

令和元年6月10日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09750

研究課題名(和文) エクソーム解析とiPS細胞を用いた受容体後障害によるインスリン抵抗症遺伝子の同定

研究課題名(英文) Identification of the gene that causes insulin resistance syndrome using exome sequencing and iPS cells.

研究代表者

廣田 勇士 (Hirota, Yushi)

神戸大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80566018

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：インスリン抵抗症家系の原因遺伝子の同定を目指し、エクソーム解析を行った結果、PIK3R1遺伝子c.1945C>T変異を同定した。この変異の機能を明らかにするため、発端者からiPS細胞の樹立を行い、肝細胞への分化誘導を行った。健康者由来iPS細胞から誘導した肝細胞と比較して、インスリン添加によるAktリン酸化が顕著に抑制されており、PIK3R1異常ではインスリン作用が抑制されていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本インスリン抵抗症家系の原因遺伝子はPIK3R1遺伝子であったが、SHORT症候群の原因遺伝子として海外から2013年に報告されていた。しかし日本人を初めとした東アジア人では初の報告となり、顔貌などの特徴が世界共通であることが明らかとなった。また、PIK3R1遺伝子の疾患iPS細胞を作成したが、この疾患iPS細胞は世界で初めてのものであり意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：As a result of exome analysis aiming at identification of the causative gene of the insulin resistance family, PIK3R1 gene c.1945C>T mutation was identified. In order to clarify the function of this mutation, we established iPS cells from probands and induced differentiation into hepatocytes. Compared with hepatocytes derived from healthy person-derived iPS cells, Akt phosphorylation upon addition of insulin was significantly suppressed, suggesting that the PIK3R1 abnormality suppresses the insulin action.

研究分野：糖代謝

キーワード：インスリン抵抗症 エクソーム解析 iPS細胞 SHORT症候群 PIK3R1遺伝子


様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

インスリン抵抗症はインスリン受容体異常症とも呼ばれ、強いインスリン抵抗性と治療の困難な糖尿病を特徴とする疾患である。インスリン抵抗症はインスリン受容体遺伝子異常により発症する A 型とインスリン受容体抗体により発症する B 型に分類される。一方、A 型様の表現型を示すものの、インスリン受容体遺伝子に異常を認めない例もごく稀に存在する。このような例はインスリン受容体以降の情報伝達障害が原因と考えられているが、その本態は十分に明らかではない。実際、インスリン受容体以降の情報伝達障害による遺伝性インスリン抵抗症としては、インスリン作用発現に関わるセリンスレオニンキナーゼである Akt2 の遺伝子異常 (*Science* 304, 1325-1328, 2004) 及び GLUT4 の細胞膜移行に関わる分子である TBC1D4 の遺伝子異常 (*PNAS* 106, 9350-9355, 2009) が報告されているものの、各々 2 家系、1 家系

図1

受容体以後の障害が疑われる
孤発例インスリン抵抗症の特徴



女性。36週1800gで出生。成人後身長142cm。
妖精様顔貌。

21歳からインスリン加療開始。以後、BMI15程度にも関わらず必要インスリン量が200単位以上。

黒色表皮腫、多嚢胞性卵巣、脂肪性肝炎、脂質異常を合併。

生後7か月時

両親、同胞(4名)に糖尿病、およびインスリン抵抗性に伴う臨床所見を認めず。顔貌、体格は家族と異なる。

高インスリン正常血糖クランプで顕著なインスリン抵抗性あり。

インスリン受容体、IRS1、IRS2、PDK1、Akt1、Akt2、PPAR γ 2の遺伝子配列に責任と考えられる異常なし。

での報告であり、受容体以降の情報伝達障害が疑われる例の大半の原因遺伝子は明らかではない。

申請者は、両親や同胞にインスリン抵抗症の兆候を全く認めないにも関わらず、小児期からの強いインスリン抵抗性に加え、妖精様顔貌、黒色表皮腫、NASH、多嚢胞性卵巣といった典型的特徴を伴うインスリン抵抗症の孤発例女性を継続診療

してきた(図1)。本例ではインスリン受容体遺伝子に加え、インスリン情報伝達に関わる主要分子である IRS1、IRS2、PDK1、Akt1、Akt2 の遺伝子、さらにインスリン抵抗症に類似した表現型を示すとされる PPAR 2 の遺伝子異常 (*Nat Genet.* 31:379, 2002) の検索のため、これらの遺伝子の全コード領域のシーケンスを行ったが、原因となり得る異常は認めていない。本例は最近、妊娠、出産に至り、無事に男児を得た。児の父親にもインスリン抵抗症の兆候は全く認めないが、児は新生児期から高インスリン血症を呈し、多毛や特徴的顔貌・身体所見なども含め、母親と同様にインスリン抵抗症様の表現型を生下時から持つことが明らかとなった。このことは、発端者女性が「**優性遺伝形式を持つ新生突然変異の獲得**」という極めて稀な遺伝学的病態により、インスリン抵抗症を発症したことを強く示唆する。

