

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591370

研究課題名(和文) 体格決定の新規分子機構に関する研究

研究課題名(英文) Studies on a novel signaling pathway that mediates postnatal body growth

研究代表者

坂口 和成 (Sakaguchi, Kazushige)

和歌山県立医科大学・先端医学研究所・教授

研究者番号：60178548

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：個体の体格形成には 成長ホルモン (GH)からインスリン様成長因子(IGF1)へのシグナル(GH-IGF1 軸)が深く関わっている。私達研究グループはEphA4KOマウスおよびこのマウス由来細胞の詳細な研究から、ephrin-EphA4シグナル伝達系がGH受容体 (GHR) およびその下流分子と相互作用してそのシグナルを増強し、IGF1産生を増強することを発見した。これは従来のGH-IGF1 axis定説に修正を加えるものである。EphA4が個体の体格決定にIGF1産生を介して関与することは、EphA4KOマウスへのIGF1の皮下注により正常化することにより確認した。

研究成果の概要(英文)：The growth hormone (GH)-insulin-like growth factor 1 (IGF1) axis mediates postnatal body growth. The GH receptor has been regarded as the sole receptor that mediates the JAK2/STAT5B signal toward IGF1 synthesis. Here, we report a signaling pathway that regulates postnatal body growth through EphA4, a member of the Eph family of receptor tyrosine kinases and a mediator of the cell-cell contact-mediated signaling. EphA4 forms a complex with the GH receptor, JAK2, and STAT5B and enhances IGF1 expression predominantly via the JAK2-dependent pathway, with some direct effect on STAT5B. Mice with a defective EphA4 gene have a gene dose-dependent short stature and low plasma IGF1 levels. Pituitary Gh mRNA and plasma GH levels were not reduced. IGF1 injection rescued the phenotype of EphA4-KO mice. These findings suggest that the local cell-cell contact-mediated ephrin/EphA4 signal is as important as the humoral GH signal in IGF1 synthesis and body size determination.

研究分野：分子医学

キーワード：体格決定 成長ホルモン インスリン様成長因子 Eph ephrin JAK2 STAT シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

- (1) EphA4 欠損マウスを解析したところ、体格が均整のとれた状態で小さいことを発見した。血中 GH は正常、血中 IGF1 は低値であった。生直後の体格に正常マウスと比べて差異は認められなかった。
- (2) 生後の個体の体格形成には GH-IGF1 系が深く関わっている。

2. 研究の目的

- (1) EphA4 欠損マウスの成長曲線の測定、血中ホルモン値測定、および各組織での GH-IGF1 axis 関連分子の発現・活性化等の測定。
- (2) ephrin-EphA4 シグナル系と GH-GHR シグナル系のクロストーク接点の解析。
- (3) IGF1 産生および体格の変化に関わる組織の決定。
- (4) 関与する組織での IGF1 産生に繋がる EphA4/GHR 複合体の下流シグナルの解析。
- (5) 内軟骨性骨化に対する EphA4 の作用、の 4 点である。

3. 研究の方法

- (1) EphA4 欠損マウスの成長・食餌摂取量を詳細に調べた。
- (2) EphA4 欠損マウスの血中各種ホルモン濃度・各臓器の *Igf1* mRNA 発現につき詳細に調べた。血中ホルモン値の測定には ELISA を用い、*Igf1* mRNA の測定には real-time RT-PCR を実施した。
- (3) EphA4 の作用に関する研究には、GH-IGF1 axis に関わる各種シグナル分子のノックアウトマウス由来胚性線維芽細胞および HEK293 細胞を用いた。各分子の retrovirus vector による発現 (欠損遺伝子のレスキューを含む) による下流シグナルへの効果を調べた。免疫沈降およびウエスタンブロッティングにより測定した。
- (4) 臓器によりその IGF1 産生機序が GH 依存性および非依存性と異なることが知られているため、臓器毎に EphA4 を欠損させ、マウス個体での血中 IGF1、組織 *Igf1* mRNA 等の解析を実施した。
- (5) GH 製剤および IGF1 製剤の皮下注入によるマウスの成長に対する効果を調べた。

