

機関番号：12102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20591216

研究課題名（和文）IGFBP-1 遺伝子多型が身長発育およびインスリン感受性に及ぼす影響に関する研究

研究課題名（英文）The association of IGFBP-1 gene polymorphism with height growth and insulin sensitivity

研究代表者

鴨田 知博（KAMODA TOMOHIRO）

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・准教授

研究者番号：50224704

研究成果の概要（和文）：特発性低身長の中には IGF (Insulin-like growth factor)-I と IGF binding protein (IGFBP)-1 との結合能が増強している例が存在するのではないかという仮説のもとに IGFBP-1 遺伝子の A4403G 多型を解析したが、遺伝子型によって血中 IGFBP-1 および Free IGF-I 値に有意差は認められず、IGFBP-1 の IGF-I に対する結合能に影響を与えるとされている A4403G 多型は身長発育への関与が少ないものと推測された。

研究成果の概要（英文）：IGFBP-1 gene polymorphism (A4403G) was analyzed in children with idiopathic short stature and the association of its genotype with blood IGFBP-1 or free IGF-I levels was evaluated. The results showed no significant association between A4403G genotype and blood free IGF-I levels, suggesting that the differences in the binding ability of IGFBP-1 for circulating IGF-I was unlikely to explain the etiology of idiopathic short children.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009 年度	500,000	150,000	650,000
2010 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	2,100,000	630,000	2,730,000

研究分野：小児内分泌学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：遺伝子、内科、臨床

## 1. 研究開始当初の背景

(1) Insulin-like growth factor (IGF)-I は、成長ホルモン (GH) の作用を仲介して細胞増殖を促進する生体内の重要な成長因子である。GH 分泌不全による血中 IGF-I 濃度の低下は身長発育を障害し低身長を来す。胎児期においては IGF-I の分泌および活性の低下が子宮内発育不全の原因となる。IGF-I には結合蛋白 (IGFBP-1～6) が存在し、血中 IGF-I 濃度は、この結合蛋白によって調節され、その作用が修飾されている。すなわち、総 IGF-I

の 90%以上が GH 依存性である IGFBP-3 と結合した状態で存在し、1～2%を占める遊離 IGF-I が GH 非依存性に IGFBP-1 と結合して標的器官まで運搬され、IGF-I 活性を発揮している。従って、血中 IGFBP-1 濃度や IGFBP-1 の IGF-I に対する結合能の変化が IGF 活性 (bioavailability) に影響を与える。IGFBP-1 は肝臓で産生され、門脈中のインスリン濃度によって産生量が調節されている (Lee et al. 1997)。

(2) IGF-I 遺伝子および IGF-I 受容体遺伝子の変異や遺伝子多型による成長障害は報告されているが、IGFBP-1 遺伝子異常による成長障害は知られていない。しかし、IGFBP-1 を過剰発現させたトランスジェニックマウスは成長障害を来たことが報告されている (Rajkumar et al. 1995, Watson et al. 2006)。

(3) IGFBP-1 遺伝子の A4403G 多型は遺伝子の C 末端側に位置し、塩基が A から G に変わることによってアミノ酸もイソロイシンからメチオニンに変わり翻訳後の IGFBP-1 蛋白にも変化が生ずるものと想定されている。また、この多型のごく近傍には細胞接着やシグナル伝達を介在するインテグリンと結合する RGD (Arg-Gly-Asp) モチーフが位置している。

(4) 2 型糖尿病の成人例において、IGFBP-1 遺伝子多型 (A4403G) が糖尿病性腎症の発症抑制に有意に関連していることが明らかにされ、腎での IGF-I の発現や活性が低下し、糖尿病合併症である腎症の発症を抑制するものと推測されている (Stephens et al. 2005)。

(5) 特発性低身長症は heterogeneous な疾患群で、多様な原因が存在するものと考えられている。特発性低身長児の中には、IGFBP-1 高値によって IGF-I 活性が低下し、低身長を来した症例が報告されているが、高 IGFBP-1 血症の発症機序は不明である (Laron et al. 1992, Lindgren et al. 1996)。本研究では特発性低身長児と正常小児において血中 total および free IGF-I、IGFBP-1、IGFBP-3、insulin を測定し、低身長児の遊離 IGF-I は正常対照に比べて有意に低く、IGFBP-1 は正常対照に比べて有意に高いことを報告した (Kamoda et al. Clin Endocrinol. 2000)

