

Title	MIRAGE症候群の疾患モデル細胞および動物の作成と変異遺伝子の機能解明
Sub Title	Model cell-line and model animals of MIRAGE syndrome
Author	長谷川, 奉延(Hasegawa, Tomonobu) 石井, 智弘(Ishii, Tomohiro) 鳴海, 覚志(Narumi, Satoshi) 天野, 直子(Amano, Naoko) 木下, 政人(Kinoshita, Masato)
Publisher	
Publication year	2018
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2017. )
JaLC DOI	
Abstract	<p>第1に世界初のMIRAGE症候群モデル細胞を樹立し、野生型SAMMD9遺伝子は細胞増殖を抑制すること、および変異型SAMMD9遺伝子は野生型SAMMD9遺伝子の作用を強く増強する"機能獲得型変異"であることを示した(Nat Genet 2016)。第2に野生型ヒトSAMMD9遺伝子を有する遺伝子改変マウス、すなわちROSA26遺伝子プロモーターの制御下でloxP-終止コドン-loxPの3'側にRFP-野生型SAMMD9をホモ接合性に有するマウスの作成に成功した。第3に野生型ヒトSAMMD9遺伝子を有する遺伝子改変メダカ、および変異SAMMD9遺伝子を有する遺伝子改変メダカの作成を試みている。</p> <p>We first defined MIRAGE ( myelodysplasia, infection, restriction of growth, adrenal hypoplasia, genital phenotypes, and enteropathy) syndrome, which is caused by germline de novo heterozygous SAMMD9 mutations. We tested the effect of each SAMMD9 protein (wild type or mutant) on the growth of HEK293 cells with inducible expression of these proteins. Expression of the SAMMD9 wild-type protein resulted in mild growth restriction, whereas expression of each mutant SAMMD9 caused profound growth inhibition. These findings imply that the identified SAMMD9 mutations in MIRAGE syndrome activate the intrinsic growth-restricting function of SAMMD9 (Nat Genet, 2016). We next generated transgenic mice having Lox P-stop codon-lox P followed by wild-type human SAMMD9 gene, which is theoretically driven by ROSA26 gene promoter. These mice, either male or female, are fertile. We are currently generating transgenic medaka having either wild-type or mutant human SAMMD9.</p>
Notes	研究種目：基盤研究(C)(一般) 研究期間：2015～2017 課題番号：15K09599 研究分野：小児内分泌学
Genre	Research Paper
URL	<a href="https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_15K09599seika">https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_15K09599seika</a>

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09599

研究課題名(和文) MIRAGE症候群の疾患モデル細胞および動物の作成と変異遺伝子の機能解明

研究課題名(英文) Model cell-line and model animals of MIRAGE syndrome

研究代表者

長谷川 奉延 (Hasegawa, Tomonobu)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・教授

研究者番号：20189533

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：第1に世界初のMIRAGE症候群モデル細胞を樹立し、野生型SAM9遺伝子は細胞増殖を抑制すること、および変異型SAM9遺伝子は野生型SAM9遺伝子の作用を強く増強する“機能獲得型変異”であることを示した(Nat Genet 2016)。第2に野生型ヒトSAM9遺伝子を有する遺伝子改変マウス、すなわちROSA26遺伝子プロモーターの制御下でloxP-終止コドン-loxPの3'側にRFP-野生型SAM9をホモ接合性に有するマウスの作成に成功した。第3に野生型ヒトSAM9遺伝子を有する遺伝子改変メダカ、および変異SAM9遺伝子を有する遺伝子改変メダカの作成を試みている。

研究成果の概要(英文)：We first defined MIRAGE (myelodysplasia, infection, restriction of growth, adrenal hypoplasia, genital phenotypes, and enteropathy) syndrome, which is caused by germline de novo heterozygous SAM9 mutations. We tested the effect of each SAM9 protein (wild type or mutant) on the growth of HEK293 cells with inducible expression of these proteins. Expression of the SAM9 wild-type protein resulted in mild growth restriction, whereas expression of each mutant SAM9 caused profound growth inhibition. These findings imply that the identified SAM9 mutations in MIRAGE syndrome activate the intrinsic growth-restricting function of SAM9 (Nat Genet, 2016). We next generated transgenic mice having Lox P-stop codon-lox P followed by wild-type human SAM9 gene, which is theoretically driven by ROSA26 gene promoter. These mice, either male or female, are fertile. We are currently generating transgenic medaka having either wild-type or mutant human SAM9.

