

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：10107

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H06608

研究課題名(和文)先天性下垂体機能低下症の新たな発症機構の解明：PIT-1 変異の機能解析

研究課題名(英文)Elucidation of a novel pathogenic mechanism for congenital hypopituitarism: functional analysis of a mutant PIT1B

研究代表者

鈴木 滋 (Suzuki, Shigeru)

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号：80516394

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：複合型下垂体機能低下症の新たな発症原因として、患者に認められたPIT1 変異(PIT1 -T152G)の病的意義の検討を行った。PIT1 -T152Gは、下垂体ホルモン産生に重要なPIT1 の産生を抑制し、通常下垂体では発現量の少ないPIT1 (PIT1 -T152G)発現の増加が示唆された。PIT1 -T152Gは、その下垂体ホルモン産生に与える転写活性はPIT1 より低いだけでなく、PIT1 に対し、抑制的に作用することが判明した。以上のことから、PIT1 の変異が複合型下垂体機能低下症の病態を惹起しうることを初めて示した。

研究成果の概要(英文)：A PIT1B mutation (PIT1B-T152G) identified in the patients with one dominant inherited family of combined hypopituitarism was investigated to elucidate a pathogenic mechanism. PIT1B-T152G suppressed the PIT1A mRNA expression, whose protein is essential for pituitary hormone production. Instead, PIT1B-T152G induced the own mRNA expression, which is unusual situation because PIT1B is much less expressed the normal condition. Heterologous expression studies of the mutated PIT1B-T152G protein showed modest reductions in its transactivation activities in HeLa cells, while acting as a dominant-negative inhibitor of the endogenous activities of PIT1A in pituitary GH3 cells. These data firstly showed that a PIT1B mutation causes congenital combined hypopituitarism.

研究分野：小児内分泌学

キーワード：下垂体機能低下症 遺伝 転写因子

1. 研究開始当初の背景

下垂体特異的転写因子である PIT1 は、成長ホルモン (GH)、プロラクチン (PRL) および甲状腺刺激ホルモン (TSH) 産生細胞の分化ならびにそれらのホルモン分泌に重要であり、この遺伝子変異による機能喪失により、GH、PRL、TSH 分泌不全による複合型下垂体機能低下症 (CPHD; combined pituitary hormone deficiency) および単独 GH 欠損症 (IGHD; isolated GH deficiency) を来す。遺伝形式は、常染色体劣性遺伝および常染色体優性遺伝であり、前者は PIT1 の機能喪失型変異により、また、後者は野生型 PIT1 に対する変異 PIT1 の優性阻害効果あるいは特定の標的遺伝子プロモーター結合障害がその発症メカニズムとして知られている。

PIT1 は POU1F1 遺伝子によりコードされる、N 末端側に transactivation domain (TAD)、C 末端側に DNA 結合領域を有するホメオボックス型の転写因子である。PIT1 は 2 量体を形成し標的遺伝子のプロモーター領域に結合し遺伝子発現調節を行う。PIT1 のアイソフォームとして、TAD に 26 アミノ酸が挿入された PIT1 β が存在する。しかしながら、PIT1 β の、生体内での機能は明らかにされておらず、また、PIT1 β 異常が CPHD あるいは IGHD の病因となるとの報告もない。

申請者は、3 世代におよぶ GH 分泌不全、軽度の PRL 分泌不全および TSH 分泌不全を有する家系を見だし、CPHD あるいは IGHD の既知原因遺伝子解析を行ってきた。その過程で、罹患者のみに PIT1 β のヘテロ接合変異を同定した。この変異は、データベース上報告がなく、同部位は種を超えて保存されているアミノ酸であり、*in silico* 解析において、同アミノ酸変異は重篤な機能変化を来す。従って、PIT1 β 変異は CPHD の新規病因であることが強く示唆された。

2. 研究の目的

(1) 変異 PIT1 β の機能解析により、病因となる機能障害が存在するかを検証し、下垂体機能異常の発症メカニズムを明らかにする。

(2) 原因不明の CPHD および IGHD に対し PIT1 β 遺伝子変異の有無を解析し、変異陽性頻度を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 常染色体優性遺伝を示す複合型下垂体機能低下症家系において、POU1F1 遺伝子をエクソンならびにイントロン境界部を PCR-direct sequence 法で塩基配列を決定した。

