

令和 3 年 5 月 26 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08527

研究課題名（和文）MIRAGE症候群：ゲノム編集による疾患モデルマウスの作成と病態解明

研究課題名（英文）The pathogenesis of MIRAGE syndrome revealed by model mice using genome editing

研究代表者

長谷川 奉延（Hasegawa, Tomonobu）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・教授

研究者番号：20189533

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：MIRAGE症候群（以下本症候群）は、造血異常、易感染性、成長障害、副腎低形成、性腺症状、消化器症状を主症状とし、責任遺伝子はSAMD9である。本研究では、CRISPR/Cas9を用いたゲノム編集技術により、本症候群で認められたSAMD9点変異をマウスに導入し、タモキシフェン投与により変異遺伝子が発現する本症候群モデルマウスを作成した。その表現型および病理所見の主な所見は1．寿命の短縮、2．生存マウスの明らかな体重増加不良、3．胸腺・脾臓・卵巣・腸管・腎臓・膵臓・骨髄・大脳・心臓・副腎の組織学的異常である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の学術的意義は以下の通りである。すなわち、世界で初めてMIRAGE症候群（以下本症候群）のモデルマウスの作成に成功した。モデルマウスにより本症候群のin vivo病態解析が進む。既に本研究により、本症候群に認められる臨床症状からの予想を上回る極めて多彩な臓器の組織学的変化が明らかとなった。今後、細胞レベル、遺伝子発現レベルでの解析が期待される。また治療法のない本症候群に対するin vivo薬物スクリーニングが可能となった。

研究成果の概要（英文）：MIRAGE syndrome is characterized by myelodysplasia, infection, restriction of growth, adrenal hypoplasia, genital phenotype, and enteropathy, caused by mutation in SAMD9. We generated MIRAGE syndrome model mice using genome editing, CRISPR/Cas9 system. In model mice, the expression of mutant SAMD9 by tamoxifen treatment induced the following phenotypes. 1. shortening in the life span, 2. poor weight gain in surviving mice, 3. histological abnormalities in thymus, spleen, ovary, intestine, kidney, pancreas, bone marrow, cerebral cortex, heart, and adrenal.

研究分野：小児内分泌学

キーワード：MIRAGE症候群 ゲノム編集

1. 研究開始当初の背景

我々は科研費(平成27年 29年度(基盤研究(C)(2))研究課題番号 15K09599)を用いて世界に先駆けて MIRAGE 症候群(以下本症候群)の疾患単位を確立し、責任遺伝子として *SAMD9* ヘテロ接合性機能亢進型変異を同定した(Nat Genet 48;792-797,2016 引用文献 1)。本症候群の中核症状は、M(myelodysplasia:造血異常)、I(infection:易感染性)、R(restriction of growth:出生前からの成長障害)、A(adrenal hypoplasia:副腎低形)、G(genital phenotypes:性腺症状)、E(enteropathy:慢性下痢)である。しかし、変異 *SAMD9*がこれらの症状をひき起こす分子メカニズム、および本症候群の長期的臨床症状、罹患臓器の縦断的な病理所見はいずれも不明であった。またこれらの不明点を解明するために、本症候群患者を対象とした研究のみでは時間的および倫理的制約が大きいことは明白であった。そこで本症候群の疾患モデルマウスを作成することとした。なお、本症候群は申請者が確立した疾患であるため、研究開始当時に国外には同様の研究は存在しなかった。

