

平成 21 年 5 月 25 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19591222

研究課題名 (和文)

成長ホルモン欠損症候補遺伝子としての *Sprouty2* の検討

研究課題名 (英文)

Is *Sprouty2* a candidate gene for growth hormone deficiency?

研究代表者

鈴木 英明 (SUZUKI HIDEAKI)

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号：20206519

研究成果の概要：

13 番染色体長腕の部分欠損症例の経験から、欠損部位に局在する *Sprouty2* (*Spry2*) が成長ホルモン欠損症および第 5 指中節骨短縮の原因遺伝子である可能性について検討した。既報例および自験例の共通欠失領域にある遺伝子の発現パターンを解析し、*Spry2* が 13q 欠失症候群におけるこの 2 つの表現型の有力な責任遺伝子であることがわかった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：成長ホルモン

## 1. 研究開始当初の背景

本研究は、成長ホルモン部分欠損を伴う低身長、精神運動発達遅滞、ヒルシュスプルング病、第 5 指中節骨短縮と橈側偏位、疎な毛髪などの症状をともなう複雑な染色体異常症を経験したことから、13 番長腕上の遺伝子のハプロ不全が上記症状に関係があると考えられることから計画された。患児の染色体核型分析の結果は 46, XY, der(8) inv(8)(p23.3q22.3) t(8;18)(p23.3;q21.3), del(13)(q22.3), der(18) t(8;18)(p23.3;q21.3) であり、本症例の欠失部分にオーバーラップす

る 13 番長腕部分欠失報告例を検討したところ、成長ホルモン欠損症と第 5 指の短指症を示した報告が複数例見つかった。我々は自験例とこれらの症例の欠損部位のマッピングから、前述した表現型に関与する可能性のある候補遺伝子として *Spry2* を見出した。*Spry2* は、線維芽細胞増殖因子 (FGF) によって誘導され、その受容体 (FGFR) を含むレセプター型チロシンキナーゼの細胞内アンタゴニストとして機能しネガティブフィードバック回路を形成する。ショウジョウバエやマウスの研究から、臓器形成期における細胞系譜

の決定機構に重要な役割を担っていることが示されている。

## 2. 研究の目的

研究の目的は下垂体および手指発生における *Sprouty2* (*Spry2*) の役割を明らかにし、*Spry2* の異常が特異性成長ホルモン欠損症または第5指中節骨短縮と橈側偏位の原因であるか否かを明らかにすることである。

## 3. 研究の方法

(1) 患児の下垂体機能および染色体欠失部位の詳細な検討。

(2) マウスを用いて 13q 欠失部位に局在する遺伝子の発現パターンの解析。特に下垂体と手指発生における発現パターンについて *in situ hybridization* 法にて検討。

(3) ゼブラフィッシュを用いて *Spry* family 遺伝子の発現パターンを解析し、さらに morpholino antisense oligonucleotide を用いて *Spry2* のノックダウンを行い、下垂体の発生にどのような影響を及ぼすかについて検討を行う。

## 4. 研究成果

### (1) 患児の下垂体機能について

患児の身長は6歳で92cm (-4.4SD)、手根骨による骨年齢は3歳相当である。患児の成長ホルモンの分泌能を調べるため、1-Dopa 負荷試験、アルギニン負荷試験、クロニジン負荷試験を行った。1-Dopa 負荷試験では正常反応であったが、アルギニン負荷試験では低反応、クロニジン負荷試験では遅延低反応であった。このことは成長ホルモンの産生は行われているが視床下部からの分泌制御もしくはそれに対する下垂体の反応に問題があることによる成長ホルモンの部分欠損症であることがわかった。

さらに、患児では睾丸の低形成を認めたため LH-RH 負荷試験を行った。その結果 FSH、LH とも負荷後 30 分で付加前の 4 倍以上の分泌が認められ患児には低ゴナドトロピン血症が認められないことがわかった。