研究分野：小児内分泌学

キーワード：MIRAGEs症候群 疾患モデル細胞 疾患モデル動物

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19(共通)

### 1. 研究開始当初の背景

研究申請当時、申請者らは成長障害を主症状とする先天性遺伝性疾患である MIRAGE 症候群（以下本症候群）の責任遺伝子として *SAMD9* 遺伝子のヘテロ接合性新規バリエーション 4 種類（R459Q など）を同定していた（当時未発表データ）。また本症候群患者 2 名に由来する皮膚繊維芽細胞の増殖がともに不良であることを確認していた。さらにそれらの皮膚繊維芽細胞に *SAMD9* 遺伝子の発現を減弱させる small interfering RNA を導入すると細胞増殖能は改善した。しかし、同定した *SAMD9* 遺伝子のヘテロ接合性新規バリエーションが真の病因か否かは未確定であった。そこで、本症候群の疾患モデル細胞およびモデル動物の作成により、とくに成長に注目して変異 *SAMD9* 遺伝子の機能を *in vitro* および *in vivo* で解析する系を確立し、同定した新規バリエーションの病原性を評価すべきと考えた。

### 2. 研究の目的

上記背景から、変異 *SAMD9* 遺伝子は細胞増殖を強く抑制することにより成長障害をきたすという仮説を立てた。そこで本研究の具体的な目的は以下の 3 点である。（1）変異 *SAMD9* 遺伝子を安定発現させた本症候群モデル細胞を作成し、その増殖能を解析する。（2）変異 *SAMD9* 遺伝子を有する本症候群モデル動物として遺伝子改変メダカを作成し、その成長を含む表現型を解析する。（3）変異 *SAMD9* 遺伝子を有する本症候群モデル動物として遺伝子改変マウスを作成し、その成長を含む表現型を解析する。

### 3. 研究の方法

（1）本症候群疾患モデル細胞の樹立およびその増殖能の解析

哺乳動物細胞のゲノムへの安定型遺伝子組み込みを利用し、ヒト胎児腎由来 HEK293 細胞に野生型遺伝子 *SAMD9* を導入した細胞（野生型 *SAMD9* 細胞）、および本症候群患者で最終的に同定した 8 つの変異型遺伝子 *SAMD9* を各々導入した細胞（疾患モデル細胞）を作成した（付記：研究開始後にあらたに 4 種類の *SAMD9* 遺伝子のヘテロ接合性新規バリエーションを同定したため、計 8 種類の疾患モデル細胞を作成した。（図 1 参照）前述の仮説によれば、増殖速度が相対的に高い *SAMD9* 遺伝子非導入細胞は変異型 *SAMD9* 遺伝子導入細胞に比して優位に増殖すると考えられる。そこで導入効率が問題とならない安定発現株を利用し、遺伝子非導入 HEK293 細胞、野生型 *SAMD9* 細胞および疾患モデル細胞を樹立し、培養した。すなわち、細胞樹立後、タイムラプス顕微鏡により、3 時間毎に 120 時間コンフルエンスを計測することにより細胞増殖能を評価した。

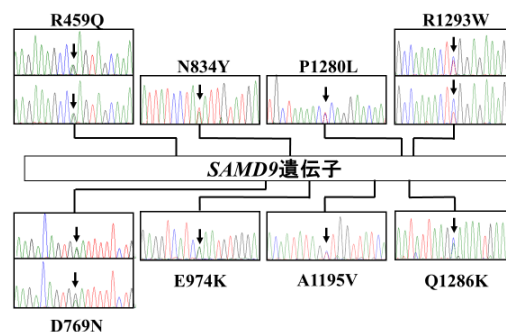


図 1 同定した *SAMD9* 遺伝子のヘテロ接合性新規バリエーション 8 種類（計 11 人の患者）のクロマトグラム

（2）本症候群モデル動物である遺伝子改変メダカの作成

以下の 3 つの方法により遺伝子改変メダカの作成を試みた。

①方法 1；Cre リコンビナーゼ誘導下に高感度緑色蛍光たんぱく質（以下 EGFP）および野生型（あるいは変異型）*SAMD9* 遺伝子を発現するベクターを作成した。このベクターを受精卵 1 細胞期にマイクロインジェクションした。

②方法 2； Cre リコンビナーゼ非誘導時には赤色蛍光たんぱく質（以下 DsRED）のみを発現し、Cre リコンビナーゼ誘導時には、DsRED は発現せず、EGFP および野生型（あるいは変異型）*SAMD9* 遺伝子を発現するベクターを作成した。このベクターを受精卵 1 細胞期にマイクロインジェクションした。

