

令和 4 年 5 月 27 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08260

研究課題名(和文) 副腎低形成症をきたす新規責任遺伝子異常を有する疾患モデルマウスの作製と病態解明

研究課題名(英文) The production and analyses of model mice having new genetic abnormality responsible for adrenal hypoplasia

研究代表者

天野 直子 (AMANO, Naoko)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・共同研究員

研究者番号：70348689

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：副腎低形成症の遺伝学的原因と考えられる遺伝子Aエクソン2のヘテロ欠失マウスをゲノム編集技術で作製した。作製したヘテロ欠失マウスでは表現型はなく、さらにホモ欠失マウスを作製し解析した。遺伝子Aホモ欠失マウスも副腎低形成の表現型は出現しなかった。ただし、副腎組織像およびRNAシーケンス解析の結果、マウス特有の副腎組織であるX-zoneの分化異常が疑われた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により遺伝子Aエクソン2のホモ欠失マウスで副腎低形成を認めなかった。しかし、副腎の形態異常やX-zoneの分化異常が疑う所見を認めた。以上より、遺伝子Aのマウス副腎とヒト副腎では種差があると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Exon 2 deletion of gene A is a new candidate genetic abnormality causing adrenal hypoplasia. We produced the mice having geneA exon 2 heterozygous deletion by genome editing. However, the mice did not have adrenal hypoplasia. We produced homozygous mice by mating the heterozygous mice. However, the homozygous mice did not have adrenal hypoplasia either.

研究分野：小児内分泌

キーワード：副腎低形成症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々は既知責任遺伝子変異陰性例を対象にオリゴレイ CGH (Agilent 180K, 1M) を行い、3例に同一遺伝子 (遺伝子 A) エクソン 2 を含む約 9kb、50kb、80kb の微細欠失を同定した。成獣および新生仔マウス副腎組織切片を用いて遺伝子 A の in situ hybridization を行い、副腎皮質被膜下で遺伝子 A 発現を確認した。また、遺伝子 A 部分欠失患者の末梢血から樹立したリンパ芽球の mRNA の塩基配列を決定し、同じ mRNA 配列であることを確認した。この遺伝子 A をコードする分子 A は Wnt- カテニン系のシグナル伝達に関与することが過去に報告されており、遺伝子 A の特定領域の欠失が Wnt- カテニン系のシグナル伝達に影響を与えると考えた。HEK293 細胞遺伝子 A (野生型・欠失型) 安定発現株および薬剤誘導性安定発現株を樹立した。これらの細胞株で TCF/LEF レポーターを用いたルシフェラーゼアッセイを行った結果、リガンド (Wnt3a, RSP01) 添加下で欠失型遺伝子 A 安定発現株は野生型遺伝子 A 安定発現株と比較し、

カテニン産生能が 50% 以下に低下していることを確認した。

遺伝子 A は Wnt- カテニンシグナル伝達の抑制因子であり、カテニンシグナル伝達を抑制することにより、細胞増殖抑制作用があると考えられている。副腎皮質がんを含む様々ながん細胞において遺伝子 A の機能喪失型体細胞変異が報告されており、これらのがん細胞において Wnt- カテニンシグナル伝達系が活性化していると考えられている。

また、カテニンは成獣マウスの副腎皮質被膜下に発現しており、SF-1 プロモーターを用いたカテニンコンディショナルノックアウトマウスでは完全副腎無形成もしくは副腎皮質 (永久層) 欠損と報告されている。以上より、少なくともマウスにおいては、Wnt- カテニンシグナル伝達系が副腎皮質の発生・分化に必須である。さらに、最近では正常に Wnt/ カテニンシグナル伝達系が機能することが、副腎皮質における正常な層構造の形成 (zonation) とその維持 (特に球状層) に重要な役割を果たしていると考えられている。しかし、マウスと同様にヒトにおいてもこの仮説が適用可能であるかは不明である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、以下の 2 点である。遺伝子 A が先天性副腎低形成症の新規責任遺伝子であること、遺伝子 A が関与する Wnt- カテニンシグナル伝達系がヒト副腎皮質の発生・分化に必須であることを証明することである。

3. 研究の方法

(1) マウス受精卵へのゲノム編集 (マウス系統は BDF1)