2. 研究の目的

本研究では申請者が継続診療している本例において、まず、発端者及びその家族のエクソーム解析を行うことにより、本例のインスリン抵抗症の原因遺伝子の候補を抽出する。また、発端者の末梢血白血球から iPS 細胞を作成し、脂肪細胞、骨格筋細胞、肝細胞といったインスリン感受性細胞に分化させた後に各種のインスリン作用の反応性について検討することにより、インスリン作用障害が生じている臓器(細胞)とステップを明らかとする。さらに、エクソーム解析で絞り込まれた候補遺伝子の機能障害の有無を iPS 細胞から分化させたインスリン感受性細胞で検討することにより、本症例におけるインスリン抵抗症の原因遺伝子の同定を目指す。

3. 研究の方法

インスリン抵抗症発端者及びその家族のエクソーム解析

発端者とその家族より末梢血を採取し、密度遠心勾配法を用いて単核球を分離する。末梢単核球からゲノム DNA を抽出し、常法に従い全エクソン配列断片を作成し、次世代シーケンサー-Hiseq2500 を用いてシーケンスを決定する。シーケンス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、塩基バ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、発端者及び児には存在し、他の家族には認めないものを抽出する。

インスリン抵抗症発端者からの iPS 細胞の樹立

患者から末梢血を採取し密度遠心勾配法を用いて単核球を分離する。得られた患者由来末梢単核球に初期化因子 (Oct3/4、Sox2、KLF4、c-Myc) をセンダイウイルスベクターもしくはエピソーマルプラスミドベクターを用いて導入し、既報のヒト多能性幹細胞培養条件下に播種する。iPS 細胞様コロニーが形成されれば、実態顕微鏡下にコロニーを採取し、株化する。また、胚様体形成法を用いた in vitro 誘導系によって三胚葉系への分化能を評価し、細胞の多機能性を確認する。

iPS 細胞から分化させたインスリン感受性細胞を用いた解析

(1) 脂肪細胞、肝細胞、骨格筋細胞への iPS 細胞からの分化誘導

既報を参考に iPS 細胞からインスリン感受性細胞への分化誘導を行う。脂肪細胞については Stem Cells Dev. 22: 2895, 2013、肝細胞については PNAS. 109 : 12538, 2012、骨格筋については PLoS One. 8:e61540, 2013 に報告された方法に基づいて分化誘導を行う。同時に連携研究者である神戸大学大学院医学研究科の青井貴之博士が既に作成している健常者から樹立された iPS 細胞を同様の方法で分化誘導し、対照細胞を作成する。

(2) iPS 細胞由来インスリン感受性細胞を用いたインスリン作用障害部位の解析

分化誘導した脂肪細胞、肝細胞、骨格筋細胞を用い、インスリンによるグルコース取り込み促進、脂肪分解抑制、グリコーゲン合成促進、脂肪合成促進、糖新生系酵素遺伝子発現抑制、脂肪酸合成系酵素遺伝子発現増強などの作用を解析し、対照細胞での反応性と比較することにより、これらの作用が患者由来細胞で障害されているかどうかを明らかにする。

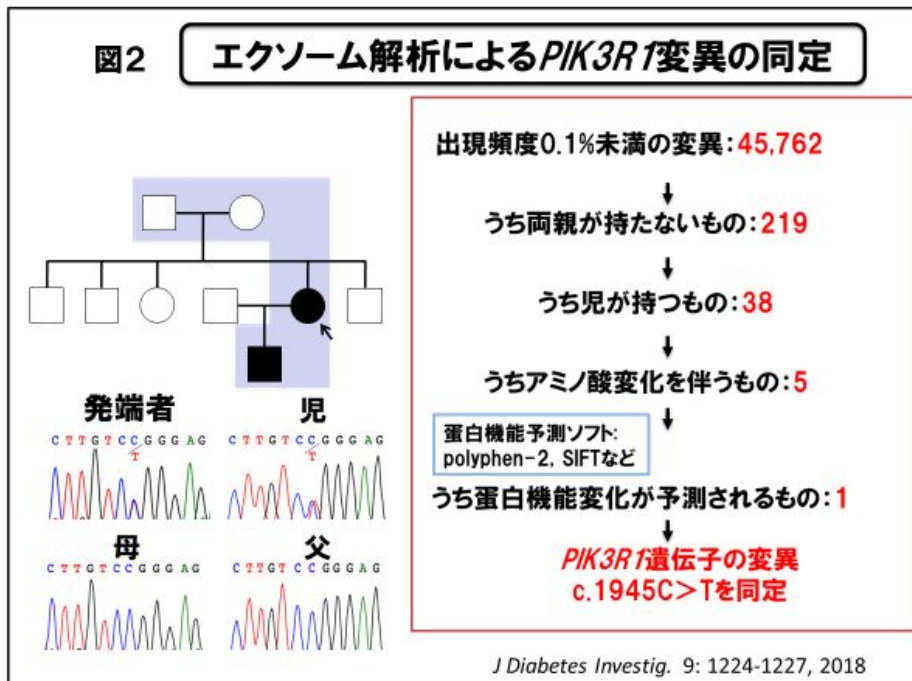
(3) インスリン抵抗性原因遺伝子の同定

エクソーム解析で得られた候補遺伝子のうち、活性測定系が確立しているものについては、患者 iPS 細胞由来インスリン感受性細胞において、その活性を測定する。また特異的抗体が得られるものについては、イムノプロット法等によりその蛋白発現量を測定する。活性や蛋白発現の異常がみられた分子について、対照細胞や株化した脂肪、肝、筋細胞への過剰発現実験、siRNA を用いたノックダウン実験、あるいは発端者が持つ変異を導入した変異分子の過剰発現実験を行い、上記の (2) の計画で認めたとような作用の障害が生じるかどうかを検討することにより、インスリン抵抗性の原因遺伝子の同定を目指す。

