

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15522

研究課題名(和文) 先天奇形症候群におけるメタボリックパスイと体重制御メカニズムの研究

研究課題名(英文) Metabolic alteration and growth control in congenital anomaly syndrome

研究代表者

青木 洋子 (Aoki, Yoko)

東北大学・医学系研究科・教授

研究者番号：80332500

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではヘテロ接合性のHras G12S変異ノックインマウス(HrasG12S/+ マウス)を用いて代謝学的な変化を明らかにした。HrasG12S/+ マウスはCostello症候群に特徴的な顔貌、咬合不正、肥大型心筋症様の心筋細胞肥大を認めた。一年間高脂肪食を与えたHrasG12S/+ マウスの肝臓では小滴性脂肪肝を認め、肝臓におけるミトコンドリア脂肪酸酸化異常が疑われた。絶食時の血中アシルカルニチン分析を行ったところ、炭素数16以上のアシルカルニチンの上昇が認められた。以上より、HrasG12S/+ マウスは高脂肪食負荷によってミトコンドリア脂肪酸酸化異常を認めることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：To examine the mechanisms of energy reprogramming by HRAS activation in vivo, we generated knock-in mice expressing a heterozygous Hras G12S mutation (HrasG12S/+ mice) as a mouse model of Costello syndrome. On a high-fat diet, HrasG12S/+ mice developed a lean phenotype with microvesicular hepatic steatosis, resulting in early death compared with wild-type mice. Under starvation conditions, hypoketosis and elevated blood levels of long-chain fatty acylcarnitines were observed, suggesting impaired mitochondrial fatty acid oxidation. Our findings suggest that the oncogenic Hras mutation modulates energy homeostasis in vivo.

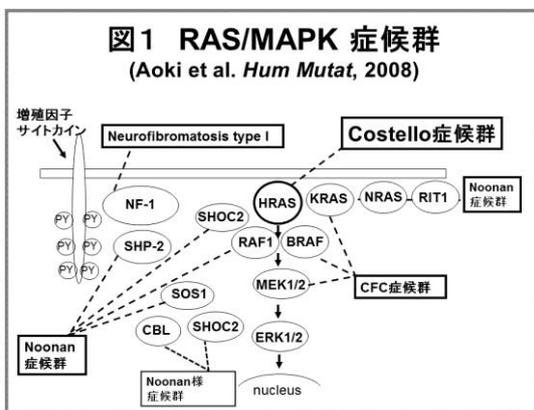
研究分野：分子遺伝学

キーワード：がん原遺伝子 代謝 コステロ症候群

1. 研究開始当初の背景

スーナン症候群、コストロ症候群、cardio-facio-cutaneous (CFC 症候群) は先天性心疾患・肥大型心筋症・骨格異常・低身長・精神遅滞を主徴とする常染色体優性遺伝性疾患である。これら症候群は RAS/MAPK シグナル伝達経路の遺伝子異常を伴う疾患で、RASopathies あるいは RAS/MAPK 症候群と呼ばれる (図 1)。研究代表者らはこれまでに新規原因遺伝子検索と病態解明の研究を行ってきた。(Aoki Y et al., Nature Genetics, 2005, Niihori T et al., Nature Genetics, 2006, Aoki Y et al., Am J Hum Genet, 2013)。これまでに CFC 症候群で最も頻度の高い BRAF Q257R 変異を導入したモデルマウス作製に成功し、その表現型の解析と治療実験を行った (Inoue SI et al., Hum Mol Genet, 2014, Moriya M et al. Hum Mol Genet, online 2015)。

コストロ症候群は特徴的な顔貌、カールした毛髪、心疾患 (肥大型心筋症、肺動脈弁狭窄、不整脈)、手掌や足底の緩い皮膚、精神発達遅滞、哺乳障害を伴う成長障害などの合併などを認める先天異常症候群であり、常染色体優性遺伝性疾患である。約 15% に悪性腫瘍の合併が報告されている。成人期まで追跡調査を行った報告は少なく、生存期間についての自然歴は不明な点が多いが、40 歳代まで生存している症例が報告されている。また、コストロ症候群患者における早期死亡の要因としては肥大型心筋症の重症度があげられている。