(6) 日本人における IGFBP-1 遺伝子多型 (A4403G) の頻度は、現在まで報告がない。

(7) 耐糖能やインスリン感受性の評価法として経口ブドウ糖負荷試験 (OGTT) が広く行われているが、低年齢小児において頻回に行うことは侵襲が大きいと考えられる。本研究でも前思春期肥満小児を対象にした検討で IGFBP-1 値が空腹時インスリン値よりも OGTT におけるインスリンの AUC (Area under the curve) とより強い負の相関関係にあることを報告した (Saitoh et al. Eur J Endocrinol 1999)。最近、Maddux らは健康成人を対象に Euglycemic insulin clamp 法を施行し、空腹時インスリンや HOMA-R に比較して血中 IGFBP-1 が Glucose disposal rate と最も強い相関関係にあり、IGFBP-1 がインスリン感受性を反映する良好な指標になり

うることを改めて報告した (Diabetes Care 2006)。

## 2. 研究の目的

(1) 正常日本人における IGFBP-1 遺伝子多型 (A4403G) の頻度を知るために臍帯血を用いて IGFBP-1 遺伝子の解析を行う。IGFBP-1 遺伝子多型が IGFBP-1 蛋白の産生量や IGF-I との結合能を遺伝的に規定し、一部の子宮内発育不全や原因不明の低身長症を説明できる可能性があり、A4403G 多型と胎内発育の指標である出生体重との関係を検討する。

(2) 特発性低身長症の一部の症例における高 IGFBP-1 血症や IGF-I 活性の低下の原因を解明するために特発性低身長症児において IGFBP-1 遺伝子の 1 塩基多型 (SNP4403) を解析し、genotype 別に IGFBP-1 の血中濃度および IGFBP-1 の IGF-I に対する結合能 (血中 Free IGF-I) との関連について検討する。さらに各 genotype とインスリン感受性の指標との関連についても検討する。

(3) SGA (small-for gestational age) 性低身長症の発症機序を解明することを目的に血中 IGFBP-1 および Free IGF-I を測定し、AGA (Appropriate-for gestational age) で出生した特発性低身長児と比較検討する。

## 3. 研究の方法

(1) 正常日本人における IGFBP-1 遺伝子多型 (SNP4403) の頻度と多型の胎内発育に及ぼす影響に関する検討

① 対象：インフォームドコンセントの得られた正常妊婦 283 名の臍帯血。在胎 35 週以上かつ出生体重 2,000g 以上の新生児 283 例を対象とした。胎児発育に明らかに影響を及ぼす母体高血圧、糖尿病、薬物服用者、喫煙者、多胎の例は対象から除外した。妊婦からインフォームドコンセントを得て、筑波大学倫理委員会の承認のもとに本研究を行った。

② 方法：臍帯血から Genomic DNA を抽出し、IGFBP-1 遺伝子多型を決定する。IGFBP-1 遺伝子多型 (A4403G) を特異的に検出する primer を用いた Taqman SNP Genotyping Assays で SNP の解析を行う (Brinkman et al. 1988, Stephens et al. 2005)。各 genotype 別に性別、在胎週数、出生体重、出生体重 SD スコア、出生身長、頭囲、胎盤重量について比較検討した。

(2) 特発性低身長児における IGFBP-1 遺伝子多型 (A4403G) の頻度と血中 IGFBP-1、Free IGF-I およびインスリン感受性との関連についての検討

① 対象：筑波大学附属病院小児科外来でフォ

ローされている特発性低身長症児 112 名。特発性低身長症は Ranke らの診断基準 (1996) を採用し、既知の成長障害の原因を除外した。全例-2.0 SD 以下の前思春期の低身長児で、身長発育に影響を及ぼす全身疾患や栄養障害はなく、GH 分泌不全は認められなかった。患者および保護者からインフォームドコンセントを得て、筑波大学倫理委員会の承認のもとに本研究を行った。

②方法：早朝空腹時に採血し、血清を分離し測定まで-80℃に凍結保存した。血中 IGFBP-1、Total IGF-I、Free IGF-I を ELISA 法 (いずれも Diagnostic System Laboratory 社製) で測定した。空腹時血糖は、グルコースオキシダーゼ法で、血中インスリンは ELISA 法で測定した。HOMA-IR は Homeostasis model assessment 法 (HOMA-CIGMA Calculator Program, Diabetes Research Laboratory, Oxford, UK) で計算する (Matthews et al, Diabetologia 1985)。IGFBP-1 遺伝子多型 (A4403G) に関しては、末梢血由来の Genomic DNA を用いて IGFBP-1 遺伝子のエクソン 4 領域を PCR 法で増幅した後、ダイレクトシーケンシング法で塩基配列を決定した。

(3) SGA 性低身長症における血中 IGFBP-1 および Free IGF-I に関する検討

①対象：筑波大学附属病院でフォローされている SGA 性低身長症児 31 名。在胎 35 週以上で出生体重が-1, 5SD 以下の SGA 児で、染色体異常や奇形症候群、成長に影響を及ぼす疾患を有するものは除外した。AGA で出生した特発性低身長児 46 名を対照とした。