高田修治 (分担研究者) の成育医療研究センターシステム発生・再生医学研究部で遺伝子 A エクソン 2 の上流下流のおのおの 100bps 以上離れた領域を切断する gRNA を作製する。胎生致死の可能性が否定できないため、マウス受精卵 2 細胞期に 1 細胞のみに gRNA と Cas9 protein を microinjection する。尚、ジェノタイプピッキングは慶應義塾大学小児科学遺伝子検査室で行う。出生した新生仔のうちエクソン 2 欠失 (体細胞モザイク) を有するマウスのみ慶應義塾大学医学部共同動物実験施設に輸送する。

(2) 遺伝子 A エクソン 2 ヘテロ欠失およびホモ欠失マウスの作製

慶應義塾大学共同動物実験施設において、野生型 C57BL/6 マウスと輸送されたエクソン 2 欠失 (体細胞モザイク) を有するマウスを交配し、生殖細胞系列に遺伝子 A のエクソン 2 欠失をヘテロ接合性に有するマウス (ヘテロ欠失マウス) を作製する。表現型で出現しない場合には遺伝子 A エクソン 2 ヘテロ欠失マウス同士を交配し、遺伝子 A エクソン 2 ホモ欠失マウス (ホモ欠失マウス) を作製する。

(3) 作製したヘテロもしくはホモ欠失マウス (疾患モデルマウス) の解析

表現型解析

作製したヘテロもしくはホモ欠失マウス (疾患モデルマウス) の生存率、体重増加などを野生型と比較する。同時に副腎機能 (コルチコステロン産生能) を評価するために血中 ACTH、コルチコステロンを測定する。

病理組織学的解析

作製した疾患モデルマウスの副腎・性腺を摘出し、重量の比較を行う。HE 染色で、層構造の有無や各層の厚さの測定などを行う。各種免疫染色 (SF1, カテニンなど) を行い、副腎発生・分化や Wnt- カテニンシグナル伝達系に関与する分子の発現の有無および野生型との比較を行う。疾患モデルマウスが生存可能であれば、それぞれの評価項目について新生仔、6-8 週齢、20-30 週齢で行う。

分子遺伝学的解析

作製した野生型マウスと疾患モデルマウスの副腎・性腺を摘出し、タンパク質と mRNA を抽出する。タンパク質はカテニンのウェスタンブロットを行い、疾患モデルマウスでカテニン産生が低下していることを確認する。抽出した mRNA でトランスクリプトーム解析を行い、Wnt- カテニン系シグナル低下による副腎発生・分化障害においてどのような分子機構が影響を受けるかを明らかにする。

4 . 研究成果

遺伝子 A エクソン 2 ヘテロ欠失は表現型がでなかったため、ホモ欠失マウスを作製し、解析した。ホモ欠失マウスは、野生型と比較し、以下の表現型が確認された。1) 体重増加不良をきたし、半数以上が週齢 1 以内に死亡した。週齢 3 以降は死亡率が低下した。2) 死亡例において鼻腔内嗅上皮の空胞変性・アポトーシス、線毛細胞の減少を認めた。3) 日齢 0 と週齢 6 で血中 ACTH、corticosterone に有意差はなかった。4) 週齢 6 で副腎は腫大し、束状層過形成と髄質細胞の皮質内への分散に加えて、皮質内側に大型の核を持つ細胞群を認めた。5) 副腎の免疫組織染色で Akr1c18 陽性細胞はみられず、カテニン陽性細胞は WT と同様であった。6) RNA-sequence では Akr1c18 発現が有意に低下していたが、Wnt- カテニン経路に関わる遺伝子発現に有意な変動は認められなかった。

以上より、遺伝子 A ホモ欠失は Wnt- カテニン経路非依存性に X-zone の分化に関わると考えた。また、遺伝子 A ホモ欠失マウスに副腎低形成症はみられず、種差が存在すると考えた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 内田登 天野直子 高田修治 小林杏子 村上智亮 鳴海覚志 石井智弘 長谷川奉延
2. 発表標題 Znrf3エクソン2はマウスX-zoneの分化に重要である：ゲノム編集を用いたin vivo解析
3. 学会等名 第54回日本小児内分泌学会学術集会
4. 発表年 2021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	高田 修治 (Takada Shuji) (20382856)	国立研究開発法人国立成育医療研究センター・システム発生・再生医学研究部・部長 (82612)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------