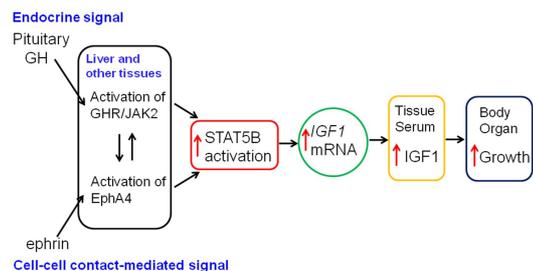
4. 研究成果

- (1) EphA4 欠損マウスは、生直後の体格には正常マウスとの間に差を認めないが、その後の成長は著しく障害された。雌雄とも成長障害は遺伝子発現量依存性であり、ホモ欠損マウスはヘテロ欠損マウスより障害が著しかった。食餌量は体重補正で同等か、EphA4 欠損マウスのほうが多かった。
- (2) 血中 GH・T4・Corticosterone 値に関しては EphA4 欠損マウスと正常マウスには差

はなかった。また、脳下垂体 Gh mRNA 産生量にも差はなかった。しかし、各臓器 *Igf1* mRNA 産生量は脳と腎臓を除いて、調べられた全ての臓器において低下していた。

- (3) 培養細胞系では、EphA4 は GHR、JAK2、および STAT5B と結合することにより IGF1 産生シグナルを増強する作用を持つことを発見した。主として JAK2 の活性化および STAT5B の直接の活性化の 2 つの経路によることを発見した。これは従来考えられていた GH-IGF1 axis のシグナル伝達定説に修正を加えるものである。
- (4) 肝・横紋筋・軟骨・骨芽細胞等の単一臓器での *Epha4* 遺伝子ノックアウトは体格に対してほとんど作用を持たなかった。しかし、肝・横紋筋・骨芽細胞の 3 者からノックアウトすることによりマウス体格は小さくなる傾向にある。この点に関してさらに詳細を検討中である。
- (5) EphA4 欠損マウスの成長には GH 製剤注入は無効であり、IGF1 は体格を正常化する作用があることが判明した。

結論の図示(下図)、これまでの GH-IGF1 axis 定説では下垂体から分泌される GH は、体内で肝臓をはじめとする各種臓器に GH 受容体を介して働いて JAK2 および STAT5B を活性化することにより *IGF1* mRNA の転写を促進することにより IGF1 産生を増加させるとされていた。私達の研究では、このシグナル伝達系に ephrin/Eph 系が加わり、Eph が JAK2 を活性化するのみではなく、STAT5B をも直接的に活性化することにより IGF1 産生をさらに促進させることが判明した。



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 3 件)

Qingfa Chen, Daiki Arai, Kazuki Kawakami, Takahiro Sawada, Xuefeng Jing, Masayasu Miyajima, Syu-ichi Hirai, Kazushige Sakaguchi, and Kenryo Furushima: EphA4 regulates the balance between self-renewal and differentiation of radial glial cells and intermediate neuronal precursors in cooperation with FGF signaling. PLoS ONE 査読有 DOI:10.1371/journal.pone.0126942,

2015
Takahiro Sawada, Daiki Arai, Xuefeng Jing, Kenryo Furushima, Qingfa Chen, Kazuki Kawakami, Hideyuki Yokote, Masayasu Miyajima, Kazushige Sakaguchi:
Trans-activation between EphA and FGFR Regulates Self-renewal and Differentiation of Mouse Embryonic Neural Stem/Progenitor Cells via Differential Activation of FRS2 α . PLoS ONE 査読有
DOI:10.1371/journal.pone.0128826, 2015
Xuefeng Jing, Masayasu Miyajima, Takahiro Sawada, Qingfa Chen, Keiji Iida, Kenryo Furushima, Daiki Arai, Kazuo Chihara, and Kazushige Sakaguchi: Crosstalk of humoral and cell-cell contact-mediated signals in postnatal body growth. Cell Reports 査読有
2: 652-665, 2012

