

令和 3 年 5 月 11 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15660

研究課題名（和文）iPS細胞および網羅的遺伝子解析を用いた重症インスリン抵抗性症候群の病態解明

研究課題名（英文）Clarification of genetic and pathogenic mechanism of syndrome of severe insulin resistance

研究代表者

高澤 啓 (Takasawa, Kei)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：50749463

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：先天性インスリン抵抗性症候群の原因遺伝子解析により、小児内分泌専門医により臨床的に診断されたA型インスリン抵抗性小児例18例を対象に遺伝学的解析を行い、12例にインスリン受容体遺伝子変異（いずれもチロシンキナーゼドメインに位置）を認めている。国内外の既報とも比較し、出生体重はインスリン需要定異常症の重症度に比例することを示し、SGA (small for gestational age) 出生はA型インスリン抵抗性の臨床的特徴である可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究を通じて、本邦の小児期発症A型インスリン抵抗性の臨床像が明らかになった。また、臨床的に重症インスリン抵抗性症候群と診断される症例の中には、次世代シーケンシングによる既存の網羅的遺伝子解析を用いても遺伝学的な原因が同定されない症例が含まれることが確認された。今後はインスリン受容体異常症および類縁疾患に加え、高度インスリン抵抗性を呈し、若年発症糖尿病をきたす疾患単位として、DNA損傷修復異常を生じるRecQヘリカーゼタンパク異常であるBloom症候群に着目し、DNA損傷修復に関与する分子とインスリン受容体下流カスケードの関連を明らかにする研究を進める。

研究成果の概要（英文）：Genetic analysis was performed on 18 pediatric patients with type A insulin resistance clinically diagnosed by pediatric endocrinologists, and 12 INSR mutations located in the tyrosine kinase domain of INSR were identified. Compared with previous reports in Japan and overseas, our study revealed that the extent of growth retardation during the fetal period is correlated with the severity of insulin signaling impairment, suggesting that SGA (small for gestational age) birth may be a clinical feature of insulin resistance type A.

研究分野：小児内分泌学

キーワード：インスリン受容体異常症 インスリン抵抗性 SGA

1. 研究開始当初の背景

重症インスリン抵抗性症候群 (Syndrome of Severe Insulin resistance: SSIR) は、インスリンシグナル伝達 (受容体およびシグナル伝達経路) の異常と脂肪萎縮症によるものが含まれ、インスリン受容体遺伝子 (INSR) 異常のみならず、種々の原因遺伝子が同定されている。SSIR は高度インスリン抵抗性を背景として、アンドロゲン過剰、代謝異常、成長障害等の症状をきたし幅広い表現型を呈することが知られている。インスリン受容体異常症を含め本邦の SSIR の実態は明らかにされておらず、分子病態の明らかでない症例が存在する。近年、インスリン受容体下流の単一遺伝子異常による先天性インスリン抵抗性の病態が徐々に明らかになってきている一方で、確立された治療法、治療戦略は定まっていない。

自験例として、我々は国内 7 例の臨床的に診断されたインスリン受容体異常症小児例 (妖精症 1 例、A 型インスリン抵抗症 6 例) の INSR 遺伝子解析を通じて、5 例に INSR 変異を同定、内 2 種の新規変異を同定し、機能解析を行ったため報告した

(Tsuji-Hosokawa A, et al. *Pediatr Diabetes*. 2017)。一方、この中で片アレルに INSR coding sequence に変異を認めない妖精症例で、INSR mRNA 発現の低下を認めており (図 1) 新たな発症機序の可能性が示唆された。また、変異陰性 2 例の著明なインスリン抵抗性の原因として INSR 変異以外が寄与している可能性が示唆された。

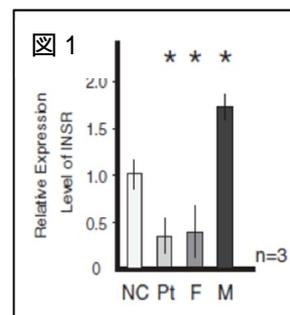


図 1
Tsuji-Hosokawa A, et al.
Pediatr Diabetes. 2017

2. 研究の目的

網羅的・複合的な遺伝学的手法を用いて、未知の INSR 異常症の発症機序および INSR 変異陰性例の病態解明を行うことで、インスリン抵抗性の原因となる新たな機構を解明する。

患者由来 iPS 細胞を樹立し、Transcriptome 解析および Metabolome 解析を用いた網羅的・統合的解析を行うことで、インスリン抵抗性をもたらす分子学的機序の解明のみならず、既知の治療による効果発現の機序を明らかにし、治療戦略を構築することを目標とする。

3. 研究の方法

I. 遺伝学的手法を用いた INSR 以外の遺伝子の同定の試み (図 2)

網羅的遺伝子解析を用いた INSR 以外にインスリン抵抗性を来す可能性のある分子の同定を試みる。次世代シーケンサーを用いた、家族を含めた Exome 解析による新規原因候補遺伝子の同定と解析を行う。