(2) ヒト下垂体 cDNA library において、PIT1 α および PIT1 β の発現を前者は PIT1 α および β を認識するプライマーで、後者を PIT1 β 特異的プライマーを用いて定量的 PCR を行った。また、ラット下垂体由来細胞株 GH3 細

胞において、PIT1 α および β を認識する抗体を用いて、Western blot を行った。

(3) ①変異 PIT1 β がスプライス異常を起こす可能性について、Exon trapping vector を用いて検討した。本ベクターは慶応大学小児科長谷川奉延博士、高木優樹博士より供与いただいた。本ベクターには野生型 PIT1 β (WT) のイントロン 1、エクソン 2 およびイントロン 2 が、pET ベクターの XhoI および NotI 部位にクローニングされており、哺乳細胞で強制発現させると、理論上 2 つの transcript variant (190bp; PIT1 α 、268bp; PIT1 β) が転写されることとなる。このベクターに変異 PIT1 β -T152G を導入し、HeLa 細胞に強制発現させ、転写産物を RT-PCR で解析した。

②2 例 (発端者の子と孫) の B リンパ球を EB ウイルスで不活化し、PIT1 mRNA 発現について検討した。RT-PCR はエクソン 1 に forward primer をエクソン 4 に reverse primer を設計し施行した。

(4) PIT1 α および PIT1 β の全長 cDNA をヒト下垂体 cDNA ライブラリーから pCDNA3.1 発現ベクターにクローニングした。PIT1 β に点変異 (c. 152T>G, p. I51S) を導入したベクターも構築した。これらの標的遺伝子に対する転写活性をデュアルルシフェラーゼアッセイシステムで解析した。標的遺伝子としては、rat GH プロモーターおよび rat PRL プロモーターをルシフェラーゼ遺伝子上流に組み込んだ発現ベクターを用いた。GH プロモーターは 1.8kbp および 0.5kbp を含む配列のもの、PRL プロモーターは 1.9kbp を含む配列のものを使用した。これらの発現ベクターは、神戸女子大学置村康彦博士より分与いただいた。

これらの発現ベクターを内因性 PIT1 が発現していない非下垂体細胞である HeLa 細胞あるいは GH3 細胞にトランスフェクションし一過性発現させることで解析を行った。

4. 研究成果

(1) PIT1 β 変異症例 (家系) と同定された PIT1 β 変異

①症例提示。発端者は 70 代女性。低身長と授乳期の乳汁分泌不全があった。GH 分泌不全が確定している。60 歳代でプロラクチノーマを発症した。発端者の子 (40 代女性) は小児期の成長障害により、GH 分泌不全の診断。経過中、軽度の TSH 分泌不全を認めた。また、PRL 分泌不全があり、発端者と同様に乳汁射出は認めなかった。発端者の孫 (10 代男性) は、新生児期より TSH 分泌不全、乳児期に成長ホルモン分泌不全の診断。PRL 分泌不全は認めていない。上記症例と非罹患者に対し、POU1F1 遺伝子解析を施行し、罹患者のみに PIT1 β (NM_001122757) の c. 152T>G, p. I51S ヘテロ接合性変異を同定した。この変異は、PIT1 α (NM_000306) を基に変異部位を

示すと、イントロン 1 に存在する、c. 143-69T>G として示されるものであった (図 1)。

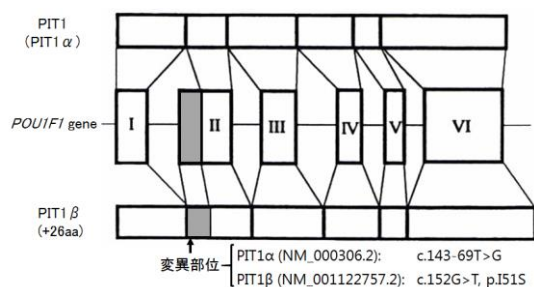


図1. PIT1遺伝子と変異部位

(2) ヒト下垂体PIT1βのmRNA発現量は、PIT1αの約3%とわずかな発現であった (図 2a)。GH3細胞におけるPIT1βのタンパク発現もPIT1αに比較し、極めて少量の発現量であった (図 2b)。

