

## 論文の内容の要旨

論文題目 次世代シーケンサーを用いた著明なインスリン抵抗性またはインスリン分泌不全を認める糖尿病の遺伝子解析

氏名 細江 隼

### <背景>

単一遺伝子異常に伴う糖尿病である **monogenic diabetes** は、インスリン分泌不全やインスリン抵抗性を呈する複数のサブタイプが知られており、新生児糖尿病 (NDM)、若年発症成人型糖尿病 (MODY) などの疾患について、複数の原因変異が報告されてきたが、一方で遺伝子診断を受けずに治療されている **monogenic diabetes** の患者が相当数存在すると考えられている。疾患の原因変異を同定することが、適切な治療法の選択や、兄弟・子孫の発症リスク予測において有用となることがあり、早期診断が重要であると考えられる。現在はサンガーシーケンス法が、**single nucleotide variant (SNV)** やインデルを同定するためのゴールドスタンダードであるが、多大な時間や労力を要し、解析対象が少数の遺伝子に限定される。さらに遺伝子全体もしくは部分的な欠失・増幅を診断するためには、**MLPA** 法などの追加解析を必要とする。その改良法として近年、次世代シーケンサー (NGS) を用いた全エクソームシーケンス (WES) や疾患に関連する複数の遺伝子領域についてのターゲットリシーケンスにより、網羅的かつ高速な遺伝子解析が可能であることが報告されている。

【研究1 インスリン受容体遺伝子の **fibronectin type III domain** の変異により惹起された著明なインスリン抵抗性】

### <目的>

インスリン作用発現の第一段階において重要なインスリン受容体をコードする遺伝子の変異は、高度のインスリン抵抗性を惹起する。同遺伝子の変異に伴う疾患には、重症度の異なる複数の臨床病型が存在する。本研究では、包括的な遺伝子解析による原因変異の同定を目的とし、サンガー法に加えて WES やアレイ CGH (**comparative genomic hybridization**) を用いた探索を行った。また、近年結晶構造を用いた解析によって、同遺伝子とインスリンの結合様式の一部が明らかにされてきた。同遺伝子において、インスリンとの結合面および受容体前駆体のプロセッシング部位を含む部位の重要性について検討するため、変異箇所ドメインと重症度の関連について解析を試みた。

### <方法>

高度のインスリン抵抗性を認める4症例を解析の対象とした。従来のサンガー法によるインスリン受容体 (**INSR**) 遺伝子の解析に加えて、一部の症例では WES およびアレイ CGH を施行

した。さらに変異の部位とインスリン抵抗性の重症度との関係を調べるために、オンラインデータベースも用いて、*INSR* 遺伝子における、プロセシング部位およびインスリンとの結合部位を含むドメインによる変異のエンリッチメント解析を行った。最重症臨床病型の原因変異については、*INSR* 遺伝子の mutant を作成し、CHO 細胞に発現させ、遺伝子発現やインスリンシグナル伝達における影響を評価した。

#### <結果>

高度なインスリン抵抗性を認める症例について、サンガー法に加えて WES およびアレイ CGH を用いて原因変異探索を行い、結果として 4 検体とも *INSR* 遺伝子における新規変異を同定し、うち 1 検体では WES およびアレイ CGH を用いて同遺伝子のエクソン 2 を含む gross deletion を同定することに成功した。さらに、オンラインデータベースから収集した変異と本研究で同定した変異を用いて、統計学的にドメインのエンリッチメント解析を行い、最重症型の Leprechaunism の原因変異が *INSR* 遺伝子におけるプロセシング部位およびインスリンとの結合面を含む fibronectin type III domain (FnIII) に集積していることを明らかにした。また、機能解析を行い、同領域の一部変異によるタンパク質の機能低下を示した。本研究で Leprechaunism の症例において新規に同定された原因変異は同ドメイン上に存在していた。この原因変異について、*INSR* 遺伝子の mutant を作成し、CHO 細胞に発現させて機能解析を行ったところ、インスリン受容体前駆体のプロセシング、インスリン受容体の自己リン酸化、Akt リン酸化のいずれも障害されていた。

