大学大学院医学系研究科循環医科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)

浅 野 昭 道

若年発症成人型糖尿病 (maturity-onset diabetes of the young, MODY) は常染色体優性遺伝形式を呈し、通常25歳以下で発症する糖尿病の一亜型である。また糖尿病成因分類において、MODYは単一遺伝子異常による糖尿病と位置付けられる。これまでに5種類の原因遺伝子が同定され、MODY第1型 (MODY1) からMODY5に分類されている。白色人種においては、臨床的にMODYと診断された症例の60%がMODY3であると遺伝子診断されており、その頻度が高いことが報告されている。またMODYは単一遺伝子異常による疾患であるが、その臨床像は多様であることが知られている。本研究では、日本人2型糖尿病の遺伝的原因を検討するため、35歳以下発症で濃厚な家族歴を有する日本人2型糖尿病患者を対象に、MODY3の原因遺伝子である肝細胞核因子-1 α (hepatocyte nuclear factor-1 alpha, HNF-1 α) 遺伝子の変異の頻度を調査し、新しい変異の有無を検討した。さらにその臨床的多様性を解明するため、新規発見の変異について、培養細胞を用いた遺伝子発現系にて変異蛋白の転写活性を評価し、変異保有者の臨床像との関連性を検討した。対象は、35歳以下発症で三世代または二世代かつ同胞に糖尿病家族歴を有する日本人2型糖尿病患者30名を第1群とし、家族歴が第1群の要件を満たさない35歳以下発症群33名を第2群、36歳以降の発症で三世代または二世代かつ同胞に糖尿病家族歴を有する群15名を第3群とした計78名である。対象者の末梢白血球より高分子DNAを抽出し、HNF-1 α 遺伝子のプロモーター領域と全10エクソンについてPCR法によりDNA断片を増幅した。その後、直接塩基配列決定法を用いて遺伝子変異を同定し、PCR制限酵素切断多型法により変異を確認した。第1群30名中2名 (6.7%) において、2種のHNF-1 α 遺伝子変異を検出した。その他の群では遺伝子変異は検出されなかった。検出された変異の一つは、エクソン4の290番目のProを中心に存在するポリシトシン (polycytosine, polyC) 配列内にC一塩基が挿入した変異 (Pro 291 frameshift insertion C, Pro291fsinsC) であり、これは既報の変異であった。もう一種は、エクソン6の433番目のThrをコードするコドンACCがIleをコードするコドンATCへと変化する変異 (Thr433Ile) であり、これまでに報告のない新しい変異であった。野生型HNF-1 α cDNAを挿入した発現ベクターを鋳型にPCR法を用いてThr433Ile変異型HNF-1 α 発現ベクターを作製し、HeLa細胞に発現させた。Thr433Ile変異体の転写活性は野生型に比べて有意に低値であり、野生型の機能を容量依存的に阻害するドミナントネガティブ変異体 (dominant-negative mutant) であった。Pro291fsinsCもまたドミナントネガティブ変異体であり、この変異を有するMODY症例は発症早期よりインスリン分泌の低下をきたすと報告されているが、本研究における同変異症例は既報例と異なり、インスリン分泌は発症後数年間保持された。またThr433Ile変異症例では、家系内に同一の遺伝子変異を母親、同胞に認めたと、それらの疾患重症度は様々であった。本研究より、HNF-1 α 遺伝子の同一変異を有する症例および家系内において、その疾患重症度の不均一性が示された。

Key words maturity-onset diabetes of the young, hepatocyte nuclear factor 1-alpha, gene mutation, gene expression, dominant-negative mutant

糖尿病は高血糖に特徴づけられる代謝疾患であり、インスリン分泌やインスリン作用の障害の結果招来される。その発症に遺伝因子と環境因子が関与する疾患であるが、遺伝因子には単独で糖尿病を発症させる単一発症遺伝子と複数の遺伝子が関与する多因子遺伝がある。大部分の糖尿病が多因子遺伝に由来し、遺伝因子の解明はこれまで困難であったが、近年の分子遺伝学

の急速な進歩により糖尿病遺伝子の解明に直接的アプローチが可能となった。特にメンデル遺伝形式の糖尿病遺伝子の同定において、罹患者系を用いた連鎖解析による位置クローニング法が頻用され、単一遺伝子異常によって生じる糖尿病の存在が明らかにされた。

比較的若年 (通常25歳以下) で発症し常染色体優性遺伝形式

平成13年12月3日受付, 平成14年2月13日受理

Abbreviations : GAD, glutamic acid decarboxylase; GIR, glucose infusion rate; HbA1c, haemoglobin A1c; HNF, hepatocyte nuclear factor; ICA, islet cell antibody; MODY, maturity-onset diabetes of the young; OGTT, oral glucose

をとる糖尿病家系が1960年代より報告され、1975年TattersallとFajansにより若年発症成人型糖尿病 (maturity-onset diabetes of the young, MODY) と命名された²⁾。MODY患者の臨床的特徴はインスリン分泌不全型の糖尿病であったことより、膵 β 細胞の機能に関連する遺伝子異常が想定された。1995年以降MODY原因遺伝子が次々に単離された。すなわち、MODY第2型 (MODY2), グルコキナーゼ (glucokinase, GCK) 遺伝子³⁾; MODY3, 肝細胞核因子 (hepatocyte nuclear factor)-1 α 遺伝子⁴⁾; MODY1, HNF-4 α 遺伝子⁵⁾; MODY4, インスリンプロモーター因子1 (insulin promoter factor-1, IPF-1) 遺伝子⁶⁾; MODY5, HNF-1 β 遺伝子⁷⁾の5種類である。HNF-1 α 遺伝子は1996年にYamagataら⁴⁾によりMODY3の原因遺伝子として同定された。この遺伝子は、染色体12q24.2領域に存在し10個のエクソンと9個のイントロンで構成される。HNF-1 α は、631個のアミノ酸からなる分子量67kdの肝細胞組織特異的転写因子として同定されていた⁸⁾が、MODYとの関連が示された後の研究により、膵 β 細胞でのインスリン遺伝子や糖輸送、糖代謝に関与する遺伝子の発現⁹⁾およびミトコンドリア代謝¹⁰⁾の調節においても機能することが判明した。

1996年以降、各人種においてHNF-1 α 遺伝子に関する検討がなされた結果^{11)~21)}、これまでに77種の遺伝子変異が報告された²²⁾。これらはすべてヘテロ接合体であり、本遺伝子異常についてホモ接合体の報告はない。MODY3患者の臨床像は発症年齢やインスリン分泌障害の低下において不均一であるが、遺伝子変異の種類と臨床像を比較した検討では両者の間に直接的な関連性は見いだされなかった²³⁾。また77種の変異中19種は培養細胞系での変異蛋白の機能解析が行われたが、変異の種類と変異蛋白の残存転写能の間にも多様性がみられた。本研究では、35歳以下発症で、3世代または2世代かつ同胞に糖尿病家族歴を有する日本人2型糖尿病患者において、HNF-1 α 遺伝子変異の検索を行った。MODY3患者の臨床的多様性を解明することを目的に、検出された変異蛋白の転写活性の測定を行い、変異を伴う症例の臨床像について検討した。

対象および方法

I. 対象

対象は、1997年から2000年の間に、金沢大学医学部第二内科および関連施設で診断された日本人糖尿病患者のうち、遺伝

子調査に関する説明と文書による同意後、検体採取が可能であった患者の中から第1群として35歳以下発症で3世代または2世代かつ同胞に糖尿病家族歴を有する患者30名、第2群として家族歴が第1群の要件をみたさない35歳以下発症患者33名、第3群として36歳以降の発症で3世代または2世代かつ同胞に糖尿病家族歴を有する患者15名の計78名(表1)、および非糖尿病対照者50名(平均年齢53.9 \pm 13.2歳)である。本研究では、抗グルタミン酸脱炭酸酵素 (glutamic acid decarboxylase, GAD) 抗体陽性者は対象から除外した。

糖尿病の診断は、1999年3月末日以前は1982年日本糖尿病学会より報告された「糖尿病の診断に関する委員会報告」²⁴⁾に基づき、また1999年4月以降は同学会により改訂された「糖尿病の分類と診断基準に関する委員会報告」²⁵⁾に従った。

患者検体の一部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。また個人情報は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、167; 課題名、日本人家族性糖尿病における糖代謝調節因子群の遺伝子変異の検討)。また組換えDNA実験については、平成11年4月15日に金沢大学組換えDNA実験安全委員会の承認を得た(課題名、糖尿病の遺伝子解析)。

II. 方法

1. 高分子DNAの抽出

対象者の末梢静脈血10mlをEDTA-2Naを抗凝固剤として採取し、トライトンX-100融解変法²⁶⁾にて高分子DNAを単離した。すなわち320mMシヨ糖溶液、Triton[®]X-100, 5mM MgCl₂, 10mM Tris HCl, pH7.6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 (Proteinase K) (P6556, 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 (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA-2Na, pH8.0)に溶解の上260nmにおける吸光度測定により濃度を求めた。