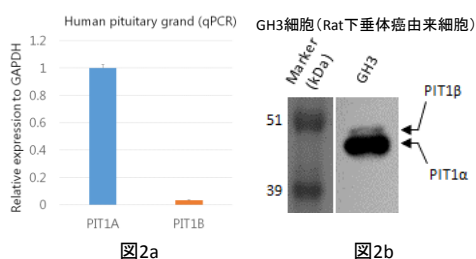


図2a

図2b

(3) PIT1β変異のPIT1発現に与える影響

①Exon trap 実験により、変異型においてはPIT1αが検出されず、変異PIT1βだけが検出された。一方、正常型では、PIT1αとPIT1βの両者がPIT1α有意に検出された。従って、変異PIT1β-T152Gは、PIT1βの転写を促進し、PIT1αの転写を抑制する可能性、あるいはPIT1αのexon2をスキップする可能性 (PIT1α-Δex2) が示唆された (図 3)。

②不死化リンパ球におけるmRNA発現を検討すると、正常コントロールでは、PIT1αの発現を認めたのに対し、患者においては、PIT1αに加え、PIT1βと思われるサイズならびにPIT1αよりサイズの小さいmRNA発現を認め

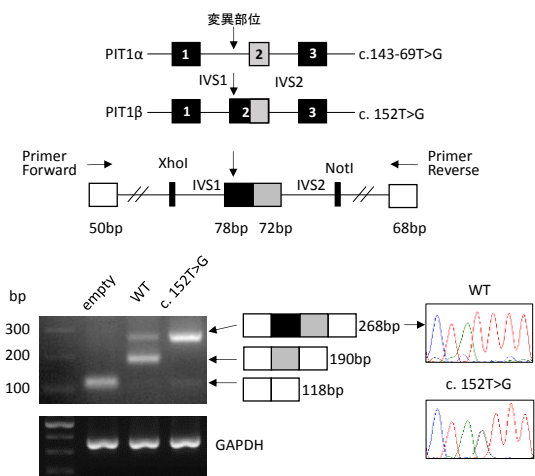


図3. Exon trap実験

た (図 4)。PIT1αとサイズの異なる2つのPCR産物のシーケンス解析は施行できていない。

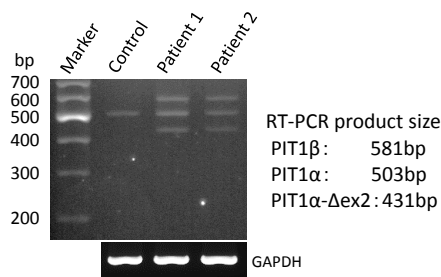


図4. 不死化リンパ球におけるPIT1 mRNA発現

(4) 変異PIT1β-I51Sの転写活性

①HeLa細胞において、1.8kb-GHプロモーターに対し、PIT1βの転写活性はPIT1αに対し有意に低値であった。変異PIT1β-I51Sの転写活性はPIT1βと同等であった。また、PIT1αとPIT1βあるいは変異PIT1β-I51Sを共発現させた場合は、PIT1α単独の場合と同程度の転写活性であった。この結果は、0.5kb-GHプロモーターでも同様の結果であった。1.9kb-PRLプロモーターを用いた解析ではPIT1βの転写活性は、PIT1αに比し著しく低く、変異PIT1β-I51SはPIT1βと同程度の転写活性であった。PIT1αとPIT1βあるいは変異PIT1β-I51Sを共発現させた場合は、変異PIT1β-I51SはPIT1α単独よりも転写活性を亢進させた (図 5)。