INSR 発現に關与するエンハンサー領域の同定。前述した症例のように、INSR 発現低下による病態が關与する可能性がある。この原因と思われる、INSR 発現低下を来すエンハンサー領域の欠失、異常の同定を試みる。エンハンサーの同定は、INSR 発現を制御する上流分子の同定に役立つと考えられる。手法として INSR 周辺 (非翻訳領域・プロモーター領域) 解析、cDNA 解析、MLPA、SNP アレイを用いる。

II. 患者由来 iPS 細胞樹立を用いたインスリン抵抗性の新規病態の解明 (図 3)

著明なインスリン抵抗性を示しながら INSR 遺伝子に変異を認めない患者由来の iPS 細胞を樹立する。iPS 細胞は、インスリン感受性において最も影響を与えられる肝細胞および筋細胞へとそれぞれ分化させる。これらを用い、以下の解析を行う。

正常コントロールとのプロファイルの比較を Transcriptome 解析 (RNA seq) および metabolome 解析を用いて行い、integrated analysis (統合解析) を行う。

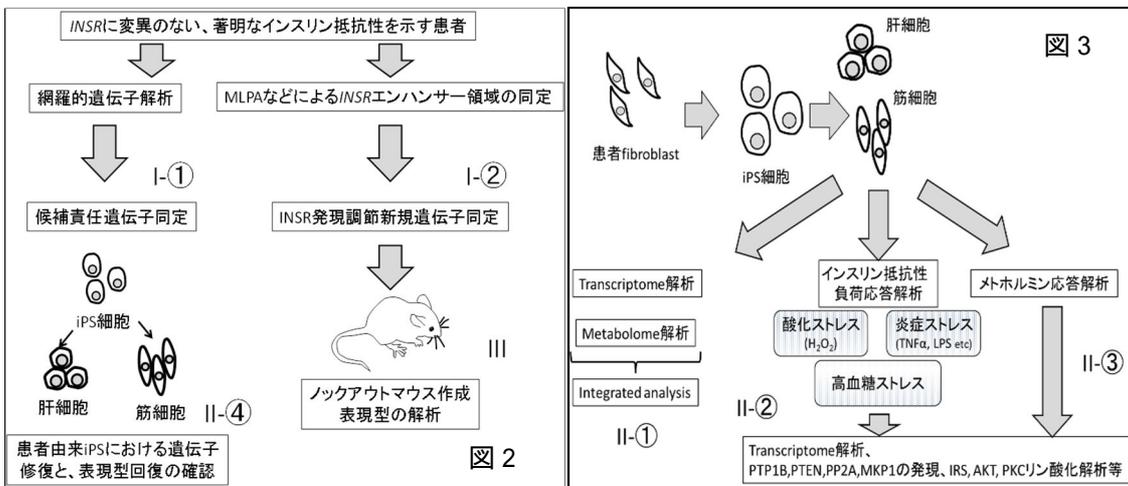
負荷に対するインスリン抵抗性の応答を評価し、さらにそれらの負荷のもとでの遺伝子発現の変化を RNA seq を用いて網羅的に解析を行う。

インスリン抵抗性改善薬であるメトホルミン投与下でのインスリン抵抗性改善の有無、応答性を RNA seq によって遺伝学的に解析する。

上記 2 つの実験において同定された病態について、I の実験で候補遺伝子が判明した場合には、ゲノム編集技術を用いて、候補遺伝子の変異を野生型に戻し、インスリン抵抗性の改善

を認めるかどうかについて確認を行う(図2)。

III. 以上の実験より同定された分子については、遺伝子改変マウスの作成、すなわち、疾患モデルマウスを作成し、その表現型について解析を行う(図2)。



4. 研究成果

I. 遺伝学的手法を用いた INSR 以外の遺伝子の同定の試み

既存の症例において、網羅的遺伝子解析および INSR エンハンサー領域解析において有意な結果は得られなかった。

脂肪萎縮症を除く先天性インスリン抵抗性症候群の原因遺伝子解析は継続的に行っており、国内多施設から依頼を受け解析結果を蓄積している。2021年までに、小児内分泌専門医により、臨床的に診断されたA型インスリン抵抗性小児例18例を対象に遺伝学的解析を行い、12例に INSR 変異(いずれもチロシキナーゼドメインに位置)を認めている。

臨床像の解明という点においては、上記の内、6例を対象とし、遺伝学的解析結果およびその臨床像を比較検討し、以下の知見を得た。1) 6例中4例に、新規変異を含めた4種の INSR 変異を認め、それらはいずれもチロシキナーゼドメインに位置し、優性阻害効果が推測された。2) INSR 変異陽性例の臨床像の鑑別は困難であったが、糖尿病家族歴、脂肪肝での鑑別が可能かもしれない。3) 国内外の既報とも比較し、出生体重 SDS は INSR 異常症の重症度に比例することを示し(図4) SGA (small for gestational age) 出生は Type A IR の臨床的特徴である可能性が示唆された。この臨床研究の成果は、第91回日本内分泌学会学術総会(2018/4/26)、第61回日本糖尿病学会年次学術集会(2018/5/25)において口演発表を行った。また研究内容は、論文化し、J Diabetes に掲載された(Takasawa K, et al. J Diabetes. 2019; 11:46-54.)