### (2) 染色体欠失領域の検討

13q の染色体欠失領域を詳しくするため、両親の同意を得て患児末梢血リンパ球を用いて高精度分染法及び fluorescence *in situ hybridization* 法による解析を行った。その結果、患児においては 13q22.1 から 13q32.2 にかけて約 25Mb の欠失があることがわかった。過去の成長ホルモンの部分欠損と第5指中節骨短縮と橈側偏位を認めた症例の欠失領域を重ね合わせた結果、患児の欠失領域のテロメア側約 18Mb に責任遺伝子が存在することがわかった(図1)。この領域には図1に示した既知の遺伝子と、いくつかのタンパクをコードしている可能性のある遺伝子や偽遺伝子が存在していた。また図中に示した

C13orf25 は c-myc の翻訳を制御する miRNA クラスタとして知られている。

患児の 13q 欠失領域にはヒルシュブルグ病の責任遺伝子である *EDNRB* (*endothelin receptor type B*) が存在した。またこれまで報告されている優性遺伝性疾患関連遺伝子としては Tourette 症候群の責任遺伝子である *SLITRK1* (*SLIT and NTRK-like family, member 1*) が存在したが、患児にチェックは認められていない。

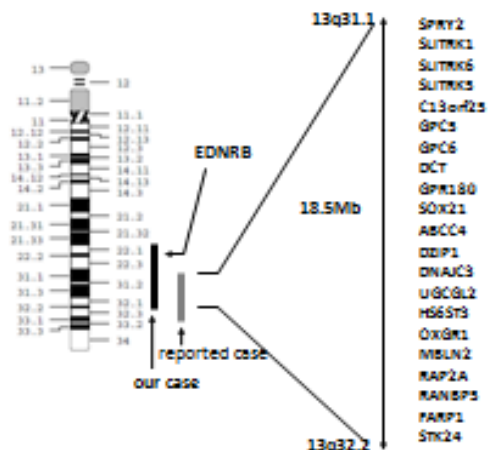


図 1

### (3) 13q 欠失領域に含まれる遺伝子の発現解析

図1に示した成長ホルモンの部分欠損と第5指中節骨短縮と橈側偏位を認めた症例で共通して欠失している遺伝子に関して E12, E14 のマウス胎仔を用いて whole mount *in situ hybridization* 法による発現解析を行った。検討した遺伝子は *Spry2*, *Slitrk1*, *Slitrk6*, *Slitrk5*, *Gpc5*, *Gpc6*, *DCT*, *GPR180*, *Sox21*, *Abcc4*, *Dzip1*, *Dnajc3*, *Ugcgl2*, *HS6ST3*, *OXGR1*, *MBLN2*, *RAP2A*, *RANBP5*, *FARP1*, *STK24* である。その結果下垂体において特異的な発現を認めたのは *Spry2* のみであり、手指では *Gpc5* と *Spry2* であった。*Gpc5* の手指での発現は E12 において基節骨予定領域に強く認められ中節骨短縮との関連はないと考えられた。

### (4) 下垂体における *Spry2* 発現パターン

下垂体における *Spry2* の発現パターンを下垂体ホルモン遺伝子 (*GH*, *PRL*, *LH*, *FSH*, *POMC*, *TSH*) と下垂体発生にかかわる遺伝子 (*Hesx1*, *Pitx1*, *Prop1*, *Pit1*, *Lhx3*, *FGFA*, *8*, *10*, *15*, *FGFR2Iib*, *FGFR2Iic*) について発現を調べた。

E12 では *FGF10* が間脳及び下垂体漏斗で強い発現を示すが、*Spry2* は、FGF10 発現領域に隣接してその下端で神経下垂体領域に強く発現している。

E14ではFGF10に代わりFGF8が神経下垂体で高発現となるが、Spry2はFGF8とその前下方にある下垂体前葉及び下垂体前葉隆起部との間で境界を接するように発現している(図2)。

この結果からSpry2が視床下部一下垂体の発生においてFGFシグナル伝達系の制御に関与していることが示唆された。これまでの報告ではFGFシグナルは下垂体前葉のホルモン産生細胞の発生に必要であることが示されている。一方でFGFシグナルが視床下部の、特に下垂体ホルモン放出因子や抑制因子産生に影響を及ぼすかは分かっていない。しかしながらFGFR1遺伝子のnonsense変異が視床下部性の低ゴナドトロピン性性腺発育不全を合併するKallmann症候群の原因であることからFGFシグナル伝達系が視床下部のホルモン産生細胞の発生分化に関与していることが疑われる。