2. 研究の目的

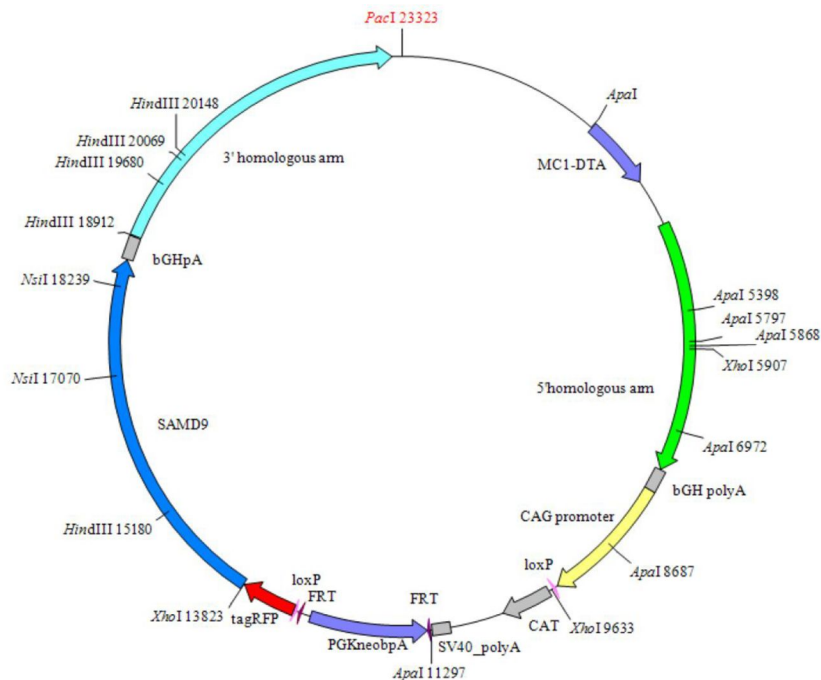
本研究の目的は、*SAMD9*のヘテロ接合性機能亢進型変異によって発症する本症候群の疾患モデルマウスをゲノム編集技術により作成し、以下4点により本症候群の病態・病理所見を *in vivo*で解明することである。1)変異 *SAMD9*を有する本症候群モデルマウスを作成する。2)本症候群モデルマウスの表現型(成長障害および副腎機能低下の有無など)を縦断的に観察し、内分泌学的検討を加える。3)本症候群モデルマウスの病理所見を光学および電子顕微鏡学的、また免疫組織学的に評価する。4)本症候群の中核症状の臓器である副腎において網羅的遺伝子発現解析を行い、副腎低形成の分子病態を解明する。

3. 研究の方法

本研究の具体的な方法は以下のとおりである。

1)本症候群モデルマウスの作成:マウスには *SAMD9*に相当する遺伝子が存在しないため、複数のステップを踏んで本症候群モデルマウスを作成する必要がある。すでに科研費(平成27年 29年度(基盤研究(C)(2))研究課題番号 15K09599)を用い、ROSA26遺伝子プロモーターの制御下でloxP-終止コドン-loxPの3'側にred fluorescent protein (RFP)-野生型 *SAMD9*をヘテロ接合性に有するROSA26/Sノックインマウスを作成した。このマウスを作成するために使用した23,323bpのターゲティングベクターを図1に示す。

図1 使用したターゲティングベクター



このマウス同志を掛け合わせ、ROSA26遺伝子プロモーターの制御下でloxP-終止コドン-loxPの3'側にRFP-野生型*SAMD9*をホモ接合性に有するマウスを作成した。本研究では、このマウスとCAGプロモーター制御下でタモキシフェン誘導型Creリコンビナーゼを発現するCAG/Cre-ERT2トランスジェニックマウスを交配し、タモキシフェン投与下にヒト野生型*SAMD9*を発現するマウス(以下対照マウス)を得る。対照マウスの精巢上体から精子を採取し、この精子と野生型マウスの卵子を体外受精させる。得られた受精卵にCRISPR/Cas9を用いたゲノム編集技術により本症候群で認められた*SAMD9*点変異(p.R1293W)を導入する。結果としてタモキシフェン投与下にp.R1293Wを発現する本症候群モデルマウスを作成する。

2) 表現型の解析

成長(体重)の評価等を行う。

3) 病理所見

経時的に本症候群の主要罹患臓器である、胸腺、副腎、性腺、腸管を含む全身臓器の病理所見を光学および電子顕微鏡学的に検討する。組織学的変化を認めた臓器においては、組織特異的遺伝子発現の変化の有無を確認するため、免疫組織学的検討を加える。

