Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-05

Human Obese Gene Molecular Screening in Japanese and Asian Indian NIDDM Patients Associated With Obesity

仁木, 敏晴

(Degree)
博士（医学）
(Date of Degree)
1998-03-31
(Resource Type)
doctoral thesis
(Report Number)
甲1807
(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1001807

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。

[86]

氏名・（本籍）	仁木敏晴（にきとしはる）　（徳島県）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学位記番号	博い第1154号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与の日付	平成10年3月31日
学位論文題目	Human Obese Gene Molecular Screening in Japanese and Asian Indean NIDDM Patisnts Associated With Ovesity （インスリン非依存性糖尿病及び単純性肥満患者における肥満（ob）遺伝子多型の検討）
審査委員	主査　教授　春日雅人 教授　千原和夫　教授　片岡　徹

論文内容の要旨

I. 序　文

インスリン非依存性糖尿病（NIDDM）は，遺伝因子や環境因子が複雑にからみあって発症する多因子疾患である。一方肥満は，虚血性心疾患や代謝障害に代表される多数の疾患に関与することが報告されており，なかでもNIDDM の病因として注目されている。その機序として，肥満者では肝臓での糖新生抑制や筋肉での糖の取り込み促進といったインスリン作用が減弱していること，インスリン感受性臓器におけるインスリン受容体の減少や高インスリン血症，膵臓におけるインスリン分泌の低下がみられることなどがあげられている。しかし，なぜ肥満によってそれらの現象が発現してくるかについては不明な点が多い。

ob／obマウスは，常染色体劣性遺伝により肥満及び糖尿病を発現するモデル動物として広く知られているが，1994年，ポジショナルクローニング法によってob／ob マウスの病因遺伝子とされる肥満(ob)遺伝子がクローニングされた。ob遺伝子にコードされる蛋白は脂肪組織のみから分泌される分泌蛋白であり，ob／ob マウスではob遺伝子変異のために正常な蛋白が発現していないことが判明した。さらに，ob／ob マウスにob蛋白を投与すると，摂食量と体重が減少し，高インスリン血症や高血糖が改善することも報告された。そこで我々はヒトob遺伝子の変異が糖尿病や肥満の発症に関与しているかを検討する目的で，ヒトobゲノム遺伝子を単離し，PCR-SSCP（polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism）法を用いてNIDDM 患者におけるob遺伝子多型を解析した。

II. 方　法

対象：88人のNIDDM患者(男性34人，女性54人）のうち，BMI（body mass index）25kg／㎡以上を肥満型，25kg／㎡未満を非肥満型と分類した。肥満型は54人（男性20人，女性34人，平均 BMI 29.2kg／㎡），非肥満型は34人（男性14人，女性20人，平均BMI 21.8kg／㎡）であった。また BMI 25kg／㎡以上で，疾病を有さない単純性肥満患者34人（男性13人，女性21人，平均BMI 31.9kg／㎡）

をコントロールグループとした。さらに，他の人種を検討するために，インド人27人（男性14人，女性13人）を対象に加えた。そのうちわけは，肥満型21人（男性10人，女性11人，平均BMI 31.8kg／㎡），非肥満型6人（男性4人，女性2人，平均BMI 22.2kg／㎡）であった。糖尿病の診断はWHOの75gOGTT診断基準に準じ，全患者からインフォームドコンセントを得た。

ヒト肥満遺伝子の単離：3T3-L1 adipocyteからAGPC（acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform）法にて抽出したtotalRNAに対し，RT(reverse transcription)-PCR法を用いてマウスob cDNAのアミノ酸コード領域を単離した。このマウスob cDNAをプローブに用いてヒトゲノムラブラリーよりスクリーニングを行い，1つの陽性クローンを得た。抽出されたヒトゲノム遺伝子を制限酵素XhoI, BamHIにて消化したところ，各々6，3.4，1.9kbの3つのフラグメントが得られ，サザンブロット法を用いてob遺伝子のアミノ酸コード領域を含む3.4kbのフラグメントを同定した。