②方法：特発性低身長児における検討と同様の方法を用いた。

#### 4. 研究成果

(1) 正常日本人における IGFBP-1 遺伝子多型 (SNP4403) の頻度と多型の胎内発育に及ぼす影響に関する検討

正常妊婦 (283 人) の臍帯血の IGFBP-1 遺伝子多型 (A4403G) の genotype 別頻度は A/A : A/G : G/G = 81 (29%) : 154 (54%) : 48 (17%)。この比率は Hardy-Weinberg の法則を満たしていた。G/G 群と A/G 群との間で出生体重について有意差が認められたが、在胎週数で修正すると有意差は認められなくなった。G/G 群と A/A 群との間で出生体重に差はなかった。そのほか 3 群間で性別、在胎週数、出生体重 SD スコア、出生身長、頭囲、胎盤重量に差を認めなかった。また、A がホモまたはヘテロ (A/A + A/G 群) と G がホモ (G/G 群) の 2 群間で比較しても上述した各パラメータに差はなかった (表 1)。以上のことから IGFBP-1 遺伝子多型 (A4403G) は、胎内発育に影響を及ぼす遺伝的因子ではない

と考えられた。

文献的に白人での IGFBP-1 遺伝子多型 (A4403G) の genotype 別頻度は A/A : A/G : G/G = 183 (35%) : 251 (48%) : 85 (17%) と報告されており (Stephens RH et al. 2005)、今回の日本人の genotype 別頻度と大差はないものと考えられ、A4403G 多型には人種差はないものと推測された。

表 1. 正常妊婦臍帯血の A4403G 頻度および胎内発育関連パラメータ

	A/A	G/A	G/G
N	81	154	48
男 : 女	45 : 36	80 : 74	25 : 23
在胎週数 (週)	39.3 (1.4)	38.9 (1.6)	39.2 (1.4)
出生体重 (g)	2976 (379)	2916 (415)	3050 (380)
出生体重 SDS	-0.1 (0.8)	-0.1 (0.8)	0.1 (0.8)
出生身長 (cm)	48.4 (2.2)	47.9 (2.3)	48.6 (2.2)
頭囲 (cm)	33.2 (5.1)	33.2 (5.3)	33.4 (6.5)
胎盤重量 (g)	568 (125)	586 (119)	594 (114)

mean (SD)

(2) 特発性低身長児における IGFBP-1 遺伝子多型 (A4403G) の頻度と血中 IGFBP-1、Free IGF-I およびインスリン感受性との関連

特発性低身長児 112 人 (平均 6.4 ± 2.9 歳) の IGFBP-1 遺伝子多型 (A4403G) の genotype 別頻度は A/A : A/G : G/G = 41 (37%) : 57 (51%) : 14 (12%)。この比率は Hardy-Weinberg の法則を満たしていた。3 群間で年齢、性別、在胎週数、出生体重、出生体重 SD スコア、検査時身長、身長 SD スコア、体重、BMI (Body mass index)、骨年齢、Total IGF-I、Free IGF-I、IGFBP-1、空腹時血糖、血中インスリン、HOMA-IR に差を認めなかった。また、A がホモまたはヘテロ (A/A + A/G 群) と G がホモ (G/G 群) の 2 群間で比較しても上述した各パラメータに差はなく、G/G 群で Free IGF-I が低く、IGFBP-1 が高い傾向が見られるものの Total IGF-I を含め統計学的に有意差を認めなかった (表 2)。特発性低身長における A4403G の genotype 別頻度は、正常日本人の各頻度に比べて A/G と G/G が低頻度であった。

特発性低身長の中には IGFBP-1 と IGF-I との結合能が増強している例が存在するのではないかという仮説のもとに本研究を行ったが、G/G 型の genotype を有する低身長児での Free IGF-I 値は A/A 型や A/G 型に比

較して有意差は認められず、IGFBP-1 の IGF-I に対する結合能が増強しているという結果は得られなかった。組織レベルでの IGF-I 活性の低下が全身の血中 Free IGF-I レベルで反映されるか否かについては検討を要する。今後、対象数を増やして検討する必要があると思われた。また、A4403G 多型以外の IGFBP-1 蛋白のリン酸化や Proteolysis を調節すると想定されている既知の SNPs (G-575A, T555C, A643G, T2877C, A3963G, C4332T, A5881G) についても同様の解析を要するものと考えられた。

