

令和元年6月3日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16164

研究課題名（和文）ヒストンメチル基転移酵素遺伝子異常による巨人症の機序の解析

研究課題名（英文）mechanism of gigantism caused by histone methyltransferase gene abnormality

研究代表者

隅田 健太郎（Suda, Kentaro）

神戸大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：50791422

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）：Luscan-Lumish症候群患者の細胞を用いて解析した。SETD2のヒストンメチル化能は有意な変化を認めなかったがGH投与でのSTAT5のリン酸化の亢進を認めた。SETD2タンパクとGHシグナル関連タンパクとの結合能を調べたところ、SETD2はSOCS2に結合していた。SETD2導入によりGH刺激下におけるSTAT5のリン酸化が亢進しているとともに、SOCS2の発現が低下していた。SETD2のSOCS2に対するメチル化能は明らかではなかった。変異SETD2はSOCS2の機能に何らかの機序で障害を与え高身長に影響している可能性があり、現在SETD2欠損細胞を作成し、さらなる解析を行っている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

SETD2の変異が高身長を起こす機序のみでなく、同様のヒストンメチル基転移酵素であるNSD1、EZH2の身長を規定する共通の機序の解明にもつながり、本症例でみられる高身長症例のみならず、他の高身長や低身長など成長障害の新たな治療法につながる新たな知見を得ることができると考えている。

研究成果の概要（英文）：Analysis was performed using cells from the patient with Luscan-Lumish syndrome. The histone methylation by mutated SETD2 was not significantly changed, but the GH induced phosphorylation of STAT5b was enhanced. The binding ability of SETD2 protein with those related with GH signal was examined, and SETD2 was bound to SOCS2. The overexpression of SETD2 promotes the GH induced phosphorylation of STAT5b and the expression of SOCS2 was decreased. The methylation of SOCS2 by SETD2 was not changed. Mutated SETD2 might impair the function of SOCS2 in unexplained mechanism and might affect the height, so we prepared the SETD2-deficient cells for further analysis.

研究分野：内分泌学

キーワード：巨人症 遺伝子変異 成長ホルモン

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

1. 研究開始当初の背景

先端巨大症、巨人症は、そのほとんどが下垂体腫瘍の発生、および腫瘍からの成長ホルモン(以下GH)の過剰分泌とそれに伴う血中 Insulin-like Growth factor (以下 IGF-I)の過剰により症状が徐々に進行する疾患である。先端巨大症では手足の肥大や特有の顔貌が出現する一方で、巨人症では骨端線が閉じる前の発育期に罹患した結果としての身長増加が著明であり、最終身長は男子で 185cm 以上、女子 175cm 以上の高身長を呈する。合併症として糖尿病、高血圧症、脂質異常症などの動脈硬化性疾患や悪性腫瘍などを来す。治療としては手術や薬物療法、放射線療法が行われる。病勢のコントロールが不良の場合は上記の合併症の進展の結果として予後が不良である一方で、血中 IGF-I を正常化することが予後の改善につながる。

その一方で、下垂体腺腫や他の GH 産生腫瘍を伴わない先端巨大症は Acromegaloidism と呼ばれている。鑑別診断として強皮骨膜症、アッシャー症候群、多発性粘膜炎神経腫症候群などがあげられ、高身長を伴う巨人症の鑑別診断として、クラインフェルター症候群や 48XXYY などの染色体異常や、脳性巨人症をきたす Sotos 症候群、その類縁疾患である Weaver 症候群がある。

Sotos 症候群、Weaver 症候群はそれぞれヒストンメチル基転移酵素である NSD1、EZH2 の遺伝子変異により発症する。NSD1 はヒストン H3 の 36 番目のリジンにジメチル化、EZH2 は H3 の 27 番目のリジンをトリメチル化する事で、標的遺伝子の転写の調節を行っている。いずれの疾患でも出生前からの高身長、特異の顔貌、発達遅滞を認めるが、発症機序については不明な部分が多い。また 2014 年に原因不明の巨人症に対する全エクソン解析により、ヒストンメチル基転移酵素である SETD2 遺伝子のヘテロ変異を認め、Luscan-Lumish 症候群と名付けられた症例が報告された。

