

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：17401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H07081

研究課題名(和文) 優性遺伝性GH1遺伝子異常症モデルマウスの作製と発症機序の解明

研究課題名(英文) An establishment of model mice for dominantly inherited growth hormone deficiency and elucidation of its molecular mechanism

研究代表者

有安 大典 (ARIYASU, DAISUKE)

熊本大学・生命資源研究・支援センター・特定事業研究員

研究者番号：60338100

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)：ヒトの下垂体から分泌される成長ホルモン(GH)をコードするGH1遺伝子の異常により、低身長症が発症する。その一部は優性遺伝形式を示す(本症)。本研究では、マウスの成長ホルモン遺伝子を、ヒトGH1遺伝子に置き換えることにより、ヒトのGHを体内で作るマウスを作製し、ヒト本症患者の臨床像とよく似た表現型を得ることに成功した。さらに、その病態の機序が、従来言われていたような仮説とは全く違った、新しいメカニズムにより発症していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Abnormalities in the GH1 gene, which codes growth hormone (GH), cause short stature in human. This research focus on inherited GH deficiency, and the researcher established humanized GH mice, namely, endogenous growth hormone genes in mice are exchanged into human GH1 genes in this research. In contrast to well-accepted hypothesis, this disease was turned out to be caused by totally novel mechanism. This is first in vivo study which uncovered a novel mechanism of GH deficiency.

研究分野：小児内分泌学

キーワード：成長ホルモン 優性阻害効果 小胞体ストレス 核内転写因子 低身長

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 常染色体優性遺伝性 GH1 遺伝子異常症 (本症)は、成長ホルモン(GH)をコードする GH1 遺伝子の、ヘテロ接合性イントロン 3 ドナーサイト変異により発症する。1 アリルが野生型であるにもかかわらず患者が GH 分泌不全から低身長を発症するため、変異アリルから産生される exon 3 が欠失した変異型 GH( 3GH)による野生型アリルへの優性阻害効果が提唱されているが、その分子生物学的詳細はいまだ不明である。培養細胞を用いた先行研究により、本症優性阻害効果は野生型 GH と 3 GH がヘテロダイマーを形成し、細胞内で分解されることによる、3 GH 単独による小胞体ストレス細胞死による、と言う2つの仮説がある。

(2)申請者らは、本症の優性阻害効果のメカニズムを解明するため、熊本大学が独自に開発した遺伝子置換システムを用いて、マウス内在性 Gh 遺伝子を、それぞれヒト野生型 GH1 遺伝子(WTGH1)と、ヒト変異型 GH1 遺伝子(3GH1)に置換した、ヒト化 GH モデルマウスを作製し、ヒト本症患者に酷似した表現型を得ることに成功した。驚くべきことに、本症モデルマウスの下垂体では、GH1 遺伝子の発現が mRNA レベルで低下しており、さらに細胞死が陰性であることから、従来の仮説では説明できない、全く別の機序により発症している可能性が示唆された。

## 2. 研究の目的

申請者らが作製したモデルマウスを用いて、本症優性阻害効果の詳細を解明する。

## 3. 研究の方法

(1)従来の通説である、野生型 GH- 3 GH ヘテロダイマーの関与を検証するため、細胞内オルガネラの観察を透過性電位顕微鏡を用いて行う。

(2)もう一つの仮説である小胞体ストレス応答の関与を検証するため、モデルマウスの下垂体を用いて各種小胞体ストレス応答をウェスタンブロッティング、リアルタイム RTPCR 法などで検証する。また、小胞体ストレスを起こすことが証明されている変異タンパクを下垂体 GH 産生細胞において 3 GH の代わりに発現させたマウスを作製し、同様の表現型が得られるかを検討する。

(3)GH 産生細胞の増殖に胎生期から関わるということが証明されている GH 放出ホルモン受容体(GHRHR)をコードする Ghrhr 遺伝子に LacZ 遺伝子をノックインしたマウスを作製し、Ghrhr 遺伝子の promoter 活性を評価する。