肥満遺伝子多型解析（PCR-SSCP）：ob遺伝子のアミノ酸コード領域を3ケ所に分割して増幅すべく，PCR-SSCP用の特異的プライマーを3セット作製した。DNA多型解析の感度を高めるため，1つのPCR産物は200-250塩基となるように設定した。対象の白血球から抽出したゲノムDNA50ngをテンプレートとし，ラベルしたプライマーを用いてPCRを行い，その産物を10％グリセロールを含む5％ポリアクリルアミドゲル，10％グリセロールを含まないゲル，及び室温，4℃の4条件にて泳動を行った。

Ⅲ．結　果

ヒト肥満遺伝子の単離：3T3-L1adipocyteから得られたマウスob cDNAのアミノ酸コード領域をプローブとしてヒトゲノムDNAライブラリーをスクリーニングしたところ，約5×10^5PFU（plaque-fromation unit）のうち陽性クローンが1つ得られた。このヒトゲノムDNAを制限酵素で消化して3つのフラグメントに分け，マウスob cDNAをプローブとしてサザンブロットを行ったところ，3.4kbのフラグメントにのみ強いシグナルを認めた。このフラグメントに対してパーシャルシークエンスを行い，ヒトob遺伝子のアミノ酸コード領域が全て含まれていることを確認した。我々の単離したヒトobゲノム遺伝子は167個のアミノ酸をコードし，N末に21アミノ酸よりなるシグナル配列を含んでいた。塩基レベルでマウスcDNAと83％の相同性を有し，既報のヒトcDNAと100％同一であった。アミノ酸コード領域は，約2.4kbのイントロンによって144塩基と360塩基に二分されており，我々はイントロンを含めてアミノ酸コード領域近傍の非コード領域の塩基配列をも同定した。

ヒト肥満遺伝子多型解析：PCR-SSCP法を用いて，88人の日本人NIDDM患者，34人の日本人単純性肥満患者，27人のインド人NIDDM患者に対してob遺伝子アミノ酸コード領域の多型を解析した。アミノ酸コード領域の全長を増幅するため，PCR-SSCP用プライマーは，非コード領域に設定した。さらに，多型解析の感度を高めるため，360塩基のコード領域に関しては2つのPCR産物に分けて増幅した。4条件で泳動を行ったところ，日本人対象のうち2検体で僅かなバンドのずれ，すなわち多型が疑われたため，PCR産物のトータルシークエンスを行ったが変異は同定されず，artifactと考えられた。結果的に，肥満型NIDDM患者，非肥満型NIDDM患者，単純性肥満患者のいずれにおいても異常泳動パターンは認められず，多型は検出されなかった。さらに，他人種におけるob遺伝子多型を検討するためインド人NIDDM患者27人（肥満型21人，非肥満型6人）を解析したが，多型は認められなかった。

Ⅳ. 考　察

本研究において我々は，ヒトobゲノム遺伝子を単離し，そのアミノ酸コード領域における遺伝子多型を日本人NIDDM 患者，日本人単純性肥満患者，インド人NIDDM患者を対象として解析した。この手法が確立されたことにより，今後あらゆるタイプのNIDDM患者ならびに肥満患者での遺伝子多型解析が可能になると考えられた。

肥満の有無によらず，ヒトob蛋白コード領域の遺伝子変異を持つNIDDM患者は一人も発見されなかった。さらに，日本人単純性肥満患者においても変異は同定されなかった。別の研究では，ヒト肥満患者の脂肪組織において，ob mRNAの発現量は対照群よりも増加していることが報告されており，むしろヒト肥満患者ではob蛋白に対する感受性の低下が示唆されている。しかし，ヒトNIDDMや肥満の発症においてob遺伝子変異が寄与している可能性が否定されたわけではなく，特殊な家系や特殊な人種においてはその可能性も充分に考えられる。