2. PCR法

Table 1. Characteristics of the study population

Factor	Group 1	Group 2	Group 3	Total
Subjects (Male/Female)	30 (18/12)	33 (23/10)	15 (8/7)	78 (49/29)
Present age (years)	37 \pm 14	39 \pm 18	55 \pm 11	41 \pm 16
Age at diagnosis (years)	23 \pm 6	23 \pm 6	44 \pm 8	27 \pm 10
Duration (years)	13 \pm 12	16 \pm 15	10 \pm 6	14 \pm 13
Number of affected generation	3.0 \pm 0.3	1.6 \pm 0.7	3.0 \pm 0	2.4 \pm 0.8
Insulin therapy	11	22	3	36

Group 1 includes diabetic subjects who were diagnosed before 35 years of age and have a family history through three generations; Group 2, diabetic subjects diagnosed before 35 years of age; Group 3, diabetic subjects who have a family history through three generations; Total, all of subjects. Values are expressed as \bar{X} \pm SD or n.

tolerance test; Pro291fsinsC, Proline 291 frameshift insertion cytosine; PCR-RFLP, PCR-restriction fragment length polymorphism

Table 2. Sequence of PCR primers for promoter region and ten exons of the HNF-1 α gene, and an exon 6 mismatch primer for PCR restriction fragment length polymorphism

Exon	Oligonucleotide name	Sequence (5'-3')	PCR product size (bp)
Promoter	PF	5'-TCCCATCGCAGGCCATAGCTC-3'	385
	PR	5'-CCGTCTGCAGCTGGCTCAGTT-3'	
1	1F	5'-GGCAGGCAAACGCAACCCACG-3'	483
	1R	5'-GAAGGGGGCTCGTTAGGAGC-3'	
2	2F	5'-CATGCACAGTCCCCACCCTCA-3'	390
	2R	5'-CTTCCAGCCCCACCTATGAG-3'	
3	3F	5'-GGGCAAGGTCAGGGGAATGGA-3'	304
	3R	5'-CAGCCCAGACCAAACCAGCAC-3'	
4	4F	5'-CAGAACCCTCCCCTTCATGCC-3'	397
	4R	5'-GGTGACTGCTGTCAATGGGAC-3'	
5	5F	5'-GGCAGACAGGCAGATGGCCTA-3'	346
	5R	5'-GCCTCCCCTAGGGACTGCTCCA-3'	
6	6F	5'-TGGAGCAGTCCCTAGGGAGGC-3'	322
	6R	5'-GTTGCCCATGAGCCTCCAC-3'	
6	6MM	5'-CCCCACCAGCTTACCGATGACCATG-3'	284
	7	7F	5'-GGTCTTGGGCAGGGGTGGGAT-3'
7R		5'-CTGCAATGCCTGCCAGGCACC-3'	
8	8F	5'-GAGGCCTGGGACTAGGGCTGT-3'	229
	8R	5'-CTCTGTACAGGCCGAGGGAG-3'	
9	9F	5'-CCTGTGACAGAGCCCCTCAC-3'	287
	9R	5'-AGGACAGCAACAGAAGGGGTG-3'	
10	10F	5'-GTACCCCTAGGGACAGGCAGG-3'	248
	10R	5'-ACCCCCAAGCAGGCAGTACA-3'	

F indicates forward primer; R, reverse primer; MM, mismatch primer; bp, base pair.

Kaisakiら¹²⁾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HNF-1 α 遺伝子配列をもとに、プロモーター領域および10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11組を作成した(表2)。プライマーは株式会社ファスマック(大阪)に合成委託した。

DNA断片の増幅にはSaiki²⁷⁾らによる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の各デオキシヌクレオチド(dATP, dCTP, dGTP, dTTP)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10mM Tris-HCl (pH 8.3), 50mM KCl, 1.5mM 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。速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°C 1分、それぞれのプライマーの融解温度で1分、72°Cで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%アガロースゲルに、鎖長マーカーとして ϕ -X174/HaeIII消化物(Toyobo, 東京)とともに泳動して断片長を確認した。

3. 自動化直接塩基配列決定法(direct sequencing)

PCR産物の断片長を確認後、目的とするDNA断片のバンドを含む部分を切り出した。マイクロピュアとマイクロコン-50(Millipore Corporation, Bedford, USA)を組み合わせて、このDNA断片を10,000rpm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・シーケンス・キット(Perkin-

Elmer)を用いサイクルシーケンス法を行った。

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を用いて室温で1680V, 7時間泳動した。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ー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。

4. PCR制限酵素切断多型(PCR-restriction fragment 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(表2)。一側に通常のプライマーを反対側に変異プライマーを用いて、95°C, 1分; 56°C, 1分; 72°C, 1.5分を1サイクルとし、30サイクルの条件での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 \times 制限酵素Nco I (Toyobo)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°Cで6時間反応させた。そして10-20%アクリルアミドゲルに反応産物を鎖長マーカー ϕ -X174/HaeIII消化物と共に泳動して、切断の有無で変異の検出を行った。

5. HNF-1 α Thr433Ile変異体の機能解析

1) 細胞培養

ヒト子宮頸部癌組織から株化されたHeLa細胞は内因性HNF-

1 α を発現しない。この細胞を購入し(ヒューマンサイエンス振興財団研究資源バンク, 大阪), 10%胎児ウシ血清 (HyClone, Utah, USA) を含むダルベッコ改変イーグル培地 (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Life Technologies, Rockville, USA) を用い細胞浮遊液を作製し, 25cm²平底フラスコ (Iwaki, 千葉) にて継代培養した。

2) 野生型HNF-1 α 発現ベクターへの変異導入とプラスミド調製

i. 部位特異的突然変異導入実験 (site-directed mutagenesis)

完全長ヒト野生型HNF-1 α cDNAをpcDNA3.1/HisC発現ベクター (Invitrogen, Carlsbad, USA) に挿入した野生型HNF-1 α 発現ベクター (Wt-HNF-1 α -pcDNA3.1/HisC) を鋳型に, Quick ChangeTM site-directed mutagenesis kit (Stratagene, La Jolla, USA) を用いたPCRによりThr433Ile変異HNF-1 α 発現ベクターを作製した。PCR反応液は50ngのWt-HNF-1 α -pcDNA3.1/HisC DNA鋳型, T433I変異を含む各々8pmolのプライマー1セット (センスプライマー, 5'-CGTTCACCAACACAGGTGCTCCATCCTGGTCATCGGCCTGGCTCC-3'; アンチセンスプライマー, 5'-GGAGGCCAGGCCGATGACCAGGATGGAGGCACCTGTGTGGTGAACG-3'), 終濃度200 μ Mとなる量の各デオキシヌクレオチド (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 2.5単位の *Pfu Turbo*^R DNAポリメラーゼ (Stratagene), 5 μ l反応緩衝液 [100mM KCl, 100 mM (NH₄)₂SO₄, 200mM Tris-HCl (pH8.8), 20mM MgSO₄, 1% Triton^RX-100, 1mg/ml ウシ血清アルブミン] および再滅菌蒸留水を加え最終的に50 μ lとなるようにして攪拌した。遠心後30 μ lのミネラルオイル (Sigma) を滴下した。PCRの温度条件は95 $^{\circ}$ Cで1分反応後, 95 $^{\circ}$ C, 30秒; 55 $^{\circ}$ C, 1分; 68 $^{\circ}$ C, 15分を12サイクルとした。増幅したPCR産物50 μ lを制限酵素 *Dpn* I 10単位にて37 $^{\circ}$ Cで1時間処理し, 鋳型DNAを切断した。

ii. エレクトロポレーション法を用いた大腸菌コンピテントセルの形質転換

大腸菌コンピテントセル (XL1-Blue) (Toyobo, 東京) 40 μ lを室温で融解した後, 前項にて増幅したThr433Ile変異型プラスミド1 μ lを加え攪拌した。これをジーンバルサー (Bio-Rad, Massachusetts, USA) 用のキューベットに移し, ジーンバルサーを用いて1.8kVの電圧で通電した。速やかにSOC培地1mlを加え, 1.5mlチューブに移し, 37 $^{\circ}$ Cで1時間培養した。この培養液の100 μ lをアンピシリン (Ampicillin, Amp) 入りプレート寒天培地上に塗り広げ, 37 $^{\circ}$ Cで12時間培養した。

iii. アルカリ溶菌法によるプラスミドの調製

12時間培養後のプレートより単一のコロニーを10個選択し, Amp2 μ lを含むLB (Luria-Bertani) 培地2mlにそれぞれ植菌し, 37 $^{\circ}$ Cで12時間振盪培養した。培養液を1.5mlチューブに移し, 遠心後上清を捨て, 沈殿物を0.2mlの試薬I [50mM グルコース溶液, 25mM Tris-HCl (pH8.0), 10mM EDTA] に攪拌溶解し, 氷上で15分培養した。さらに試薬II (0.2N NaOH, 1% SDS) を0.4ml加え, 1.5mlチューブを反転し混和した後, 氷上で5分間静置した。0.3mlの試薬III (酢酸カリウム 294.5 g, 酢酸 120ml, 再滅菌蒸留水 530ml) を加え, 氷上に10分間静置し, 4 $^{\circ}$ C, 15000回転で15分間遠心分離した。遠心分離された上清を別の1.5mlチューブに移し, RNA分解酵素2 μ lを加え, 37 $^{\circ}$ Cで30分間処理した。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, 70%エタノールで沈殿物を洗浄した。エタノールを吸引し, 沈殿物を30 μ lの再滅菌蒸留水に攪拌混和した。これに0.2mlのポリエチレングリコール溶液 (13%ポリエチレングリコール, 0.8M NaCl) を加え氷上で1時間静置し, フェノール・クロロホルム抽出, エタノール沈殿後, 沈殿物を乾燥させ30 μ lの再滅菌蒸留水に攪拌溶解した。2) ii. と iii. の実験で使用した大腸菌コンピテントセル, SOC培地, Amp入りプレート寒天培地およびアルカリ溶菌法で使用した試薬や酵素は, 金沢大学癌研究所細胞機能統御研究分野, 佐藤博教授より供与された。