(4)GH 産生細胞特異的各種コンディショナルノックアウトマウス作製のために必要になる、GH 産生細胞特異的 Cre ドライバースマウス

を作製する。

## 4. 研究成果

(1)本症モデルマウス下垂体における GH1 mRNA の低下が、GH 産生細胞数の低下によるものなのか、あるいは個々の GH 産生細胞内の GH1 mRNA の低下によるものなのかを検証するため、GH1 exon 3 mRNA を probe にした in situ hybridization (ISH)を行った。その結果、モデルマウス下垂体では GH 産生細胞数、個々の GH 産生細胞内での GH1 mRNA、の両方が低下していることが明らかとなった。

一般的に、視床下部から分泌される GH 分泌ホルモン(GHRH)が下垂体 GH 産生細胞膜上に発現する GHRH 受容体(GHRHR)に結合することにより GHRH シグナルが伝わり、GH 産生細胞の増殖、および 個々の細胞内での GH1 遺伝子の転写の両方が促進される。すなわち、GHRH シグナルが低下している場合、上記 および の両方が障害され、本症モデルマウスの表現型が説明可能となる。また、GHRHR をコードする Ghrhr 遺伝子のミスセンス変異をホモ接合性に有する自然発生 little mouse では、GHRH と変異 GHRHR の結合が妨げられ、細胞内 GHRH シグナルが低下する結果、GH 産生細胞内の Gh mRNA 量、および GH 産生細胞数の両方が低下することが知られている。

このことから、申請者らは本症モデルマウスにおいて GHRH シグナルが低下しているのではないかと仮説を立て、Ghrhr 遺伝子の発現を ISH およびリアルタイム RTPCR で評価した。その結果、モデルマウス下垂体において Ghrhr 遺伝子の発現が mRNA レベルで低下していることが明らかとなった。GH 分泌不全状態にある本症モデルマウスでは、本来であれば negative feedback 機構を介して Ghrhr mRNA は上昇しているべきであり、したがって本症優性阻害効果は Ghrhr mRNA の低下により引き起こされている可能性が強く示唆された。申請者らは ISH およびリアルタイム RTPCR により、Ghrhr mRNA の低下が本症モデルマウスにおいて胎生期より発症していることを確認した。

また、この Ghrhr mRNA の低下は、片アリル 3GH1 遺伝子、片アリル KO のモデルマウス(野生型 GH を発現せず、3 GH のみを発現する)においても同様に認められたことから、本症優性阻害効果が 3 GH 単独により引き起こされることが明らかとなった。

(2)モデルマウス下垂体を透過性電子顕微鏡(TEM)で観察したところ、健常コントロールモデルと比べて、粗面小胞体の著明な増殖、細胞質の巨大タンパク凝集体が観察された。また、上述の片アリル 3GH1 遺伝子、片アリル KO のモデルマウスにおいても全く同じ細

胞内オルガネラの異常が認められたことから、本症優性阻害効果は野生型 GH の存在なしに、3 GH 単独により発揮されるものである申請者らの仮説がより強く支持された。この細胞内オルガネラの異常所見は、小胞体内に異常タンパクが蓄積するような、小胞体ストレス関連疾患における電子顕微鏡所見と一致する。

(3)以上の結果より、申請者らは 3 GH 単独による小胞体ストレスに着目した。モデルマウスの下垂体を用いたウェスタンブロットング、リアルタイム RTPCR を行った結果、哺乳類の小胞体ストレス応答主要 3 経路である PERK, ATF6, IRE1 すべての pathway で小胞体ストレス応答の活性化を認め、3 GH により小胞体ストレスが引き起こされていることが明らかとなった。しかしながら、その程度は軽度であること、さらに小胞体ストレスによるアポトーシスが認められないことより、3 GH による小胞体ストレスが本症 GH 分泌不全の原因である可能性は否定的と考えられた。

本症における小胞体ストレス応答の関与を完全に否定すべく、小胞体ストレスを緩和することが証明されている 4-フェニル酪酸 (4PBA) をモデルマウスに腹腔内投与し、表現型を観察したが、救済されなかった。さらに、小胞体ストレスを起こすことが先行研究により証明されている、変異型インシュリン、およびヒト変異型 1 アンチトリプシンをそれぞれ 3 GH の代わりに GH 産生細胞において発現させたモデルマウスを作製したが、本症モデルマウスと同等の表現型を呈さなかったことから、本症モデルマウスにおける小胞体ストレスは GH 分泌不全の直接の原因ではなく、3 GH が細胞内で発現した結果である可能性が示唆された。

