

平成 30 年 6 月 10 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19650

研究課題名(和文) 脂肪萎縮性糖尿病原因遺伝子POLD1の機能解析

研究課題名(英文) Analysis of POLD1 gene function that causes lipotrophic diabetes mellitus

研究代表者

大久保 一宏 (OHKUBO, KAZUHIRO)

九州大学・医学研究院・助教

研究者番号：60737576

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：脂肪萎縮性糖尿病は脂肪萎縮によりレプチンが欠乏し、インスリン抵抗性により発症する。既知の原因遺伝子としてAGPAT、BSCL2、CAV1、POLD1等が知られている。今回、我々は本研究を通じて、網羅的遺伝子解析により、脂肪萎縮性糖尿病症例に対し、PIK3R1遺伝子に未報告の挿入変異(新生突然変異)を見いだした。また、本症例の末梢血を用いて、インスリンシグナル異常を同定できた。末梢血を用いての検討が可能なることを示したことで、本疾患を簡便かつ迅速に診断できる可能性があり、意義深いものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Lipotrophic diabetes mellitus occurs by leptin deficiency and insulin resistance due to lipotrophy. AGPAT, BSCL2, CAV1, POLD1 etc. have become known as responsible genes for this disease. Here, we found novel unknown insertion mutation in PIK3R1 gene for a patient with lipotrophic diabetes mellitus. Moreover, we identified insulin signal abnormality by peripheral blood analysis of this patient. We think that this is meaningful result because there is a potential for easy and rapid diagnosis for this disease by peripheral blood analysis.

研究分野：小児内分泌・代謝

キーワード：脂肪萎縮性糖尿病 PIK3R1

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 脂肪萎縮症は、脂肪組織が全身性あるいは部分的に減少・消失する疾患の総称であり、原因は遺伝子異常による先天性のもの、自己免疫の関与する後天性のものなどがある。脂肪萎縮症ではいずれの原因によっても、高度のインスリン抵抗性を伴う糖尿病（脂肪萎縮性糖尿病と呼ばれる）や、高中性脂肪血症を主体とした脂質異常症、脂肪肝などを合併する予後不良の疾患である。また、疫学的には数百万人に一人の発症頻度の稀少疾患と考えられている。

(2) 脂肪萎縮症の病態には、脂肪細胞由来のホルモンであるレプチンが欠乏していることが関与するとされており、2013年にはレプチン補充療法が本疾患に対する治療法として認可され、臨床的に糖尿病や脂質異常症の改善に効果を挙げている。

(3) 遺伝性の全身性脂肪萎縮症の原因遺伝子としては、これまでに *AGPAT2*、*BSCL2*、*CAVI*、*PTRF* 等が知られているが、近年、下顎低形成、難聴、早老症様症状を伴う遺伝性の全身性脂肪萎縮症（Mandibular hypoplasia, deafness, progeroid features and lipodystrophy; MDPL）の原因遺伝子として、*POLD1* が同定された（Nat Genet. 2013, Metabolism 2014, Metabolism 2015）。

(4) *POLD1* の生理的機能については、ゲノムの安定性、DNA複製に関与するとの報告がある（J Biol Chem. 2012）が、脂肪細胞における役割や全身性脂肪萎縮症の発症への関与、分子メカニズムについては明らかにされていない。

## 2. 研究の目的

脂肪萎縮症は脂肪組織が減少または消失する疾患の総称である。脂肪萎縮症にはその分布から全身性脂肪萎縮症や部分性脂肪萎縮症に分類され、また発症時期・原因により遺伝性脂肪萎縮症・後天性脂肪萎縮症に分類される。近年、下顎低形成、難聴、早老症様症状を伴う遺伝性の全身性脂肪萎縮症の原因遺伝子として、*POLD1* が同定されたが、その脂肪細胞での役割はこれまでほとんど明らかにされていない。そこで、脂肪細胞における *POLD1* の生理的機能を明らかにし、全身性脂肪萎縮症発症に関連する細胞内分子シグナルを同定することを目的として研究を開始した。

## 3. 研究の方法

(1) はじめに、当科にて診療中の全身性脂肪萎縮症患者さん（臨床的に MDPL が疑われる患者さん）より、書面にて同意を得た上でダイレクトシーケンス法にて *AGPAT2*、*BSCL2*、*CAVI*、*INSR* 等、既知の全身性脂肪萎縮症の原因遺伝子ならびに *POLD1* 遺伝子について、遺伝子解析を施行した。

(2) MDPL 疑い患者さんの確定診断を遺伝学的に行うために、全エクソンシーケンスを行う方針とした。書面にて同意を得た上で、両親ならびに患者さん本人について、全エクソームシーケンスを行った。

(3) *PIK3R1* は PI3K の調節サブユニットをコードし、*PIK3R1* 遺伝子変異陽性の患者由来線維芽細胞における PI3K シグナルは、定常状態での活性が亢進しており、インスリン刺激によってのさらなる活性の亢進が障害されることが既に知られている（Am J Hum Genet 2013）。そこで、本患者さんにおいても同様に PI3K シグナルの異常があると考え、機能解析を施行した。既報では、線維芽細胞を用いた検討であったため、線維芽細胞を採取する際にやや侵襲を伴う検討方法であった。そこで、我々は侵襲のより少ない血球細胞を用いた検討を行うこととした。