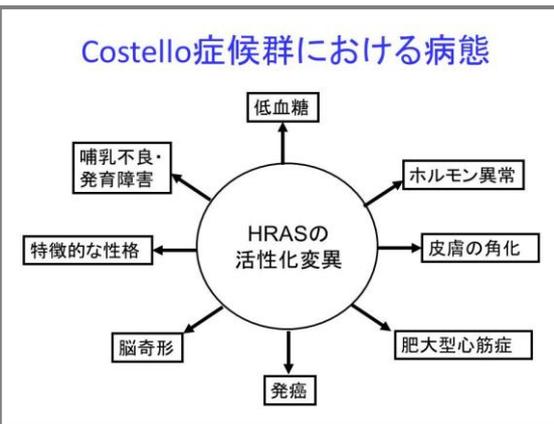
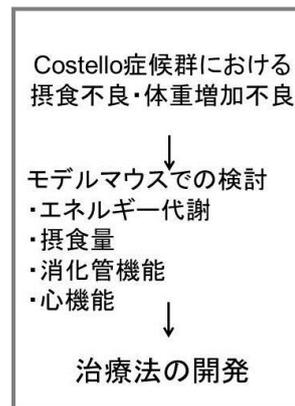


私達は、最近コストロ症候群で最も頻度の高い HRAS 変異を有するモデルマウス (HRAS 変異マウス) 作製にも世界で初めて成功した。現在その表現型を解析中で、心疾患、骨格異常などコストロ症候群に類似する表現型が明らかになってきた。本研究は HRAS 変異マウスを用いてコストロ症候群の哺乳障害・体重増加不良のメカニズムを解明することを目的とする。

2. 研究の目的

コストロ症候群は、肥大型心筋症、低身長、骨格異常、易発がん性を示す先天奇形症候群であり、HRAS 遺伝子の機能獲得性変異を持

つ。患者は低血糖、ホルモン異常など様々な内分泌・代謝系の症状を呈してくる。また、重度な哺乳障害・摂食障害と成長障害を示すが、チューブ栄養や点滴でカロリーを補充しても体重増加に結びつかないことが経験的に知られている。Leoni らの報告によると、コストロ症候群においては空腹時の低血糖や高コレステロール血症の傾向があり、安静時エネルギー消費量が高いことが示唆されている (Leoni et al. J Pediatr, 2016)。本研究ではコストロ症候群モデルマウスを用いて、高脂肪食にしたときの表現型の変化や、エネルギー代謝の変化を調べることを目的にする。本研究により、スーナン症候群類縁疾患を初めとした先天奇形症候群の体重増加不良のメカニズムが明らかになり、成長や発達障害の改善に貢献すると考えられる。



3. 研究の方法

コストロ症候群モデルマウス (HRAS 変異マウス) を用いて、通常餌と高脂肪食を投与したときの症状や臓器の変化、エネルギー代謝の違いを調べる。

実験 1: コストロ症候群モデルマウス (HRAS 変異マウス) において、通常餌投与時に体重増加、摂食量、基礎代謝量、体脂肪量などの表現型を調べる。エネルギー代謝のパラメーターを調べる。また消化管の形態・組織を正常マウスと比較する。

実験 2: HRAS 変異マウスに高脂肪食を与え、体重増加や体脂肪の変化や表現型の変化があるかどうか、正常マウスや普通食を与えたマウスとの比較を行う。またエネルギー代謝のパラメーターや、消化管の組織形態の変化を検討する。

4. 研究成果

実験 1 :

ターゲティングベクターは図 2 のように作成し、作成したターゲティングベクターは制限酵素の Sal I を用いて切断しエレクトロポレーション法により C57BL6 マウスの