表 2. A4403G の genotype 別低身長児背景および IGF 関連パラメータ

	A/A	G/A	G/G
N	41	57	14
年齢 (歳)	6.6 (2.9)	6.0 (2.7)	6.7 (3.2)
男:女	21:20	30:27	9:5
在胎週数 (週)	37.6 (4.5)	39.1 (3.7)	37.9 (1.3)
出生体重 (g)	2484 (882)	2446 (783)	2815 (514)
身長 (cm)	100.8 (15.7)	100.2 (14.9)	109.1 (17.2)
身長 SDS	-2.8 (0.8)	-2.6 (0.8)	-2.7 (0.5)
体重 (kg)	15.6 (5.1)	15.6 (5.3)	18.6 (6.5)
BMI	15.0 (1.6)	15.1 (1.3)	15.2 (1.3)
骨年齢 (歳)	4.6 (2.2)	4.4 (2.3)	5.2 (3.4)
父身長 (cm)	169.4 (6.1)	165.9 (6.9)	169.5 (8.9)
母身長 (cm)	154.4 (6.6)	152.4 (5.4)	153.2 (7.0)
Total IGF-I (ng/ml)	100.1 (62.2)	91.2 (51.8)	115.8 (42.3)
Free IGF-I (ng/ml)	0.4 (0.6)	0.5 (0.9)	0.2 (0.4)
IGFBP-I (ng/ml)	136.8 (51.7)	140.8 (55.2)	140.3 (57.3)
空腹時血糖 (mg/dl)	87.6 (7.4)	85.4 (7.1)	85.9 (5.6)
Insulin ( $\mu$ U/ml)	3.6 (2.2)	2.8 (1.7)	2.3 (0.9)
HOMA-IR	0.8 (0.5)	0.6 (0.4)	0.5 (0.2)
mean (SD)			

(3) SGA 性低身長症における血中 IGFBP-1 および Free IGF-I は AGA で出生した特発性低身長児と有意差は認められなかった (表 3)。しかし、SGA 性低身長症における Total IGF-I 値は有意に高く、IGF-I 受容体の抵抗性を有する例が含まれている可能性が推測された。SGA で出生した児は一般にインスリン抵抗性を獲得しやすく将来糖尿病をきたしやすいとされているが、SGA 性低身長症における空腹時血糖、インスリン、HOMA-IR は AGA で出生した低身長児と比べて有意差は認められなかった。今後、さらにインスリン抵抗性についてはフォローしていく必要がある。

表 3. AGA で出生した特発性低身長症と SGA 性低身長症との比較検討

	AGA	SGA
N	46	31
年齢 (歳)	5.9 (2.1)	5.8 (2.9)
男:女	32:14	23:8
在胎週数 (週)	37.9 (3.6)	36.4 (4.8)
出生体重 (g)	2723 (667)	1742* (746)
出生体重 SDS	-0.1 (0.9)	-2.4* (0.7)
出生身長 (cm)	46.2 (4.8)	40.3* (6.9)
身長 (cm)	99.2 (11.5)	96.3 (13.9)
身長 SDS	-2.8 (0.5)	-2.9 (0.7)
体重 (kg)	15.1 (3.6)	14.0 (5.4)
BMI	15.2 (1.2)	14.6 (1.7)
Total IGF-I (ng/ml)	79.0 (35.9)	118.4* (89.9)
Free IGF-I (ng/ml)	0.3 (0.4)	0.4 (0.7)
IGFBP-I (ng/ml)	145.1 (53.8)	156.6 (81.0)
空腹時血糖 (mg/dl)	85.4 (7.2)	88 (6.7)
Insulin ( $\mu$ U/ml)	2.3 (1.3)	3.1 (2.3)
HOMA-IR	0.5 (0.3)	0.7 (0.6)
mean (SD)	*p<0.01	

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

- ① 鴨田知博、岩淵 敦、齋藤 誠、宮園弥生、野末裕紀. 低出生体重のSGA性低身長児におけるGH補充療法のインスリン感受性に及ぼす影響に関する研究. 成長科学協会研究年報 2010、第33号、103-107 査読無
- ② 鴨田知博. 特発性低身長症におけるIGFBP-1遺伝子多型に関する研究. 成長科学協会研究年報 2008、第31号、97-100 査読無

〔学会発表〕(計2件)

- ① 野末裕紀、鴨田知博、岩淵 敦、齋藤 誠、宮園弥生. 低出生体重のSGA性低身長児におけるGH補充療法のインスリン感受性に及ぼす影響. 第44回日本小児内分泌学会、2010年10月8日、大阪
- ② 齋藤 誠、鴨田知博、宮園弥生、日高大介、西村一記、中尾 厚、須磨崎亮. 早産時における生後早期の血中アディポネクチンに関する研究. 第113回日本小児科学会学術集会、2010年4月23日、盛岡

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

鴨田 知博 (KAMODA TOMOHIRO)  
筑波大学・大学院人間総合科学研究科・  
准教授  
研究者番号：50224704

### (2) 研究分担者

宮園 弥生 (MIYAZONO YAYOI)  
筑波大学・大学院人間総合科学研究科・  
講師  
研究者番号：30400675