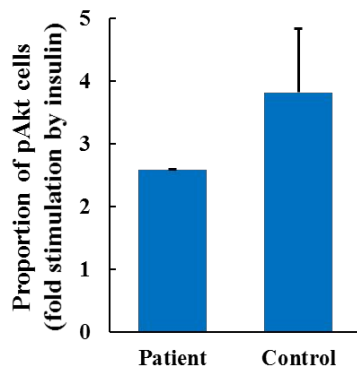
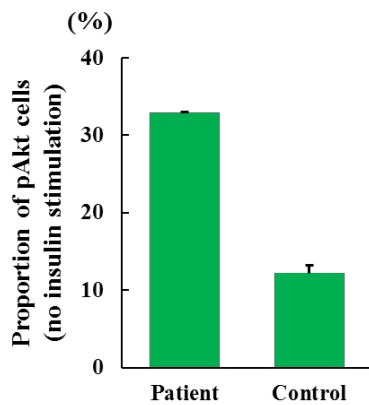
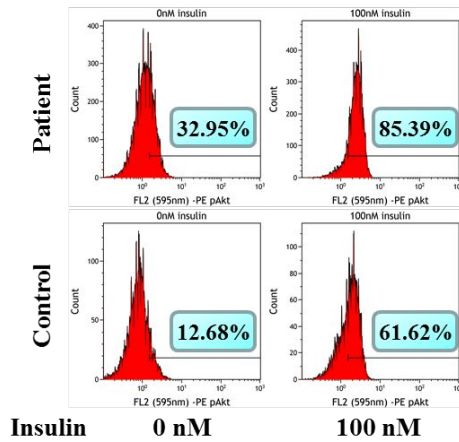
(4) 患者さんならびに正常コントロールから書面での同意を得た上で末梢血を採取し、そのうち単核球を Lymphocyte Separation Medium を使用して分離し、インスリン非刺激下ならびに刺激下でのリン酸化 AKT の割合をフローサイトメトリー機器を用いて検討した。

## 4. 研究成果

(1) *AGPAT2*、*BSCL2*、*CAVI*、*INSR* については変異を認めなかった。*POLD1* 遺伝子についても、多型は認めるものの、有意な遺伝子変異は認めなかった。

(2) 両親ならびに患者さん本人について、全エクソームシーケンスを行った結果、*PIK3R1* 遺伝子に新規の *de novo* の 33 塩基重複をヘテロ接合性に認めた。

(3) (4) 患者さん由来の細胞においては、コントロールに比し、インスリン非刺激下で pAKT の割合が多く、インスリン刺激による活性亢進が障害されていた。



図(上段): 患者さん、正常コントロールにおけるインスリン非刺激下ならびにインスリン刺激下における pAkt の割合 (フローサイトメトリーでの検討)

(中段): インスリン非刺激下での pAkt の割合

(下段): インスリン非刺激下と、インスリン刺激下での pAkt の割合の比

(5) *PI3K1* 遺伝子異常による脂肪性萎縮性糖尿病患者さんにおけるインスリンシグナルの異常を、末梢血を用いたフローサイトメトリー法で検討可能な可能性を示すことができた。今後多数例での検討を要するものの、*PI3K1* 遺伝子異常による脂肪性萎縮性糖尿病におけるインスリンシグナルの異常を簡便にかつ迅速に示すことができる可能性があり、意義深いものと考えている。

## 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)

大久保一宏、石井 加奈子、大山 紀子、トカン・ヴラッド、戸田 尚子、海老原 健、吉浦 孝一郎、井原 健二、大賀 正一：  
PIK3R1 変異により SHORT 症候群と診断した脂肪萎縮性糖尿病の一例  
日本内分泌学会雑誌 93 巻 2 号、Page536、2017

〔学会発表〕(計 2 件)

大久保一宏、石井加奈子、大山紀子、トカン・ヴラッド、戸田 尚子、海老原 健、吉浦 孝一郎、井原 健二、大賀 正一：  
脂肪萎縮性糖尿病に先天性難聴を合併し、PIK3R1 遺伝子に新生突然変異を認め SHORT 症候群と診断した一例  
第 51 回日本小児内分泌学会学術集会、2017.9.30

大久保一宏、石井 加奈子、大山 紀子、トカン・ヴラッド、戸田 尚子、海老原 健、吉浦 孝一郎、井原 健二、大賀 正一：  
PIK3R1 変異により SHORT 症候群と診断した脂肪萎縮性糖尿病の一例  
第 27 回臨床内分泌代謝 Update、2017.11.25

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

大久保一宏 (OHKUBO, Kazuhiro)

九州大学・大学院医学研究院成長発達医学・助教

研究者番号：60737576

(2)研究分担者  
( )

研究者番号：

(3)連携研究者  
( )

研究者番号：

(4)研究協力者  
( )