

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19504

研究課題名(和文)小児先天異常症における代謝システム制御機構とがん細胞代謝とのクロストーク

研究課題名(英文) Crosstalk between mechanism of metabolic abnormalities in congenital disorders and cancer cell metabolism

研究代表者

青木 洋子 (Aoki, Yoko)

東北大学・医学系研究科・教授

研究者番号：80332500

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：Costello症候群はRASopathiesに属する先天性疾患である。私達はそのモデルマウスを作製し、高脂肪食投与では太りにくく、肝臓で小滴性脂肪肝を呈しベータ酸化異常が示すことを報告した。本研究では解糖系、糖新生、脂質代謝、核酸、アミノ酸代謝について網羅的に解析した結果、変異マウスでは前回同様に血糖値が低下するとともに、酸化関連遺伝子の発現減少が認められた。加えて解糖系の亢進、コレステロール合成の亢進、血糖値調節に働くホルモンであるグルカゴン上昇、グルカゴンが高いにも関わらず糖新生が低下していることが明らかになった。しかし、これらの遺伝子の発現変動は絶食下では観察されないことが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、HRASの活性化変異を発現するマウス個体における代謝性変化をみることで、がん細胞の代謝のin vivoモデルになるのではないかと発想から生まれた。HRAS活性化変異を有するマウスの網羅的な代謝パスウェイの解析を行うことで、コステロ症候群の患者さんでの成長障害や低血糖などのメカニズム解明に役だつ可能性がある。さらに研究を進めることでがん細胞における代謝や、がんの進展における代謝的变化などを俯瞰することが可能と考えられる。

研究成果の概要(英文)：Costello syndrome is involved in RASopathies. We have generated Costello syndrome model mice and found that the mutant mice are resistant to high-fat diet-induced obesity. Histology of liver showed microvesicular hepatic steatosis, suggesting abnormal beta-oxidation. In this study, we comprehensively analyzed glycolysis, gluconeogenesis, lipid metabolism, nucleic acid, and amino acid metabolism in addition to the revealed mitochondrial  $\beta$ -oxidation pathway in the liver. In mutant mice, the blood glucose level decreased and the expression of  $\beta$ -oxidation-related genes decreased. In addition, glycolysis and cholesterol synthesis are enhanced with increased glucagon levels, which is a hormone that regulates blood glucose level. Gluconeogenesis is decreased despite high glucagon. Surprisingly, however, changes in the expression of these genes involved in energy metabolism were not observed at all after fasting.

研究分野：先天性疾患

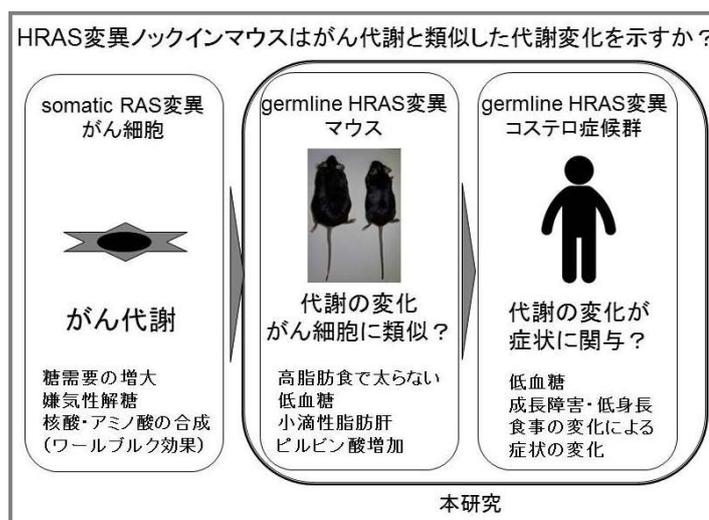
キーワード：先天異常症 代謝 がん原遺伝子

1. 研究開始当初の背景

Costello 症候群患者は受精卵から HRAS の活性化変異を有し、骨格異常、肥大型心筋症、精神遅滞、易発がん性を示す。Costello 症候群患者は重度な成長障害や低血糖をきたし、なんらかの代謝・内分泌的障害をもつと考えられてきたが、そのメカニズムは明らかではない