(4)そこで申請者らは、上記の Ghrhr mRNA の低下が転写の低下によるものなのか、あるいは mRNA の安定性の低下によるものなのかを検証するため、Ghrhr 遺伝子座に LacZ をノックインしたモデルマウスを作製した。このモデルマウスの 4 週齢下垂体を用いて X-gal 染色を行ったところ、モデルマウス下垂体は健康コントロールと比較して明らかに染色の度合いが低下しており、本症優性阻害効果は Ghrhr 遺伝子の promoter 活性の低下によることが明らかとなった。Ghrhr promoter 活性の低下は、E19.5 の下垂体を用いても同様に再現され、胎生期から発症する GH 分泌不全が Ghrhr promoter 活性の低下を介することが in vivo で確認された。

以上より、本症優性阻害効果は小胞体に局在する 3 GH が、Ghrhr 遺伝子上流に結合する核内転写因子の発現を何らかの機序により阻害することによる可能性が示唆された。

現在、Ghrhr 遺伝子上流に結合する核内転写因子として知られているのは PIT-1 のみであるが、ウェスタンブロットングの結果、モデルマウス下垂体において PIT1 の発現は減少していなかった。また、PIT1 は小胞体移行シグナルペプチドを有しておらず、細胞内で 3 GH と interaction を起こす可能性は極めて低いと考えられる。すなわち、未知の核内転写因子が本症発症に関与している可能性が示唆された。

近年、小胞体に全長が局在し、組織発生及び分化に際し、その N 末端が切断を受けて核内に移行することにより核内転写因子として働きうるファミリーが報告されている。申請者らはこれらのファミリーが本症優性阻害効果に何らかの関与をもたらしめている可能性を考えている。

(5)将来的に核内転写因子が同定された場合、下垂体 GH 産生細胞特異的コンディショナル KO マウスが本症モデルマウスと同様の表現型を呈することを証明する必要があるため、本研究では前もって GH 産生細胞特異的 Cre driver マウスを作製した。具体的には、Ghrhr 遺伝子の最終 exon 内の停止コドンと pA シグナルをそれぞれ homology arm とし、internal ribosome entry site (IRES)-Cre をつなげることにより、Ghrhr 遺伝子の発現を低下させることなく、Ghrhr promoter 下に Cre を特異的に発現させることができる。

作製した Cre driver マウスを Rosa26 locus に lox-stop-lox (LSL)- galactosidase (gal) をノックインしたマウスと交配して得られた産仔の各臓器を X-gal 染色し、下垂体特異的な gal の発現を確認した。

## 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 1 件)

Ariyasu D, Yoshida H, and Hasegawa Y. Endoplasmic reticulum (ER) stress and endocrine disorders. *Int J Mol Sci.*, 18. pii: E382 (2017) (査読あり)

[学会発表](計 4 件)

有安 大典、久保英実香、芝田晋介、荒木喜美：常染色体優性遺伝性 GH1 遺伝子異常症の発症機序の解明～ヒト化 GH マウスを用いた in vivo 解析～第 40 回日本分子生物学会 2017.12 月 9 日、神戸ポートアイランド

有安 大典、久保英実香、芝田晋介、長谷川行洋、長谷川奉延、荒木喜美：常染色体優性遺伝性 GH1 遺伝子異常症モデルマウスの GH 分泌不全は、Ghrhr mRNA の低下による

第51回日本小児内分泌学会 2017.9月30日、  
梅田スカイビル

有安 大典、久保英実香、芝田晋介、荒木  
喜美：常染色体優性遺伝性 GH1 遺伝子異常症  
の発症機序の解明～ヒト化 GH マウスを用い  
た in vivo 解析～第39回日本分子生物学会  
2016.12月2日、パシフィコ横浜

有安 大典、荒木 喜美：常染色体優性遺  
伝性 GH1 遺伝子異常症の発症機序の解明 ～  
遺伝子置換システムによる疾患モデルマウ  
スの作製～ 第1回 Let's Enjoy  
Endocrinology 特別講演 2016.3月4日、ホ  
テルオークラ熊本

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕なし

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

有安 大典 (ARIYASU, Daisuke)  
熊本大学 生命資源研究・支援センター  
特定事業研究員  
研究者番号：60338100

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

(4) 研究協力者

( )