

令和 4 年 5 月 27 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08981

研究課題名(和文) 先天性インスリン抵抗症の原因遺伝子の探索と患者iPS細胞を用いた病態の解析

研究課題名(英文) Search for the causative gene of genetic insulin resistance syndrome and analysis of the pathogenesis using patient iPS cells.

研究代表者

廣田 勇士(Hirota, Yushi)

神戸大学・医学研究科・准教授

研究者番号：80566018

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：近年、SHORT症候群の原因であるPIK3R1遺伝子変異によりインスリン抵抗症を来すことが明らかとなった。

PIK3R1変異によるインスリン抵抗症患者からiPS細胞を樹立し、CRISPR/Cas9を用いて変異を修復した。疾患iPS細胞由来肝細胞ではインスリンによるAktの活性化が抑制されていたが、修復したiPS細胞由来肝細胞では改善していた。

また疾患iPS細胞由来肝細胞ではインスリンによるG6PC発現抑制を認めなかったが、修復iPS細胞由来肝細胞ではインスリンによるG6PC発現抑制が認められ、PIK3R1変異患者のiPS細胞由来肝細胞ではPI3-キナーゼ経路が障害されていることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題において、PIK3R1変異によるインスリン抵抗症患者から患者由来iPS細胞を樹立するとともに、iPS細胞からインスリン作用が評価できる肝細胞へ分化する系を確立した。従来、iPS細胞から肝細胞への分化においては細胞形態や分化マーカーを指標に分化誘導法が検討されてきたが、インスリン反応性を示す肝細胞への分化に成功したという報告はなく、学術的意義は大きい。さらに、PIK3R1変異によるインスリン抵抗症患者の肝細胞では、PI3-キナーゼ経路が障害されていることを明らかとし、PIK3R1遺伝子変異のインスリン作用に対する影響を明らかとした点でも学術的意義は大きいと言える。

研究成果の概要(英文)：Recently, it was shown that the PIK3R1 mutation, which is the cause of SHORT syndrome, causes insulin resistance.

iPS cells were established from patients with insulin resistance due to the PIK3R1 mutation, and the mutation was repaired using CRISPR/Cas9. The hepatocytes derived from diseased iPS cells showed suppression of insulin-induced Akt activation, whereas the restored iPS cell-derived hepatocytes showed improvement. In addition, insulin did not suppress G6PC expression in diseased iPS cell-derived hepatocytes, whereas insulin suppressed G6PC expression in repaired iPS cell-derived hepatocytes, indicating that the PI3-kinase pathway is impaired in iPS cell-derived hepatocytes from patients with PIK3R1 mutations.

研究分野：糖代謝

キーワード：インスリン抵抗症 iPS細胞 CRISPR/Cas9 インスリン受容体遺伝子 PIK3R1遺伝子

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

A型インスリン抵抗症は、インスリン受容体遺伝子の異常により、強いインスリン抵抗性を呈する糖尿病を発症する疾患である。一方、A型様表現型を示すものの、インスリン受容体遺伝子に異常のない例も稀に存在し、このような例は受容体以降の情報伝達障害が原因と考えられている。Akt2の遺伝子異常 (Science 304: 1325-1328, 2004) や GLUT4の細胞膜移行に関わる TBC1D4の遺伝子異常 (PNAS 106: 9350-9355, 2009) が報告されていたが、原因遺伝子が明らかでない例も多いのが実情であった。

