

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19602

研究課題名(和文) インスリン受容体異常症の新たな病態解明

研究課題名(英文) Clarification of genetic and pathogenic mechanism of insulin receptor abnormality

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) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：国内7例の、小児内分泌科専門医によって臨床的に診断されたインスリン受容体(INSR)異常症小児例を対象に遺伝子解析を行い、3種の新規変異(S98R,G1146R,R1201P)を含む5種のINSR遺伝子変異(R1158W,R1201W:既報)を同定し、機能解析を行った。INSR mRNA発現の低下が、インスリン受容体異常症の新たな発症機序である可能性が示唆された。INSR遺伝子変異陽性例と陰性例の臨床像の比較において、家族歴や脂肪肝の有無で鑑別しうる可能性が示唆され、A型インスリン抵抗症においてもSGA出生が臨床的特徴である可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：We reported seven Japanese cases with clinically diagnosed insulin receptor (INSR) abnormality including one case with Leprechaunism and six peripubertal cases with clinically diagnosed type A IR. In five of seven cases, five INSR mutations including three novel mutations; S98R, G1146R, R1201P, and two previously reported mutations; R1158W, R1201W, were identified. We also demonstrated that reduced mRNA expression of INSR should be considered as a possible cause of insulin resistance. By a group comparative study between INSR mutation-positive and mutation-negative cases, we indicated common clinical features of type A insulin resistance with the INSR mutations which were family history of diabetes mellitus and absence of fatty liver. Furthermore, being small for gestational age is another clinical feature of type A insulin resistance with the INSR mutation.

研究分野：小児内分泌学

キーワード：インスリン受容体 糖尿病 インスリン抵抗性 インスリン受容体異常症 妖精症 A型インスリン抵抗症 SGA

科学研究費助成事業 研究成果報告書

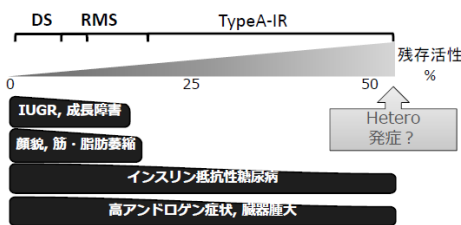
1. 研究開始当初の背景

妖精症はインスリン受容体異常症の最重症型に位置付けられ、胎生期から始まる成長障害と乳児期より顕在化する耐糖能異常などを呈する稀少な先天性疾患であり、確立した治療法がないため、多くは乳児期に死亡する予後不良な疾患である。

先天性インスリン受容体異常症は、インスリン受容体 (INSR) 遺伝子の異常に起因し、重症度から妖精症 (Donohue 症候群)、Rabson-Mendenhall 症候群、A 型インスリン受容体異常症に分類されるが、分子病態の明らかでない症例が存在するため、病態解明が新たな治療法の確立につながる可能性がある (図 1)。

また、先天性インスリン受容体異常症における臨床情報は十分に集積がされておらず国内例の治療実態などが不確かな状況である。

図 1 Spectrum of INSR deficiency



Endocrine Reviews, 2011, 32(4):498-514より改変

2. 研究の目的

既知の遺伝子異常が同定できない妖精症の病態解明を通じて、インスリン受容体異常症の新たな病態解明および治療困難な妖精症の新たな治療法の確立を目標とする。

また、本研究を通じて、インスリン抵抗性の原因となる新たな機構の解明を目指すとともにインスリン抵抗性を主体とした 2 型糖尿病に対する新たな治療法の確立を最終目標とする。