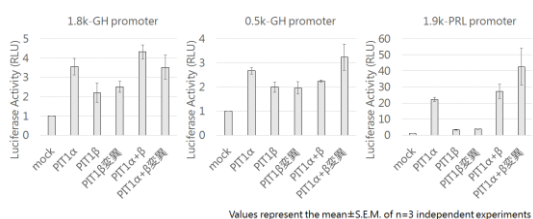


図5. HeLa細胞におけるPIT1転写活性

②GH細胞においては、1.8k-GHプロモーターに対し、PIT1β変異-I51SはPIT1βと同様に内因性PIT1αにわずかに優性阻害効果を示したが、0.5k-GHプロモーターに対しては不変であった。PRLプロモーターに対しては、PIT1β変異-I51SはPIT1βと同様、PIT1αに対し優性阻害効果を示した (図 6)。

(5) 特発性複合型下垂体機能低下症2例ならびに特発性GHD11例にPIT1β遺伝子変異は同定されなかった。

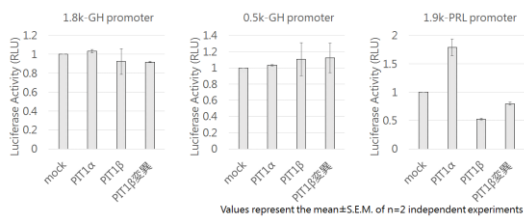


図6. GH3細胞におけるPIT1転写活性

(6) 本研究において、GHDを基盤の症状とし、種々の程度のPRL、TSH分泌不全を合併する常染色体優性遺伝家系において、これまで全く報告のないPIT1 β の翻訳領域に変異を初めて同定し、その病的意義の検討を行った。同定されたPIT1 β -I51Sは、その転写活性は野生型PIT1 β と同様であった。PIT1 β および変異PIT1 β -I51Sは、健常人における主たる転写産物であるPIT1 α より転写活性は低く、また、PRLプロモーターに対しては優性阻害効果を来すことが明らかとなった。興味深いことに、この変異体はPIT1 α の転写を抑制し、PIT1 β の転写を促進することが明らかとなった。さらに患者不死化リンパ球においては、PIT1 β およびPIT1 α - Δ ex2と推定されるmRNA発現を認めた。従って、想定される下垂体機能低下症に至るメカニズムとして、転写活性が低くかつPIT1 α 転写活性を阻害する変異PIT1 β -I51Sの発現が亢進し、かつ、正常のPIT1 α の発現量が減ることで、さらには転写活性が低く内因性PIT1 α に対し優性阻害効果を認めると報告のされているPIT1 α - Δ ex2の発現により、相加的にPIT1の標的遺伝子であるGH、PRL、TSHの産生抑制に至るのではないかと考えられた。以上の成績は、PIT1 β 変異が下垂体機能低下症の原因となることを初めて示したものである。

<引用文献>

- ① Pfäffle R, et al. Pituitary transcription factors in the aetiology of combined pituitary hormone deficiency. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2011;25:43-60.
- ② Sobrier ML, et al. Functional characterization of a human POU1F1 mutation associated with isolated growth hormone deficiency: a novel etiology for IGHD. *Hum Mol Genet.* 25: 472-483.
- ③ Diamond SE, et al. A 26-amino acid insertion domain defines a functional transcription switch motif in Pit-1beta. *J Biol Chem.* 1996;271:28925-32.
- ④ Konzak KE, et al. Functional isoforms of Pit-1 generated by alternative messenger RNA splicing. *Mol Endocrinol.* 1992;6:241-7.
- ⑤ Takagi M, et al. A novel heterozygous intronic mutation in POU1F1 is associated with combined pituitary hormone deficiency. *Endocr J.* 2017; 27:64:229-234.
- ⑥ Inoue H, et al. Identification of a novel mutation in the exon 2 splice donor site of the POU1F1/PIT-1 gene in Japanese identical twins with mild combined pituitary hormone deficiency. *Clin Endocrinol.* 2012;76:78-87.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計1件)

- ① 棚橋祐典、鈴木滋、古谷曜子、先天性下垂体機能低下症の新たな発症機構の解明 PIT-1 β 変異の機能解析、成長科学協会研究年報、査読無、40巻、2017、129-132
DOI: なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 滋 (SUZUKI, Shigeru)
旭川医科大学・医学部・助教
研究者番号: 80516394