



Lack of association of CPT1A polymorphisms or haplotypes on hepatic lipid content or insulin resistance in Japanese individuals with type 2 diabetes mellitus

廣田, 勇士

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2007-09-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲4064

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1004064>

※ 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。



氏 名 廣田 勇士
博士の専攻分野の名称 博士（医学）
学 位 記 番 号 博い第 1866 号
学位授与の 要 件 学位規則第 5 条第 1 項該当
学位授与の 日 付 平成 19 年 9 月 25 日

【 学位論文題目 】

Lack of association of CPT1A polymorphisms or haplotypes onhepatic lipid content or insulin resistance in Japanese individualswith type 2 diabetes mellitus (日本人 2 型糖尿病患者における CPT1A 遺伝子と肝細胞内脂肪含量およびインスリン抵抗性との関連解析)

審 査 委 員

主 査 教 授 松尾 雅文
教 授 横野 浩一
教 授 林 祥剛

はじめに

2型糖尿病の発症には、インスリン抵抗性が関与している。インスリン抵抗性には遺伝因子も関与していると考えられているが、その詳細の多くはいまだ不明である。

近年、NMR (nuclear magnetic resonance) を用いて臓器内脂肪蓄積を非侵襲的に評価することができるようになり、骨格筋や肝臓における脂肪蓄積とインスリン抵抗性との関連が注目されている。肝臓における脂肪蓄積は、脂肪肝 (fatty liver や hepatic steatosis) として広く知られており、インスリン抵抗性に関与していることが知られている。肝細胞内脂肪は、供給された脂肪酸が肝細胞内でエステル化をうけ中性脂肪となり蓄積したものである。肝細胞へ供給された脂肪酸は、細胞内に蓄積されるか細胞外へ VLDL として放出される。また脂肪酸はミトコンドリアに輸送されると、 β 酸化をうけエネルギー産生へ働く。以上より、ミトコンドリアでの β 酸化は肝細胞内脂肪蓄積にとって重要な要素であると思われる。

Calnitine palmitoyltransferase(CPT)1 はミトコンドリア外膜に存在し、アシルCoA (脂肪酸) をミトコンドリアに輸送するための必須の酵素であり、ミトコンドリアでの脂肪酸酸化における律速的な役割を果たしている。CPT1 には異なった遺伝子でコードされた 3 種類の isoform があり、広く発現しているが肝臓に最も多く発現している CPT1A(L-CPT1)、主に筋肉に発現している CPT1B (M-CPT1)、脳に発現している CPT1C が存在する。以上より、CPT1A は肝臓における脂肪酸酸化において重要な役割を果たす分子であると思われる。CPT1A 遺伝子 (*CPT1A*) は 11q13.1-13.5 に存在する 19 個の exon からなる遺伝子であり、その遺伝子変異は CPT1A 欠損症として 30 症例以上の報告があり、低ケトン性低血糖や脂肪肝を伴うことが報告されている。

以上より、*CPT1A* は脂肪肝を伴うインスリン抵抗性のような代謝異常の候補遺伝子である。我々は、*CPT1A* の多型と肝細胞内脂肪含量 (hepatic lipid content:HLC) あるいはインスリン抵抗性あるいは 2 型糖尿病との関連解析を行った。

方法

324 人の 2 型糖尿病患者 (男性 176 人、女性 148 人; 年齢 62.4 ± 10.7 歳; BMI $24.1 \pm 3.8 \text{kg/m}^2$; HbA1c $8.0 \pm 1.9\%$) と 300 人の非糖尿病対照者 (男性 139 人、女

性 161 人; 年齢 74.6 ± 8.0 歳; BMI $21.6 \pm 3.6 \text{kg/m}^2$; HbA1c $5.0 \pm 0.4\%$) を対象とした。非糖尿病対照者は 60 歳以上で耐糖能異常を指摘されたことがなく、HbA1c が 5.6% 以下、糖尿病の家族歴を認めないことを条件とした。空腹時血糖(FPG)、空腹時血清インスリン濃度(FIRI)、血清脂質濃度、HbA1c の臨床パラメーターは、血清より測定した。インスリンおよび脂質治療薬で治療されていない 2 型糖尿病患者 87 人 (男性 51 人、女性 36 人) については、HOMA-IR (homeostasis model assessment for insulin resistance; $[FPG (\text{mmol l}^{-1}) \times FIRI (\mu\text{U ml}^{-1})] / 22.5$) でインスリン抵抗性を評価し、NMR (nuclear magnetic resonance) を用いて肝細胞内脂肪含量 (HLC) を評価した。なお対象者は、書面による同意をした後、研究に参加した。またこの研究は、神戸大学医学部の倫理委員会の承認を得ている。