Thr433Ile変異型HNF-1 α 発現ベクター (Thr433Ile-HNF-1 α -pcDNA3.1/HisC) は, 置換塩基を含む領域をPCRにより増幅し, 自動化直接塩基配列決定法を用いて塩基配列を確認した後, 再度アルカリ溶菌法にて増幅, 調製した。Wt-HNF-1 α -pcDNA3.1/HisCは大阪大学山縣和也博士より供与された。

3) レポーターベクターの調製

レポーター遺伝子としては, ヒト糖輸送体 (glucose transporter, GLUT) 2遺伝子のプロモーター領域 (-1296/+312) をpGL3-Basic (Promega, Madison, USA) レポーターベクターに組み込んだもの (GLUT2-pGL3) をアルカリ溶菌法にて増幅, 調製し使用した。GLUT2-pGL3は群馬大学武田純教授より供与を受けた。

4) カチオン性脂質を用いた, HeLa細胞への遺伝子導入

HeLa細胞を遺伝子導入24時間前に, 6穴平底プレート (Iwaki) に各穴細胞数 1×10^5 となるよう蒔き, 遺伝子導入時に各穴70%細胞密度であることを確認した。Wt-HNF-1 α -pcDNA3.1/HisC 0.2 μ gまたはThr433Ile-HNF-1 α -pcDNA3.1/HisC 0.2 μ gを, HNF-1 α cDNAが挿入されていないベクター (Empty-pcDNA3.1/HisC) 0.9 μ g, GLUT2-pGL3 1.0 μ gと内部コントロールであるpRL-チミジンキナーゼ (thymidine kinase) 50ngとともに, カチオン性脂質であるTrans IT (Pan Vera Corporation, Madison, USA) 6 μ lの存在下にHeLa細胞に遺伝子導入した。またThr433IleはN末端の二量体形成領域を保持しているため, この蛋白が野生型に結合して正常機能を阻害する可能性が考えられた。そこで変異蛋白を野生型と共発現させることにより, 変異蛋白が正常機能に及ぼす効果についても検討した。

5) ルシフェラーゼリポーターアッセイ (luciferase reporter assay)

遺伝子導入のためHeLa細胞を48時間37 $^{\circ}$ C 5% CO₂下に培養した後, HeLa細胞を回収した。細胞溶解液にてHeLa細胞を処理し, Dual-Luciferase^R Reporter Assay System (Promega) を用いて, ホタルルシフェラーゼおよびウミシイタケルシフェラーゼの発光をルミノメーター (Lumat LB9501 Measuring System) (Berthold Japan, 大阪) にて測定した。ルシフェラーゼリポーターアッセイの手順はPromega社のプロトコールに従った。

6. 臨床生化学的事項の検討

1) 血液生化学検査

対象者全例において静脈採血を行い, 血糖, 糖化ヘモグロビンA_{1c} (glycosylated haemoglobin A_{1c}, HbA_{1c}), 抗GAD抗体を測定した。血糖はグルコースオキシダーゼ電極法を, HbA_{1c}は高速液体クロマトグラフィー法を, 抗GAD抗体はコスミック社GADキット (東京) をそれぞれ用いて測定した。

2) 75g経口ブドウ糖負荷試験 (oral glucose tolerance test, OGTT)

同意が得られた症例に、75gOGTTを実施した。検査手順は日本糖尿病学会より報告された「糖尿病の分類と診断基準に関する委員会報告」に従った。血糖値と同時に、免疫反応性インスリン (immunoreactive insulin) をラジオイムノアッセイ競合二抗体法にて測定した。

3) 高インスリン正常血糖クランプ法

Thr433Ile変異発端者と妹において、人工臓器STG-22 (日機装, 東京) を用いた高インスリン正常血糖クランプ法によりインスリン感受性を検討した。検査手順はDeFronzoら²⁸⁾の報告を参考に実施し、ブドウ糖注入率 (glucose infusion rate, GIR) を算出した。

III. 統計学的検討

対象者における臨床指標値は平均値±標準偏差で示した。ルシフェラーゼアッセイでの群間の比較は、ANOVA分散分析の後、Tukey法およびDunnett法を用いた。統計学的有意水準はP<0.05とした。

成 績

I. HNF-1 α 遺伝子解析

1. 直接塩基配列決定法の結果

第1群30名中2名 (6.7%) において、エクソン4とエクソン6にHNF-1 α 遺伝子変異を見出した。第2群、第3群では遺伝子変異は検出されなかった。エクソン4の変異は、1996年Yamagataら⁴⁾により報告された最初のHNF-1 α 遺伝子変異であり、290番目のProを中心に存在するポリシトシン (polycytosine) 配列内に、C一塩基が挿入した変異 (Pro 291 frameshift insertion C, Pro291fsinsC) であった (図1)。この変異は転写活性化領域に位置し、一塩基挿入によるフレームシフトの結果、316番目のコドンが停止コドンとなった。エクソン6の変異は、433番目のThrをコードするコドンACCが、IleをコードするコドンATCへと、一塩基置換により極性の異なるアミノ酸に変化する変異 (Thr433Ile) であった (図2)。これは転写

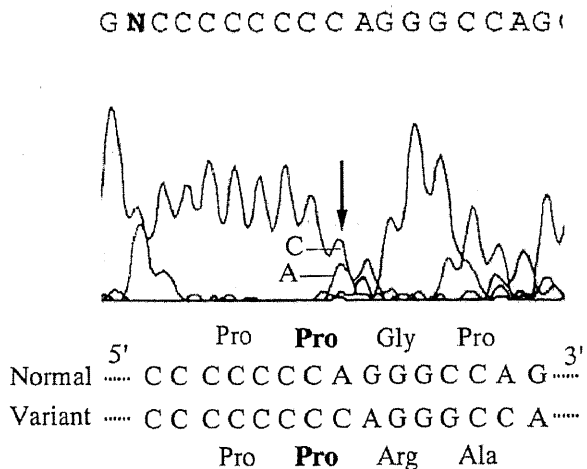


Fig. 1. Automated fluorescent direct sequencing of exon 4 of the HNF-1 α gene. The electropherogram is the result of the proband in the Pro291fsinsC mutation family. The arrow indicates inserted C peak of the variant allele and A peak of the wild-type allele.

活性化領域に位置し、今までに報告のない新しい変異であった。

2. PCR-RFLP法による発端者家系内での変異の確認

Thr433Ile変異について、プライマー Ex6FおよびEx6MMの組み合わせによるPCR産物は284bpとなり、野生型のみが制限酵素Nco Iにより259bpと25bpに切断される (図3)。図4にThr433Ile変異発端者の家系図とPCR-RFLP法による変異の確認結果を示した。発端者とその妹、弟および母親に、切断された

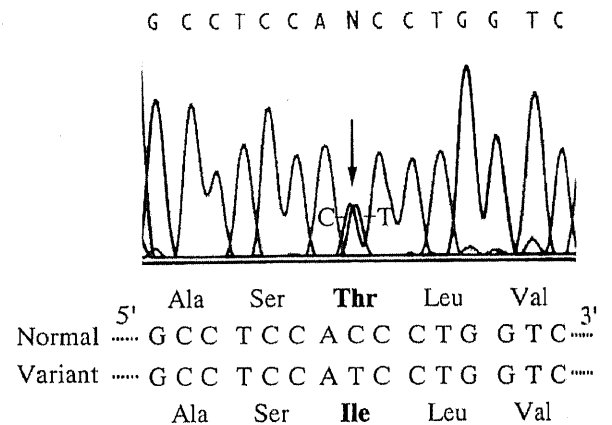


Fig. 2. Automated fluorescent direct sequencing of exon 6 of the HNF-1 α gene. The electropherogram is the result of the proband in the Thr433Ile mutation family. The arrow indicates T peak of the variant allele and C peak of the wild-type allele.