Costello 症候群は Noonan 症候群、cardio-facio-cutaneous 症候群と同様 RAS/MAPK シグナル伝達経路の異常をきたす疾患 (RASopathies あるいは RAS/MAPK 症候群) である。当研究室ではこれまでに BRAF Q257R 変異ノックインマウスを作製し、マウスが CFC 症候群と同様に心疾患・骨格異常・成長障害を示すことを明らかにした(Inoue S, et al Hum Mol Genet, 2014; Moriya et al. Hum Mol Genet, 2015; Inoue S et al. Hum Mol Genet, 2017)。

当研究室ではコストロ症候群で最も頻度の高い G12S 変異を発現するノックインマウスを世界で初めて作成に成功し、現在解析を行っている。HRAS 変異マウスは特徴的な顔貌、心肥大、腎疾患を認めた。通常の餌では体重増加は正常と同等であるが、高脂肪食投与では太りにくいという表現型を持つ。高脂肪食投与後 HRAS 変異マウスの肝臓の観察では、β酸化異常を疑わせる小滴性脂肪肝となっており、血中のアシルカルニチン分析と関連酵素の発現解析よりペー酸化異常が示唆された。また肝臓の mRNA 発現解析にてがん細胞で見られるのと同様の代謝酵素の発現の上昇がみられた。



2. 研究の目的

私達は、最近コストロ症候群で最も頻度の高い HRAS 変異を有するモデルマウス (HRAS 変異マウス) 作製にも世界で初めて成功した。本研究では、1) RAS 変異を発現するモデルマウスにおいて、メタボローム解析を行いがん細胞で見られるのと同様の代謝性変化がみられるのかどうか明らかにする。餌の組成により代謝異常が改善するかどうか検討を行う。

2) RAS 変異をもつコストロ症候群の血液・尿サンプルを収集し、メタボローム解析を行い、マウスで見られたような代謝的な変化がみられるかどうかを検証する。食事内容の変化により代謝異常が改善されるかどうか検討を行う。コストロ症候群に特異的なバイオマーカーについても同定する。

3. 研究の方法

コストロ症候群モデルマウス (HRAS 変異マウス) についての表現型をさらに調べていく。通常餌と高脂肪食を投与したとき、あるいは絶食時の臓器の変化、エネルギー代謝の違いを調べる。さらに HRAS の活性化変異を恒常的に発現するマウスががん細胞で見られるような代謝的变化が観察されるかどうか検討する。具体的にはマウスの組織学的解析・ウェスタンブロッティング・qPCR による発現解析・初代培養などを行う。

