

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 3 月 31 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2012

課題番号：21591183

研究課題名（和文） 新規成長ホルモン不応性成長障害の発症機序に関する分子医学的研究

研究課題名（英文） Genetic and molecular analysis of growth retardation caused by growth hormone insensitivity

研究代表者

京 雪楓 (Jing Xuefeng)

和歌山県立医科大学・先端医学研究所・講師

研究者番号：70316123

研究成果の概要（和文）：生後の体格決定には成長ホルモン（GH）- インスリン様成長因子 1（IGF1）軸が大きな役割を担う。脳下垂体から分泌された GH は、肝細胞の GH 受容体に働き、IGF1 産生を促すことにより血中 IGF1 値を上昇させ、IGF1 が内分泌ホルモンとして体の成長に働く。さらに、GH は肝以外の臓器細胞にも働いて IGF1 産生を促し、この IGF1 が局所で成長促進作用を発揮する。

私達は EphA4 欠損マウスが成長障害を示すことを見出し、その原因を分子レベルで追及することにより、EphA4 が GH 受容体と直接結合してその下流シグナル伝達を増幅していることを発見した。

研究成果の概要（英文）：GH is regarded as an essential hormone for postnatal body growth that mainly works through IGF1 production in liver and other tissues, and the whole signaling process is named GH-IGF1 axis. We identified EphA4 as an essential binding partner of GHR. EphA4 binds to GHR and augments activation of the JAK2/STAT5B pathway. In addition, EphA4 directly binds to and phosphorylates STAT5B. Through these interactions, EphA4 transcriptionally enhances IGF1 production in liver cells as well as in others. *Epha4* KO mice show short stature in an *Epha4* gene dose-dependent fashion, and respond well to IGF1 but not to GH treatment.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
21 年度	700000	210000	910000
22 年度	600000	180000	780000
23 年度	1100000	330000	1430000
24 年度	1000000	300000	1300000
年度			
総計	3400000	1020000	4420000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学、内分泌学

キーワード：成長障害

1. 研究開始当初の背景：EphA4 KO マウスがワイルドタイプ (WT) およびヘテロタイプと比べて全身的に調和がとれた状態で小さいことを発見した。FGFR を介するシグナルの異常が骨軟骨疾患に関与していることが知られていることから、まずは軟骨の増殖・分化を調べる目的で脛骨骨端軟骨の組織像を調べたが、EphA4 KO マウスでは、静止軟骨細胞層、増殖軟骨細胞層および肥大軟骨細胞層の全細胞層の幅が薄くなっていることを発見した。この所見および骨 X 線写真から、Achondroplasia, Alpert syndrome, Crouzon syndrome, Pfeiffer syndrome などの FGF 受容体を介するシグナルに関係した疾患は否定的であると判断した。次に摂食量が関与しているかどうかを調べたところ、EphA4^{-/-}は EphA4^{+/+}よりも体重当たりの摂食量が多い事を発見した。

このため GH-IGF1 系のシグナル伝達異常を疑い、血中の IGF-1 を測定したところ、EphA4 KO マウスではその値は WT マウスと比べて約 1/3 に減少していた。GH は脈動的な分泌をすることから血中ホルモン測定には向かないため、下垂体中の *Gh* mRNA を定量したところ EphA4KO、ヘテロ、およびワイルドタイプで有意差はなかった。

以上のマウス個体における所見から、GH のシグナル伝達に EphA4 が深く関わっていることが推察される。この点を明らかにするために EphA4^{-/-}マウス胚由来線維芽細胞 (MEF) 株を樹立し、レトロウイルスベクターを使って EphA4 を発現させることにより細胞レベルで実験を行った。その結果、EphA4 は GH 受容体-Jak2 複合体と結合していること、EphA4 の発現により GH 刺激による GH 受容体以降のシグナル伝達が亢進することを発見している。

2. 研究の目的：GHR-Jak2-Stat5b-IGF1 シグナル伝達系および IGF1-IGF1R シグナル伝達系に EphA4 およびその他の Eph がどのように関与するかにつき分子レベルで詳細に検討する。

3. 研究の方法：

【1】GHR-Jak2-Stat5b-IGF1 シグナル伝達系および IGF1-IGF1R シグナル伝達系と EphA4 との接点に関する研究

- ① EphA4 の発現の有無による Jak2 以降のシグナルの増減はあるかを調べる。
- ② EphA4 がどの分子と結合する事によりこれらの作用を及ぼすかを調べる。
- ③ EphA4 は IGF1R 下流のシグナル伝達

にも影響を与える可能性もあり、IGF1 刺激により EphA4 発現の有無で IGF1R 以下のシグナルがどのように変化するかを調べる。

【2】EphA4 結合パートナーに関する研究

- ① Jak2^{-/-}および GHR^{-/-}マウス由来 MEF を用いて EphA4 が Jak2 または GHR とどのような相互作用をするかを分子レベルで調べる。
- ② Jak2^{-/-}マウス由来 MEF で EphA4 が GHR 下流のシグナルにどの程度関与できるかにつき調べる。

【3】EphA4 以外の Eph の GHR-Jak2-Stat5b-IGF1 シグナル伝達系及び IGF1-IGF1R シグナル伝達系への関与

- ① まず EphA4^{-/-}MEF でのこれらの EphA メンバー分子の発現程度を RT-PCR およびウエスタンブロッティングにより調べる。
- ② その後に EphA4 以外の EphA 分子の発現効果を siRNA による発現抑制およびレトロウイルスによる過剰発現を用いて調べる。

