

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591512

研究課題名(和文) インスリン様成長因子 - の転写因子と結合蛋白の異常による成長ホルモン不応症の解明

研究課題名(英文) Growth hormone insensitivity due to disorders of insulin like growth factor system

研究代表者

神崎 晋 (Kanzaki, Susumu)

鳥取大学・医学部・教授

研究者番号：90224873

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：SGA性低身長2例に1型IGF受容体遺伝子(IGF-1R)の新規変異(p.Q1220X、p.W1219X)を見出した。変異遺伝子導入細胞は、IGF-1R蛋白の著明な発現低下を示した。ナンセンス変異の異常蛋白産生は、細胞はmRNAレベルではナンセンス変異依存性mRNA分解(NMD)、蛋白レベルでは小胞体関連分解(ERAD)により、抑制される。NMDを阻害するEmetine添加ではIGF-1RのmRNA発現に変化はなく、一方、ERADを阻害するMG132を加えたところ、変異IGF-1R蛋白の発現が増加した。従って、ERADを介したIGF-1R蛋白発現低下により成長障害をきたしたと思われた。

研究成果の概要(英文)：We identified two novel heterozygous nonsense mutations of type 1 IGF receptor (IGF-1R) gene in 9-year-old boy (p.Q1220X) and 3-year-old girl (p.W1219X) with SGA short stature. The cells transfected with these mutated IGF-1R genes showed an extremely low level of the IGF-1R protein compared to those with wild type. These mutations cause premature stop codon (PTC) in exon 21, and result in the absence of the carboxyl terminal fragment of IGF-1R. Quality of protein production is usually controlled by two mechanism; nonsense-mediated mRNA decay (NMD) in mRNA stage and endoplasmic reticulum associated degradation (ERAD) in protein production. Emetine, that blocks NMD, did not improve IGF-1R mRNA expression in transfected cells. Whereas, addition of MG132, that blocks ERAD, could rescue the reduced IGF-1R protein production. From the above results, we speculated that the mutation (p.W1219X and p.Q1220X) lead to decrease IGF-1R protein expression through ERAD, result in growth failure.

研究分野：小児内分泌

キーワード：IGF-I受容体異常症 成長ホルモン不応症 SGA性低身長 IGF-I 小胞体関連分解

1. 研究開始当初の背景

(1) 成長ホルモン(GH)の骨発育促進作用は、インスリン様成長因子[insulin-like growth factor (IGF)]-I を介して発揮される。成長ホルモン不応症は、当初、GH 受容体(GHR)の異常を中心に解析がなされてきた。しかし、GH の骨発育促進作用は、GH 受容体に加えて、細胞内情報伝達に関与し、IGF-I の転写を調節する signal transducers and activators of transcription (STAT) 5b、産生された血中IGF-I濃度を維持するIGF 結合蛋白(IGFBP)-3 や acid-labile subunit (ALS)、また、IGF-I 作用を仲介する1型IGF 受容体(IGF-IR)など多くの物質が関与している。これらの異常も GH 不応症の原因となり得る。
 (2) また、IGF-I、IGF-II あるいは1型IGF 受容体ノックアウトマウスは、胎内発育遅滞(SGA)、および 出生直後より成長障害を来す (Liu J. et al. Cell 75: 59, 1993)。従って、原因不明の SGA 児の中に1型IGF 受容体異常症が含まれる可能性がある。
 (3) 現在、SGA 性低身長をはじめ多くの低身長を来す疾患に GH 投与が行われている。しかし、GH 投与に伴う身長増加は個々の症例により異なる。これに STAT5b、ALS あるいは IGF-IR の機能異常が関与している可能性がある。

2. 研究の目的

成長ホルモン作用を仲介し、インスリン様成長因子 (IGF) -I の転写を調節する転写因子 STAT5b、血中 IGF-I 濃度の維持の役割を持つ結合蛋白 ALS および IGF-I 受容体に注目して以下を解明する。
 (1) 原因不明の低身長児、GH 不応症の新しい病因を明らかにする。
 (2) STAT5b、ALS および IGF-I 受容体遺伝子変異の機能解析とその臨床像を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 原因不明の低身長児、(特に血中 IGF-I 血が異常値を示す)を対象に STAT5b、ALS および IGF-I 遺伝子を SSCP 法と direct sequence 法で解析した。
 (2) 見出された変異 STAT5b 遺伝子、変異 ALS 遺伝子あるいは変異 IGF-IR 遺伝子を CHO 細胞に発現させ、それぞれの変異遺伝子の機能を解析した。