#### <考察>

インスリン受容体の細胞外部分の結晶構造が明らかにされ、インスリン受容体にはインスリンとの結合面が 2 箇所あることが知られている。そのうち primary binding site は L1 ドメインおよび  $\alpha$ CT から構成され、second binding site は、FnIII -1 および FnIII -2 の連結部近傍のループ領域から構成されている。本研究で解析対象となった患者のうち、最重症の Leprechaunism の症例は FnIII における変異を認めており、統計学的なドメイン解析により、最重症型の Leprechaunism の原因変異が *INSR* 遺伝子の FnIII に集積していることを明らかにした。本研究で解析対象とした糖尿病だけではなく、今後は他の疾患についても変異解析と統計学的ドメイン解析の統合解析が応用されることが期待できる。また、機能解析を行い、実際に同領域の一部変異によりタンパク質の機能低下を認めることを示した。FnIII にはプロセシング部位およびインスリンとの binding site が存在しており、同ドメインに最重症臨床病型の変異が集積していたことは、同部位の臨床的な重要性を支持すると考えられる。なお、WES のデータから *INSR* 遺伝子 エクソン 2 全域の deletion を検出することに成功したが、WES によって SNV やインデルだけではなくコピー数異常について信頼性の高い解析ができれば、コスト効率性や解析時間の面からも有益であるため、今後同様の解析についてさらなる精度向上が望まれる。

## 【研究2 著明なインスリン抵抗性またはインスリン分泌不全を認める糖尿病患者を対象とした糖代謝異常関連遺伝子についてのパネル解析】

### <目的>

monogenic diabetes の患者について適切な治療法を選択し、兄弟・子孫の発症リスク予測を行ううえで、早期の遺伝子診断が重要である。しかし、遺伝子診断されずに治療されている monogenic diabetes の患者が多く存在すると考えられている。本研究では、インスリン分泌不全またはインスリン抵抗性を認め、monogenic diabetes が疑われた患者を対象に、228 個の糖代謝関連遺伝子パネルを使用し、NGS を用いた包括的で高速な遺伝因子解析による疾患の原因変異同定を試みた。

### <方法>

インスリン分泌不全またはインスリン抵抗性を認め、monogenic diabetes が疑われたがサンガー法で変異が同定されていなかった患者 6 名と、既にサンガー法で疾患の原因変異が同定されている患者 2 名を解析の対象とした。monogenic diabetes の既知の原因遺伝子と 1 型糖尿病および 2 型糖尿病関連遺伝子等の合計 228 個の関連候補遺伝子をターゲットとしたターゲットキャプチャプローブを作製し、Illumina HiSeq 2000 次世代シーケンサーを用いてパネル解析を行った。call された variants から、フィルタリングを行い、原因変異探索解析を施行した。

### <結果>

8 症例において、糖代謝異常と関連する合計 228 個の遺伝子領域を対象に、NGS を用いたパネル解析を施行した。サンガーシーケンス法で既に疾患の原因変異が同定されている MODY の患者 2 名について、原因変異を正しく同定できることを確認した。また、高インスリン血症を認める症例では、以前 *INS* 遺伝子についてサンガーシーケンスを行い変異を同定できなかったが、本研究で *INSR* 遺伝子における既報の変異の同定に成功した。また、パネル解析にて疾患の原因変異が確定できなかった患者においても、一部の症例では原因変異の候補の絞り込みの結果、*WFS1* 遺伝子、*LGR5* 遺伝子、*CTRB1* 遺伝子、*BBS12* 遺伝子などに原因候補となる興味深いバリエーションを同定することができた。

### <考察>

本研究でデザインした monogenic diabetes の原因遺伝因子探索用のオリゴプローブは、近年実施されたゲノムワイド関連解析で同定された 1 型糖尿病、2 型糖尿病等の関連遺伝子も含めてターゲット領域を広くしており、さらにサンガー法による解析で診断されていない患者を多く解析対象に含めた。既にサンガーシーケンス法で変異が同定されている 2 名の MODY 患者について、ターゲットキャプチャ解析で変異を同定することに成功し、本研究で用いた monogenic diabetes のパネル解析により確かに変異を同定できることの確証を得た。さらに、高インスリン血症を認める 1 症例では、以前に *INS* 遺伝子についてサンガーシーケンスを行い変異を同定できなかったが、本研究では包括かつ高速なターゲットキャプチャ解析を行うことにより、*INSR* 遺伝子における変異の同定に成功した。今回診断はできなかった患者においても、原因変異の候補の絞り込みの結果、一部の症例で 2 型糖尿病関連遺伝子領域などに疾患の

原因候補と考えられる興味深いバリエントを同定しており、疾患の原因かどうか検証するために今後家系での解析や機能解析をすすめる方針である。今後、多くの検体を対象に NGS による高速で包括的な遺伝子解析を行うことにより、新規の変異が同定されることが期待される。本研究によって早期診断と治療法選択への活用を目指した NGS が有用となりうることを示した。