4. 研究成果

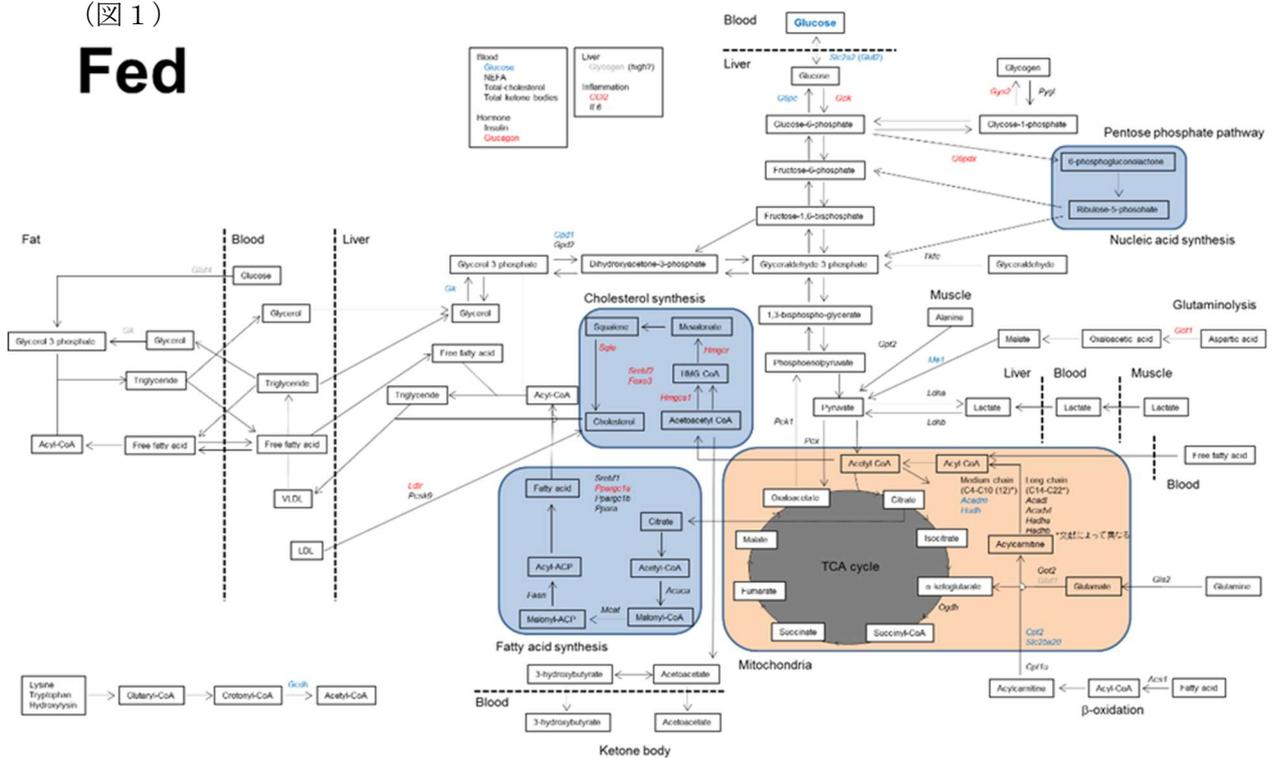
本研究ではコストロ症候群の病態解明を行うため、Hras 変異マウスを作製し表現型の解析を行った。通常餌では体重増加は正常と同等であるが、高脂肪食投与では太りにくく、短命という表現型を持つ。高脂肪食投与後 HRAS 変異マウスの肝臓の観察では、β酸化異常を疑わせる小滴性脂肪肝となっており、血中アシルカルニチン分析においてβ酸化異常を疑わせる長鎖アシルカルニチンの蓄積が認められた。

本研究では絶食を行いβ酸化誘導時の血中・尿中ケトン体 (β-ヒドロキシ酪酸)、血中遊離脂肪酸、血中アミノ酸、肝臓内への脂質蓄積などβ酸化関連因子を測定したところ、絶食 24 時間時点で尿中ケトン体の低下が見られ、48 時間では血中ケトン体の低下もまた認められた。HRAS 変異マウスはコントロールマウスと比べて血中遊離脂肪酸、メチオニン、フェニルアラニンが上昇していた。さらに肝臓への脂質蓄積は絶食によってコントロールマウス、HRAS 変異マウスともに増加していたが、HRAS 変異マウスでは特にコレステロールの蓄積が有意に増加していた。また、解糖系亢進によるビルビン酸の上昇がみられた。グル

コース負荷試験を行ったところ、変異マウスの方がグルコースの値が低値となり、糖利用の亢進が見られた。また、HRAS マウスにて絶食時に ERK 活性が上昇した。

(図 1)

# Fed



## エネルギー代謝の変化

グルコース ↓	コレステロール合成 ↑
β酸化 ↓	グルカゴン ↑
解糖系 ↑	糖新生 ↓

(図 2)

絶食 → エネルギー代謝のリセット

さらに HRAS 変異マウスのエネルギー代謝異常を詳細に調べるため、これまでに明らかになった肝臓のミトコンドリア β 酸化経路の破綻以外に、解糖系、糖新生、脂質代謝、核酸、アミノ酸代謝経路に変化が生じていないか網羅的な解析を行った。HRAS 変異マウスでは通常食摂取時においても、血糖値が低下するとともに β 酸化関連遺伝子の発現減少することが前回の実験同様に観察された。また解糖系の亢進、コレステロール合成の亢進、血糖値調節に働くホルモンであるグルカゴン上昇、グルカゴンが高いにも関わらず糖新生関連遺伝子の発現レベルが低下していることが新たに明らかになった。加えて 24 時間の絶食を行ったコントロールマウス、HRAS 変異マウス間ではこれらエネルギー代謝の変化の差が認められなくなることが明らかになった。今回の研究で、高脂肪食以外の通常食摂取時にも血糖値の低下や、他の代謝関連遺伝子の発現レベルの変化がみられることが明らかになった。(図 1, 2)。