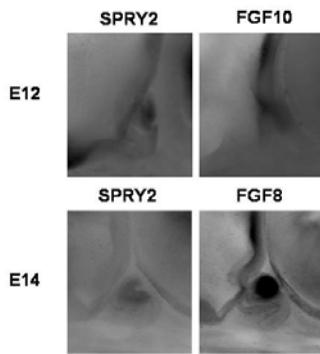


図2

(5)ゼブラフィッシュを用いたSpryの視床下部一下垂体発生における役割の検討

今回の研究の最初の計画では、この後Spry2ノックアウトマウスの胎仔を入手して、下垂体ホルモン産生細胞の発生について検討していく予定であったが、残念ながらマウスを入手することができなかった。

そこでゼブラフィッシュにおいても下垂体発生時にSpry familyが発現しているかを調べた。その結果ゼブラフィッシュでは下垂体発生時にSpry1、2、4の三種類が発現していることがわかった。現在この三種類についてmorpholino antisense oligonucleotideによる遺伝子ノックダウンを行いSpryの視床下部一下垂体系発生における役割について検討を進めている。

(6)手指パターン形成時のSpry2発現解析

患児の第5指中節骨短縮と橈側偏位の表現型発現にSpry2が関与している可能性をさぐるため、Spry2及び他の手指パターン形成、特に遠近軸に沿った、に関与していると考えられる遺伝子群(FGF4、FGF8、FGF10、FGFR2IIb、

FGFR2IIc、FGFR3、Noggin、GDF5、Wnt9a、Ihh、PTHrP、Ror2、Snail)の発現パターンを解析した。その結果、外胚葉性頂堤でFGF8が発現しているE12では、外胚葉性頂堤直下の間葉系細胞でFGF10の発現領域に一致してSpry2は発現しており、外胚葉性頂堤でFGF8発現が低下するE14では、指の先端構造(Tip)の形成とともにSpry2及びFGF10の発現が指の先端での発現から、将来中節骨になる予定領域へと移る(図3)。四肢の遠近軸に沿った発生分化は近位端から進んでいくが、末梢構造である指のパターン形成においては最遠位端であるTipの形成が起きてからはじまることが知られており、今回の結果からはSpry2が手指の遠近軸に沿ったパターン形成に重要な働きをしている可能性が示唆された(図4)。しかしながら、患児で観察された第5指中節骨の有意な短縮が、Spry2のハプロ不全によっておこっているという直接的な証明は得られなかった。今後はニワトリ胚を用いて解析を進めていく予定である。

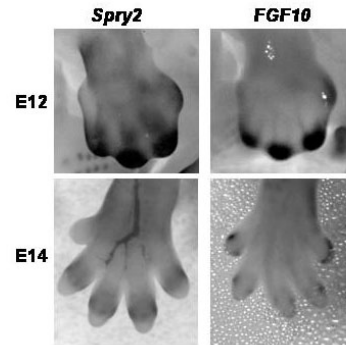


図3

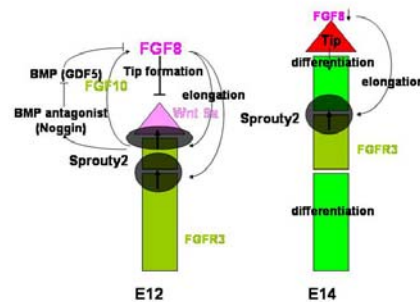


図4

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2件)

- ① 鈴木英明、奇形症候群、小児科診療、72、45-50、2009、査読無し
- ② Iwaizumi M, Shinmura K, Mori H, Yamada H, Suzuki M, Kitayama Y, Igarashi H, Nakamura T, Suzuki H, Watanabe Y, Hishida A, Ikuma M, Sugimura H, Human Sgo1

downregulation leads to chromosomal instability in colorectal cancer. Gut, 58, 249-260, 2009, 査読有り

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 英明 (SUZUKI HIDEAKI)  
東京慈恵会医科大学・医学部・講師  
研究者番号：20206519

(2) 研究分担者

岡部 正隆 (OKABE MASATAKA)  
東京慈恵会医科大学・医学部・教授  
研究者番号：10300716