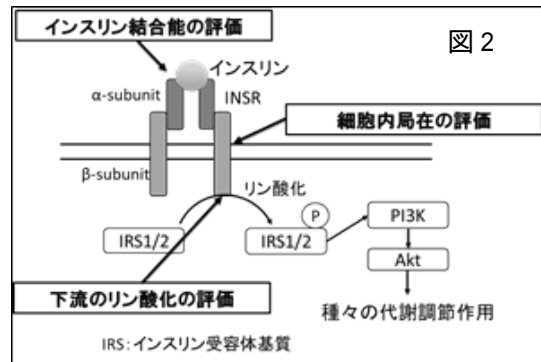
3. 研究の方法

自験例となる妖精症患者の遺伝学的解析およびリンパ球由来不死化細胞を用いた機能解析を行う。

INSR 新規変異に対しては、変異導入したベクターを CHO 細胞に導入し、以下の手法を用いて機能解析を行う (図 2)。

- ・タンパク発現：ウエスタンブロッティング
- ・インスリン結合能：<sup>125</sup>I 標識インスリンによる解析

- ・細胞内局在：免疫蛍光染色
- ・下流のリン酸化：免疫沈降法等を用いたリン酸化経路の解析



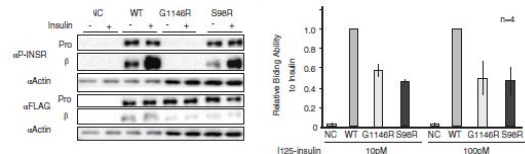
変異が同定されないアレルに対しては、INSR 翻訳領域・既知のプロモーター領域の PCR 直接シーケンス、cDNA 解析、SNP アレイを行うとともに、リンパ球由来不死化細胞を用いて INSR mRNA の発現を確認する。

学会やアンケート調査を通じて、国内のインスリン受容体異常症例の情報集積、解析を行う。

4. 研究成果

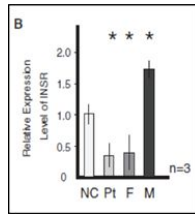
妖精症例 (自験例) と A 型インスリン抵抗症例 (山形大学症例) のインスリン受容体遺伝子解析を通じて、それぞれ S98R と G1146R という 2 種の新規ミスセンス変異を同定した。これらの変異は *in silico* 解析にて疾患原性が強く示唆されるとともに変異部位のアミノ酸は脊椎動物間でよく保存されていることがわかった。強制発現系を用いた *in vitro* 機能解析によって両変異はそれぞれインスリン結合能とインスリン受容体下流のリン酸化が障害されることを確認した (図 3)。

図 3



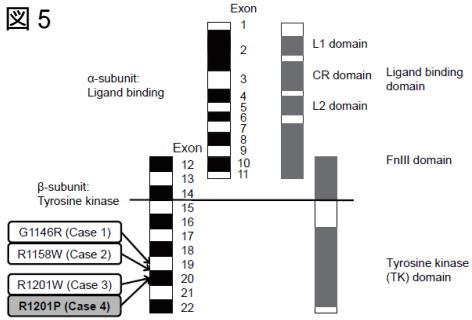
妖精症例において、S98R を持つ母方アレルに対して父方アレルには PCR-直接シーケンス法で明らかな変異は認めなかった。SNP アレイおよび cDNA に対する PCR-直接シーケンスによって明らかな deletion を認めなかった。患者および父のリンパ球由来の不死化細胞を用いた qRT-PCR において両者で明らかにインスリン受容体遺伝子の mRNA 発現が低下していることが確認された (図 4)。インスリン受容体遺伝子発現低下の原因検索として、インスリン遺伝子発現を調節する

HMGA1 遺伝子を含む既知の関連遺伝子に対する次世代シーケンスおよび既知のインスリン受容体遺伝子のプロモーター・エンハンサー領域のシーケンスを行ったが明らかな異常は見いだせなかった。本検討において、*INSR* mRNA 発現の低下は、インスリン受容体異常症の新たな発症機序の可能性が示唆された。(Tsuji-Hosokawa A, et al. *Pediatr Diabetes*. 2017)



更に、小児期に耐糖能異常を呈し、小児内分泌科専門医によって臨床的に診断された A 型インスリン抵抗症小児例 5 例のインスリン受容体遺伝子解析を通じて、3 例に 1 種の新規変異(R1201P)を含む 3 種のインスリン受容体遺伝子変異(R1158W, R1201W)を同定した(図 5)

図 5



これらの変異はいずれもインスリン受容体サブユニットのチロシンキナーゼドメインに位置し、構造解析からリン酸化ドメインの構造変化を起こすことが推測された。既報のインスリン受容体遺伝子変異と表現型の解析から、常染色優性遺伝を呈する A 型インスリン抵抗症を生じる変異の多くはチロシンキナーゼドメインに位置し、優性阻害効果によって症状を呈する可能性を示した。インスリン受容体遺伝子変異陽性例と陰性例の臨床像の比較において、肥満度やインスリン抵抗性の程度での鑑別は困難であったが、家族歴や脂肪肝の有無で鑑別しうる可能性が示唆された(表 1)。