③方法 3；マウスアクチンプロモーター制御下に、loxP-終始コドン-loxP の 3' 側に EGFP および野生型 *SAMD9* 遺伝子を連結した。このベクターを受精卵の 1 細胞期にマイクロインジェクションした。

（3）本症候群モデル動物である遺伝子改変マウスの作成

マウスには *SAMD9* に相当する遺伝子が存在しないため、ROSA26 マウス ES 細胞株での相同組み替えを利用し、複数のステップを踏んで本症候群モデルマウスを作成する方法を選択した。すなわち、まず ROSA26 遺伝子プロモーターの制御下で loxP-終止コドン-loxP の 3' 側に red fluorescent protein (RFP)-野生型 *SAMD9* を有する 23, 323bp のターゲティングベクター（図 2 参照）を作成した（野生型 *SAMD9* ベクター）。さらにこのターゲティングベクターの *SAMD9* に本症候群で同定した変異のひとつ（p. R1293W）を導入した（変異型 *SAMD9* ベクター）。作成したおのおののターゲティングベクターを ROSA26 マウス ES 細胞にエレクトロポレーションした。

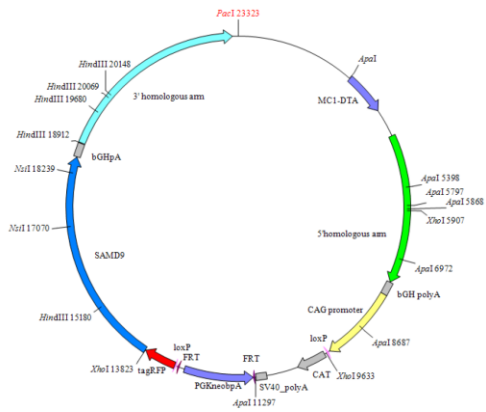


図2 ROSA26 遺伝子プロモーターの制御下で loxP-終止コドン-loxP の 3' 側に red fluorescent protein (RFP)-野生型 *SAMD9* を有するターゲティングベクター

#### 4. 研究成果

(1) 本症候群疾患モデル細胞の樹立およびその増殖能の解析

野生型 *SAMD9* 遺伝子を導入した細胞の細胞増殖は遺伝子非導入 HEK293 細胞に比しやや不良であった。すなわちほぼコンフルエントになった時間は、遺伝子非導入 HEK293 細胞で 60 時間であったのに比し、野生型 *SAMD9* 細胞で 80 時間であった。さらに 8 種類の疾患モデル細胞は野生型 *SAMD9* 細胞に比し、細胞増殖は明らかに不良であった。すなわち、8 つの疾患モデル細胞すべての 120 時間後のコンフルエンスは 20~40% であった (図 3 参照)。

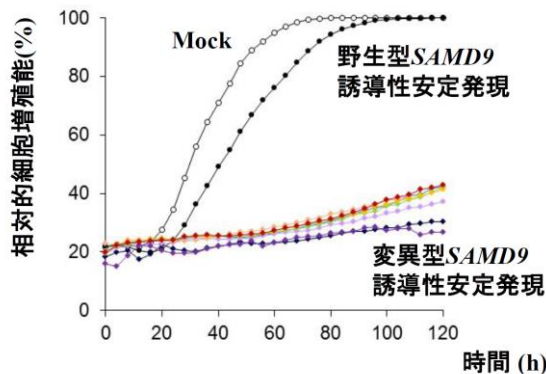


図3 野生型 *SAMD9* 遺伝子導入細胞および疾患モデル細胞の細胞増殖能

以上のように、野生型および変異 *SAMD9* 遺伝子の機能を *in vitro* で解析する系、すなわち世界初の疾患モデル細胞の樹立に成功した。さらに、野生型 *SAMD9* 遺伝子は細胞増殖を抑制する機能を有すること、変異型 *SAMD9* 遺伝子は野生型 *SAMD9* 遺伝子の細胞増殖抑制作用を強く増強する“機能獲得

型変異”であること、を世界で初めて示した。同定していた 8 種類の *SAMD9* 遺伝子のヘテロ接合性新規バリエーションはいずれも病原性を有することも証明し、これらの研究成果を発表した (雑誌論文 4; Nat Genet 2016)。