対象者のDNAはQIAamp DNA Blood Maxi Kitをもじいて血液より抽出した。*CPT1A* の全exon領域 (exon intron境界領域を含む) と上流 1000bpについて、22 人の糖尿病患者のDNAを用いて、PCR direct sequence法により遺伝子多型の検索を行った。同定された 12 個の一塩基多型 (SNP) とデータベースから選んだ 7 個のSNPを、Taqman法あるいはIntercalator mediated FRET Probe(IFP)法でタイプングした。関連解析、連鎖不平衡解析およびハプロタイプ解析は、SNPalyze version 5.0 Pro softwareを用いて行った。関連は χ^2 検定により評価し、連鎖不平衡は非糖尿病対照者 86 人のタイプング結果をD'により評価した。遺伝子型およびハプロタイプについての、臨床パラメーターの群間比較はStat-View program(version 5.0-J)を用い、Kruskal-Wallis testにより評価した。P<0.05 を統計的に有意と判断した。

結果

CPT1A 領域に 19 個の SNP (SNP1～SNP19) を同定した (図 1、表 1)。22 人のタイプングにより絶対連鎖不平衡の関係にあることが判明した 4 グループの SNP については、代表して 1SNP を連鎖不平衡解析に用いることとした。非糖尿病患者 86 人で合計 13SNP (図 1 □印) のタイプングを行ったが、SNP15 は Hardy-Weinberg 平衡を満たさなかったため、これ以降の解析には用いなかった。連鎖不平衡解析を行ったが、SNP8 (intron 5) と SNP17 (intron 14) の間が強い連鎖不平衡ブロックであった (図 2)。連鎖不平衡ブロック内の 7SNP は 5 つのコモンなハプロタイプ (*ht1*～*ht5*) を形成し、そのハプロタイプは 4 つの tag SNP で代表されるこ

とが分かった(表2)。そこで、これら4つのtag SNP(SNP8, SNP9, SNP12, SNP16)と連鎖不平衡ブロック外に存在する5SNP(SNP1, SNP4, SNP5, SNP6, SNP19)の計9SNPについて、対象すべてのタイピングを行い、SNPおよびハプロタイプと2型糖尿病との関連解析を行ったが、いずれも有意な関連を認めなかつた(図3)。

次に、我々はこれら5つのコモンハプロタイプ(*ht1*~*ht5*)が、HLC、HOMA-IR、血清中性脂肪値に及ぼす影響について、これらを評価している87人の2型糖尿病患者において解析を行つた。*ht2*がHOMA-IRとの間に弱い関連の傾向を認めた($P=0.066$)が、HLC($P=0.34$)や血清中性脂肪値($P=0.97$)とは有意な関連を示さなかつた(図4)。また、この弱い関連について、さらに149人の2型糖尿病患者において解析を行つたが、有意な関連を認めなかつた($P=0.29$)。偽陰性を避けるため、9SNP(図1*印)についてHLCおよびHOMA-IRとの関連を検討したが、いずれも有意な関連を認めなかつた。

考察

我々が行った日本人2型糖尿病患者における関連解析では、*CPT1A*遺伝子領域のSNPおよびハプロタイプと2型糖尿病、インスリン抵抗性(HOMA-IR)、肝細胞内脂肪含量(HLC)との有意な関連は認めなかつた。

*CPT1A*の変異は30以上報告されているが、遺伝子多型の関連解析は初めての報告である。コモンな多型を検出するには十分と考えられる22人のDNAを用いて、*CPT1A*の全exonについて多型のスクリーニングを行つたが、coding領域では、exon11内にアミノ酸変化を来たさないSNPを同定したのみであった。

*CPT1A*領域において19個のSNPを解析したが、平均4.8Kbに1SNPの割合で87Kbの領域をカバーしたことになる。比較的小規模な解析でありType 2 errorを避けるために、より有効な解析と思われたハプロタイプを用いた解析を行つたが、有意な関連は認めなかつた。

2型糖尿病やインスリン抵抗性の病態に関係する遺伝子を同定するためには、遺伝子多型とHLCのような臨床的パラメーターとの関連を解析することは重要である。我々は、以前にUCP1遺伝子多型がインスリン抵抗性やHLCと関連することを報告した。また、ADIPO1遺伝子やLIPC遺伝子のSNPがHLCと関連していることが他のグループから報告されており、これらの多型がHLCの遺伝的決定因子の一つとして、マーカーとなる可能性を示唆している。

ミトコンドリアでの脂肪酸 β 酸化は肝細胞内脂肪蓄積にとって重要な要素で

あり、その律速段階であるCPT1Aの活性が変化することは、HLCや血清中性脂肪値に影響を与える。この解析では、*CPT1A*遺伝子多型とHLC、血清中性脂肪値とに関連を認めなかつたが、この結果は*CPT1A*^{+/+}マウスがHLCや血清脂質で変化を認めないと合致するように思える。