HRAS モデルマウスの更なる表現型の解析を行った。皮膚刺激を行い、腫瘍発生や、皮膚病変発生の有無を解析した。様々な化学物質投与のうち、ダニアレルゲンに皮膚に投与すると野生型に比べコストロ症候群モデルマウスで著明なアトピー性皮膚炎用所見を呈した。これらの結果より HRAS H12S 変異を持つ個体がある特定の刺激により、RAS/MAPK シグナル伝達経路を活性化し、細胞増殖、あるいは炎症反応が亢進することを示した。

これまでに HRAS 変異が同定されたコストロ症候群患者における低血糖や腫瘍合併などの症状を検討した。一般にコストロ症候群で同定される HRAS バリエントは コドン 12,13 のアミノ酸変化を伴うミスセンス変異であるが、最近 HRAS の G3 ドメイン、あるいは SwitchII 領域に 9 塩基、あるいは 21 塩基の重複配列が挿入されたバリエントが 3 人の患者に同定された。これまでの報告のある遺伝子内重複を持つ患者は非典型的な表現型をもつとされているが、今回同定された患者さんでは治療が必要な肥大型心筋症を有する典型的な Costello 症候群と診断された。

以上のように本研究では、HRAS の活性化変異を発現するマウス個体における代謝性変化をみることで、がん細胞の代謝の in vivo モデルになるのではないかと発想から生ま

(図 2)