我々は、受容体以降の情報伝達障害が疑われるインスリン抵抗症家系で全エクソーム解析を行い、本家系のインスリン抵抗症の発症者に PI3 キナーゼの調節サブユニット p85 をコードする遺伝子である *PIK3R1* に c.1945C>T 変異が存在することを見出していた (J Diabetes Investig. 9: 1224-1227, 2018)。既に、*PIK3R1* 遺伝子変異も遺伝的インスリン抵抗症の原因となることが明らかとされていたが (Am J Hum Genet. 93: 141-149, 2013)、我々の見出した症例は、本邦はもとより、アジア人で初めての *PIK3R1* 遺伝子異常によるインスリン抵抗症症例であった。また、「厚生労働科学研究費補助金ホルモン受容機構異常に関する調査研究」の全国調査において、インスリン受容体遺伝子に異常のない遺伝的インスリン抵抗症が 8 例報告されたが、我々の検討により、8 例中 5 例に *PIK3R1* 遺伝子異常が確認された。すなわち、*PIK3R1* 遺伝子異常は、遺伝的要因による受容体以降の情報伝達障害の原因として、最も頻度が高いものである可能性が高いことが明らかとなりつつあった。しかし、インスリン受容体遺伝子や *PIK3R1* 遺伝子に変異がない家系も複数認めていた。

PI3 キナーゼはインスリン作用発現に必須の分子であるが、PI3 キナーゼ調節サブユニットには、3つの遺伝子から産生される5つのアイソフォームが存在し、個々の調節サブユニットのアイソフォームはPI3 キナーゼ経路の活性化に促進的だけでなく、抑制的に作用するものもあると考えられていた。実際、*PIK3R1* を欠損したマウスは、インスリン抵抗性ではなく、インスリン感受性の増強と低血糖が生じる (Nat Genet. 21:230-235, 1999)。すなわち、PI3 キナーゼの活性は、複数の調節サブユニットと触媒サブユニットの、さらには調節サブユニットとチロシンリン酸化タンパクとの結合比率や様式によって決定されることが考えられるが、その詳細は明らかではなかった。

### 2. 研究の目的

本計画では、*PIK3R1* 異常によるインスリン抵抗症患者由来 iPS 細胞をインスリン感受性細胞に分化させ、それらの細胞でPI3 キナーゼ経路の活性化機構を検討することにより、*PIK3R1* 異常のPI3 キナーゼの活性化機構及びインスリン作用に対する影響とそのメカニズムの詳細を明らかにすることを目的とする。さらに、原因遺伝子が未同定の遺伝的インスリン抵抗性糖尿病の症例のエクソーム解析から、新たなインスリン抵抗症の原因遺伝子の同定を試みることも目的とした。

### 3. 研究の方法

#### iPS細胞を用いた解析

*PIK3R1* 変異を持つ患者から iPS 細胞、および、CRISPR/Cas9 を用いて *PIK3R1* の変異を修復した iPS 細胞を樹立する。患者 iPS 細胞と変異を修復した iPS 細胞を肝細胞以外に、筋、脂

肪などのインスリン感受性細胞に分化させ、これらの細胞で糖・脂質・蛋白の各代謝に関する種々のインスリン作用を検討することにより、本変異がどのインスリン感受性細胞において、どのような代謝障害を起こすかを明らかとする。また、*PIK3R1* によって産生される3つの調節サブユニットと触媒ユニットやチロシンリン酸化蛋白との結合性、インスリンによる PIP3 産生量の測定や PIP3 産生部位の細胞内局在のバイオイメージング解析等を患者 iPS 細胞及びゲノム編集後 iPS 細胞を用いて実施し、PI3 キナーゼの活性化機構における *PIK3R1* c.1945C>T 変異の意義を明らかにする。

