

平成18年度

政策創薬総合研究
重点研究報告書（I）

目 次

課題番号		
KH11001	バイオフィotonicsを利用した細胞組織障害を視る、測る、解析する技術の開発	川西 徹 …… 1
KH11002	成長制御機構の解明と成長障害治療法の開発	緒方 勤 …… 16
KH12072	変異を克服した画期的抗ウイルス薬の開発	野口博司 …… 21
KH21004	動脈硬化症と血栓症にかかわるスフィンゴシン1-リン酸 (S1P) 受容体 (S1P3) の拮抗薬の開発	望月直樹 …… 30
KH21005	遺伝子改変動物を用いた病態関連因子の解明と創薬への応用に関する研究	田上昭人 …… 40
KH21006	病態時の侵害情報伝達に関与するプリン受容体の機能解明	井上和秀 …… 100
KH21007	蛋白立体構造異常を原因とするコンフォメーション病に対する病態解明と創薬探索システムの確立	桃井 隆 …… 126
KH21008	高密度CGHアレイを用いた新規白血病・リンパ腫治療薬の標的分子の探索	小川誠司 …… 144
KH21009	脂質代謝・機能の解明とその抗微生物薬開発への応用	花田賢太郎 …… 154
KH21010	繊維芽細胞の放出するmacrophage活性化因子とJAG1蛋白の関連と臓器繊維化の機序解明	香坂隆夫 …… 168
KH21011	血管におけるレクチンを介する生体防御システムの解明と創薬への応用	若宮伸隆 …… 181
KH21012	コネキシン遺伝子の癌抑制機能の網羅的解析；癌予防および治療への応用	矢野友啓 …… 196
KH21013	免疫グロブリン大量静注療法的作用機序解明と新しい治療標的分子の探索	阿部 淳 …… 208
KH21014	受精および初期胚発生における糖鎖の役割解析とその応用に関する研究	藤本純一郎 …… 221
KH21015	細胞内エネルギー代謝制御分子の機能発現機構の解明と新規治療薬への応用	江崎 治 …… 235
KH21018	アルツハイマー病における新規創薬ターゲット検索のための、APP細胞内ドメインの機能解析	中山耕造 …… 247
KH21019	創薬への応用を目標としたB細胞の分化・増殖・細胞死の制御機構解明に関する研究	上出利光 …… 262
KH21021	エンドトキシン認識・刺激伝達機構の解明と医療への応用に関する研究	西島正弘 …… 286
KH21022	ウイルスRNA結合ペプチドを用いたC型肝炎治療薬の開発	鈴木哲朗 …… 300
KH21023	末梢血幹細胞の分化増殖機構の解明と創薬への応用に関する研究	葛西正孝 …… 310
KH21101	DNAマイクロアレイによる多発性硬化症の迅速診断法の樹立に関する研究	佐藤準一 …… 318