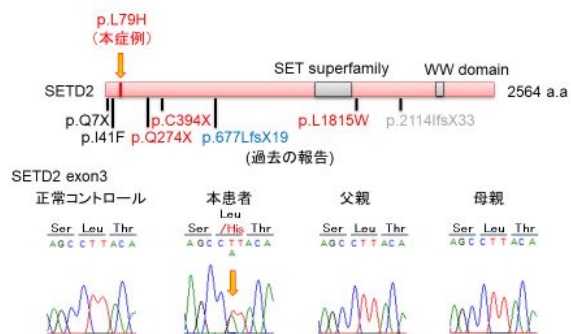
Luscan-Lumish 症候群は、出生後の高身長とともに、先端巨大症様顔貌、知能障害を呈する疾患である。他の症状として肥満、骨年齢促進、キアリ奇形、けいれん発作の報告がある。原因遺伝子である SETD2 は、NSD1 や EZH2 と同様のヒストンメチル基転移酵素であり、H3 の 36 番目のリジンをトリメチル化する事で、関連遺伝子の転写の調節を行っている。フレームシフト変異では症状がより顕著に表れるのに対し、ミスセンス変異では過成長と先端巨大症顔貌、キアリ奇形のみで症状は比較的軽度である。本変異が高身長を来す機序はこれまでのところ全く不明である。

2. 研究の目的

申請者は今まで先端巨大症、巨人症の臨床に携わり多くの症例を経験してきた。先端巨大症の有病率は 10 万人あたり 8-24 人と比較的稀な疾患と考えられているが、症状発現が緩徐である事、顔貌の特徴が加齢性変化と鑑別しにくい場合がある事、非専門医に見逃されている場合がある事などが原因で、有病率は低く見積もられている可能性があり、今までに申請者らの研究により、日本人 2 型糖尿病の入院患者のうち、GH 産生下垂体腺腫が 327 人中 2 人(10 万人あたり 610 人)とより高率に存在する可能性が示唆されており(Endocr J. 62: 53-9, 2015)、GH 産生下垂体腺腫の適切な診断が重要と考えられた。

その臨床研究の中で、明らかな高身長、先端巨大症様顔貌を呈しているにも関わらず、先端巨大症、巨人症で通常みられる成長ホルモン過剰分泌や血中 IGF-I 高値を認めない症例が存在し、それらの疾患における高身長の原因を明らかにすることが重要と考えている。そこで高身長患者に遺伝子異常がないか、慶應義塾大学小児科学教室と共同研究において、エクソーム解析を行った所、興味深い事に SETD2 遺伝子に de novo のヘテロの L79H ミスセンス変異を見出した(右図)。巨人症、先端巨大症様顔貌、また同疾患で見られるキアリ奇形を本患者にも認めたことから、本症例を Luscan-Lumish 症候群と診断した。そこで本研究では、SETD2 変異が高身長に関与する機序を明らかにする事を目的とした。

エクソーム解析によって、患者の SETD2 遺伝子に de novo のヘテロのミスセンス変異を同定した



3. 研究の方法

1) 患者細胞におけるヒストンメチル化、GH-IGF-I シグナルの変化の解析

SETD2 がヒストンメチル基転移酵素であることから、患者の細胞におけるヒストンメチル化の変化を解析する。具体的には、患者および家族から採取した線維芽細胞を GH で刺激し全細胞破砕液を抽出した後、ヒストンメチル化抗体を用いたウエスタンブロッティング法を用いて解析する。患者の変異はヘテロ変異であり、全細胞破砕液からの解析では差が十分にみられない可

能性があるため、差が十分にみられない場合は、細胞破碎液からヒストン分画を抽出し、同様にウエスタンブロッティング法で解析する。

また患者の線維芽細胞では明らかな成長ホルモン過剰分泌や IGF-1 の増加を認めていなかったが、明らかな高身長を呈している原因として GH-IGF-1 シグナルに異常がないか、GH 刺激下での GH シグナルの変化、下流における STAT5b の転写活性や IGF-1 mRNA の発現量を、GH 刺激した線維芽細胞抽出液を用いて解析する。さらに、IGF-1 シグナルに変化がないか、IGF-1 投与後の細胞破碎液からウエスタンブロッティング法を用いて解析する。

2) 正常・変異 SETD2 コンストラクトの作成

2008 年に SETD2 の consensus 配列が改訂になっており、現時点で新しい正常 SETD2 は市場にないことから、患者 DNA から増幅、あるいは以前の SETD2 配列に新しい配列を挿入して作成する必要があると考えられた。まずは患者および家族の線維芽細胞から抽出した DNA から、PCR 法を用いて SETD2 配列を増幅し、TOPO cloning kit を用いてプラスミド内に subcloning 法によりコンストラクトを作成するとともに、完成した配列についてダイレクトシーケンス法を用いて確認する。ただ SETD2 は 7500bp とかなり長い配列を有しており、患者および家族の DNA からの増幅が困難である可能性が考えられる。その場合は 2008 年以前の SETD2 のコンストラクトを入手するとともに、患者および家族の DNA から新しい配列にあたる部分のみを増幅し、2 つの配列を HD fusion cloning kit を用いて融合させて新しい SETD2 配列の入ったコンストラクトを作成する。そのようにして正常 SETD2 コンストラクトを作成した後、患者で見られた L79H 変異、および今までに Luscan-Lumish 症候群の遺伝子異常として知られている変異を、QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit を用いて野生型 SETD2 に導入する。