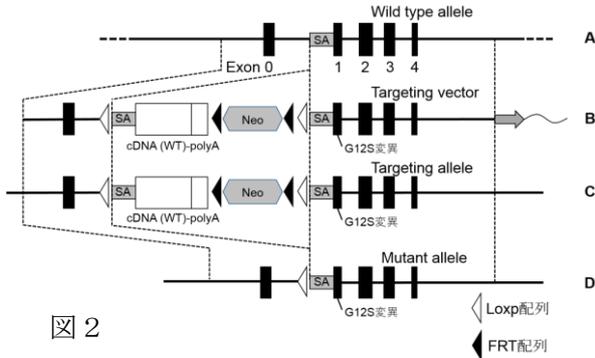


図 2

ES 細胞に導入した。目的配列を含む ES 細胞を識別するために Genotyping、ダイレクトシーケンシング、Cre recombinase による相同組換え試験による確認を行った。目的配列が導入された ES 細胞は BALB/c マウスの未分化胚芽細胞にマイクロインジェクションを行い、その後得られたキメラマウスを C57BL/6J マウスと交配させることで C57BL/6J をバックグラウンドに持ち、片アレルに目的配列を含むマウス ($Hras^{G12S/Neo/+}$ マウス)を得た。 $Hras^{G12S/Neo/+}$ マウスをさらに C57BL/6J を遺伝的バックグラウンドにもち Cre recombinase を発現する遺伝子改変マウス (CAG-Cre マウス; RIKEN BioResource Center, Tsukuba, Japan; RBRC01828)と交配することで C57BL/6J をバックグラウンドに持ち、変異アレルと Cre recombinase を発現するマウス ($Hras^{G12S/+}; Cre$ マウス)を得た。最終的に、Cre recombinase 配列を持たず変異アレルを発現する $Hras^{G12S/+}$ ノックインマウスを得るために、 $Hras^{G12S/+}; Cre$ マウスと C57BL/6J マウスを交配した。

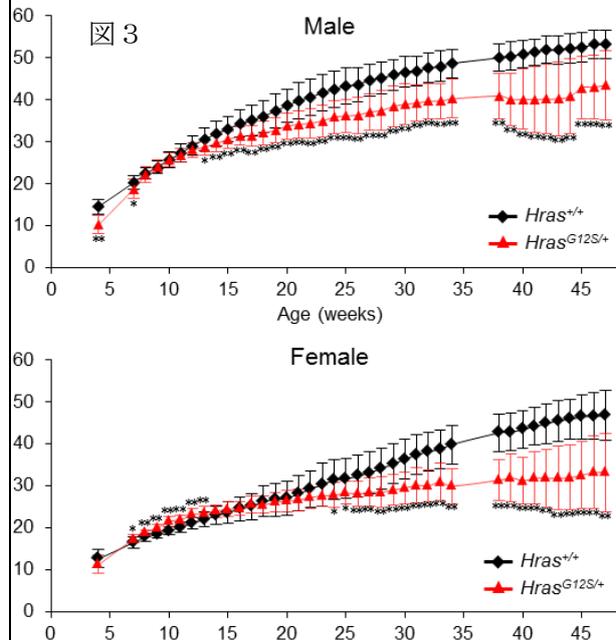
$Hras^{G12S/+}$ マウスは頭部骨格の変形、咬合不正、脱肛などの外表奇形および心・腎の異常を認めた。心疾患に関しては心肥大を認め、生後 16 週の時点で $Hras^{G12S/+}$ マウス体重あたりの心臓重量がコントロールマウス ($Hras^{+/+}$ マウス)に比べて有意に重かった。組織学的には生後 16 週齢の $Hras^{G12S/+}$ マウスにおいて心筋細胞の大きさが $Hras^{+/+}$ マウスに比べて有意に大きく、心筋細胞肥大が認められた。また、 $Hras^{G12S/+}$ マウスにおける心筋細胞肥大は加齢とともに増悪傾向にあった。一方で、心臓における線維化の増悪は認められなかった。腎奇形としては嚢胞腎を認め、その他に生後 1 年齢の $Hras^{G12S/+}$ マウスにおける糸球体変化と腎臓の線維化が認められた。消化管の構造は特に大きな変化は見られなかった。

$Hras^{G12S/+}$ マウスはコストロ症候群で認められる症状のうち、毛髪異常、皮膚症状、易

発がん性は認められなかったが、特徴的な顔貌、咬合不正、肥大型心筋症様の心筋細胞肥大を認めたためコストロ症候群の病態解明に用いるモデルマウスとして利用可能であると考えた。

実験 2 :

高脂肪食負荷による体重増加の変化を解析した。7 週齢から高脂肪食を与えたところ、雄マウスでは高脂肪食投与後 6 週目の 13 週齢より $Hras^{G12S/+}$ マウスの体重が有意に軽くなった。また、雌マウスでは高脂肪食投与後 17 週の 24 週齢より $Hras^{G12S/+}$ マウスの体重が有意に軽くなった (図 3)。 $Hras^{G12S/+}$ マウスへ高脂肪食を与えることで表現型の変化を確認したところ、生存率の低下、心筋細胞肥大の増悪、糸球体変化の増悪を認めた。1 年間高脂肪食を与えた $Hras^{G12S/+}$ マウスの肝臓では小滴性脂肪肝を認め、肝臓におけるミトコンドリア脂肪酸 β 酸化異常が疑われた。離乳時より 11 週間高脂肪食を与えた後