KH22073	機能性精神疾患のハイスループットSNPs解析と機能解析による創薬標的分子の解明	功 刀 浩 …… 344
KH31024	超難溶性薬物の効率的製剤化に非晶質の特異性を活用する技術とその評価法の確立	吉 岡 澄 江 …… 358
KH31025	生薬及び漢方処方の科学的品質保証に関する研究	合 田 幸 広 …… 373
KH31026	食中毒細菌の新規迅速検査法の開発とその評価法に関する研究	工 藤 由 起 子 …… 390
KH31027	ハイスループット・ヒト型遺伝毒性試験系の構築	能 美 健 彦 …… 402
KH31028	ヒト肝細胞で置換された肝臓を持つマウスの医薬品開発への利用ー非拘束マウスの胆汁採取分析技術の確立ー	吉 里 勝 利 …… 417
KH31029	高度分析評価技術を応用した医薬品製剤開発および製造工程管理手法の研究	檜 山 行 雄 …… 435
KH31030	患者個別化薬物治療のための遺伝子タイピング法及びメタボロミクス的手法の開発に関する研究	斎 藤 嘉 朗 …… 449
KH31031	細胞医療に用いられる細胞組織利用医薬品の品質・安全性評価技術の開発	山 口 照 英 …… 466
KH31032	医薬品等の有効性・安全性を保証するための分析・解析技術の評価と標準化に関する研究	林 謙 …… 481
KH31034	プロテオミクス及び構造生物学的アプローチ等を用いたバイオ医薬品の特性解析・品質評価技術の開発	川 崎 ナ ナ …… 494
KH31035	生物由来製品のウイルス安全性に関する基盤研究	内 田 恵 理 子 …… 509
KH31036	臨床薬理学的視点による薬効ゲノム情報活用のための基盤研究	東 純 一 …… 525
KH32074	IT技術を用いた低コストかつ高品質な大規模臨床試験実施基盤の構築	永 井 洋 士 …… 537
KH41037	抗フリーラジカル療法を目指した基盤研究と創薬への応用	綱 脇 祥 子 …… 551
KH41038	ボツリヌス神経毒素有効成分を利用したジストニア・痙縮等の治療法の確立と筋萎縮性側索硬化症に対するdrug delivery systemの開発	梶 龍 兒 …… 566
KH42075	熱帯病・寄生虫症に対する稀少疾病治療薬の輸入・保管・治療体制の開発研究	名 和 行 文 …… 576

成長制御機構の解明と成長障害治療法の開発

所属 国立成育医療センター研究所, 小児思春期発育研究部

研究者 緒方勤

研究期間 平成16年4月～平成19年3月

研究要旨 ヒト成長遺伝子 SHOX の発現調節領域を SHOX 3'領域の 800 bp に限局しえた。また、遺伝子導入に必要な SHOX cDNA を合成しえた。胎児期の成長に密接に拘わるインプリンティング異常症を同定した。さらに、低身長同胞例において成長ホルモン遺伝子および成長ホルモン受容体遺伝子変異解析を行い、ヘテロ変異は認められなかったが、成長ホルモン欠損症において、成長ホルモンインプリンティング異常症を3例同定した。特に、成長ホルモン測定用の用いられる免疫活性を有さない遺伝子変異を特定できた。

分担研究者

国立成育医療センター遺伝診療科 奥山虎之

岡山大学医学部歯学部小児科 田中弘之

日本ケミカルリサーチ株式会社研究センター鈴木徹

株式会社エスアールエル遺伝子・染色体解析センター 引地一昌

A. 研究目的

成長障害は、一般集団の2.3%に認められる極めて頻度の高い病態で、その原因は、骨系統疾患、内分泌疾患、染色体異常症など多様である。しかし、大多数の成長障害は、原因不明の特発性低身長と診断され、有効な治療法は存在しない。本研究の目的は、ヒト成長遺伝子 SHOX 導入マウスの成長解析、胎児期後期・乳児期の成長機序の原因解明、低身長児における包括的遺伝子・染色体異常スクリーニングにより、成長制御機構を解明し、成長障害治療法を開発することである。

B. 研究方法

1. ヒト成長遺伝子 SHOX 導入マウスの成長解析：SHOX エンハンサーの同定と SHOX 遺伝子導入マウスの作製を行った。SHOX エンハンサーの同定における対象は、典型的な Leri-Weill 軟骨骨異形成症を有する3家系である。全てにおいて、染色体異常や SHOX の欠失/変異は認められていない。3'領域を主に計30以上の座位にたいする FISH (fluorescence in situ hybridization) 解析、マイクロサテライト解析、SHOX 変異解析、PCR 欠失解析を行った。その後、in silico 解析で進化上保存されている領域を検出し、ルシフェラーゼ活性解析でエンハンサー領域を同定した。SHOX 遺伝子導入マウスは、cDNA を合成し、ベクターに組み込むことで作製した。