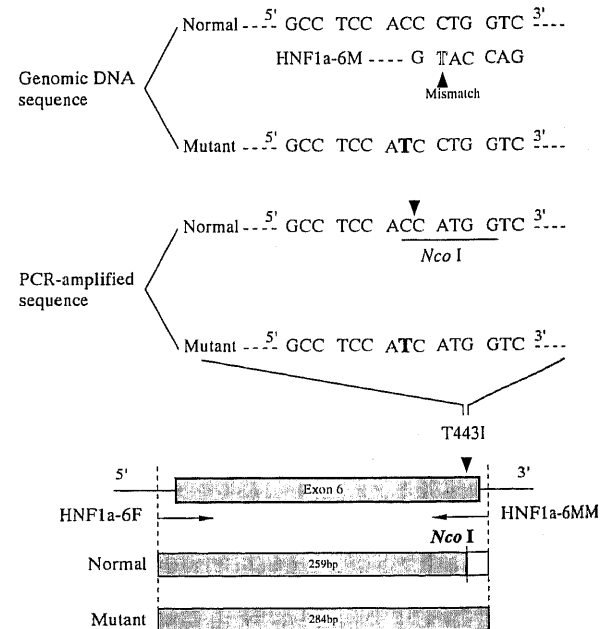


Fig. 3. Rapid detection method for an exon 6 missense mutation (T433I) employing the mutagenic primer-mediated restriction map modification. Using a forward primer HNF-1 α -6F and a mutagenic reverse primer HNF-1 α -6MM, gene amplification by PCR introduced an artificial Nco I site in the PCR product only for the normal allele. Digestion of the PCR products with Nco I generates polymorphic restriction fragments of 259 bp and 25 bp. Heterozygotes show double bands of 259 bp and 289 bp.

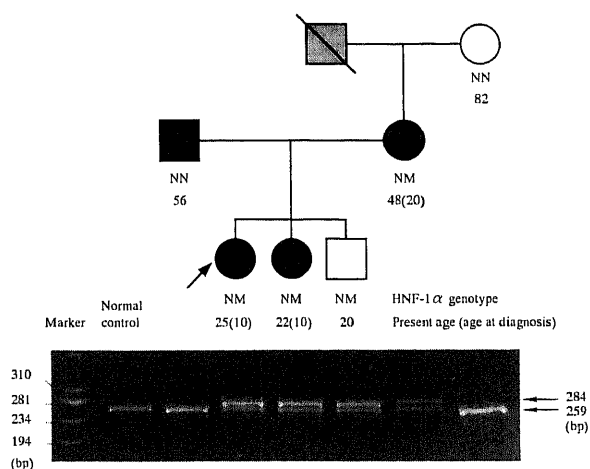


Fig. 4. The pedigree and result of PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) analysis of the family with the Thr433Ile mutation. Digestion of the PCR products with *Nco* I generates polymorphic restriction fragments of 259 bp and/or 289 bp. The proband, her mother, sister, and brother show 259 bp and 289 bp fragments, which indicate the heterozygote for HNF-1 α gene mutation (T433I). Normal control, a non-diabetic subject as normal control. Marker, the molecular size marker of ϕ X174 double strand DNA digested with *Hae* III. Squares are males and circles are females. Patients with diabetes are indicated by closed symbols, nondiabetic subjects by open symbols, and undiagnosed subjects by gray symbols. The arrow in the pedigree represents the proband who was examined for mutations. The HNF-1 α genotype is indicated below the symbols (N, normal allele; M, mutant allele). The present age (age at diagnosis of diabetes) is indicated as well.

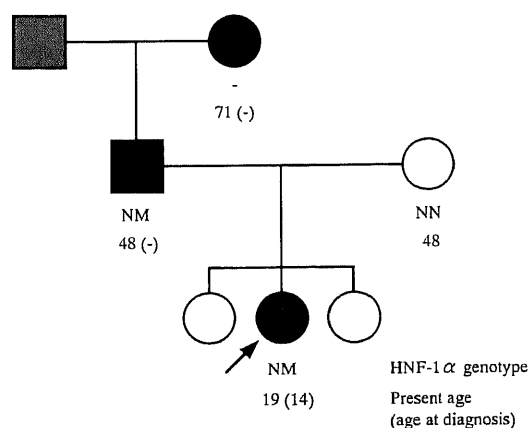


Fig. 5. The pedigree of the family with the Pro291fsinsC mutation. Squares are males and circles are females. Patients with diabetes are indicated by closed symbols, nondiabetic subjects by open symbols, and undiagnosed subjects by gray symbols. The arrow in the pedigree represents the proband who was examined for mutations. The HNF-1 α genotype is indicated below the symbols (N, normal allele; M, mutant allele). The present age (age at diagnosis of diabetes) is indicated as well. -, not examined.

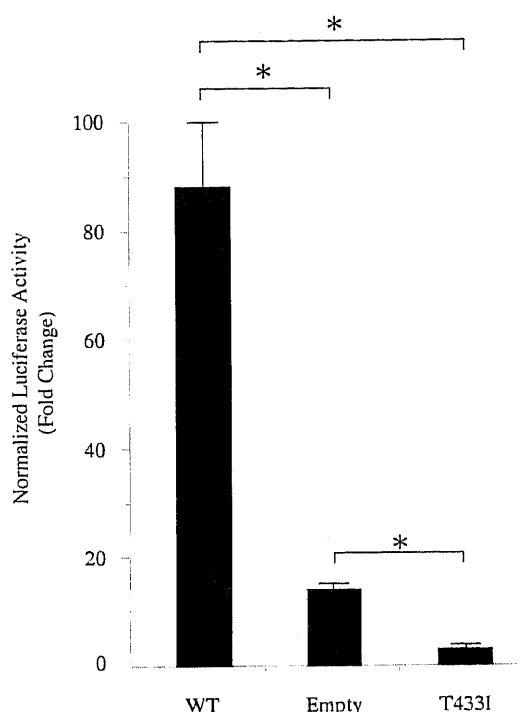


Fig. 6. Transcriptional activity of glucose transporter (GLUT) 2 in HeLa cells. Two hundreds ng of wild type-HNF-1 α -pcDNA3.1/HisC (WT) or Thr433Ile-HNF-1 α -pcDNA3.1/HisC (T433I) were transfected with 900 ng of Empty-pcDNA3.1/HisC (Empty), 1.0 μ g of GLUT2-pGL3, and 50ng of pRL-thymidine kinase (TK) DNA. Luciferase activity was normalized by the activity of thymidine kinase induced by pRL-TK. Experiments were repeated three times. SD shown as error bars. ANOVA and Turkey method were used for statistical analysis. *P < 0.01.

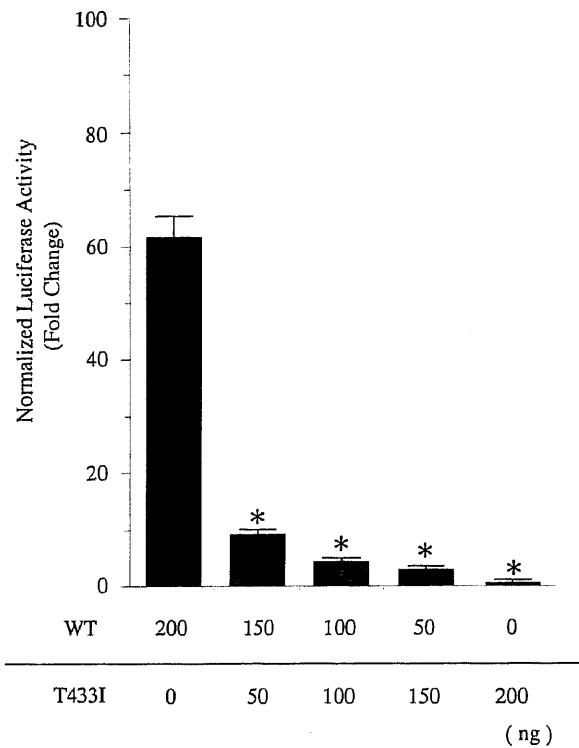
259bpのバンドと切断されない284bpのバンドの両方が確認され、同変異のヘテロ接合体と診断された。非糖尿病正常対照群50名の検討では、切断を受けない284bpのバンドは認められなかった。Pro291fsinsC変異については、制限酵素の選択が困難であったため、PCR-RFLP法による変異の確認は行わなかった。図5にはPro291fsinsC変異発端者の家系図のみを示した。発端者の父親と父方祖母は糖尿病であり、直接塩基配列決定法により父親と母親のエクソン4について検討した結果、父親に発端者と同一の遺伝子異常を検出した。

3. 野生型と変異HNF-1 α 蛋白の機能解析

Pro291fsinsC変異については、1998年Yamagataら²⁹⁾により機能解析が行われドミナントネガティブ (dominant-negative) 変異であると報告されており、本研究では新規発見変異であるThr433Ileについて検討した。図6には、ルシフェラーゼアッセイによるHNF-1 α の転写活性の測定結果を示した。図縦軸のルシフェラーゼ活性は転写活性を示し、内部コントロールにより補正された計測値である。Wt-HNF-1 α -pcDNA3.1/HisCは、Empty-pcDNA3.1/HisCに比し、有意に転写活性を増強させたが、Thr433Ile-HNF-1 α cDNA-pcDNA3.1/HisCの転写活性は有意に減弱していた。

4. 変異HNF-1 α の野生型HNF-1 α 作用への影響

Thr433Ile変異体は、導入DNA容量依存的に正常蛋白の機能



を減弱させることより、ドミナントネガティブ変異体であると考えられた (図7)。

II. Thr433Ile 変異での臨床像の検討

1. Thr433Ile 変異発端者の臨床像

発端者は25歳女性、10歳時に初めて学校検診で尿糖陽性を指摘され、11歳時に75gOGTTにて糖尿病と確定診断された。図8. Aには本症例での75gOGTTの推移を示した。ブドウ糖応答性インスリン分泌の低下が認められたが、13歳までは食事療法による治療を受けた。13歳時に経口血糖降下剤の内服が開始され、内服量は徐々に増量されたが、高血糖の改善はなく18歳時よりインスリン治療となった。20歳時に当科を初めて受診した際の75gOGTTでは、ブドウ糖応答性は消失し、内因性イ

Fig. 7. Transcriptional activity of glucose transporter (GLUT) 2 in HeLa cells. Two hundreds ng of wild type-HNF-1 α -pcDNA3.1/HisC (WT) was transfected alone or with increasing amounts of Thr433Ile-HNF-1 α -pcDNA3.1/HisC (T433I) DNA. Luciferase activity was normalized by the activity of thymidine kinase induced by pRL-TK. Experiments were repeated three times. SD shown as error bars. ANOVA and Dunnett method were used for statistical analysis. *P < 0.01 versus 200ng of WT.