〔学会発表〕(計 8 件)

坂口和成 GH/IGF-1 axis における新規分子機構 Pfizer Endocrinology Forum 特別講演 (招待講演) 2014 年 8 月 30 日 虎ノ門ヒルズ

坂口和成、澤田貴宏、新井大貴、京雪楓、古島謙亮、河上和紀、宮嶋正康、成長ホルモン (GH) - インスリン様成長因子 1 (IGF1) 軸 (GH-IGF1 axis) シグナル伝達系の新展開 第 56 回日本甲状腺学会学術集会 (招待講演) 2013 年 11 月 14 - 16 日 和歌山県民文化会館

Takahiro Sawada, Daiki Arai, Xuefeng Jing, Masayasu Miyajima, Qingfa Chen, Kazuki Kawakami, Kenryo Furushima, and Kazushige Sakaguchi, Molecular mechanisms of EphA4-mediated signal modulation of the growth hormone (GH)-Insulin-like growth factor 1 (IGF1) axis. ENDO2013 (American Endocrine Society's 95th Annual Meeting) 2013 年 6 月 15 日 - 6 月 18 日 San Francisco Convention Center

坂口和成 澤田貴宏、京雪楓、新井大貴、古島謙亮、飯田啓二、千原和夫、宮嶋正康、体格決定の新規分子機構 第 86 回日本内分泌学会学術総会 (招待講演) 2013 年 4 月 25 - 27 日 仙台国際センター

Kazushige Sakaguchi, Crosstalk of the cell surface receptors. Proteoglycan Forum (招待講演) 2013 年 3 月 9 日 東京医科歯科大学

Daiki Arai, Takahiro Sawada, Xuefeng Jing, Masayasu Miyajima, Qingfa Chen, Kenryo Furushima, Keiji Iida, Kazuo Chihara and Kazushige Sakaguchi, EphA4 plays an important role in postnatal body growth. 第 35 回日本分子生物学会 2012 年 12 月 11-14 日 福岡国際会議場

Qingfa Chen, Kenryo Furushima, Xuefeng Jing, Masayasu Miyajima, Takahiro Sawada, Daiki Arai and Kazushige Sakaguchi, Functional analysis of EphA4 in corticogenesis using conditional knockout mice. 第 35 回日本分子生物学会 2012 年 12 月 11-14 日 福岡国際会議場

坂口和成 体格決定に關与する新規分子機構の発見 (招待講演) 大阪臨床整形外科医学会 2012 年 11 月 17 日 大阪リッツカールトン

〔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 :
出願年月日 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕
ホームページ等

<http://www.wakayama-med.ac.jp/dept/igakubu/1606031/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂口 和成 (SAKAGUCHI, Kazushige)
和歌山県立医科大学・先端医学研究所・教授
研究者番号 : 60178548

(2) 研究分担者

澤田 貴宏 (SAWADA, Takahiro)
和歌山県立医科大学・先端医学研究所・非常勤講師
研究者番号 : 00382325

古島 謙亮 (FURUSHIMA, Kenryo)
和歌山県立医科大学・先端医学研究所・講師
研究者番号 : 50392105

京 雪楓 (JING, Xuefeng)
和歌山県立医科大学・先端医学研究所・講師
研究者番号：70316123

宮嶋 正康 (MIYAJIMA, Masayasu)
和歌山県立医科大学・共同利用施設・講師
研究者番号：80137257

新井 大貴 (ARAI, Daiki)
和歌山県立医科大学・先端医学研究所・学
内助教
研究者番号：90725574

三輪 英人 (MIWA, Hideto)
和歌山県立医科大学・医学部・准教授
研究者番号：50231626

(3)連携研究者：なし
()

研究者番号：