4 . 研究成果

原因遺伝子の同定のために、発端者とその家族から得た DNA を用いてエクソーム解析を行った結果、発端者で denovo に生じ児へ遺伝した遺伝子変異を 38 個認めた。そのうち、アミノ酸変化を伴い機能の変化が予測された遺伝子変異を 1 個同定した (図 2)。その遺伝子変異は、PIK3R1 遺伝子 c.1945C>T であった (Hamaguchi T, Hirota Y, et al. J Diabetes

Investig. 2018 9: 1224-1227) が、SHORT 症候群の原因遺伝子として 2013 年に報告されてい



た (Am J Hum Genet. 93:141, 2013)。また、発端者とその児の末梢血単核球にセンダイウイルスベクターを用いて初期化因子 (Oct3/4、Sox2、KLF4、c-Myc) を導入し、iPS細胞の樹立を行った。また、健常者由来

iPS細胞および患者由来 iPS細胞を用いて、既報 (PNAS. 109. 12358-12543) に従い肝細胞への分化誘導を行った。AFP や ALB など肝細胞のマーカーの発現を mRNA、蛋白質レベルで確認し、肝細胞に分化していることを確認した。また、インスリン作用の検討として、インスリン受容体の下流にある Akt について、インスリン添加によるリン酸化を解析した。健常者由来 iPS細胞から誘導した肝細胞と比較して、患者 iPS細胞から誘導した肝細胞ではインスリンによる Akt リン酸化が顕著に抑制されており、PIK3R1 異常ではインスリン作用が抑制されていることが示唆された。また、糖新生系酵素の発現を検討することが必要であったが、通常の誘導方法では、糖新生系酵素である G6PC (Glucose-6-phosphatase catalytic subunit) の発現が認められなかったため、培地の変更や、分子化合物の添加など、誘導方法を改良することで G6PC が発現する条件を見出した。さらに、インスリン添加による G6PC 発現の減弱作用を比較したところ、疾患 iPS細胞由来肝細胞の方が G6PC 発現の減弱作用がより弱いという結果が得られた。以上よりこの PIK3R1 変異ではインスリン作用が抑制されていることが示唆された。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、申請者の例は世界で初めてのものである。この点では、本研究成果は極めて独自性と科学的優越性の高いものと言える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1. Hamaguchi T, Hirota Y, Takeuchi T, Nakagawa Y, Matsuoka A, Matsumoto M, Awano H, Iijima K, Cha PC, Satake W, Toda T, Ogawa W. Treatment of a case of severe insulin resistance due to a PIK3R1 mutation with a sodium-glucose cotransporter-2 inhibitor. J Diabetes Investig. 2018 9: 1224-1227. doi: 10.1111/jdi.12825 査読あり

〔学会発表〕(計 3 件)

1. 浜口哲矢、廣田勇士、松岡敦子、竹内健人、末松那都、三浦洋、宗杏奈、中村友昭、岡田裕子、駒田久子、坂口一彦、小川渉、インスリン受容体以後のシグナル伝達障害が疑われ

るインスリン抵抗症に対する SGLT2 阻害薬の有効性と安全性の検討、第 60 回日本糖尿病学会
年次学術集会、2017

2 . 浜口哲矢、廣田勇士、松本真明、粟野宏之、飯島一誠、佐竹渉、戸田達史、青井三千代、
青井 貴之、小川渉、PI3 キナーゼ遺伝子異常によるインスリン抵抗症の同定と iPS 細胞を
用いた障害の解析、第 61 回日本糖尿病学会年次学術集会、2018

3 . 浜口哲矢、廣田勇士、松岡敦子、竹内健人、中川靖、岡田裕子、青井三千代、青井貴之、
坂口 一彦、小川渉、PIK3R1 遺伝子異常によるインスリン抵抗症に対する SGLT2 阻害薬の
有効性・安全性の検討、第 55 回日本糖尿病学会近畿地方会、2018

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：糖尿病予防又は治療剤スクリーニング方法、及び当該方法に用いる細胞

発明者：小川渉、廣田勇士、青井貴之

権利者：

種類：

番号：特願 2018-098886

出願年：2018 年

国内外の別： 国内

取得状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：小川渉

ローマ字氏名：Ogawa Wataru

研究協力者氏名：青井貴之

ローマ字氏名：Aoi Takashi

研究協力者氏名：佐竹渉

ローマ字氏名：Satake Wataru

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。