INSR 遺伝子変異陰性例に関しては、次世代シーケンサーを用いた網羅的遺伝子解析を並行して行っており、新規原因遺伝子の探索を続けている。

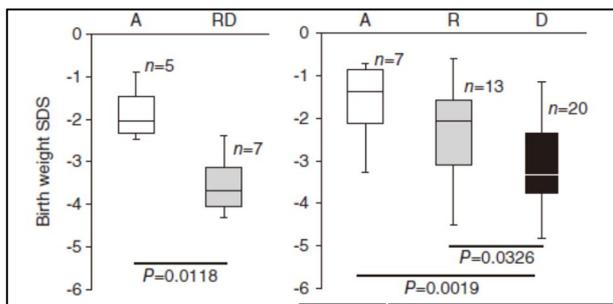


図4 Takasawa K, et al. J Diabetes. 2019.

II. 患者由来 iPS 細胞樹立を用いたインスリン抵抗性の新規病態の解明

インスリン受容体異常症および類縁疾患の患者由来不死化細胞を樹立した。今後、若年発症インスリン抵抗性糖尿病をきたす他の疾患との比較検討を行う予定である。

高度インスリン抵抗性を呈し、若年発症糖尿病をきたす疾患単位として、DNA 損傷修復異常を生じる RecQ ヘリカーゼタンパク異常である Bloom 症候群に着目し、DNA 損傷修復に関与する分子とインスリン受容体下流カスケードの関連を明らかにする研究を進めている。

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 0件）

1. 著者名 Yamauchi Takeru, Takasawa Kei, Kamiya Takahiro, Kirino Shizuka, Gau Maki, Inoue Kento, Hoshino Akihiro, Kashimada Kenichi, Kanegane Hirokazu, Morio Tomohiro	4. 巻 20
2. 論文標題 Hematopoietic stem cell transplantation recovers insulin deficiency in type 1 diabetes mellitus associated with IPEX syndrome	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Pediatric Diabetes	6. 最初と最後の頁 1035 ~ 1040
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pedi.12895	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 Takasawa Kei, Miyakawa Yuichi, Saito Yoko, Adachi Eriko, Shidei Tsunanori, Sutani Akito, Gau Maki, Nakagawa Ryuichi, Taki Atsuko, Kashimada Kenichi, Morio Tomohiro	4. 巻 0
2. 論文標題 Marked clinical heterogeneity in congenital hyperinsulinism due to a novel homozygous ABCC8 mutation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clinical Endocrinology	6. 最初と最後の頁 0
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cen.14443	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 Yamauchi Takeru, Imamura Masatoshi, Takasawa Kei, Nakajima Keisuke, Nakagawa Ryuichi, Gau Maki, Sugie Manabu, Taki Atsuko, Kawai Masahiko, Kashimada Kenichi, Morio Tomohiro	4. 巻 70
2. 論文標題 Prematurity at less than 24 weeks of gestation is a risk for prolonged hyperglycemia in extremely low-birth weight infants	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Endocrine	6. 最初と最後の頁 71 ~ 77
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12020-020-02393-3	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 Takasawa Kei, Tsuji-Hosokawa Atsumi, Takishima Shigeru, Wada Yasunori, Nagasaki Keisuke, Dateki Sumito, Numakura Chikahiko, Hijikata Atsushi, Shirai Tsuyoshi, Kashimada Kenichi, Morio Tomohiro	4. 巻 11
2. 論文標題 Clinical characteristics of adolescent cases with Type A insulin resistance syndrome caused by heterozygous mutations in the -subunit of the insulin receptor (INSR) gene	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Diabetes	6. 最初と最後の頁 46 ~ 54
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1753-0407.12797	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4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高澤啓 我有茉希 山内建 中川竜一 宮川雄一 小野真 森尾友宏 鹿島田健一
2. 発表標題 Bloom症候群はIGF1不応による成長障害とインスリン抵抗性糖尿病を発症する
3. 学会等名 第53回日本小児内分泌学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高澤 啓、細川 敦美、滝島 茂、和田 泰格、長崎 啓祐、伊達木 澄人、沼倉 周彦、土方 敦司、白井剛、森尾 友宏、鹿島田 健一
2. 発表標題 小児A型インスリン抵抗症の臨床像と遺伝子型相関
3. 学会等名 第61回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高澤 啓、細川 敦美、滝島 茂、和田 泰格、長崎 啓祐、伊達木 澄人、沼倉 周彦、土方 敦司、白井剛、森尾 友宏、鹿島田 健一
2. 発表標題 小児A型インスリン抵抗症の臨床像と遺伝学的背景
3. 学会等名 第91回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高澤啓 我有茉希 山内建 中川竜一 宮川雄一 小野真 森尾友宏 鹿島田健一
2. 発表標題 Bloom症候群はIGF-1不応による成長障害とインスリン抵抗性糖尿病を発症する
3. 学会等名 第93回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

先天性内分泌疾患の分子病態の解明
http://www.tmd.ac.jp/med/ped/medical/research/life_theme.html#04

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
---------	---------