4) 内分泌学的評価

血中副腎皮質刺激ホルモン(ACTH)、およびコルチコステロン(CS)(マウスにおける主要な副腎皮質ステロイドホルモン)を経時的に測定する。

4. 研究成果

1) 予定通り、ROSA26遺伝子プロモーターの制御下でloxP-終止コドン-loxPの3'側にRFP-野生型*SAMD9*をホモ接合性に有するマウスとCAGプロモーター制御下でタモキシフェン誘導型Creリコンビナーゼを発現するCAG/Cre-ERT2トランスジェニックマウスを交配し、タモキシフェン投与下にヒト野生型*SAMD9*を発現するマウス(以下対照マウス)を得た。対照マウスの精巢上体から精子を採取し、この精子と野生型マウスの卵子を体外受精させた。得られた受精卵にCRISPR/Cas9を用いたゲノム編集技術により本症候群で認めた*SAMD9*点変異(p.R1293W)を導入した。最終的に、3週目のマウスにタモキシフェンを3日間 100 microgram/体重 (gram) / dose 腹腔内投与下により、p.R1293Wを発現する本症候群モデルマウスを得た。

2) 表現型の解析

以後の解析は対照マウスと本症候群モデルマウスを比較した。

雄はタモキシフェン投与後5日目、雌はタモキシフェン投与後3日目に安楽死させ、以下の所見を得た。

2)-1. 本症候群モデルマウスは肉眼的に対照マウスに比して小さかった(図2)。現在、体長および体重の推移を統計処理中である。

図2 タモキシフェン投与後に安楽死させた際の対照マウスと本症候群モデルマウス

本症候群モデルマウス 対照マウス

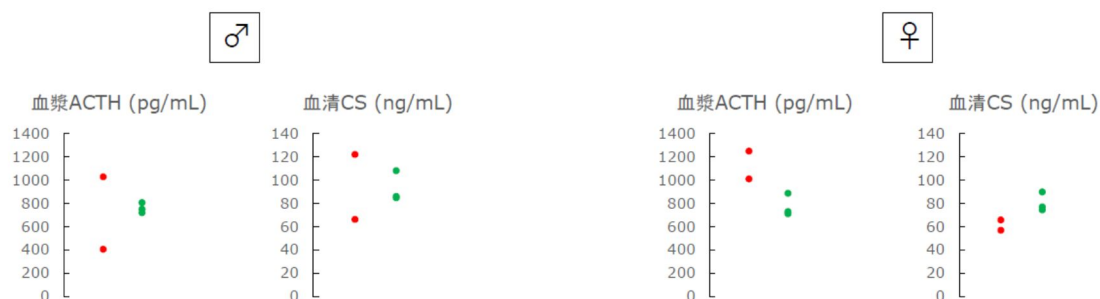


2)-2. 本症候群モデルマウスに全身臓器の組織学的異常を認めた。(1)胸腺:高度のアポトーシス、マクロファージの浸潤、間質の線維増生(2)脾臓:アポトーシス、白脾髄および赤脾髄のリンパ球減少(3)卵巣:閉鎖卵胞の増加(4)腸管:胃腺上皮のアポトーシス、腸管膜リンパ節のリンパ球減少(5)腎臓:集合管におけるアポトーシス(6)膵臓:膵房細胞の高度のアポトーシス(7)骨髄:リンパ球減少(8)大脳:海馬領域の神経細胞アポトーシス(9)心臓:心筋の空胞変性、心筋線維の大小不同(10)副腎:副腎皮質のアポトーシス、皮髄境界のアポトーシス(11)肝臓・肺・脊髄・大腿骨:明らかな異常なし。結果として、タモキシフェン投与モデルマウスはMIRAGE症候群の主症状である、骨髄異常、免疫系異常、成長障害、副腎異常、性腺症状、腸管異常をいずれも部分的に