3) SETD2 導入細胞におけるヒストンメチル化、GH, IGF-1 シグナル変化の解析

作成した正常および変異 SETD2 を培養細胞に transfection して、SETD2 がヒストンメチル化に変化を及ぼすか否か、また GH, IGF-1 シグナルに変化を起こすかどうか、ウエスタンブロッティング法を用いて解析する。具体的に、まずはヒト腎線維芽細胞株である HEK293 あるいはヒト骨肉腫細胞株である Saos-2 に、XtremegeneHP 試薬を用いて SETD2 を transfection し、GH で刺激し全細胞破碎液を抽出し、ウエスタンブロッティングを行う。ただ HEK293, Saos-2 には内因性 SETD2 が存在していることから、導入 SETD2 による変化を十分に確認できない可能性がある。その場合は SETD2 変異株である A498, LB996 の細胞株や、ゲノム編集技術である CRISPR や TALEN を用いて SETD2 を欠損させた培養細胞を作成して同様の検討を行う。

4) GH, IGF-1 シグナル関連タンパクと SETD2 との相互作用の解析

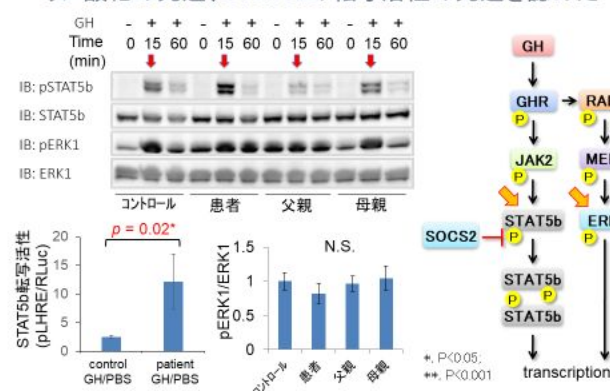
患者の細胞や、変異 SETD2 導入細胞でヒストンメチル化に変化が見られなかった場合、ヒストンのメチル化ではなく、ヒストン以外のタンパクの SETD2 によるメチル化の変化が関連している可能性が考えられる事から、特に GH, IGF-1 シグナル関連タンパクのメチル化を解析する。また GH, IGF-1 シグナルに変化があった場合、具体的にどの関連タンパクと相互作用しているか、またその相互作用により互いのタンパクにどのような影響を及ぼしているかについても解析を行う。具体的に、まずはヒト腎線維芽細胞株である HEK293 あるいはヒト骨肉腫細胞株である Saos-2 に、XtremegeneHP 試薬を用いて正常および変異 SETD2 を transfection し、GH で刺激し全細胞破碎液を抽出し、各種抗体で免疫沈降を行った後、GH シグナル関連タンパクの抗体、また IGF-1 シグナル関連タンパクの抗体でブロッティングを行う。ただ HEK293, Saos-2 には内因性 SETD2 が存在していることから、導入 SETD2 の相互作用を十分に確認できない可能性がある。その場合は SETD2 変異株である A498, LB996 の細胞株や、ゲノム編集技術である CRISPR や TALEN を用いて SETD2 を欠損させた培養細胞を作成して同様の検討を行う。

4. 研究成果

1) 患者細胞におけるヒストンメチル化、GH-IGF-1 シグナルの変化の解析

神戸大学皮膚科学教室との共同研究により患者および家族の前腕より線維芽細胞を採取し解析を行った。SETD2 がヒストンメチル基転移酵素であるが、患者におけるメチル化能はコントロールと比較し有意な変化を認めなかった。しかし患者細胞では GH 投与での STAT5 のリン酸化の亢進を認めた。線維芽細胞における IGF-1 mRNA 発現量は確認が困難であったが、下流の STAT5b の転写活性は亢進を認めた。MAPK や STAT1 のリン酸化は明らかな変化を認めず、IGF-1 投与後の AKT リン酸化についても変化を認めなかったことから、この変化は STAT5b 特異的であると考えられた。(右図)

