

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：82612

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18017

研究課題名(和文) POU1F1を用いた深部イントロン変異の病原性評価法の確立

研究課題名(英文) Establishment of a method to assess the pathogenicity of a deep intron mutation of POU1F1/Pou1f1

研究代表者

秋葉 和壽 (Akiba, Kazuhisa)

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・リサーチアソシエイト

研究者番号：10649974

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では以下の2点で解析困難であったPOU1F1遺伝子変異と疾患との因果関係を示しました。第一に今回の遺伝子変異が通常解析できない深部イントロン変異にあったこと、第二に遺伝子変異の影響を受ける臓器が下垂体というヒトでは採取困難な臓器(下垂体)であったことです。我々はモデルマウスとモデル細胞を用いることで、この遺伝子変異が通常とは異なるタンパク質を複数作ること、その結果下垂体の発生を障害し、病気となることを解明しました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

第一に、本研究において確立したPOU1F1遺伝子の全長再現実験を他の遺伝子に応用することができます。その結果、これまで解析困難であった深部イントロンの病原性の評価につなげることができます。第二に、本研究を通じて我々は解析対象であるPOU1F1遺伝子変異の新しいモデルマウスを作製しました。このマウスはPOU1F1遺伝子の複数のアイソフォームを発現しており、今後POU1F1遺伝子研究有用なツールになると考えます。

研究成果の概要(英文)：In this study, we showed the pathogenicity of the deep intronic variant of POU1F1/Pou1f1 gene, which was difficult to analyse for the two reasons. First, the gene mutation was located in a deep intron that cannot be analysed normally. Second, the organ affected by the gene variant was the pituitary gland, which is difficult to extract the tissue. Using mice model and cultured cell line, we showed that the gene variant led splicing error and generated several unusual mRNA.

研究分野：小児内分泌学 遺伝学

キーワード：スプライシング 深部イントロン 成長 POU1F1 下垂体

1. 研究開始当初の背景

ヒト遺伝性疾患における病原性変異の 80%はタンパク質翻訳領域に起きるとされる。しかし、残り 20%の変異がどのようにして遺伝子機能異常となるかはほとんどわかっていない。これは病原性の検証方法に乏しいためである。本研究では下垂体の発生に重要な役割を果たし、その変異により遺伝性複合型下垂体機能低下症を生じる *POU1F1/Pou1f1* に着目した。

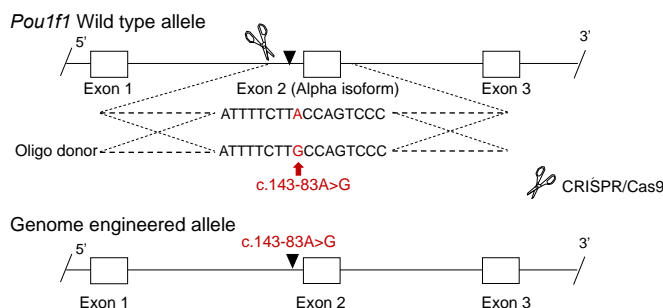
POU1F1/Pou1f1 は哺乳類の下垂体に特異的に発現する転写因子である。*POU1F1/Pou1f1* 遺伝子の変異はヒト、マウスにおいて先天性下垂体機能低下症を引き起こすことが知られている。2017 年我々のグループは複合型下垂体機能低下症を示す患者において *POU1F1* c.143-83A>G バリエントを同定したが、以下の 2 点でその病原性の証明は困難であった。第一に対象の遺伝子が下垂体という検体採取が困難な臓器であったこと、第二にバリエントが一般的な解析対象であるエクソンから 83 塩基離れた位置にあったことである。

2. 研究の目的

本研究の目的は *POU1F1* のイントロン内のレアバリエントと病原性の発症機序を解明することである。

3. 研究の方法

(1) CRISPR/Cas9 システムでマウス *Pou1f1* に本変異に相同な一塩基置換を導入した (図 1)。ホモ変異マウスと同腹の野生型マウスの間で成長、血清 IGF- I 値、下垂体重量、下垂体 *Pou1f1* mRNA、下垂体トランスクリプトームを比較した。野生型に対するホモマウスの計測値の比を括弧内に示した。



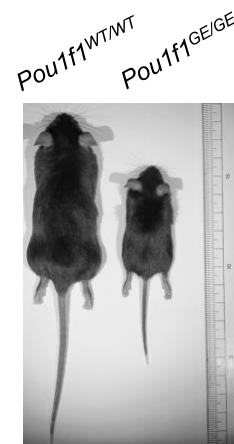
(図 1)

(2) マウスモデルにおけるスプライス異常から本変異がスプライス分枝部位を破壊したと考えた。予測ソフト (Human Splicing Finder) を用い、スプライス部位の分枝部位候補として本変異を含む 8 箇所を抽出した。CMV プロモータ下流にヒト全長 *POU1F1* ゲノム配列 (16.4kb) を挿入したプラスミドを作製し、これを鋳型に予測された分枝部位候補 (本変異を含む) の塩基置換 8 種をそれぞれ作製した。これらを HEK293 細胞に一過性強制発現し、スプライシング異常の有無を RT-PCR とウェスタンブロットで評価した。