表 1

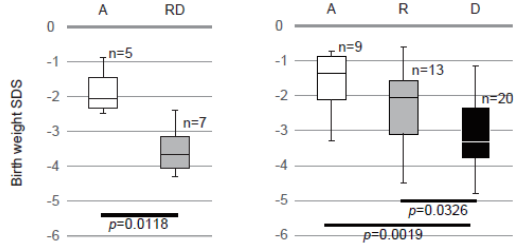
年齢/性別	臨床診断	<i>INSR</i> 変異	BMI	IRI 基礎/頂値	HOMA-R
0y, F	妖精症	*S98R/-	N.D.	1070/-	877
11y, M	Type A	G1146R/-	25.3	72/1280	14.8
12y, F	Type A	R1158W/-	16.6	261/2179	41.8
11y, F	Type A	R1201W/-	16.6	151/657	33.6
13y, F	Type A	*R1201P/-	14.6	113/725	24.6
10y, M	Type A	-/-	24.1	33/251	7.7
6y, F	Type A	-/-	25.8	71/1310	13.3

\*:新規変異 kg/m<sup>2</sup> μU/ml

全例において Small for Gestational Age (SGA) 出生の傾向が見られ、既報を含めた検討から、出生体重 SD スコアはインスリン受

容体異常症の重症度に比例することを確認し、A 型インスリン抵抗症においても SGA 出生が臨床的特徴である可能性を示した(図 6)。

図 6



A: A 型インスリン抵抗症  
R: Rabson-Mendenhall 症候群  
D: Donohue 症候群(妖精症)

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インスリン受容体遺伝子変異以外が寄与している可能性が示唆された。(上記結果は論文投稿中である)

今後、インスリン受容体下流の遺伝子や脂肪萎縮症関連遺伝子を含め網羅的な遺伝子解析を行う予定である(図 7)。

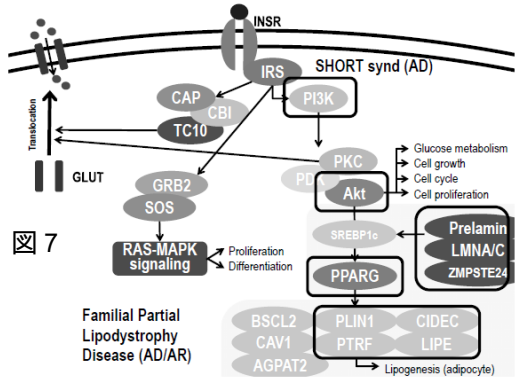


図 7

5. 主な発表論文等 (研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)  
Tsuji-Hosokawa A, Takasawa K, Nomura R, Miyakawa Y, Numakura C, Hijikata A, Shirai T, Ogawa Y, Kashimada K, Morio T. *Pediatr Diabetes*. 2017 Dec;18(8):917-924. doi: 10.1111/pedi.12508. 査読有

〔学会発表〕(計 6 件)  
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。小児 A 型インスリン抵抗症の臨床像と遺伝子型相関。第 91 回日本内分泌学会学術集会。2018 年 4 月。宮崎。  
辻敦美、高澤啓、野村莉紗、宮川雄一、

沼倉周彦, 土方敦司, 白井剛, 小川佳宏, 鹿島田健一, 森尾友宏. インスリン受容体異常症の病態解明: 自験例2例の分子内分泌学的検討. 第90回日本内分泌学会学術集会. 2017年4月. 京都

高澤啓, 辻敦美, 野村莉紗, 宮川雄一, 沼倉周彦, 鹿島田健一, 森尾友宏. インスリン受容体異常症の病態解明: 自験例2例の分子内分泌学的検討. 第120回日本小児科学会学術集会. 2017年4月. 札幌.

Atsumi Tsuji, Kei Takasawa, et al. Molecular mechanisms of insulin resistance in two cases of primary insulin receptor defect-associated diseases. APPEP-JSPE2016 (Joint session)(国際学会). 2016年11月. 東京.

高澤啓, 辻敦美, 沼倉周彦, 鹿島田健一. インスリン受容体異常症の病態解明. 第20回小児分子内分泌研究会. 2016年7月. 函館.

高澤啓, 酢谷明人, 前澤身江子, 石黒利佳, 箕面崎至宏, 鹿島田健一. IGF1製剤が有効であった妖精症の1例. 第88回日本内分泌学会学術総会. 2015年4月. 東京

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 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

### (2) 研究分担者: なし

( )

### (3) 連携研究者: なし

( )

### (4) 研究協力者:

辻-細川 敦美 (TSUJI-HOSOKAWA, Atsumi)

鹿島田 健一 (KASHIMADA, Kenichi)