

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |       |   |     |         |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|---|-----|---------|
| 報告番号                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 甲 ㊦ 第 | 号 | 氏 名 | 佐 藤 武 志 |
| 主 論 文 題 名                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |       |   |     |         |
| Establishment of <i>Star</i> -edited Y1 cells as a novel <i>in vitro</i> functional assay for STAR<br>(新規 <i>in vitro</i> STAR機能解析系としての <i>Star</i> 遺伝子ゲノム編集Y1細胞の確立)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |       |   |     |         |
| ( 内 容 の 要 旨 )                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |       |   |     |         |
| <p>Steroidogenic acute regulatory protein (Star)は、コレステロールをミトコンドリア内に輸送する蛋白質で、ステロイドホルモン産生の律速段階となる。<i>STAR</i>異常症（先天性リポイド副腎過形成症）では、ミトコンドリア内に輸送されるコレステロールが減少し、副腎、性腺でのステロイドホルモン産生が低下する。その結果、重症例（古典型<i>STAR</i>異常症）では新生児期の副腎不全、46,XY個体の外陰部女性化をきたす。軽症例（非古典型<i>STAR</i>異常症）では、乳児後期以降の副腎不全、正常外性器を呈する。重症度は<i>STAR</i>残存活性に依存し、その<i>STAR</i>残存活性は遺伝子変異効果によると考えられている。これまでの<i>Star</i>/<i>STAR</i>構造-機能解析は、非ステロイドホルモン産生細胞に、<i>Star</i>、CYP11A1などステロイドホルモン産生に必須の因子を導入し、一過性に強制発現させることで行われてきた。この解析系から得られた結果の中には、ヒトの臨床症状と合致しない結果もあった。その理由は、従来の解析系が生体環境を模倣できていないためと考えられる。本研究では、ステロイドホルモン産生能を有するマウス副腎皮質腫瘍由来Y1細胞に対して、<i>Star</i>遺伝子の開始コドン直下を標的配列としたTranscription activator-like effector nucleaseを用い、<i>Star</i>遺伝子ゲノム編集Y1細胞を樹立した。</p> <p>本細胞は、両アレルにframeshiftバリエーションを有し、ウエスタンブロットで<i>Star</i>タンパク質発現を認めなかった。また、プレグネロン産生能が大きく低下していた。Y1 <i>Star</i> cDNAあるいは22(R)-ヒドロキシコレステロールを用いたプレグネロン産生量の回復実験を行い、本細胞におけるプレグネロン産生能低下が、<i>Star</i>機能低下によること、ならびに<i>Star</i>以外のステロイドホルモン産生因子が保たれていることを確認した。本細胞と<i>STAR</i>変異体の発現ベクター（古典型<i>STAR</i>異常症で報告のあるQ258*ならびにS195A、非古典型<i>STAR</i>異常症で報告のある R272C）を用い、プレグネロン産生量を指標に<i>STAR</i>変異体の機能解析を行った。Q258* ならびにR272C変異体においてそれぞれ古典型、非古典型に合致する残存活性を得た。特筆すべきは、従来の機能解析系では重症度と乖離した、高い残存活性を示していたS195Aにおいて、重症度と合致する低い残存活性を得たことである。この理由として本解析系が従来の機能解析系と異なり内因性のステロイドホルモン産生経路を用いた機能解析系であったためと推測した。</p> <p>さらに本細胞において、db-cAMP刺激により<i>STAR</i>異常症に類似した脂肪滴を細胞質内に形成すること、ならびにdb-cAMP濃度依存性にプレグネロン産生能が増加することを確認した。このことは、本細胞が<i>STAR</i>異常症の病態解明のための疾患モデルになりえることを示し、また、臨床的に推測されていた<i>Star</i>/<i>STAR</i>非依存性ステロイドホルモン産生経路の存在を支持するものである。</p> <p>本研究で、<i>Star</i>遺伝子ゲノム編集Y1細胞を樹立することにより、i) 従来の<i>in vitro</i>機能解析系で評価困難であった変異体を評価可能な新規<i>in vitro</i>機能解析系を確立した、ii) <i>STAR</i>異常症の副腎表現型に関連した病態解明のための疾患モデル細胞を得た。</p> |       |   |     |         |