

令和 2 年 6 月 30 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10078

研究課題名（和文）新たな成長障害 GH-IGFシグナル蛋白遺伝子異常症の病態解明

研究課題名（英文）Elucidation of mechanism for short stature with abnormal GH-IGF signaling

研究代表者

鞆嶋 有紀（KAWASHIMA, YUKI）

鳥取大学・医学部・講師

研究者番号：20403412

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：GH分泌低下の見られない原因不明の成長障害患者と、IGF1R（IGF1受容体）遺伝子異常が疑われ、診断目的で遺伝子解析を行い異常が認められなかった成長患者を対象に、MiSeqにて TruSightOne シーケンスパネルを用いてGH-IGF系経路関連蛋白遺伝子の1%未満の希少変異の有無を確認した。平成29年度から平成31年度まで合計18人の対象者に解析を行った。その結果、うち2名に新規のIGF1Rのヘテロ変異（p.Tyr 888 X）を同定した。この変異の機能解析を行った結果、変異IGF1RではIGF1Rの発現が認められないことを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新たに2例のIGF1R遺伝子変異による成長障害を同定した。これまでの研究ではGH-IGFシグナル異常による成長障害は非常に稀とされているが、ある程度の割合で存在することが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：Targeted resequencing using TruSight One sequencing panels and direct PCR sequencing were performed in 18 patients with unknown short stature. We identified a heterozygous IGF1R mutation (p.Tyr 888 X) in two patients. The mutation result in deficit of the expression of IGF1R protein in transiently transfected cells.

研究分野：小児内分泌学

キーワード：小児内分泌学 成長障害 GH-IGFシグナル IGF1R

1. 研究開始当初の背景

成長ホルモン (GH) とインスリン様成長因子 [insulin-like growth factor (IGF)] は成長に関わっている最も重要な成長因子である。しかし、GH-IGFシグナルには多くの蛋白が複雑に関わっており、ヒトの成長障害との関連について、未だ明らかにされず、病態については不明な点が多い。私達は2014年度より、原因不明の低身長患者を対象に、次世代シーケンサーを用いた GH-IGF系シグナル関連蛋白のエクソーム解析研究を開始し、世界で初めてのGH-IGFシグナル蛋白遺伝子 (*IRS1* および *IGFALS*) 異常による成長障害や IGF2 遺伝子変異による成長障害を同定した。

2. 研究の目的

本研究では、エクソーム解析にて、GH/IGF 系シグナル蛋白遺伝子異常による成長障害 (IGF シグナル異常に起因する成長障害) を中心に検討し、機能解析を進めることで、これまで明らかにされていなかった成長障害の病態解明を行う。

3. 研究の方法

GH分泌低下の見られない原因不明の成長障害患者と、IGF1R (IGF1受容体) 遺伝子異常が疑われ、診断目的で遺伝子解析を行い異常が認められなかった成長患者を対象とし、MiSeqにて TruSightOneシーケンスパネルを用いてデータを取得する。この中からGH-IGF系経路関連蛋白遺伝子のデータを取りだし、変異の有無を確認する。見出された変異を機能予測ソフト、データベースを用いて、機能予測で、中等度の機能低下がみられる1%未満の希少変異について検討した。さらに、IGF1値高値を示し、IGF1R遺伝子異常が疑われても、IGF1R遺伝子変異を認めなかった5例に、IGF1Rプロモーター領域のメチル化解析を行った。

さらに既に認めていた *IRS1* 変異症例より、本学倫理委員会申請認可後に、同意をとり、皮膚より線維芽細胞を樹立し、患者の線維芽細胞と、正常コントロール線維芽細胞を用いて、増殖能を評価するため、10%FBS 添加 DMEM 培地で 10 日間培養、毎日細胞数をカウントし、細胞増殖曲線を作成、また [methyl-³H]チミジンを用いて、IGF1 添加 20 時間後の線維芽細胞の DNA 合成能について評価した。さらに、IGF 1 刺激による Akt, ERK のセリンリン酸化、*IRS1* の発現についてウェスタンブロットで確認した。