4. 研究成果

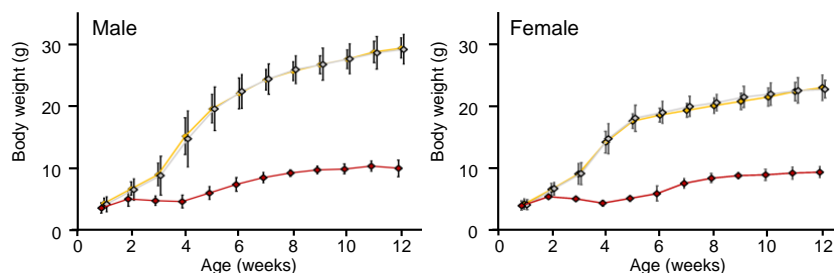
(1) ホモマウスは成長障害 (35.0%)、著明な血清 IGF- I 低値 (測定感度以下)、体重に対する下垂体重量低値 (40%) を示した (図 2-5)。ホモマウスの下垂体 *Pou1f1* mRNA 解析では mRNA 総量の減少 (20%) を示した。さらに *Pou1f1* mRNA のうち、正常なスプライシングを受けた mRNA は 1.0% のみであり、エクソン 2 欠失、78 塩基対挿入がそれぞれ *Pou1f1* mRNA の 77.0%、17.3% を占めた (図 6)。トランスクリプトーム解析では Gh、Pr1 が最も大きな発現変動 (減少) を示した (0.00%、0.01%)。

(2) RT-PCR、ウェスタンブロットのいずれの解析法でもエクソン 2 欠失、78 塩基対挿入を生じるのは本変異のみであった。

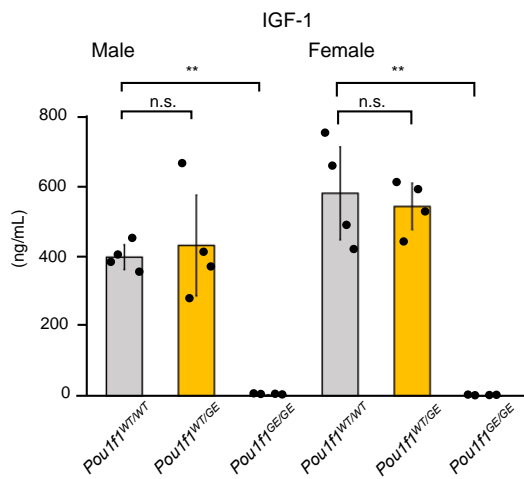


(図 2)

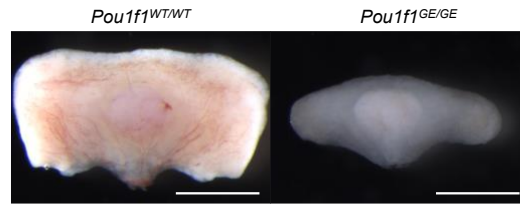
本研究によりヒトでは解析困難である下垂体特異的に発現する遺伝子の深部イントロン変異の病原性を証明し、さらにその機能喪失機序を解明した。



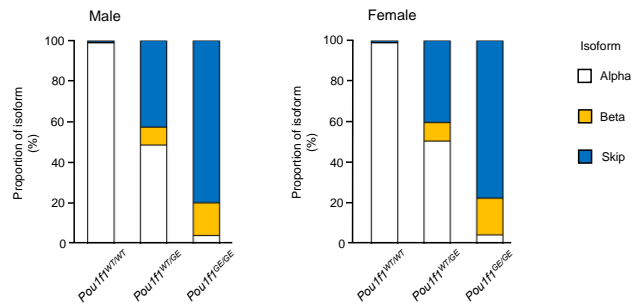
(図 3)



(図 4)



(図 5)



(図 6)

本研究は以下の2点で今後の拡張性を期待できる。第一に Pou1f1 の新しいマウスモデルを作出したことである。このマウスは Pou1f1 mRNA のスプライシング異常を有する世界初のマウスである。我々の研究期間中に、ヒトで POU1F1 の本変異の周辺の変異を有する症例の報告が相次いだ。そこでは POU1F1 のアイソフォームの割合の異常が疾患発症につながっているとしている。本マウスをさらに解析することでさらに POU1F1 に関する知見が深まる可能性がある。第二に本研究で示した全長再現系は他の遺伝子にも応用可能である。これにより、現在遺伝学的に診断されていない患者の診断につながる可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 秋葉 和壽、福井 由宇子、長谷川 行洋、高田 修治、深見 真紀、鳴海 覚志
2. 発表標題 深部イントロンPOU1F1変異の多階層機能解析系の構築： c.143-83A>Gは分枝部位破壊によるスプライス異常を起こす
3. 学会等名 第54回小児内分泌学会学術総会
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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------