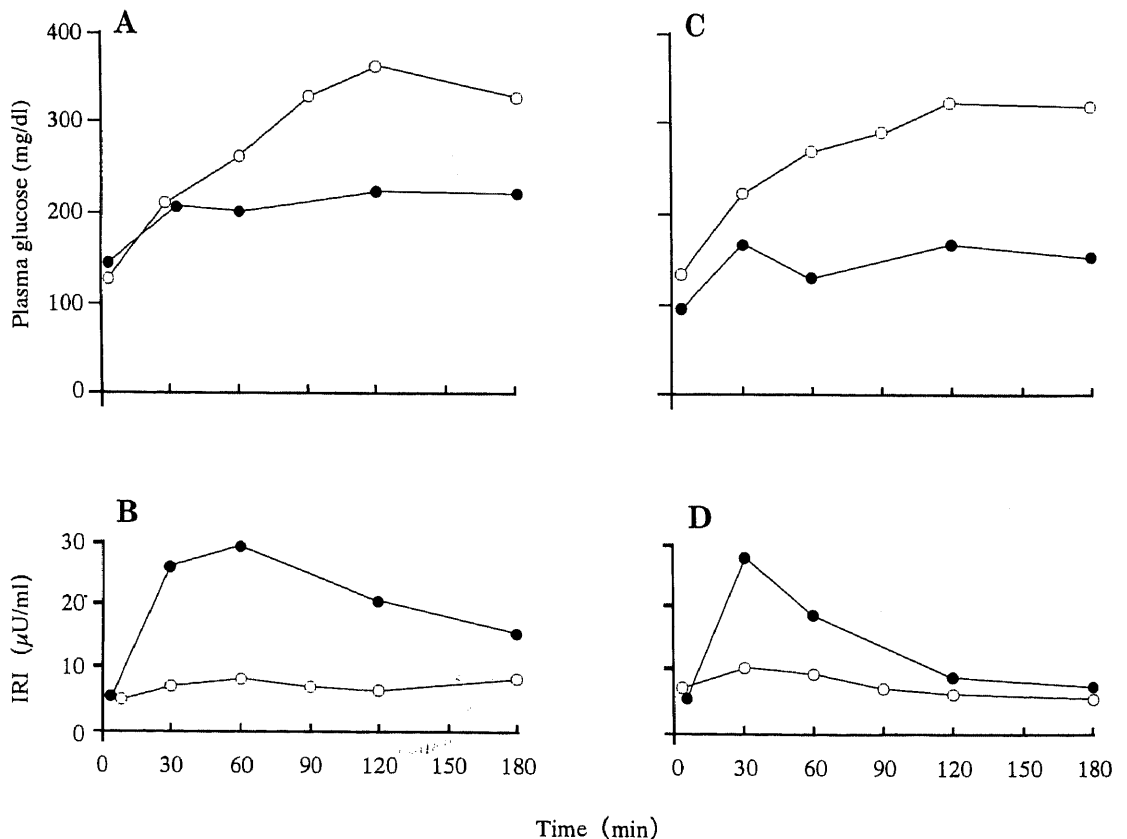


Fig. 8. Plasma glucose and serum immunoreactive insulin (IRI) during 75g oral glucose tolerance test (75gOGTT) of the proband and her sister of the Thr433Ile mutation family. (A) and (B) show plasma glucose and serum IRI concentrations of the proband respectively. ●, performed at 11 years old; ○, at 21 years old. (C) and (D) show plasma glucose and serum IRI concentrations of the proband's sister respectively. ●, performed at 10 years old; ○, at 18 years old.

Table 3. Clinical characteristics of the family members

Factor	III-1	III-2	III-3	II-1	II-2	I-2
BMI (kg/m ²)	21.6	21.6	20.8	—	20.8	—
75gOGTT						
Fasting Plasma Glucose (mg/dl)	135	120	74	—	136	79
2 hours Plasma Glucose (mg/dl)	326	368	78	221	—	110
Fasting Serum Insulin (μ U/ml)	5.3	5.3	3.0	—	1.8	4.1
Maximum Serum Insulin (μ U/ml)	8.1	10.5	22.0	—	—	75.0
HbA1c (%)	11.7	9.6	4.8	—	9.7	4.8
GAD-Ab	Negative	Negative	Negative	—	Negative	—
ICA	Negative	Negative	Negative	—	Negative	—
GIR (mg/kg/min)	4.59	4.83	—	—	—	—

BMI indicates body mass index; 75gOGTT, 75g oral glucose tolerance test; HbA1c, glycosylated haemoglobin A1c; GAD-Ab, anti glutamic acid decarboxylase antibody; ICA, islet cell antibody; GIR, glucose infusion rate; —, not tested. III-1 indicates the proband; III-2, proband's sister; III-3, brother; II-1, father; II-2, mother; I-2, grand mother.

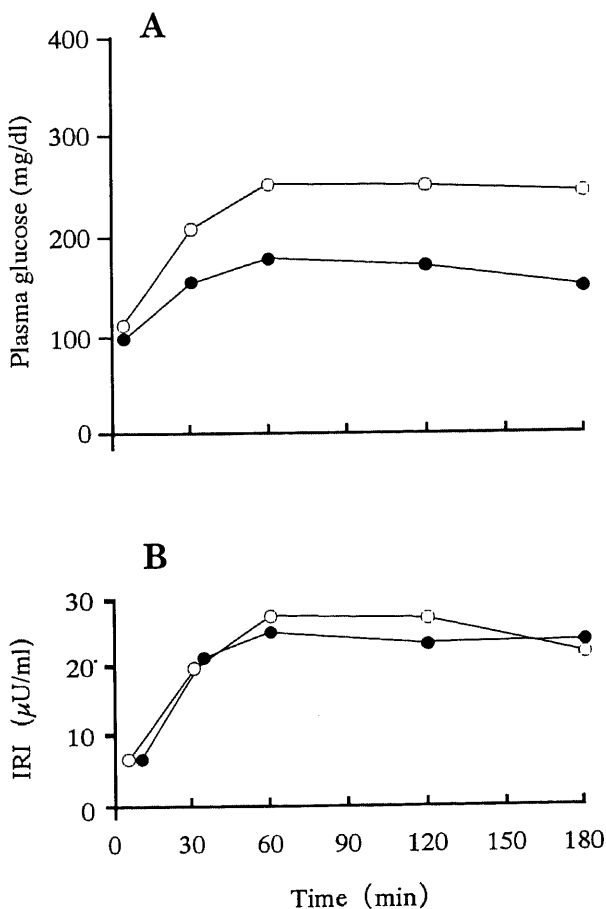


Fig. 9. Plasma glucose and serum immunoreactive insulin (IRI) during 75g oral glucose tolerance test (75gOGTT) of the proband of the Pro291fsinsC mutation family. (A) Plasma glucose concentration. (B) Serum IRI concentration. ●, performed at 13 years old; ○, at 17 years old.