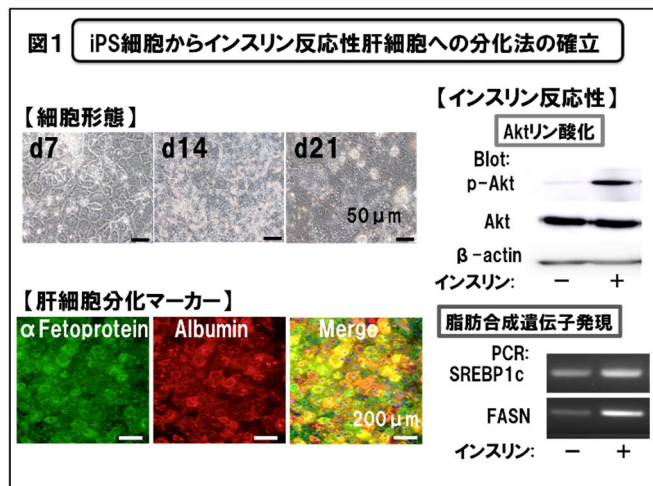
#### 遺伝的インスリン抵抗症患者及びその家系のエクソーム解析

インスリン受容体遺伝子及び *PIK3R1* 遺伝子に変異がないインスリン抵抗症家系のゲノム DNA について、次世代シーケンサー-Hiseq2500 を用いて全エクソンシーケンスを行う。データをヒトゲノム参照配列にマッピングし、GATK3 best practice に則って、塩基パリエーションや欠失/挿入等の変異を検出する。このようにして検出された変異の中で、患者には存在し、他の家族には認めないものを抽出する。

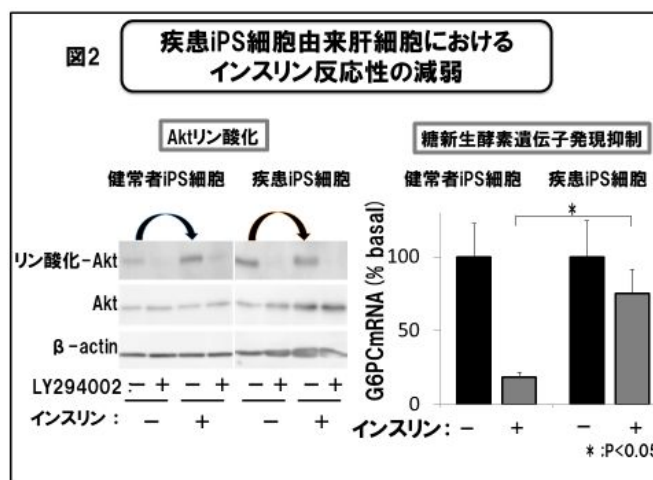
候補遺伝子が同定されれば、脂肪細胞、筋肉細胞、肝細胞における発現を検討し、いずれのインスリン標的臓器で機能を持つかを推定する。その後、培養筋肉、脂肪、肝細胞において野生型の過剰発現実験、患者が有する変異を持つ変異体の過剰発現実験、siRNA による発現抑制実験などを行うことにより、候補遺伝子のインスリン作用における機能を細胞レベルで確認する。

#### 4. 研究成果

PIK3R1 変異をもつ患者の末梢血単核細胞から iPS 細胞を樹立した(以下疾患 iPS 細胞)(図



1)。また健常者由来 iPS 細胞を用い、Akt の活性化などインスリンによる PI3-キナーゼ経路の活性化が確認できる肝細胞の分化誘導法を確立し、分化誘導終了時に c-AMP と dexamethasone によって G6PC 発現が誘導されることを確認した。次に CRISPR/Cas9 を用いて疾患 iPS 細胞の *PIK3R1* 変異を修復した iPS 細胞(以下修復 iPS 細胞)を作製した。疾患 iPS 細胞と修復 iPS 細胞を肝細胞に分化させたところ、アルブミンなどの肝細胞マーカーの発現量は両者で同程度であった。さらに疾患 iPS 細胞由来肝細胞と修復 iPS 細胞由来肝細胞でインスリンによる Akt 活性化の程度を検討したところ、疾患 iPS 細胞由来肝細胞では Akt の活性化が抑制されていたのに対し、修復 iPS 細胞由来肝細胞では Akt 活性化の抑制は認めなかった(図2)。また疾患 iPS 細胞由来肝細胞ではインスリンによる



G6PC 発現抑制が認められなかったのに対して、修復 iPS 細胞由来肝細胞ではインスリンによる G6PC 発現抑制が認められた (図 2)。以上のことから、PIK3R1 変異によるインスリン抵抗症患者の肝細胞で PI3-キナーゼ経路が障害されていることを明らかにした。

