

令和 6 年 5 月 30 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08564

研究課題名（和文）遺伝子改変マウスを用いたMIRAGE症候群における副腎機能低下症の病態解明

研究課題名（英文）Pathogenesis of adrenal insufficiency in MIRAGE syndrome revealed by genetically modified mouse

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） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：胎児期から野生型SAM9あるいは変異型SAM9を副腎に強発現する遺伝子改変マウス（それぞれWT副腎マウス、およびMT副腎マウス）を作成した。WT副腎マウス62匹中58匹は24週齢まで生存した。MT副腎マウス32匹のうち17匹は日齢0-1に、7匹は日齢7までに死亡し、8例は4週齢まで生存した。分娩直前の母体を帝王切開し、WT副腎マウス胎仔およびMT副腎マウス胎仔を回収し、観察可能な臓器（副腎、他）を得るよう試みている。帝王切開で得た生存マウスから心臓採血により血清を確保し、ACTH、コルチコステロンなどを測定中である。

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ヒトMIRAGE症候群における副腎機能低下症の病態を解明するための新しい疾患モデルマウスが作出されたことである。すなわち、本研究で新たに作出された遺伝子改変マウスのうち、MTマウスが疾患モデルマウスであり、WTマウスはその対照である。MTマウスが副腎機能低下症を発症したために死亡したことを確認中であり、その後副腎機能低下症に対する胎内治療、出生後早期の治療を試みることで、ヒトMIRAGE症候群に対する新規治療に繋げたい。

研究成果の概要（英文）：This study generated two types of genetically modified mice; WT adrenal mouse and MT adrenal mouse, in which wild type SAM9 or mutant type SAM9 are strongly expressed in adrenals, respectively. Fifty-eight out of 62 WT adrenal mouse could survive beyond 24 weeks of age. Seventeen MT adrenal mouse died within 0 to 1 day of life, and seven did within 7 days. Prenatal WT adrenal mouse and MT adrenal mouse were obtained by Cesarean section. We would analyze histology of adrenal and other organ. We also obtained blood by cardiac puncture to measure adrenocorticotrophic hormone, corticosterone, and other hormones.

研究分野：小児内分泌学

キーワード：MIRAGE症候群 SAM9 遺伝子改変マウス 副腎

## 様式 C-19、F-19-1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

申請者らは、世界で初めて MIRAGE 症候群 (以下本症候群) の疾患単位を確立し、責任遺伝子 *SAMD9* を同定した (*SAMD9* mutations cause a novel multisystem disorder, MIRAGE syndrome, and are associated with loss of chromosome 7. Nat Genet 48:792-797, 2016)。本症候群の 6 つの主要徴候は、造血異常: Myelodysplasia, 易感染性: Infection, 成長障害: Restriction of growth, 先天性副腎低形成症: Adrenal hypoplasia, 性腺症状: Genital phenotypes, 消化器症状: Enteropathy) である。本症候群に関する研究の歴史は浅く、組織学的、遺伝子発現レベルでの病態は未解決であった。そこでゲノム編集技術により、Cre リコンビナーゼによりヒト野生型 *SAMD9* を発現するマウス (以下 *SAMD9*-WT マウス)、および本症候群で認めたヒト *SAMD9* の病的バリエーション p. R1293W を発現する本症候群モデルマウス (以下 *SAMD9*-MT マウス) を作成した ( (基盤研究(C)(2)) 研究課題番号 18K08527 ) )。 *SAMD9*-MT マウスは、Cre リコンビナーゼのもとに MIRAGE 症候群の部分症状を示したが、副腎機能は正常であった。 *SAMD9*-MT マウスにおいて副腎機能が正常であった理由は、副腎における *SAMD9* の病的バリエーション発現量が低かったためと考えている (未発表データ)。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、本症候群の中核症状の 1 つである副腎機能低下症の病態を解明することである。すなわち、本症候群で認めた *SAMD9* の病的バリエーションを副腎において強く発現する新たな遺伝子改変マウスを作成し、副腎における経時的な内分泌学的・病理学的・網羅的遺伝子発現解析を行う。