ンズリン分泌は著明に低下していた。大血管性および細小血管性糖尿病合併症は認められなかった。人工臓器を用いた高インスリン正常血糖クランプ法での検討より、発端者の GIR は 4.59mg/kg/分であり、軽度のインスリン抵抗性が示唆された。

抗GAD抗体および膵島抗体 (islet cell antibody, ICA) 陰性より1型糖尿病は除外され、MODYと臨床診断された。

2. Thr433Ile変異発端者の家系内調査

表3には発端者家系の臨床像を示した。発端者の両親、妹は糖尿病であり、発端者と同一の変異が母親、妹および弟に見いだされた。母親は20歳時に、妹は10歳時に糖尿病を発症した。父親は随時血糖値より糖尿病と診断されたが、発症年齢は不明である。母親は40歳まで未治療であり、40歳より経口血糖降下剤を投薬された。発端者妹の75gOGTTの推移を図8. Bに示した。妹は10歳時に学校検診にて尿糖を指摘され、75gOGTTにより糖尿病と診断された。11歳時より経口血糖降下剤を内服し、18歳時当科受診した際の75gOGTTではインスリン分泌は発端者20歳時と同程度に低下し、インスリン治療が開始された。母、妹とも糖尿病性合併症は認められなかった。弟は15歳時の75gOGTTにて正常血糖であったが、インスリン分泌は低下していた。

3. Pro291fsinsC変異発端者の臨床像

発端者は11歳時学校検診にて初めて尿糖を指摘された。本症例での75gOGTTの推移を図9に示した。13歳当科受診時には正常体重であり、その後も肥満傾向はみられなかった。75gOGTTでは耐糖能障害であり、インスリン分泌の軽度の低下を認めた。14歳時には75gOGTTにて糖尿病と診断され、17歳時にはインスリン分泌に変化はないが、ブドウ糖負荷後の高血糖が著明となった。発端者は、現在まで食事療法を継続している。発端者の家系内には父親と父方祖母に糖尿病がみられ、父親に発端者と同一の変異を認めた。父親は中年期以降発症の糖尿病であり現在食事療法にて経過観察されている。

考 察

膵 β 細胞に発現している種々の転写因子は、成熟した β 細胞を形成するという発生における作用、および形成された β 細胞の代謝を担う様々な分子の発現調節という二つの作用を有しており、正常な糖代謝の維持を行っている。HNF-1 α をはじめとしたいくつかの膵 β 細胞の転写因子の遺伝子異常によりインスリン分泌不全型糖尿病が発症するという発見から、転写因子異常による糖尿病³⁰⁾という新たな概念が提唱された。

HNF-1 α はホメオドメイン (homeodomain) を有する転写因子群の一つであり、二量体形成領域、DNA結合領域、転写活性領域の三種の機能的領域から構成される。他の転写因子と階層構造を形成し³¹⁾、より上位に位置するHNF-4 α により転写調節を受けている。二量体形成領域を介して、ホモ二量体またはHNF-1 β とのヘテロ二量体を形成し標的遺伝子に結合する。HNF-1 α の結合配列はGTTAATNATTANCという13bpの回文構造をとるが、ヒト膵 β 細胞におけるHNF-1 α の標的遺伝子は不明であった。Wangら¹⁰⁾は、インスリノーマ細胞から樹立された細胞株をHNF-1 α ドミナントネガティブ変異体で形質交換させた実験から、HNF-1 α の標的遺伝子はインスリン、GLUT2、L型ピルビン酸キナーゼ (L-pyruvate kinase)、アルドラーゼB (aldolase B)、3-ヒドロキシ-3-メチルグルタルリコエンザイムAリダクターゼ (3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase) およびミトコンドリア2-オキソグルタル酸デヒドロゲナーゼ遺伝子 (mitochondrial 2-oxo-glutarate-dehydrogenase) であると報告した。これらの遺伝子はすべてHNF-1 α 結合領域を含み、その蛋白は膵 β 細胞での代謝や内分泌機能に深く関わっており、発現が低下することで膵 β 細胞機能不全をきたすと考えられた。また変異HNF-1 α 遺伝子を導入されたマウスでは、肝でのHNF-1 α 依存性蛋白発現に変化はみられず、HNF-1 α の機能損失はHNF-1 β や他の転写因子によって代償される可能性が示された³²⁾。

これまでのMODY遺伝子変異の検索から、人種間においてMODY病型の発症頻度に差があることが報告されている。仏国のMODYではグルコキナーゼ遺伝子異常が約50%を占めるが、日本人ではまれである³⁴⁾。HNF-1 α 遺伝子異常は、仏国のMODYの25~50%、英国のMODYの約70%を占めると報告されている¹³⁾。本邦においても約20%を占め最も頻度の高いMODY遺伝子である¹¹⁾。ただし本邦では、MODY患者の80%が遺伝子診断されていない。また本邦での糖尿病患者全体を対象とした検討によると、35歳以下発症糖尿病の10%、15歳以下発症の約20%にHNF-1 α 遺伝子変異が同定されている¹¹⁾。本研究では、変異発端者は2名とも15歳以下で発症した。対象者第1群において6.7% (2/30)であったが対象を35歳以下とすると3.2% (2/63)となり、既報よりも低率となった。15歳以下発症者は8名であり、この群では25% (2/8)となり既報とほぼ同等であった。この結果より学童期発症の2型糖尿病に対しては本遺伝子変異を考慮する必要があると考えられた。

MODYは比較的若年で発症し、常染色体優性遺伝形式をとる2型糖尿病である³⁷⁾。HNF-1 α 遺伝子変異によるMODY3は、家系内での疾患浸透率が高く、55歳までに95%が糖尿病を発症する²²⁾とされており、多くはやせ型でMODYの中では比較的重症の糖尿病となる¹⁴⁾。またHNF-1 α 変異を有する糖尿病未発症例においても、血糖値144mg/dl以上ではインスリン分泌反応は低下すると報告されており⁴⁰⁾、高血糖をきたす以前よりインスリン分泌障害が認められる。糖尿病発症後の75gOGTTでは、空腹時血糖値は軽度高値であるが2時間後血糖値は高値となり、ブドウ糖応答性インスリン分泌不全が強く認められる³⁷⁾。発症当初は食事療法のみで経過観察される症例もあるが、数年で高血糖のため経口血糖降下剤が必要となり、最終的には症例の30%から40%がインスリン治療を必要とする。一方インスリン抵抗性は存在していないと理解されている⁴²⁾。またMODY3における糖尿病合併症の重症度は多様で

ある。罹病期間と血糖値の程度を一致させた1型または2型糖尿病患者と比較して、網膜症、腎症の発症率、重症度に有意差はないと報告されている⁴³⁾が、MODY3患者の中には高血糖の是正が困難なため慢性合併症が進展する例が散見される。本研究における2症例はともに学童期に尿糖陽性を指摘され、糖尿病発症当初の75gOGTTでは、血糖値200mg/dl前後でインスリンの分泌は頂値となり、その後のさらなる血糖値上昇に対しインスリン分泌は低下を示した。また2症例とも糖尿病合併症を有さないという共通点がある。しかしながら、Thr433Ile変異発端者とその妹は、発症後早期にインスリン分泌が低下しインスリン治療を必要とした。一方Pro291fsinsC変異発端者は数年の経過を経てもインスリン分泌に著変はみられず、両発端者の発症後の経過は異なるものである。またThr433Ile変異家系において、発端者と妹の臨床像は類似するが、母親の75gOGTTにおけるインスリン分泌の低下は軽度である。この家系では父親が糖尿病であり、父方由来の何らかの糖尿病遺伝因子が発端者の臨床像を修飾していると考えられた。

若年発症糖尿病患者を中心にHNF-1 α 遺伝子変異の検索が行われた結果、これまでに同定された変異は77種におよぶ²²⁾。これらの変異はすべての機能的領域におよび、プロモーター領域にも存在する。このうち19種は、インスリン合成および分泌に関与していると考えられる候補遺伝子のプロモーター領域を用いたレポーターアッセイにより変異蛋白の機能解析が行われている。その結果、機能減弱変異が10種、機能喪失 (loss of function) 型変異が9種でありこれには4種のドミナントネガティブ変異が含まれた。このうち機能減弱型変異の1種類と機能喪失型変異の5種類が、ミスセンス変異またはフレームシフト変異であることより、培養細胞を用いた一過性発現系では途切れた蛋白 (truncated protein) をコードする変異がより強い機能障害をもたらすことが示された²³⁾。ドミナントネガティブ変異では比較的重症例が多く、血糖降下剤やインスリン治療を必要とする症例が多いとの報告もあるが、糖尿病の重症度は同一変異を有する家系内においても異なることがあり、HNF-1 α 変異体の残存機能活性と発症年齢やインスリン必要性の有無が相関するか否かは結論が得られていない。本研究で認められた両変異はともに転写活性領域に位置するドミナントネガティブ変異であったが、臨床像の検討では、Thr433Ile変異発端者はPro291fsinsC変異発端者よりインスリン分泌の低下は重度であった。この原因として一つには、Thr433Ile変異発端者が父親から何らかの糖尿病遺伝因子を受け継いで重症となった可能性が挙げられる。またナンセンス変異やフレームシフト変異より転写されるRNAは構造が不安定であるため、変異蛋白の発現レベルが低下しドミナントネガティブ変異として機能しない可能性が示唆されている²²⁾。この場合には機能喪失によるハプロ不全となり、より軽症の表現型を呈すると推察される。これらより途切れた蛋白よりなるHNF-1 α 変異体が、ヒト膵 β 細胞においてドミナントネガティブ効果を示すか否かは、検討の余地を残すと考えられる。

また培養細胞を用いた変異遺伝子の一過性発現実験では、発現ベクターは、最大効率で培養細胞内に導入され、なおかつ高活性型プロモーターにより目的とする遺伝子が転写されるので、培養細胞内では生体細胞よりもはるかに強発現状態となる。さらに今回利用したHeLa細胞は内因性HNF-1 α を発現しない細胞であり、その中でHNF-1 α が過剰量つくられるという異常

な状態での実験である。これらのことから、培養細胞内での実験結果は生体細胞内での遺伝子の機能を必ずしも反映しない可能性があることを理解しなければならない。しかしながら転写機能の解析実験は、同定された遺伝子変異と臨床像をつなぎ合わせる有効な手段であり、今後さらなる症例の積み重ねが必要と考える。

