

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07849

研究課題名（和文）優性遺伝性成長ホルモン欠損モデルマウスの作製と成長ホルモン分泌不全発症機序の解明

研究課題名（英文）An establishment of dominantly inherited growth hormone deficiency model mice

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・客員助教

研究者番号：60338100

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：優性遺伝性GH1遺伝子異常症モデルマウスにおけるGH分泌不全の分子生物学的機序を解明するため、マウスの内因性Gh遺伝子のexon 3をCRISPR/Cas9を用いて欠失させたモデルマウスを作製した。このマウスを用いた下垂体リアルタイムRT-PCRによりXbp1遺伝子のスプライシングが亢進していることを確認した。exon 3が欠失した変異型GHにより小胞体ストレスが起こっていることを示唆する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

初報以来今まで30年間その発症機序が未解明であった顕性遺伝性GH1遺伝子異常症について、その発症機序を初めて解明する遺伝学的ツールを作製したこと。また、マウスにヒトと同じ遺伝子バリエーションを挿入することでマウスにおいても同様の表現型が得られたことは、学術的意義が大きい。

研究成果の概要（英文）：We established model mice representing the phenotype of human isolated growth hormone deficiency type 2 by deleting endogenous exon 3 in the Gh gene using CRISPR/Cas9 system. Quantitative RT-PCR analysis revealed splicing of Xbp1 gene is stimulated, which suggests that exon 3-deleted growth hormone exerted endoplasmic reticulum stress.

研究分野：小児内分泌学

キーワード：成長ホルモン分泌不全 小胞体ストレス 優性阻害効果

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

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。

(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。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った。

(3)申請者らは、上述のヒト化 GH モデルマウスを用いて、本症の GH 分泌不全の根幹が下垂体 GH 産生細胞膜上に発現する、GH 放出ホルモン受容体の発現低下によることを見出した。さらにこの受容体の発現低下は、受容体をコードする Ghrhr 遺伝子のプロモーター活性の低下によることを証明した。

(4)しかし、上述のヒト化モデルマウスは、遺伝子編集過程が複雑であり、個体数を増やしにくいという欠点があった。また、内因性 Gh 遺伝子のプロモーター領域をゲノム編集しているため、ゲノム編集による二次的な影響の結果遺伝子の発現が変動している可能性が否定できない問題点があった。そこでこの問題点を解決し、かつより簡便に、より確実に疾患モデルマウスを樹立するために、申請者らはマウスの内在性 Gh 遺伝子の exon 3 を CRISPR/Cas9 システムを用いて欠失させたモデルマウスを作製し、ヒト本症と同等かより重症の表現型を得ることに成功した。

2. 研究の目的

申請者らが作製した新たな内因性 Gh 遺伝子 exon 3 欠失モデルマウス(以下 3Gh 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) 細胞内オルガネラの観察を透過性電子顕微鏡を用いて行い、先行研究で樹立した本症ヒト化モデルマウスと同様の所見が得られるかどうかを検証する。

(2) 3GH によ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小胞体ストレス応答をリアルタイム RTPCR 法で検証する。

(3) 3 GH が下垂体 GH 産生細胞に及ぼす影響を網羅的に解析するため、モデルマウスの下垂体を用いて transcriptome 解析を行う。

4. 研究成果

(1) 3 Gh マウスの下垂体を透過性電子顕微鏡(TEM)で観察したところ、野生型と比べて、粗面小胞体の著明な増殖、分泌顆粒の減少と共に、細胞質の巨大タンパク凝集体が観察された。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。

(2)モデルマウスの下垂体を用いたリアルタイム RTPCR を行った結果、哺乳類の小胞体ストレス応答主要経路である IRE1 pathway の下流である Xbp1 遺伝子のスプライシングが亢進していることを確認した。このことは、本症の GH 分泌不全に小胞体に蓄積する 3 GH による小胞体ストレスが関与している可能性を強く示唆するものであった。

(3)申請者らは、3 GH による下垂体 GH 産生細胞に対する影響を網羅的に解析するため、ノックアウトマウス(-/-)およびその片アリルが 3Gh アリルであるマウス(3/-)を用いて、下垂体の transcriptome 解析を行った。その結果、細胞膜上に発現、もしくは細胞膜を通過し細胞外に分泌される多数のタンパクの発現が mRNA レベルで著明に低下していることが明らかとなった。

近年、真核細胞全てにおいて保存されている新規の小胞体ストレス応答として、小胞体を通過する mRNA が RNA 干渉と同様の機序により分解を受ける機構(ER-associated RNA silencing, ERAS)が報告された。従来より知られていた小胞体に蓄積したタンパクを ubiquitin-proteasome 経路で分解する ER-associated degradation(ERAD)と共に働くことにより小胞体にかかるタンパク

負荷を軽減する役割を担っているものと推測される。申請者らは、モデルマウスで見られた上記の多数の細胞膜を通過するタンパクの発現が mRNA レベルで低下している現象に、ERAS が関与しているのではないかと仮説を立てている。将来的にはモデルマウスにおいて ERAS の実行部隊である Argonaute を下垂体 GH 産生細胞特異的に KO することにより表現型が救済されるかどうかを検証する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 荒木喜美
2. 発表標題 成長ホルモン分泌不全症 型 (IGHD2)モデルマウスの作製と病態解析
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 島田颯
2. 発表標題 成長ホルモン分泌不全症 型 (IGHD2)モデルマウスの作製と病態解析
3. 学会等名 日本遺伝学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 島田 颯、徳留 遼、川下 真奈、芝田 晋介、有安 大典、荒木 喜美
2. 発表標題 成長ホルモン分泌不全症 型(IGHD2)モデルマウスの作製と病態解析
3. 学会等名 2021年度先端モデル動物支援プラットフォーム成果発表会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 徳留 遼、島田 颯、川下 真奈、芝田 晋介、有安 大典、荒木 喜美
2. 発表標題 成長ホルモン分泌不全症 型IGHD2モデルマウスの作製と病態解析
3. 学会等名 日本遺伝学会
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	荒木 喜美 (Araki Kimi) (90211705)	熊本大学・生命資源研究・支援センター・教授 (17401)	

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
---------	---------