結論として、*CPT1A*遺伝子領域のSNPおよびハプロタイプと、2型糖尿病、インスリン抵抗性(HOMA-IR)、肝細胞内脂肪含量(HLC)との有意な関連は認めなかつた。しかし、HLCという詳細な臨床パラメーターを用いた比較的小規模な解析であったため、ヒトにおける*CPT1A*遺伝子多型の役割を明らかにするためには、大規模解析や正常耐糖能者での解析など、さらなる解析が必要である。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲第1868号	氏名	廣田 勇士
論文題目	<p>Lack of association of CPT1A polymorphisms or haplotypes on hepatic lipid content or insulin resistance in Japanese individuals with type 2 diabetes mellitus</p> <p>日本人 2型糖尿病患者における CPT1A 遺伝子と肝細胞内脂肪含量およびインスリン抵抗性との関連解析</p>		
審査委員	主査 松尾 雅文 副査 横野 浩一 副査 林 祥園		
審査終了日	平成 19 年 7 月 18 日		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

2型糖尿病の発症には、インスリン抵抗性が関与している。インスリン抵抗性には遺伝因子も関与していると考えられているが、その詳細の多くはいまだ不明である。近年、NMR (nuclear magnetic resonance) を用いて臓器内脂肪蓄積を非侵襲的に評価することができるようになり、骨格筋や肝臓における脂肪蓄積とインスリン抵抗性との関連が注目されている。肝臓における脂肪蓄積は、脂肪 (fatty liver や hepatic steatosis) として広く知られており、インスリン抵抗性に関与していることが知られている。

Calnitine palmitoyltransferase(CPT)1 はミトコンドリア外膜に存在し、アシル CoA (脂肪酸) をミトコンドリアに輸送するための必須の酵素であり、ミトコンドリアでの脂肪酸酸化における律速的な役割を果たしている。CPT1A は脂肪肝を伴うインスリン抵抗性のような代謝異常の候補遺伝子の 1 つである。本研究は、CPT1A 遺伝子の多型と肝細胞内脂肪含量 (hepatic lipid content:HLC) あるいはインスリン抵抗性あるいは 2型糖尿病との関連解析を行った。

方法

324 人の 2型糖尿病患者 (男性 176 人、女性 148 人) と 300 人の非糖尿病対照者 (男性 139 人、女性 161 人) を対象とした。空腹時血糖 (FPG)、空腹時血清インスリン濃度 (FIRI)、血清脂質濃度、HbA1c の臨床パラメーターは、血清より測定した。インスリンおよび脂質治療薬で治療されていない 2型糖尿病患者 87 人 (男性 51 人、女性 36 人) については、HOMA-IR (homeostasis model assessment for insulin resistance: [FPG (mmol l⁻¹) × FIRI (μU ml⁻¹)] / 22.5) でインスリン抵抗性を評価し、NMR (nuclear magnetic resonance) を用いて肝細胞内脂肪含量 (HLC) を評価した。対象者の CPT1A の全 exon 領域 (exon intron 境界領域を含む) と上流 1000bp について、22 人の糖尿病患者の DNA を用いて、PCR direct sequence 法により遺伝子多型の検索を行った。同定された 12 個の一塩基多型 (SNP) とデータベースから選んだ 7 個の SNP を、Taqman 法あるいは Intercalator mediated FRET Probe (IPF) 法でタイピングした。関連解析、連鎖不平衡解析およびハプロタイプ解析は、SNPAlyze version 5.0 Pro software を用いて行った。関連は χ^2 検定により評価し、連鎖不平衡は非糖尿病対照者 86 人のタイピング結果を D' により評価した。遺伝子型およびハプロタイプについての、臨床パラメーターの群間比較は Stat-View program (version 5.0-J) を用い、Kruskal-Wallis test により評価した。P<0.05 を統計的に有意と判断した。

結果

CPT1A 遺伝子領域に 19 個の SNP (SNP1～SNP19) を同定した。SNP およびハプロタイプと 2 型糖尿病との関連解析を行ったが、いずれも有意な関連を認めなかった。次に、5 つのコモンハプロタイプ (*ht1*～*ht5*) が、HLC、HOMA-IR、血清中性脂肪値に及ぼす影響について、これらを評価している 87 人の 2 型糖尿病患者において解析を行った。*ht2* が HOMA-IR との間に弱い関連の傾向を認めた ($P=0.066$) が、HLC ($P=0.34$) や血清中性脂肪値 ($P=0.97$) とは有意な関連を示さなかった。また、この弱い関連について、さらに 149 人の 2 型糖尿病患者において解析を行ったが、有意な関連を認めなかった ($P=0.29$)。

本研究は、日本人 2 型糖尿病について、その *CPT1A* 遺伝子多型との関連解析を初めて実施したもので、2 型糖尿病の発症関連因子の解明において重要な知見を得たものとして価値ある集績と認める。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。