れた。HRAS 活性化変異を有するマウスの網羅的な代謝パスウェイの解析を行うことで、コステロ症候群の患者さんでの成長障害や低血糖などのメカニズム解明に役だつ可能性がある。さらに研究を進めることでがん細胞における代謝や、がんの進展における代謝的变化などを俯瞰することが可能と考えられる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 Takahara Shingo, Inoue Shin-ichi, Miyagawa-Tomita Sachiko, Matsuura Katsuhisa, Nakashima Yasumi, Niihori Tetsuya, Matsubara Yoichi, Saiki Yoshikatsu, Aoki Yoko	4. 巻 42
2. 論文標題 New Noonan syndrome model mice with RIT1 mutation exhibit cardiac hypertrophy and susceptibility to $\alpha$ -adrenergic stimulation-induced cardiac fibrosis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 EBioMedicine	6. 最初と最後の頁 43 ~ 53
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ebiom.2019.03.014	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 Shoji Yasuko, Ida Shinobu, Niihori Tetsuya, Aoki Yoko, Okamoto Nobuhiko, Etani Yuri, Kawai Masanobu	4. 巻 66
2. 論文標題 Genotype-phenotype correlation analysis in Japanese patients with Noonan syndrome	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Endocrine Journal	6. 最初と最後の頁 983 ~ 994
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1507/endocrj.EJ18-0564	査読の有無 有
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 Yamamoto Masahiro, Takashio Seiji, Nakashima Naoya, Hanatani Shinsuke, Arima Yuichiro, Sakamoto Kenji, Yamamoto Eiichiro, Kaikita Koichi, Aoki Yoko, Tsujita Kenichi	4. 巻 7
2. 論文標題 Double chambered right ventricle complicated by hypertrophic obstructive cardiomyopathy diagnosed as Noonan syndrome	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ESC Heart Failure	6. 最初と最後の頁 721 ~ 726
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/ehf2.12650	査読の有無 有
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 Suzuki-Muromoto Sato, Miyabayashi Takuya, Nagai Koki, Yamamura-Suzuki Saeko, Anzai Mai, Takezawa Yusuke, Sato Ryo, Okubo Yukimune, Endo Wakaba, Inui Takehiko, Togashi Noriko, Kikuchi Atsuo, Niihori Tetsuya, Aoki Yoko, Kure Shigeo, Haginoya Kazuhiro	4. 巻 64
2. 論文標題 Leucine-485 deletion variant of BRAF may exhibit the severe end of the clinical spectrum of CFC syndrome	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Human Genetics	6. 最初と最後の頁 499 ~ 504
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s10038-019-0579-3	査読の有無 有
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9件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Yoko Aoki, Shin-Ichi Inoue, Taiki Abe, Yu Katata, Aya Shibui-Inoue, Koki Nagai and Tetsuya Niihori
2. 発表標題 RASopathies : genetic syndromes associated with the Ras/MAPK pathway
3. 学会等名 Tohoku Forum for Creativity Thematic program 2019 International symposium1 Cancer Etiology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shin-ichi Inoue, Daiju Oba, Sachiko Miyagawa-Tomita, Yasumi Nakashima, Tetsuya Niihori, Seiji Yamaguchi, Yoichi Matsubara, Yoko Aoki
2. 発表標題 Metabolic Effects in Mouse Model of Costello Syndrome
3. 学会等名 6th International RASopathies Symposium:Precision Medicine ; From Promise to Practice (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shingo Takahara, Shin-ichi Inoue, Sachiko Miyagawa-Tomita, Katsuhisa Matsuura, Yasumi Nakashima, Tetsuya Niihori, Yoichi Matsubara, Yoshikatsu Saiki and Yoko Aoki
2. 発表標題 Noonan syndrome model mice with RIT1 A57G mutation exhibit cardiac hypertrophy and susceptibility to $\alpha$ -adrenergic stimulation-induced cardiac fibrosis
3. 学会等名 6th International RASopathies Symposium:Precision Medicine ; From Promise to Practice (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大場大樹、中畠八隅、新堀哲也、山口清次、松原洋一、青木洋子
2. 発表標題 新規コステロ症候群モデルマウスを用いたエネルギー代謝変化の病態解明
3. 学会等名 第122回日本小児科学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Inoue SI , Takahara S, Miyagawa-Tomita S, Matsuura K, Nakashima Y, Niihori T, Matsubara Y, Saiki Y, Aoki Y.
2. 発表標題 RIT1 A57G knock-in mice recapitulate features of Noonan syndrome.
3. 学会等名 日本人類遺伝学会第64回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shin-ichi Inoue and Yoko Aoki
2. 発表標題 The basis of nutritional and metabolic problems in RASopathies:Lessons form mouse models
3. 学会等名 7th International Meeting on Rare Disorders of the RAS-MAPK Pathway A workshop precedomg the ESHG conmference Milan 2018 (招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shin-ichi Inoue, Shingo Takahara, Takeo Yoshikawa, Kazuhiko Yanai, Yoichi Matsubara and Yoko Aoki
2. 発表標題 Pathogenesis and treatment of esophageal dilation and gastric epithelial hyperplasia in a mouse model for cardio-facio-cutaneous syndrome
3. 学会等名 ESHG/EMPAG 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 青木洋子
2. 発表標題 RASopathies : 広がりのゆく疾患概念とモデルマウス研究
3. 学会等名 第63回日本人類遺伝学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 堅田有宇, 堅田有宇, 井上晋一, 浅尾敦子, 小林周平, 小林周平, 照井仁, 井上彩, 阿部太紀, 新堀哲也, 相場節也, 石井直人, 吳繁夫, 青木洋子
2. 発表標題 Costello症候群モデルマウスにおけるアレルゲンによる皮膚炎の誘発と病態メカニズムの解明
3. 学会等名 日本人類遺伝学会第65回大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東北大学大学院医学系研究科遺伝医療学分野研究室 <a href="http://www.medgen.med.tohoku.ac.jp/">http://www.medgen.med.tohoku.ac.jp/</a>
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

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	松原 洋一  (Matsubara Yoichi)  (00209602)	国立研究開発法人国立成育医療研究センター・所長室・研究所長   (82612)	
研究分担者	新堀 哲也  (Niihori Tetsuya)  (40436134)	東北大学・医学系研究科・准教授   (11301)	
研究分担者	井上 晋一  (Inoue Shin-ichi)  (70622091)	東北大学・医学系研究科・助教   (11301)	削除：2020年3月18日

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	堅田 有宇  (Katata Yu)		
研究協力者	永井 康貴  (Nagai Koki)		

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