ob／obマウスにはC57BL6／J ob／ob と SM／Ckc-＋^{Dac}ob^{2J}／ob^{2J} の２種が同定されており，C57BL6／J ob／obマウスは，CからTへの一塩基置換により105番目のアルギニンが終止コドンに変わるナンセンス変異を持つ。一方，SM／Ckc-＋^{Dac}ob^{2J}／ob^{2J}マウスの脂肪組織にはob mRNAが検出されず，この形質はob遺伝子の転写開始点の約7kb上流に存在するBglⅡ部位の多型性と一致することからプロモーター領域の異常であることが推察される。よって，ヒトにおいてもob遺伝子プロモーター領域における多型解析が今後の課題の一つとなろう。また，ob／obマウス同様，常染色対劣性遺伝により肥満及び糖尿病を発現する別のモデル動物としてdb／dbマウスも有名であるが，ob蛋白をdb／dbマウスに投与しても摂食量や体重の減少がみられないことより，ob蛋白受容体異常を有すると考えられている。ob蛋白受容体遺伝子も，肥満，糖尿病の病因遺伝子の候補になると考えられる。

Ⅴ. 結　論

ヒトob遺伝子のアミノ酸コード領域における変異が，肥満，糖尿病の主因ではないことが示唆された。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

インスリン非依存型糖尿病（ＮＩＤＤＭ）は，インスリン作用の不足，すなわちインスリン分泌の低下やインスリン感受性の低下により生ずる糖代謝異常であるが，そのうちのインスリン抵抗性をもたらす重要な一因子として古くから肥満が注目されてきた。ＮＩＤＤＭの発症には遺伝因子と環境因子が関与するが，肥満自体の発症にもまた遺伝因子と環境因子が関与することが明らかになりつつある。肥満に関連する遺伝子研究のbreakthroughとなった肥満遺伝子（ob 遺伝子）は，肥満，糖尿病モデル動物として有名なob／ob のマウスの病因遺伝子であり，ob遺伝子にコードされる蛋白レプチンは脂肪組織のみから分泌される分泌蛋白で，摂食抑制やエネルギー調節を行うことが知られている。本研究においては，ヒトobゲノム遺伝子を単離し，ヒトob遺伝子の変異が肥満やNIDDMの発症に関与しているかを検討した。

3T3-L1 adipocyteから，RT-PCR法を用いてマウスob cDNAのアミノ酸コード領域を単離した。このマウスob cDNAをプローブに用いてヒトゲノムライブラリーをスクリーニングし，得られたクローンに対してパーシャルシークエンスを行ったところ，ヒトob遺伝子のアミノ酸コード領域が全

て含まれていることが確認された。単離されたヒトobゲノム遺伝子は167個のアミノ酸をコードし，N末に21アミノ酸よりなるシグナル配列を含んでいた。アミノ酸コード領域は，約2.4kbのイントロンによって144塩基と360塩基に二分されており，未発表であるイントロンやエクソン内アミノ酸非コード領域の塩基配列も同定された。

日本人対象として，肥満型NIDDM患者54人，非肥満型NIDDM患者34人，単純性肥満患者34人に対してPCR-SSCP（polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism）法を用いて多型解析を行った。アミノ酸コード領域の全長を増幅するため，PCR-SSCP用プライマーは非コード領域に設定し，また多型解析の感度を高めるため，360塩基のコード領域に関しては２つのPCR産物に分けて増幅した。PCR産物の泳動を４条件で行ったところ，２検体で僅かなバンドのずれ，すなわち多型が疑われたが，トータルシークエンスにて変異は同定されず，artifactと考えられた。その他に異常泳動パターンは認められす，多型は検出されなかった。

他民族における遺伝子変異の有無を調べるため，インド人肥満型NIDDM患者21人，非肥満型NIDDM患者６人に対しても同様の多型解析を行ったが，異常泳動パターンは認められなかった。以上より，ヒトob遺伝子変異が肥満，NIDDM発症の主たる原因ではないことが推測された。

本研究は，ヒトob遺伝子について，そのゲノム塩基配列を明らかにし，肥満及びNIDDM発症との関連性を研究したものであるが，従来ほとんど行われなかったヒトob遺伝子変異について重要な地見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって，本研究者は，博士（医学）の学位を得る資格があると認める。