### 3. 研究の方法

以下の様に新たな遺伝子改変マウスを作成した。すなわち、内因性 *Sf1* プロモーター・エンハンサーにより Cre リコンビナーゼを発現するマウス (以下 *Sf1* promoter Cre マウス) を用いた。 *Sf1* promoter Cre マウスは、マウス *Sf1* 遺伝子の 5' 領域 106kb - Cre リコンビナーゼ - *Sf1* 遺伝子の 3' 領域 100kb を有し、 *Sf1* プロモーターおよび副腎特異的エンハンサーにより副腎皮質に Cre リコンビナーゼが強発現することを確認済みである。既に作成済の *SAMD9*-WT マウスあるいは *SAMD9*-MT マウスと *Sf1* promoter Cre マウスを掛け合わせ、胎児期から野生型 *SAMD9* あるいは病的バリエーション *SAMD9* を副腎に強発現する遺伝子改変マウス (それぞれ *SAMD9*-WT 副腎発現マウス、および *SAMD9*-MT 副腎発現マウス) を作成した。

### 4. 研究成果

*SAMD9*-WT 副腎発現マウスおよび *SAMD9*-MT 副腎発現マウスの生存率を検討した。 *SAMD9*-WT 副腎発現マウス 62 匹中 58 匹が 24 週齢まで生存し、最長 55 週齢まで生存を確認・飼育継続中である。一方 *SAMD9*-MT 副腎発現マウス 32 匹のうち 17 匹は日齢 0-1 に、7 匹は日齢 7 までに死亡し、8 例は 4 週齢まで生存した。

*SAMD9*-MT 副腎発現マウス副腎の組織学的検討を試みた。日齢 1 に死亡した雌 *SAMD9*-MT 副腎発現マウスの副腎は死後変化と思われる組織学的異常を認めた。 *SAMD9*-MT 副腎発現マウスの多くが日齢 0-1 に死亡したため、死後変化を伴わない *SAMD9*-MT 副腎発現マウスを十分な数確保することが困難であった。なお、なお 4 週齢まで生存した雌 *SAMD9*-MT 副腎発現マウスの副腎は明らかな組織学的異常を認めなかった。

分娩直前の母体を帝王切開し、 *SAMD9*-WT 副腎発現マウス胎仔および *SAMD9*-MT 副腎発現マウス胎仔を回収し、胎子ごとホルマリン固定した。 *SAMD9*-WT 副腎発現マウス胎子 8 匹および *SAMD9*-

MT 副腎発現マウス胎子 7 匹を得た。しかし、計 15 匹中 14 匹は固定不良であり、副腎を含む腹腔内臓器の顕微鏡下での観察は困難であった。観察可能であった 1 匹の SAMD9-WT 副腎発現マウス胎子の副腎は組織学的に明らかな異常を認めなかった。

別途分娩直前の母体を帝王切開して SAMD9-WT 副腎発現マウス 6 匹および SAMD9-MT 副腎発現マウス 6 匹を回収した。マウス胎子腹腔内にホルマリン固定液を直接注入することで観察可能な臓器を得ることが可能となった。現在副腎の組織学的検討を進めている。Preliminary ではあるが、SAMD9-MT 副腎発現マウスの副腎は小さい可能性がある。さらに別途分娩直前の母体帝王切開で得た SAMD9-WT 副腎発現マウス 4 匹および SAMD9-MT 副腎発現マウス 6 匹をから心臓採血により血清を得てプールした。プール血清中のナトリウム、カリウム、血糖を自動分析装置により、ACTH を免疫化学的祖測定方法により、コルチコステロンなどを液体クロマトグラフィータンデム質量分析装置により測定中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 長谷川奉延
2. 発表標題 内分泌学における分子遺伝学の臨床実装
3. 学会等名 第23回日本内分泌学会関東甲信越支部学術集会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 長谷川奉延
2. 発表標題 遺伝性原発性副腎皮質機能低下症 - 私たちはどこにいるのか？どこに向かうのか？ -
3. 学会等名 第28回特定非営利活動法人東北内分泌研究会・第40回日本内分泌学会東北地方会（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	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	鳴海 覚志  (Narumi Satoshi)  (40365317)	慶應義塾大学・医学部（信濃町）・教授    (82612)	

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	天野 直子  (Amano Naoko)  (70348689)	慶應義塾大学・医学部（信濃町）・講師（非常勤）    (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