(2) 本症候群モデル動物である遺伝子改変メダカの作成

①結果 1 ; 飼育中の受精卵において Cre リコンビナーゼによる EGFP の誘導発現を確認した。しかし、EGFP および野生型 (あるいは変異型) *SAMD9* 遺伝子を持つメダカは全例発生過程で死亡し、出生にいたらなかった。

②結果 2 ; DsRED の蛍光観察により、このベクターの導入に成功した受精卵のみを杯の段階で選択することが可能であった。導入に成功した受精卵に対し、Cre リコンビナーゼによる発現誘導を行った。EGFP および野生型 (あるいは変異型) *SAMD9* 遺伝子を持つメダカは全例発生過程で死亡し、出生にいたらなかった。

③結果 3 ; 中期のう胚期において Cre リコンビナーゼ誘導下に EGFP の発現を確認した (図 4 参照)。このメダカも全例発生過程で死亡し、出生にいたらなかった。

以上の結果は、上記の方法では遺伝子改変メダカを作成することは困難であることを強く示唆する。メダカにおいては、本来存在しないヒト由来野生型 (あるいは変異型) *SAMD9* 遺伝子は強い細胞増殖抑制作用を有するため、遺伝子発現が起こってしまうと出生に至らない可能性を考えている。

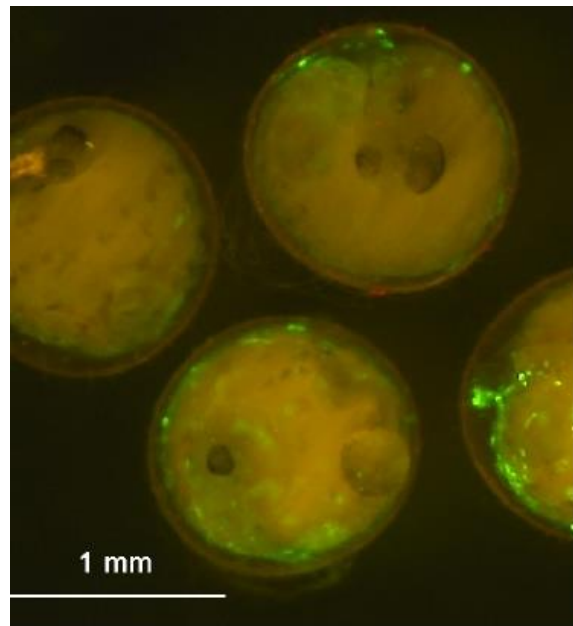


図4 中期のう胚期において Cre リコンビナーゼ誘導下に発現した EGFP

(3) 本症候群モデル動物である遺伝子改変マウスの作成

野生型 *SAMD9* ベクターをインジェクションした ES 細胞からヘテロ接合性にトランスジーンを有する ROSA26/S ノックインキメラマウスが出生した。このマウスを成獣まで飼育後、野生型マウスとの掛け合わせにより、トランスジーンをヘテロ接合性に有する ROSA26/S ノックインマウスを作成した。さらにこのマウス同士を掛け合わせ、ROSA26 遺伝子プロモーターの制御下で loxP-終止コドン-loxP の 3' 側に RFP-野生型 *SAMD9* をホモ接合性に有するマウス（以下終止コドン付きホモ野生型 *SAMD9* マウス）を作成した。現在終止コドン付きホモ野生型 *SAMD9* マウスを飼育継続中であり、生後 14 週の時点まで明らかな表現型のないことを確認している。また終止コドン付きホモ野生型 *SAMD9* マウス同士を掛け合わせ、雌雄ともに生殖能力を有することを確認した。以上のように、世界で初めてヒト野生型 *SAMD9* 遺伝子を有する遺伝子改変マウスの作成に成功した。

一方、変異型 *SAMD9* ベクターをインジェクションした ES 細胞からトランスジーンを有する ROSA26/S ノックインキメラマウスは出生しなかった。この理由は明らかではない。しかし、マウスにおいては、変異型 *SAMD9* 遺伝子が *in vivo* で極めて強い細胞増殖抑制作用をもつため、ごく少量でも遺伝子発現が起こると出生に至らない可能性を考えている。結果的に上述の方法では本症候群モデルマウスを作成できないことを示唆しており、別の方法論の必要性を認識した。

現在、終止コドン付きホモ野生型 *SAMD9* マウス同士を掛け合わせた受精卵に対し、CRISPR/CAS9 システムによるゲノム編集の技術を用いて変異 (p. R1293W) を導入し、終止コドン付き変異型 *SAMD9* ノックインマウスを作成する準備を進めている。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 6 件)