さらに、発端者 19 名を含む 50 名のインスリン抵抗症家系の DNA を、同意を得た上で収集した。これらのうち *INSR* の直接シーケンスにて 6 家系 9 名に *INSR* の変異を認めた。そのうちの 2 家系 3 名は低血糖の症状を呈する症例であった。さらに、*PIK3R1* の直接シーケンスにおいて、3 家系 4 名に変異を認めた。そのうち 2 家系 3 名は新規の遺伝子変異であった。これらの解析で遺伝子が同定されなかった家系については、エクソーム解析を行ったが、原因遺伝子の同定に至っていない。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ogawa W, Araki E, Ishigaki Y, Hirota Y, Maegawa H, Yamauchi T, Yorifuji T, Katagiri H.	4. 巻 69
2. 論文標題 New classification and diagnostic criteria for insulin resistance syndrome.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Endocr J.	6. 最初と最後の頁 107 ~ 113
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1507/endocrj.EJ21-0725.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ogawa W, Araki E, Ishigaki Y, Hirota Y, Maegawa H, Yamauchi T, Yorifuji T, Katagiri H.	4. 巻 13
2. 論文標題 New classification and diagnostic criteria for insulin resistance syndrome.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Diabetol Int.	6. 最初と最後の頁 337 ~ 343
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s13340-022-00570-5.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takeuchi Takehito, Ishigaki Yasushi, Hirota Yushi, Hasegawa Yutaka, Yorifuji Tohru, Kadowaki Hiroko, Akamizu Takashi, Ogawa Wataru, Katagiri Hideki	4. 巻 11
2. 論文標題 Clinical characteristics of insulin resistance syndromes: A nationwide survey in Japan	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Diabetes Investigation	6. 最初と最後の頁 603 ~ 616
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jdi.13171	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 小川渉、荒木栄一、石垣泰、廣田勇士、前川聡、山内敏正、依藤亨、片桐秀樹	4. 巻 64
2. 論文標題 インスリン抵抗症の疾患分類と診断基準に関するワーキンググループ報告	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 糖尿病	6. 最初と最後の頁 561 ~ 568
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 西影星二、廣田勇士、高吉倫史、竹内健人、浜口哲矢、稲葉惟子、芳野啓、山本雅昭、福岡秀規、小川渉
2. 発表標題 反応性低血糖により診断に至ったA型インスリン抵抗症の1例
3. 学会等名 第64回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高吉倫史、廣田勇士、竹内健人、山本あかね、中川靖、浜口哲矢、三村由卯、川北理恵、依藤亨、小川渉
2. 発表標題 インスリン抵抗性もしくは成長障害から新規変異を含むPIK3R1遺伝子変異の同定に至った3家系の報告
3. 学会等名 第64回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 竹内健人、廣田勇士、浜口哲矢、佐竹渉、戸田達史、小川渉
2. 発表標題 PI 3-キナーゼ調節サブユニット異常による遺伝的インスリン抵抗症の解析
3. 学会等名 第63回糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 浜口哲矢、廣田勇士、青井三千代、青井貴之、小川渉
2. 発表標題 PI3-キナーゼ調節サブユニット(PIK3R1)異常によるインスリン抵抗症患者由来iPS細胞を用いたPI3-キナーゼ経路障害の解析
3. 学会等名 第63回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tetsushi Hamaguchi, Yushi Hirota, Takehito Takeuchi, Michiyo Koyanagi-Aoi, Takashi Aoi, Wataru Ogawa
2. 発表標題 Generation Of Induced Pluripotent Stem Cells Derived From A Patient With PIK3R1 Mutation And Analysis Of Defects In Insulin Action In Hepatocytes Differentiated From These Cells
3. 学会等名 American Diabetes Association (ADA) 80th Scientific Sessions (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 竹内健人、廣田勇士、石垣泰、門脇弘子、依藤亨、赤水尚史、小川渉、片桐秀樹
2. 発表標題 インスリン抵抗症のINSR 遺伝子およびPIK3R1遺伝子の遺伝子解析
3. 学会等名 第62回糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------