示した。

2)-3. 血中副腎皮質刺激ホルモン(ACTH)、およびコルチコステロン(CS)は対照マウスと本症候群モデルマウスに明確なオーバーラップを認めた(図3)。

図3 対照マウスと本症候群モデルマウスの血中ACTHおよびCS



(左側は本症候群モデルマウス、右側は対照マウスを示す)

2)-4. 現在さらに以下の研究を継続している。

- (1) 出生時・2週齢・4週齢・8週齢・24週齢における体長および体重の計測
- (2) 組織学的異常を認めた臓器(胸腺など)における電子顕微鏡学的評価、免疫組織学的評価
- (3) 血中 ACTH および CS の測定
- (4) 副腎などの臓器における経時的な網羅的遺伝子発現解析

<引用文献>

1. Narumi S, Amano N, Ishii T, Katsumata N, Muroya K, Adachi M, Toyoshima K, Tanaka Y, Fukuzawa R, Miyako K, Kinjo S, Ohga S, Ihara K, Inoue H, Kinjo T, Hara T, Kohno M, Yamada S, Urano H, Kitagawa Y, Tsugawa K, Higa A, Miyawaki M, Okutani T, Kizaki Z, Hamada H, Kihara M, Shiga K, Yamaguchi T, Kenmochi M, Kitajima H, Fukami M, Shimizu A, Kudoh J, Shibata S, Okano H, Miyake N, Mastumoto N, Hasegawa T. *SAMD9* mutations cause a novel multisystem disorder, MIRAGE syndrome, and are associated with loss of chromosome 7. *Nat Genet* 48:792-797,2016 査読有

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Shima H, Hayashi M, Tachibana T, Oshiro M, Amano N, Ishii T, Haruna H, Igarashi M, Kon M, Fukuzawa R, Tanaka Y, Fukami M, Hasegawa T, Narumi S.	4. 巻 7;13(11)
2. 論文標題 MIRAGE syndrome is a rare cause of 46,XY DSD born SGA without adrenal insufficiency.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0206184.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 鳴海覚志、長谷川奉延	4. 巻 48
2. 論文標題 MIRAGE症候群	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 周産期医学	6. 最初と最後の頁 1526-1530
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 鳴海覚志、長谷川奉延	4. 巻 73
2. 論文標題 MIRAGE症候群 先天性副腎低形成症を主徴とする新たな遺伝子疾患	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 最新医学	6. 最初と最後の頁 1115-1120
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 天野直子、長谷川奉延	4. 巻 78
2. 論文標題 MIRAGE症候群	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本臨牀	6. 最初と最後の頁 489-491
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 長谷川奉延
2. 発表標題 Cutting edge: 日本から発信する新しい疾患概念 MIRAGE症候群 新規疾患単位の確立とその後の“思いもよらない”展開
3. 学会等名 第28回臨床内分泌代謝Update（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 長谷川奉延
2. 発表標題 副腎で輝く星・副腎に見える嵐気楼
3. 学会等名 第6回PA・Aldosterone関連疾患研究会特別講演（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長谷川奉延
2. 発表標題 小児期発症原発性副腎機能低下症の分子基盤
3. 学会等名 第93回日本内分泌学会学術総会 教育講演（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 長谷川奉延
2. 発表標題 副腎で輝く星・副腎に見える嵐気楼
3. 学会等名 名古屋糖尿病・内分泌Online研究会（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	高田 修治 (Takada Shuji) (20382856)	国立研究開発法人国立成育医療研究センター・システム発生・再生医学研究部・部長 (82612)	
研究分担者	鳴海 覚志 (Narumi Satoshi) (40365317)	国立研究開発法人国立成育医療研究センター・分子内分泌研究部基礎内分泌研究室・室長 (82612)	
研究分担者	石井 智弘 (Ishii Tomohiro) (70265867)	慶應義塾大学・医学部(信濃町)・准教授 (32612)	
研究分担者	天野 直子 (Amano Naoko) (70348689)	慶應義塾大学・医学部(信濃町)・共同研究員 (32612)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------