結 論

日本人2型糖尿病患者を対象に、HNF-1 α 遺伝子変異を検索し、変異蛋白の機能解析と臨床像を比較検討することより以下の結果を得た。

1. 対象者78名中15歳以下発症者は8名存在し、このうちの2名においてHNF-1 α 遺伝子変異を検出した。この条件では変異検出率25% (2名/8名) となり、本邦におけるMODY3は学童期発症の2型糖尿病患者に高頻度に存在する可能性が示唆された。

2. 1家系4名にHNF-1 α 遺伝子Thr433Ile変異を検出した。この変異はこれまでに報告のない新変異であった。

3. 1家系2名に検出されたHNF-1 α 遺伝子Pro291fsinsC変異はドミナントネガティブ変異であり、比較的重症の糖尿病となるとされているが、本研究での発端者ではインスリン分泌障害の進展は緩徐であり、これまでの報告症例と異なった。これより同一遺伝子変異を有する症例においても、その臨床像は多様であると考えられた。

4. 今回新しく見つかったHNF-1 α 遺伝子Thr433Ile変異は、変異蛋白の機能解析よりドミナントネガティブ変異と考えられた。この家系における患者の臨床像の検討より、MODY3患者の臨床像は他の糖尿病遺伝因子により修飾されることが示された。

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。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 八木邦公助手に心から謝意を表します。また遺伝子組み換え実験において、実験試料、実験室を提供していただいた金沢大学医学部癌研究所細胞機能統御研究分野 佐藤博教授に厚く御礼申し上げます。御助言、御協力を戴きました金沢大学大学院医学系研究科血管分子遺伝学 野原淳助手、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技師、水野美保子技師に感謝いたします。

本研究の一部は第14回 International Symposium on Drugs Affecting Lipid Metabolism (Sep. 9-12, 2001, New York, USA) において発表した。

文 献

- 1) Bell GI, Xiang KS, Newman MV, Wu SH, Wright LG, Fajans SS, Spielman RS, Cox NJ. Gene for non-insulin-dependent diabetes mellitus (maturity-onset diabetes of the young subtype) is linked to DNA polymorphism on human chromosome 20q. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(4): 1484-1488, 1991
- 2) Tattersall RB, Fajans SS. A difference between the inheritance of classical juvenile-onset and maturity-onset type diabetes of young people. *Diabetes* 24: 44-53, 1975
- 3) Vionnet N, Stoffel M, Takeda J, Yasuda K, Bell GI, Zouali H, Lesage S, Velho G, Iris F, Passa P, et al. Nonsense mutation in the glucokinase gene causes early-onset non-insulin-dependent

diabetes mellitus. *Nature* 356(6371): 721-722, 1992

- 4) Yamagata K, Oda N, Kaisaki PJ, Menzel S, Furuta H, Vaxillaire M, Southam L, Cox RD, Lathrop GM, Boriraj VV, Chen X, Cox NJ, Oda Y, Yano H, Le Beau MM, Yamada S, Nishigori H, Takeda J, Fajans SS, Hattersley AT, Iwasaki N, Hansen T, Pedersen O, Polonsky KS, Bell GI. Mutations in the hepatocyte nuclear factor-1alpha gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY3). *Nature* 384(6608): 455-458, 1996
- 5) Yamagata K, Furuta H, Oda N, Kaisaki PJ, Menzel S, Cox NJ, Fajans SS, Signorini S, Stoffel M, Bell GI. Mutations in the hepatocyte nuclear factor-4alpha gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY1). *Nature* 384(6608): 458-460, 1996
- 6) Stoffers DA, Ferrer J, Clarke WL, Habener JF. Early-onset type-II diabetes mellitus (MODY4) linked to IPF1. *Nat Genet* 17(2): 138-139, 1997
- 7) Horikawa Y, Iwasaki N, Hara M, Furuta H, Hinokio Y, Cockburn BN, Lindner T, Yamagata K, Ogata M, Tomonaga O, Kuroki H, Kasahara T, Iwamoto Y, Bell GI. Mutation in hepatocyte nuclear factor-1 beta gene (TCF2) associated with MODY. *Nat Genet* 17(4): 384-385, 1997
- 8) Frain M, Swart G, Monaci P, Nicosia A, Stampfli S, Frank R, Cortese R. The liver-specific transcription factor LF-B1 contains a highly diverged homeobox DNA binding domain. *Cell* 59(1): 145-157, 1989
- 9) Stoffel M, Duncan SA. The maturity-onset diabetes of the young (MODY1) transcription factor HNF4alpha regulates expression of genes required for glucose transport and metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(24): 13209-13214, 1997
- 10) Wang H, Maechler P, Antinozzi PA, Hagenfeldt KA, Wollheim CB. Hepatocyte nuclear factor 4alpha regulates the expression of pancreatic beta-cell genes implicated in glucose metabolism and nutrient-induced insulin secretion. *J Biol Chem*.275(46): 35953-35959, 2000
- 11) Iwasaki N, Oda N, Ogata M, Hara M, Hinokio Y, Oda Y, Yamagata K, Kanematsu S, Ohgawara H, Omori Y, Bell GI. Mutations in the hepatocyte nuclear factor-1alpha/MODY3 gene in Japanese subjects with early- and late-onset NIDDM. *Diabetes* 46(9): 1504-1508, 1997
- 12) Kaisaki PJ, Menzel S, Lindner T, Oda N, Rjasanowski I, Sahm J, Meincke G, Schulze J, Schmechel H, Petzold C, Ledermann HM, Sachse G, Boriraj VV, Menzel R, Kerner W, Turner RC, Yamagata K, Bell GI. Mutations in the hepatocyte nuclear factor-1alpha gene in MODY and early-onset NIDDM: evidence for a mutational hotspot in exon 4. *Diabetes* 46(3): 528-535, 1997
- 13) Vaxillaire M, Rouard M, Yamagata K, Oda N, Kaisaki PJ, Boriraj VV, Chevre JC, Boccio V, Cox RD, Lathrop GM, Dussoix P, Philippe J, Timsit J, Charpentier G, Velho G, Bell GI, Froguel P. Identification of nine novel mutations in the hepatocyte nuclear factor 1 alpha gene associated with maturity-onset diabetes of the young (MODY3). *Hum Mol Genet* 6(4): 583-586, 1997
- 14) Frayling TM, Bulamn MP, Ellard S, Appleton M, Dronsfield MJ, Mackie AD, Baird JD, Kaisaki PJ, Yamagata K, Bell GI, Bain SC, Hattersley AT. Mutations in the hepatocyte nuclear factor-

1alpha gene are a common cause of maturity-onset diabetes of the young in the U.K. *Diabetes* 46(4): 720-725, 1997

15) Hansen T, Eiberg H, Rouard M, Vaxillaire M, Moller AM, Rasmussen SK, Fridberg M, Urhammer SA, Holst JJ, Almind K, Echwald SM, Hansen L, Bell GI, Pedersen O. Novel MODY3 mutations in the hepatocyte nuclear factor-1alpha gene: evidence for a hyperexcitability of pancreatic beta-cells to intravenous secretagogues in a glucose-tolerant carrier of a P447L mutation. *Diabetes* 46(4):726-730, 1997

16) Gragnoli C, Lindner T, Cockburn BN, Kaisaki PJ, Gragnoli F, Marozzi G, Bell GI. Maturity-onset diabetes of the young due to a mutation in the hepatocyte nuclear factor-4 alpha binding site in the promoter of the hepatocyte nuclear factor-1 alpha gene. *Diabetes* 46(10): 1648-1651, 1997

17) Yamada S, Nishigori H, Onda H, Utsugi T, Yanagawa T, Maruyama T, Onigata K, Nagashima K, Nagai R, Morikawa A, Takeuchi T, Takeda J. Identification of mutations in the hepatocyte nuclear factor (HNF)-1 alpha gene in Japanese subjects with IDDM. *Diabetes* 46(10): 1643-1647, 1997

18) Urhammer SA, Rasmussen SK, Kaisaki PJ, Oda N, Yamagata K, Moller AM, Fridberg M, Hansen L, Hansen T, Bell GI, Pedersen O. Genetic variation in the hepatocyte nuclear factor-1 alpha gene in Danish Caucasians with late-onset NIDDM. *Diabetologia* 40(4): 473-475, 1997

19) Glucksmann MA, Lehto M, Tayber O, Scotti S, Berkemeier L, Pulido JC, Wu Y, Nir WJ, Fang L, Markel P, Munnely KD, Goranson J, Orho M, Young BM, Whitacre JL, McMenimen C, Wantman M, Tuomi T, Warram J, Forsblom CM, Carlsson M, Rosenzweig J, Kennedy G, Duyk GM, Thomas JD, et al. Novel mutations and a mutational hotspot in the MODY3 gene. *Diabetes* 46(6): 1081-1086, 1997

20) Urhammer SA, Fridberg M, Hansen T, Rasmussen SK, Moller AM, Clausen JO, Pedersen O. A prevalent amino acid polymorphism at codon 98 in the hepatocyte nuclear factor-1alpha gene is associated with reduced serum C-peptide and insulin responses to an oral glucose challenge. *Diabetes* 46(5): 912-916, 1997