1. 天野直子、長谷川奉延。全身症状を生じる新たな遺伝子疾患「MIRAGE 症候群」感染・免疫・炎症 47;142-143, 2017 査読無
2. 鳴海覚志。MIRAGE 症候群 先天性副腎低形成症の新病型 小児科臨床 70;13-18, 2017 査読無  
[http://mol.medicalonline.jp/library/journal/download?GoodsID=aglsnrsd/2017/007001/004&name=0013-0018j&UserID=131.113.186.38&base=jamas\\_pdf](http://mol.medicalonline.jp/library/journal/download?GoodsID=aglsnrsd/2017/007001/004&name=0013-0018j&UserID=131.113.186.38&base=jamas_pdf)
3. 鳴海覚志、長谷川奉延。SAMD9/SAMD9L と 7 番染色体欠失型骨髄異形成症候群 血液内科 74;662-667, 2017 査読無
4. Narumi S, Amano N, Ishii T, (中略), Hasegawa T. SAMD9 mutations cause a novel multisystem disorder, MIRAGE

syndrome, and are associated with loss of chromosome 7. Nat Genet 48:792-797, 2016 査読有  
DOI:10.1038/ng.3569

〔学会発表〕 (計 13 件)

1. 長谷川奉延。MIRAGE 症候群—新規疾患単位の確立とその後の展開— 第 27 回臨床内分泌代謝 update 2017 年 (モーニングセミナー)
2. 長谷川奉延。小児科領域における最近のステロイドホルモン研究のトピックス 第 25 回日本ステロイドホルモン学会学術集会 2017 年 (シンポジウム)
3. 石毛崇、龍城 真衣子、羽鳥 麗子、河野 美幸、友政 剛、荒川 浩一、鳴海 覚志、Maise Aleixo。MIRAGE 症候群の 1 例 第 44 回日本小児栄養消化器肝臓学会 2017 年 (一般演題)
4. Shima H, Hayashi M, Amano N, Ishii T, Hasegawa T. (中略), Narumi S. Adrenal Hypoplasia Is Not an Invariable Feature of MIRAGE Syndrome: SAMD9 Mutation Screening in 49 Patients with 46, XY DSD and SGA. 第 51 回日本小児内分泌学会学術集会 English Session 2017 年 (一般演題)
5. 長谷川奉延。MIRAGE 症候群—原発性副腎皮質機能低下症の新規責任遺伝子同定、疾患単位確立、そして機能解析— New Insights of Molecular Genetics on Growth Disorders 2017 年 (特別講演)
6. 天野直子。MIRAGE 症候群の発見と疾患概念の確立 第 90 回日本内分泌学会学術集会 2017 年 4 月 (シンポジウム)
7. 鳴海覚志。遺伝学と生理学の融合 疾患研究から迫る分子機能の理解 MIRAGE 症候群 SAMD9 変異とモノソミー 7 のミステリー 第 94 回日本生理学会大会 2017 年 (企画シンポジウム)
8. 長谷川奉延。MIRAGE 症候群—責任遺伝子同定、新規疾患単位確立、機能解析— 第 39 回日本小児遺伝学会学術集会 2016 年 (特別講演)
9. 長谷川奉延。MIRAGE 症候群—原発性副腎皮質機能低下症の新規責任遺伝子同定、疾患単位確立、そして機能解析— Endocrinology and Metabolism Conference in Fukuoka 2016 年 (特別講演)

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

慶應義塾大学プレスリリース

[https://www.keio.ac.jp/ja/press\\_releas  
e/2016/osa3qr00001oozj-att/160517\\_01.  
pdf](https://www.keio.ac.jp/ja/press_release/2016/osa3qr00001oozj-att/160517_01.pdf)

マイナビニュース

[http://news.livedoor.com/article/detai  
l/11532492/](http://news.livedoor.com/article/detail/11532492/)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

長谷川 奉延 (HASEGAWA, Tomonobu)  
慶應義塾大学・医学部 (信濃町) ・教授  
研究者番号 : 20189533

### (2) 研究分担者

石井 智弘 (ISHII, Tomohiro)  
慶應義塾大学・医学部 (信濃町) ・准教  
授  
研究者番号 : 70265867  
鳴海 覚志 (NARUMI, Satoshi)  
国立研究開発法人国立成育医療研究セン  
ター・分子内分泌研究部・室長  
研究者番号 : 40365317  
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  
木下 政人 (KINOSHITA, Masato)  
京都大学・(連合) 能楽研究科・(研究  
員) ・助教  
研究者番号 : 60263125