に絶食試験を行ったところ、絶食後の $Hras^{G12S/+}$ マウスの肝臓は組織学的に大滴性脂肪変性をきたした。また、絶食時の血中アシルカルニチン分析を行ったところ、炭素数 16 以上のアシルカルニチンの上昇が認められた。以上の結果から、 $Hras^{G12S/+}$ マウスは高脂肪食負荷によって肝臓におけるミトコンドリア脂肪酸 β 酸化異常が疑われた。

脂肪酸代謝以外の解析として糖代謝、有機酸代謝、グルタミン代謝に関連する遺伝子発現を肝臓において解析したところ、glucose-6-phosphate dehydrogenase 遺伝子 ($G6pd$)、pyruvate dehydrogenase alpha 遺伝子 ($Pdha$)、glutaryl-CoA dehydrogenase 遺伝子 ($Gcdh$)、aspartate aminotransferase 1 遺伝子 ($Got1$)、aspartate aminotransferase 2 遺伝子 ($Got2$)、glutamate dehydrogenase 1 遺伝子 ($Glud1$)、malic enzyme 1 遺伝子 ($Me1$)の発現

に変化を認めた。これらの遺伝子発現変化は、がん細胞において認められた変化は、mitochondrial tricarboxylic acid (TCA) サイクルを介した効率的な ATP 産生の低下と解糖系を利用した非効率的な ATP 産生の亢進を引き起こしていると考えられる。また、非効率的な ATP 産生はエネルギー需要の上昇を引き起こす。以上の結果から、コステロ症候群における脂肪酸代謝、糖代謝、有機酸代謝、グルタミン代謝などの代謝性変化およびこれらの代謝性変化に伴う体重増加不良が示唆された。

本研究ではコステロ症候群の病態解明を行うため、Hras 変異マウスを作製し表現型の解析を行った。また、Hras 変異マウスにおける代謝性変化の解明がコステロ症候群の病態解明に役立つと考え、高脂肪食負荷を行い、代謝変化を解析した。Hras^{G12S/+} マウスは高脂肪食負荷によって肝臓におけるミトコンドリア脂肪酸β酸化異常が疑われた。

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)

1. Oba D, Inoue SI, Miyagawa-Tomita S, Nakashima Y, Niihori T, Yamaguchi S, Matsubara Y, Aoki Y. Mice with an Oncogenic HRAS Mutation are Resistant to High-Fat Diet-Induced Obesity and Exhibit Impaired Hepatic Energy Homeostasis. **EBioMedicine**. 査読あり 2018 Jan;27:138-150. doi: 10.1016/j.ebiom.2017.11.029. Epub 2017 Dec 6.

[学会発表] (計 4 件)

1. 青木洋子 「遺伝性疾患の病態解明から新しい生命現象を明らかにする」 第 59 回日本小児神経学会学術集会 2017 年 6 月 15 日 (木) 大阪国際会議場 (大阪)

2. Aoki Y. RASopathies: genetic syndromes associated with the Ras/MAPK pathway. 日本研究皮膚科学会 第 41 回年次学術大会・総会 2016 年 12 月 9 日 仙台国際センター (仙台)

3. 青木洋子 「RASopathies: 広がりゆく疾患概念」 第 115 回日本皮膚科学会総会 2016 年 6 月 3 日 京都国際会館 (京都)

4. Oba D, Inoue S, Moriya M, Watanabe Y, Niihori T, Miyagawa-Tomita S, Ono M, Kure S, Ogura T, Matsubara Y, Aoki Y. Therapeutic research in a mouse model of cardio-facio-cutaneous syndrome. ICHG 2016 The 13th International Congress of Human Genetics April 7, 2016. 2016 年 4 月 3-7 日 京都国際会館 (京都)

[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

<http://www.medgen.med.tohoku.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

青木 洋子 (AOKI, Yoko)
東北大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：80332500

(2)研究分担者

松原 洋一 (MATSUBARA, Yoichi)
国立研究開発法人国立成育医療研究センター・研究所・所長
研究者番号：00209602

新堀 哲也 (NIIHORI, Tetsuya)
東北大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：40436134

井上 晋一 (INOUE, Shinichi)
東北大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：70622091

(3)連携研究者 なし

(4)研究協力者

東北大学・大学院医学系研究科
大場 大樹 (OBA, Daiju)
西山 亜由美 (NISHIYAMA, Ayumi)
梅木 郁美 (UMEKI, Ikumi)
高原 真吾 (TAKAHARA, Shingo)