4. 研究成果

(1) IGF-I 受容体 (IGF-IR) 変異 (p.Q1220X) の機能解析：
 9歳男児。SGA で出生し、著明な IGF-I 高値 298.4 ng/ml (3.8 SD)を認め、SGA 性低身長症と診断され、GH 治療を受けたが治療効果は不良であった。遺伝子検索で、ナンセンス変異 (p.Q1220X) をヘテロで認めた。この変異 IGF-IR 遺伝子導入細胞は、変異 IGF-IR 蛋白の著明な発現低下を示した (図1)。

IGF1R α subunit / β-actin

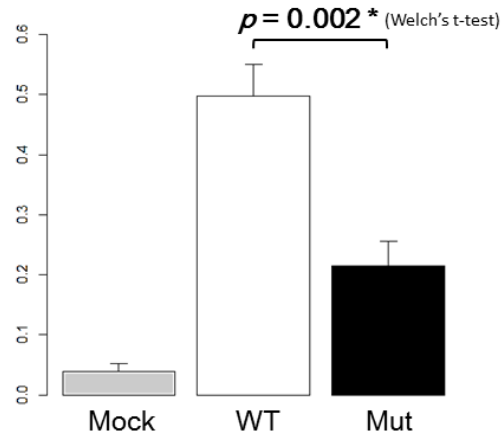


図1. 変異 IGF-IR 蛋白の発現

ナンセンス変異で異常蛋白が産生される場合、細胞は mRNA レベルではナンセンス変異依存性 mRNA 分解 (NMD) pathway によって、蛋白レベルでは小胞体関連分解 (ERAD) pathway により、不完全 (変異) 蛋白の産生を抑制する (図2)。

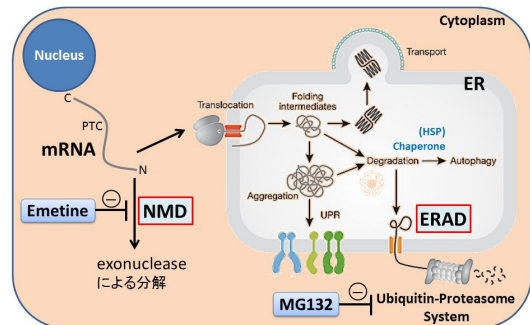


図2. mRNA (NMD)や蛋白質(ERAD)の品質管理機構

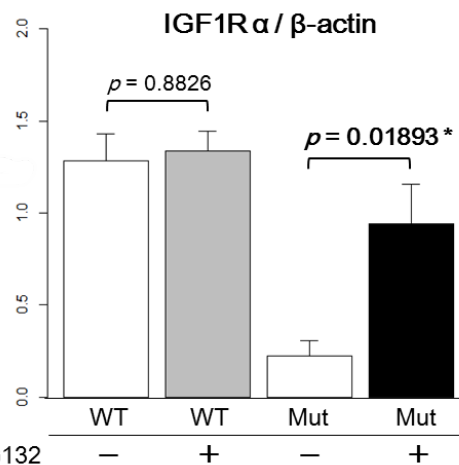


図3. MG132 による変異 IGF-IR 蛋白量の改善

変異 IGF-1R 遺伝子 (p.Q1220X) を導入した細胞を用いて、NMD を阻害する Emetine 添加したが、添加による変異 IGF-1R の mRNA レベルに変化はなく、一方、ERAD を阻害する MG132 を加えたところ、変異 IGF-1R 蛋白の発現が増加した (図 3)。従って、変異により ERAD の機序で、変異 IGF-1R 蛋白の発現低下を来した。

(2) IGF-1 受容体 (IGF-1R) 変異 (p.Q1219X) の機能解析:

3 歳女児。SGA で出生し、SGA 性低身長症と診断された。IGF-1R 遺伝子解析でナンセンス変異 p.Q1219X をヘテロに見出した。変異 IGF-1R (p.Q1219X) 遺伝子導入細胞では、変異 IGF-1R 蛋白の発現低下が認められた。p.Q1219X 患者末梢血単核球の IGF-1R 遺伝子の mRNA の発現量は健常対象と差は無く、p.Q1250X 変異では優勢阻害効果を介した蛋白量の低下も認めなかった。本変異は前の症例でみられた変異 p.Q1220X の隣であり、ERAD を介した IGF-1R 発現低下に起因すると考えられた。

(3) Interleukin (IL)-6 は IGF-1 産生を抑制する、Castleman 病の解析:

14 歳の男児が低身長 (-4.5 SD)、間歇熱で受診し、下腹部に 6x5x4cm を触知した。血液検査で IL-6 (97.3 pg/mL、基準値:<4.0) と CRP (14.3 mg/dL) の高値と、IGF-1 (28 ng/mL、基準値:<180) の低値を認めた。尿中 GH は 12.4 pg/mg Cre (基準値: 6.8 - 28.9) と正常であった。腹部腫瘍の摘出を行い、Castleman 病と診断した。腫瘍摘出に伴い血中 IL-6 は正常化し、血中 IGF-1 の上昇と身長増加の改善が認められた。本症例から IL-6 は IGF-1 産生を抑制し、GH 不応症の原因となることが明かとなった。

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 2 6 件)

Fujimoto M, Sonoyama YK, Hanaki K, Kanzaki S (11 番目)(他 7 名)
Heterozygous nonsense mutations near the C terminal region of IGF1R in two patients with small-for-gestational-age-related short stature.