患者の線維芽細胞において、GH刺激下でのSTAT5bリン酸化の亢進、STAT5bの転写活性の亢進を認めた



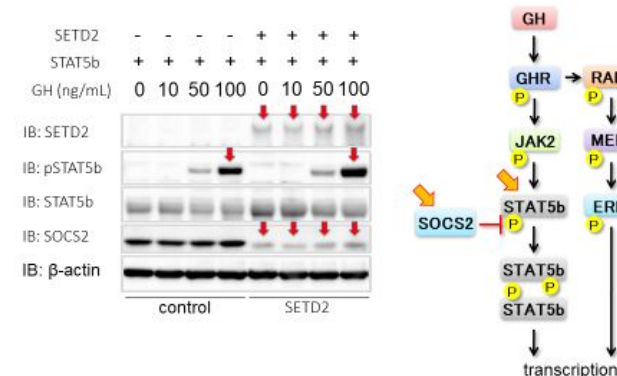
2) 正常・変異 SETD2 コンストラクトの作成

まずは患者および家族の線維芽細胞から抽出した DNA から、PCR 法を用いて SETD2 配列を増幅することを試みたが増幅が困難であった。そのため 2008 年以前の SETD2 のコンストラクトを譲渡いただき、また新しい配列にあたる部分の cDNA を購入し、2 つの配列を HD fusion cloning kit を用いて融合させることを試みたが融合がうまくいかなかったため、二つの配列を Overlap Extension PCR を用いて結合した後に TOPO cloning kit を用いて導入し新しい SETD2 配列の入ったコンストラクトを作成することができた。その後患者で見られた L79H 変異を、QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit を用いて野生型 SETD2 に導入し、野生型 SETD2、L79H human-SETD2 を作成することができた。

3) SETD2 導入細胞におけるヒストンメチル化、GH シグナル変化の解析

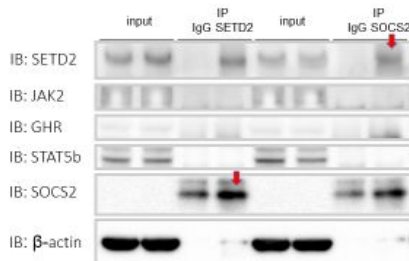
作成した野生型および変異 SETD2 を HEK293 に transfection してヒストンメチル化能の変化を確認したが、H3K36me3 に明らかな変化を認めなかった。次に GH シグナルに変化を起こすかどうか、野生型 SETD2 を導入し解析した所、SETD2 導入により SOCS2 のタンパク量が低下するとともに、STAT5b のリン酸化は亢進を認めたことから、SETD2 が SOCS2 の機能を低下させることにより STAT5b のリン酸化を間接的に亢進させていることが考えられた。ただこの細胞には内因性 SETD2 が発現していることから、SETD2 の欠損株である A498、LB996 細胞でも同様の解析を行ったが強制発現が困難であり施行困難であった。現在 CRISPR の系による SETD2 欠損 Saos-2 を作成済みであり、本細胞に electroporation での導入が確認できたことから、本細胞での同様の実験をすすめている。

SETD2の強制発現によりSOCS2の発現低下とSTAT5bリン酸化の亢進を認めた



4) GH シグナル関連タンパクと SETD2 との相互作用の解析

Saos-2細胞において、SETD2はSOCS2と結合している



患者の細胞や SETD2 導入細胞でヒストンメチル化に変化が見られず、GH シグナルに変化を認めたことから、GH 関連タンパクと SETD2 との相互作用について、免疫沈降法により解析を行った。Saos-2 細胞において免疫沈降法を行った所、内因性 SOCS2 と内因性 SETD2 が結合している事が確認できた。この結合は SOCS1 や SOCS3 とは認めず、SOCS2 特異的と考えられた。また外因性 SETD2 について HEK293 に強制発現により導入し行い解析を行った所、同様に SOCS2 と SETD2 の結合が確認できた。

SETD2 はメチル基転移酵素であることから、SOCS2 のメチル化の変化について解析を行ったが、明らかな変化を認めなかった。SOCS2 はユビキチンリガーゼであることから、現在 SOCS2 が SETD2 をユビキチン化するかどうかについての解析を行うとともに、変異 SETD2 において SOCS2 との結合が変化しているか否かについても解析を進めている。

5 . 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 1 件)

隅田 健太郎、福岡 秀規、井口 元三、蟹江 慶太郎、藤田 康功、小武 由紀子、吉田 健一、坂東 弘教、高橋 路子、千原 和夫、鳴海 覚志、長谷川 泰延、小川 渉、高橋 裕、Luscan-Lumish 症候群による巨人症発症機序の解析、第 91 回日本内分泌学会学術集会、2018 年

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：高橋 裕

ローマ字氏名：TAKAHASHI, yutaka

所属研究機関名：神戸大学

部局名：大学院医学研究科

職名：准教授

研究者番号(8桁): 70301281

研究分担者氏名：永井 宏

ローマ字氏名：NAGAI, hiroshi

所属研究機関名：神戸大学

部局名：大学院医学研究科

職名：准教授

研究者番号(8桁): 80335447

研究分担者氏名：長谷川 泰延

ローマ字氏名：HASEGAWA, tomonobu

所属研究機関名：慶応義塾大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号(8桁): 20189533

(2)研究協力者

研究協力者氏名：西澤 衡

ローマ字氏名：NISHIZAWA, hitoshi

研究協力者氏名：坂東 弘教

ローマ字氏名：BANDO, hironori

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。