4. 研究成果

うち 2 名に新規の IGF1R のヘテロ変異 (p.Tyr 888 X) を同定した。この変異 IGF1R 遺伝子を IGF1R ノックアウトマウス由来の線維芽細胞 (R-CELL) に発現させ、機能解析を行った結果 変異 IGF1R では IGF1R の発現が認められず、本変異にて成長障害をきたしていることが明らかになった。

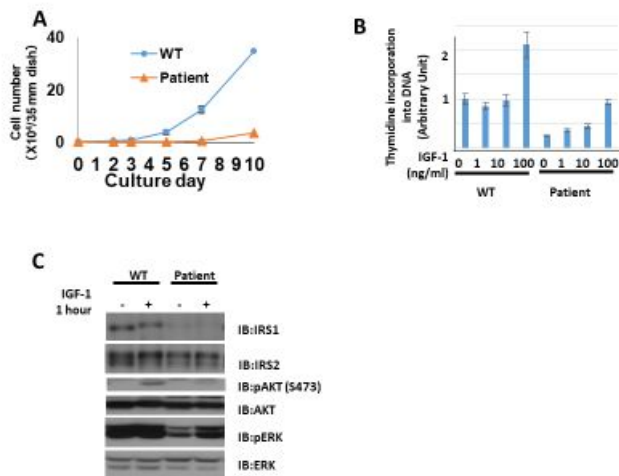
さらに、IGF1Rプロモーター領域のメチル化解析では、同部位のメチル化異常は同定されなかつ

た。

これまでの研究では GH-IGF シグナル異常による成長障害は非常に稀とされているが、さらに 2 例の IGF1R 遺伝子異常症を同定し、ある程度の割合で存在することが明らかになった。また IGF1R プロモーターのメチル化異常について、はっきりと示すことができないことも明らかになった。

既に認めていた IRS1 変異症例より樹立した患者の線維芽細胞と、正常コントロール線維芽細胞を用いて、増殖能について評価をおこなったところ、細胞増殖曲線および DNA 合成能の著明な低下を認めた (図 1 A,B)。さらに、IGF 1 刺激による Akt, ERK のセリンリン酸化、IRS1 の発現についてウェスタンブロットで確認したところ、IRS1 蛋白量の低下、長時間 (1 時間後) の IGF1 刺激で、IRS1 のリン酸化の低下、Akt のリン酸化の低下を認め (図 1 C)、IRS1 変異が成長障害の原因になっている可能性が強く考えられた。現在、この解析について論文を投稿中である。

図 1



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Masanobu Fujimoto, Yuki Kawashima Sonoyama, Naoki Hamajima, Takashi Hamajima, Yumiko Kumura, Naoki Miyahara, Rei Nishimura Kaori Adachi, Eiji Nanba, Keiichi Hanaki, Susumu Kanzaki	4. 巻 1
2. 論文標題 Increased IRS2 mRNA Expression in SGA Neonates: PCR Analysis of Insulin/IGF Signaling in Cord Blood	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of the Endocrine Society	6. 最初と最後の頁 1408-1416
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1210/js.2017-00294	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Masunaga Yohei, Inoue Takanobu, Yamoto Kaori, Fujisawa Yasuko, Sato Yasuhiro, Kawashima-Sonoyama Yuki, Morisada Naoya, Iijima Kazumoto, Ohata Yasuhisa, Namba Noriyuki, Suzumura Hiroshi, Kuribayashi Ryota, Yamaguchi Yu, Yoshihashi Hiroshi, Fukami Maki, Saito Hiroto, Kagami Masayo, Ogata Tsutomu	4. 巻 105
2. 論文標題 IGF2 Mutations	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism	6. 最初と最後の頁 116 ~ 125
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1210/clinem/dgz034	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鞆嶋有紀 伯野史彦 妹尾慎太郎 山口由起子 西村玲 花木啓一 高橋伸一郎 神崎晋
2. 発表標題 IRS1遺伝子変異 (p.Ser685_Ser686del) は、IGF作用のみに影響を与え、成長障害を引き起こす
3. 学会等名 第53回日本小児内分泌学会学術集会
4. 発表年 2019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	伯野 史彦 (Hakuno Fumihiko) (30282700)	東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・助教 (12601)	