Clin Endocrinol (Oxf). In press) doi: 10.1111/cen.12791.(査読有)

Kawashima Y, Okada S, Hanaki K, Kanzaki S (11 番目)(他 7 名)

Familial short stature is associated with a novel dominant-negative heterozygous insulin-like growth factor 1 receptor (IGF1R) mutation.

Clin Endocrinol (Oxf). 81:312-4, 2014. doi: 10.1111/cen.12317.(査読有)

Kawashima Y, Hanaki K, Kanzaki S (8 番

目)(他 5 名)

Leprechaunism (Donohue syndrome): a case bearing novel compound heterozygous mutations in the insulin receptor gene. Endocr J. 60:107-12, 2013. (査読有)

Hanada T, Okada S, Murakami J, Hanaki K, Kanzaki S (11 番目)(他 6 名)

Castleman disease in a child with short stature.

Pediatr Int. 54:720-4, 2012. doi:

10.1111/j.1442-200X.2012.03589.x. (査読有)

Kawashima Y, Hanaki K, Kanzaki S (9 番目)(他 6 名).

Novel missense mutation in the IGF-1 receptor L2 domain results in intrauterine and postnatal growth retardation.

Clin Endocrinol (Oxf). 77:246-54, 2012. doi: 10.1111/j.1365-2265.2012.04357.x.

(査読有)

[学会発表](計 9 件)

Fujimoto M, Kanzaki S (8 番目)(他 6 名)

SGA short stature bearing with a novel nonsense mutation (p.W1219X) in the IGF1R gene.

The Endocrine Society 96th Annual Meeting & Expo, 2014/06/21-24, Chicago (USA)

Fujimoto M, Kanzaki S (6 番目)(他 4 名)

A nonsense mutation at the carboxy terminal region of IGF1R (p.Q1220X) leads to reduction in IGF-1R protein level, and results in SGA short stature.

The Endocrine Society 95th Annual Meeting & Expo, 2013/06/15-18, San Francisco (USA)

Kawashima Y, Kanzaki S (6 番目)(他 4 名)

A novel mutation (p.D1105E) of IGF1R detected in a family of short stature has dominant negative effect to IGF1R, not to IR.

Sixth International Congress of the GRS and the IGF Society. 2012/10/17-20, Munich (Germany)

(USA)

Kawashima Y, Kanzaki S (6 番目)(他 4 名)

A novel mutation (p.D1105E) of IGF1R detected in a family of short stature has dominant negative effect to IGF1R, not to IR.

Sixth International Congress of the GRS and the IGF Society. 2012/10/17-20, Munich (Germany)

(USA)

Kawashima Y, Kanzaki S (6 番目)(他 4 名)

A novel mutation (p.D1105E) of IGF1R detected in a family of short stature has dominant negative effect to IGF1R, not to IR.

Sixth International Congress of the GRS and the IGF Society. 2012/10/17-20, Munich (Germany)

(USA)

Kawashima Y, Kanzaki S (6 番目)(他 4 名)

A novel mutation (p.D1105E) of IGF1R detected in a family of short stature has dominant negative effect to IGF1R, not to IR.

Sixth International Congress of the GRS and the IGF Society. 2012/10/17-20, Munich (Germany)

[図書](計 2 件)

神崎晋. 標準小児科学第 8 版、医学書院、233-240、249-254、2013

神崎晋. 今日の小児治療指針、医学書院、222-223、2012

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ等

無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

神崎 晋 (Kanzaki Susumu)
鳥取大学・医学部・教授
研究者番号：90224873

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

岡田 晋一 (Okada Shin-ichi)
鳥取大学・医学部・准教授
研究者番号：50343281

村上 潤 (Murakami Jun)
鳥取大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：90362889

花木 啓一 (Hanaki Keiichi)
鳥取大学・医学部・教授
研究者番号：20238041

園山(鞆嶋) 有紀 (Sonoyama-Kawashima
Yuki)
鳥取大学・医学部・講師
研究者番号：20403412