21) Ellard S. Hepatocyte nuclear factor 1 alpha (HNF-1 alpha) mutations in maturity-onset diabetes of the young. *Hum Mutat* 16(5): 377-385, 2000

22) Ryffel GU. Mutations in the human genes encoding the transcription factors of the hepatocyte nuclear factor (HNF) 1 and HNF4 families: functional and pathological consequences. *J Mol Endocrinol* 27(1): 11-29, 2001

23) Frayling TM, Evans JC, Bulman MP, Pearson E, Allen L, Owen K, Bingham C, Hannemann M, Shepherd M, Ellard S, Hattersley AT. beta-cell genes and diabetes: molecular and clinical characterization of mutations in transcription factors. *Diabetes* 50 Suppl 1: S94-100, 2001

24) 小坂樹徳, 赤坂安夫, 後藤由夫, 羽倉稜子, 平田幸生, 川手亮三, 葛谷 健, 三村悟郎, 中山秀隆, 坂本信夫, 繁田幸男. 糖尿病の診断に関する委員会報告. *糖尿病* 25: 859-866, 1982

25) 葛谷 健, 中川昌一, 佐藤 譲, 金澤康徳, 岩本安彦,

小林 正, 南條輝志男, 佐々木陽, 清野 裕, 伊藤千香子, 島健二, 野中 共平, 門脇 孝. 糖尿病の分類と診断基準に関する委員会報告. *糖尿病* 42: 385-404, 1999

26) Vandenplas 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 Genet* 21: 164-172, 1984

27) Saiki RK, Bugawan TL, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Analysis of enzymatically amplified E-globin and HLA-Dqa DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature* 324: 163-166, 1986

28) DeFronzo RA, Tobin JD, Andres R. Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *Am J Physiol* 237(3): E214-223, 1979

29) Yamagata K, Yang Q, Yamamoto K, Iwahashi H, Miyagawa J, Okita K, Yoshiuchi I, Miyazaki J, Noguchi T, Nakajima H, Namba M, Hanafusa T, Matsuzawa Y. Mutation P291fsinsC in the transcription factor hepatocyte nuclear factor-1alpha is dominant negative. *Diabetes* 47(8): 1231-1235, 1998

30) Todd JA. Transcribing diabetes. *Nature* 384(6608): 407-408, 1996

31) Cereghini S. Liver-enriched transcription factors and hepatocyte differentiation. *FASEB J* 10(2): 267-282, 1996

32) Wang H, Maechler P, Hagenfeldt KA, Wollheim CB. Dominant-negative suppression of HNF-1alpha function results in defective insulin gene transcription and impaired metabolism-secretion coupling in a pancreatic beta-cell line. *EMBO J* 17(22): 6701-6713, 1998

33) Pontoglio M, Barra J, Hadchouel M, Doyen A, Kress C, Bach JP, Babinet C, Yaniv M. Hepatocyte nuclear factor 1 inactivation results in hepatic dysfunction, phenylketonuria, and renal Fanconi syndrome. *Cell* 84(4): 575-585, 1996

34) Furuta H, Iwasaki N, Oda N, Hinokio Y, Horikawa Y, Yamagata K, Yano N, Sugahiro J, Ogata M, Ohgawara H, Omori Y, Iwamoto Y, Bell GI. Organization and partial sequence of the hepatocyte nuclear factor-4 alpha/MODY1 gene and identification of a missense mutation, R127W, in a Japanese family with MODY. *Diabetes* 46(10): 1652-1657, 1997

35) Katagiri H, Asano T, Ishihara H, Inukai K, Anai M, Miyazaki J, Tsukuda K, Kikuchi M, Yazaki Y, Oka Y. Nonsense mutation of glucokinase gene in late-onset non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Lancet* 340(8831): 1316-1317, 1992

36) Yamada S, Tomura H, Nishigori H, Sho K, Mabe H, Iwatani N, Takumi T, Kito Y, Moriya N, Muroya K, Ogata T, Onigata K, Morikawa A, Inoue I, Takeda J. Identification of mutations in the hepatocyte nuclear factor-1alpha gene in Japanese subjects with early-onset NIDDM and functional analysis of the mutant proteins. *Diabetes* 48(3): 645-648, 1999

37) Hattersley AT. Maturity-onset diabetes of the young: clinical heterogeneity explained by genetic heterogeneity. *Diabet Med* 15(1): 15-24, 1998

38) Shepherd M, Ellis I, Ahmad AM, Todd PJ, Bowen-Jones D, Mannion G, Ellard S, Sparkes AC, Hattersley AT. Predictive genetic testing in maturity-onset diabetes of the young (MODY). *Diabet Med* 18(5): 417-421, 2001

- 39) Vaxillaire M, Boccio V, Philippi A, Vigouroux C, Terwilliger J, Passa P, Beckmann JS, Velho G, Lathrop GM, Froguel P. A gene for maturity onset diabetes of the young (MODY) maps to chromosome 12q. *Nat Genet* 9(4): 418-423, 1995
- 40) Byrne MM, Sturis J, Menzel S, Yamagata K, Fajans SS, Dronsfield MJ, Bain SC, Hattersley AT, Velho G, Froguel P, Bell GI, Polonsky KS. Altered insulin secretory responses to glucose in diabetic and nondiabetic subjects with mutations in the diabetes susceptibility gene MODY3 on chromosome 12. *Diabetes* 45(11): 1503-1510, 1996
- 41) Vaxillaire M, Pueyo ME, Clement K, Fiet J, Timsit J, Philippe J, Robert JJ, Tappy L, Froguel P, Velho G. Insulin secretion and insulin sensitivity in diabetic and non-diabetic subjects with hepatic nuclear factor-1alpha (maturity-onset diabetes of the young-3) mutations. *Eur J Endocrinol* 141(6): 609-618, 1999
- 42) Pearson ER, Velho G, Clark P, Stride A, Shepherd M, Frayling TM, Bulman MP, Ellard S, Froguel P, Hattersley AT. beta-cell genes and diabetes: quantitative and qualitative differences in the pathophysiology of hepatic nuclear factor-1alpha and glucokinase mutations. *Diabetes* 50 Suppl 1: S101-107, 2001
- 43) Isomaa B, Henricsson M, Lehto M, Forsblom C, Karanko S, Sarelin L, Hagglom M, Groop L. Chronic diabetic complications in patients with MODY3 diabetes. *Diabetologia* 41(4): 467-473, 1998
- 44) Vaxillaire M, Abderrahmani A, Boutin P, Bailleul B, Froguel P, Yaniv M, Pontoglio M. Anatomy of a homeoprotein revealed by the analysis of human MODY3 mutations. *J Biol Chem* 274(50): 35639-35646, 1999

Molecular Genetic Analysis of Hepatocyte nuclear factor-1 alpha mutations in Japanese with type 2 diabetes

Akimichi Asano, Department of Molecular Genetics of Cardiovascular Disorders, Graduate School of Medical Science, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640-J. *Juzen Med Soc.*, **110**, 130-141 (2002)

Key words hepatocyte nuclear factor-1 alpha, maturity-onset diabetes of the young, gene mutation, gene expression, dominant-negative mutant

Abstract

Maturity-onset diabetes of the young (MODY) is a monogenic form of diabetes mellitus characterized by an autosomal dominant mode of inheritance, and an onset usually before the age of 25. MODY can result from mutations in any one of five different genes. The aim of this study was to estimate the prevalence of the mutations in the MODY3 gene -the hepatocyte nuclear factor-1alpha (HNF-1 α) gene - in early-onset Japanese diabetics with a prominent family history of the disorder. A functional analysis of the mutant HNF-1 α genes newly identified in this study were performed to evaluate the contribution of the mutant functional properties to the clinical manifestation. Ten exons, flanking introns, and the promoter region of the HNF-1 α gene in these subjects were amplified by PCR and the base sequences of the products were analyzed by a direct sequencing method. Mutations were identified in two (2.6%) of the 78 unrelated patients. A frameshift mutation resulting from an insertion of a C in a polyC tract around codon 291 for Pro, Pro291fsinsC, which would generate a mutant truncated protein of 340 amino acids, was found in a subject who was diagnosed as diabetes at 13 years of age. A novel missense mutation of Thr433Ile (replacement of Thr by Ile in codon 433) in the transactivation domain was found in a patient who developed diabetes 3 years after the first diagnosis at 10 years old. The proband carrying the Thr433Ile mutation had a more severe form of diabetes than that of her mother, who had the same mutation of the HNF-1 α gene. These mutations were identified in a heterozygous form and were not detected in 50 non-diabetic healthy controls. Transfection experiments using the reporter assay in HeLa cells revealed the Thr433Ile mutation had no transcriptional activation activity. When the wild-type-encoding plasmid was cotransfected with increasing amounts of the Thr433Ile construct, the Thr433Ile mutant interfered with the wild-type HNF-1 α activity in a dose-dependent manner. This suggests that the Thr433Ile HNF-1 α mutation can generate a dominant negative effector. Based on comparison of the functional data with the clinical information of the family members possessing the Thr433Ile HNF-1 α mutation, there is no evidence that the patients with the HNF-1 α dominant-negative mutation have a more serious disease. Variability of the severity of the phenotype has been observed within family members with the same mutation, suggesting that other factors contribute to the phenotype.