【4】EphA4 発現が血中 IGF1R および ALS 濃度に及ぼす効果

ELISA により各 EphA4 遺伝型マウスの血中 IGF1R および ALS 濃度を測定する。

【5】IGF1 製剤の投与による EphA4^{-/-}マウスの成長障害改善効果

EphA4KO マウスに IGF1 製剤を投与することによりその成長障害改善効果を調べる。

4. 研究成果：

- ① EphA4 欠損マウスが成長障害を示すことを見出し、その原因を分子レベルで追及することにより、EphA4 が GH 受容体と直接結合してその下流シグナル伝達を増幅していることを発見した。
- ② 機序として、EphA4 が GHR および JAK2 と 3 量体を形成して IGF1mRNA 転写を促進する転写因子 STAT5B の活性化を亢進させること、さらに EphA4 は STAT5B と直接結合しこれを活性化することを発見した。
- ③ EphA4 欠損マウスの成長障害は GH 治療には不応性であるが、IGF1 治療は有効であることを発見した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計4件)

① Xuefeng Jing, Hideto Miwa, Takahiro Sawada, Ichiro Nakanishi, Tomoyoshi Kondo, Masayasu Miyajima, and Kazushige Sakaguchi. Ephrin-A1-Mediated Dopaminergic Neurogenesis and Angiogenesis in a Rat Model of Parkinson's Disease. PLoS ONE 7: 1-14, 2012 査読有

② Xuefeng Jing, Masayasu Miyajima, Takahiro Sawada, Qingfa Chen, Keiji Iida, Kenryo Furushima, Daiki Arai, Kazuo Chihara, and Kazushige Sakaguchi. Crosstalk of Humoral and Cell-Cell Contact-Mediated Signals in Postnatal Body Growth. Cell Reports 2: 652-665, 2012 査読有

③ Takahiro Sawada, Xuefeng Jing, Yueqiang Zhang, Emi Shimada, Hideyuki Yokote, Masayasu Miyajima, and Kazushige Sakaguchi. Ternary complex formation of EphA4, FGFR and FRS2 α plays an important role in the proliferation of embryonic neural stem/progenitor cells. Genes Cells 15: 297-311, 2010 査読有

④ Masayuki Kawahara, Yasumasa Iwasaki, Kazushige Sakaguchi, Takafumi Taguchi, Mitsuru Nishiyama, Takeshi Nigawara, Machiko Kambayashi, Takahiro Sawada, Xuefeng Jing, Masayasu Miyajima, Yoshio Terada, Kozo Hashimoto, and Toshihoro Suda. Involvement of GCMB in the transcriptional regulation of the human parathyroid hormone gene in a parathyroid-derived cell line, PT-r: Effects of calcium and 1,25(OH) $_2$ D $_3$. 47: 534-541, 2010 査読有

[学会発表] (計6件)

① Daiki Arai, Takahiro Sawada, Xuefeng Jing, Masayasu Miyajima, Qingfa Chen, Kenryo Furushima, Keiji Iida, Kazuo Chihara, and Kazushige Sakaguchi. EphA4 plays an important role in postnatal body growth. 第35回日本分子生物学会年会 2012年12月11-14日福岡国際会議場

② Qingfa Chen, Kenryo Furushima, Xuefeng Jing, Masayasu Miyajima, Takahiro

Sawada, Daiki Arai, and Kazushige Sakaguchi. Functional analysis of EphA4 in corticogenesis using conditional knockout mice. 第35回日本分子生物学会年会 2012年12月11日~2012年12月14日福岡国際会議場

③ Kazushige Sakaguchi, Takahiro Sawada, Xuefeng Jing, Kenryo Furushima, Qingfa Chen, Daiki Arai, and Masayasu Miyajima. Novel signaling pathways of Eph receptors - Contribution to the stem cell biology and the postnatal body growth. Shandong-Wakayama medical symposium celebrating the 25th anniversary of friendship. 平成23年11月23日 中国山東省済南市

④ Xuefeng Jing, Hideto Miwa, Takahiro Sawada, Ichiro Nakanishi, Tomoyoshi Kondo, Masayasu Miyajima and Kazushige Sakaguchi. Ephrin-A1-mediated transformation of subventricular neural stem niche leading to dopaminergic neurogenesis in the dopamine-depleted striatum (poster). Eph/ephrins and cancer meeting. 2010年6月22日 Washington-Salem, NC, USA

⑤ Takahiro Sawada, Xuefeng Jing, Masayasu Miyajima, Emi Shimada and Kazushige Sakaguchi. Signaling through the ternary complex of EphA4, FGFR, and FRS2 (poster). Eph/ephrins and cancer meeting. 2010年6月22日 Washington-Salem, NC, USA

⑥ Kazushige Sakaguchi, Takahiro Sawada, Xuefeng Jing, Emiko Shimada, and Masayasu Miyajima. Functional and structural analysis of Eph-FGFR and Eph-GHR interactions (oral presentation). Eph/ephrins and cancer meeting. 2010年6月22日 Washington-Salem, NC, USA

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:

国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

京 雪楓 (JING XUEFENG)

和歌山県立医科大学・先端医学研究所・
助教

研究者番号：70316123

(2) 研究分担者

坂口 和成 (SAKAGUCHI KAZUSHIGE)

和歌山県立医科大学・先端医学研究所・
教授

研究者番号：60178548

宮嶋 正康 (MASAYASU MIYAJIMA)

和歌山県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：80137257

澤田 貴宏 (TAKAHIRO SAWADA)

和歌山県立医科大学・先端医学研究所・
分子医学研究部・助教

研究者番号：00382325

(3) 連携研究者

千原 和夫 (Chihara Kazuo)

神戸大学・大学院医学研究科・客員教
授

研究者番号：00107955

飯田 啓二 (Iida Keiji)

神戸大学・大学院医学研究科・助手

研究者番号：80324911