2. 胎児期後期・乳児期の成長機序の原因解明：子宮内発育不全患者72例(52例は相対的な頭圍拡大、左右不对称、第5指屈曲短縮などで特徴づけられシルバーラッセル症候群)において、第7染色体母親性ダイソミーと H19-DMR とのメチル化解析を行った。第7染色体母親性ダイソミーは、あるいは

メチル化状態特異的プライマーを用いたPCR法によった。母親性ダイソミーの確定はマイクロサテライト解析によった。H19-DMR とのメチル化解析は、bisulphite-sequencing 法によった。また、性ステロイドと Y 特異的成長遺伝子の成長雌雄差における関与を判定するために、性線摘出ラットの成長パターンを解析した。

3. 低身長児における包括的遺伝子・染色体異常スクリーニング：対象は、低身長[-2SD 以下]同胞例が存在する52家系である。成長ホルモン遺伝子および成長ホルモン受容体遺伝子の全コード領域を直接塩基配列法で解析した。また、ゲノムワイドアプローチを LOD スコア3以上が報告されている6座位に対してマイクロサテライト解析で行った。正常身長50例を用いて、相関解析を成長ホルモン受容体のプロモーター多型に対して行った。

(倫理面への配慮) 本研究は成育医療センター倫理委員会の承認のもとに行われ、個人情報管理は三省指針を順守して行われた。また、動物実験は、“開発研究所・バイオサイエンス研究所動物実験の実施に関する規定”に従って施行された。

C. 研究成果

1. ヒト成長遺伝子 SHOX 導入マウスの成長解析：33家系において SHOX 3'領域の欠失が検出された。その共通欠失領域は約39 kb で、この領域には、進化上保存された配列が複数存在し、その中の800 bp から成る1つのみが、SHOX promoter との組み合わせで有意の活性亢進効果を有することが見いだされた。

現在5ラインの SHOX 導入が確認されたマウス系統が確立された。現在、発現量を解析中である。

2. 胎児期後期・乳児期の成長機序の原因解明：シ

ルバーラッセル症候群の患者52例中3例で第7染色体母親性ダイソミーが、16例でH19-DMRの低メチル化が見出された。臨床症状の解析から、詳細が判明した全例において胎盤形成不全が見出された。シルバーラッセル症候群ではない子宮内発育遅延患者においては、インプリンティング異常症は同定されなかった。

精巣摘出雄ラットと卵巣摘出雌ラットの口吻-尾根長には、生後47日めから有意差が認められた。同様に、精巣摘出雄ラットと卵巣摘出雌ラットの口吻-尾端長には、生後47日めから有意差が認められた。内分泌データは、両群間で同等であった。

3. 低身長児における包括的遺伝子・染色体異常スクリーニング：特発性低身長同胞例においては、成長ホルモン遺伝子のヘテロ変異は同定されていないが、3家系において成長ホルモン受容体のヘテロ変異が同定された。成長ホルモン分泌障害患者では、孤発例の1例において成長ホルモンのホモの完全欠損が、常染色体優性遺伝の1家系においてイントロンのスプライスドナーサイトのヘテロの変異が、孤発例の1例においてミスセンス変異とフレームシフト変異の複合型ヘテロ接合体が検出された。このミスセンス変異は血清成長ホルモン測定に用いられる免疫活性を喪失していることが判明した。さらに、機能解析で、ミスセンス変異が残存活性を有すること、フレームシフト変異が完全機能喪失型であることが見いだされた。

成長ホルモン分泌障害患者では、様々な変異が認められ、血中成長ホルモン濃度が生物学的活性を反映しない症例が存在することが明確となった。

成長ホルモン受容体プロモーターの rs4314405G アリル頻度は、正常者14%、低身長患者12%で同等であった。

ゲノムワイドアプローチは、D6S1007、D6S2436、D7S2439、D7S2195、D12S398、D12S1091、D13S779、D13S797 にたいして終了し、遺伝統計学的解析を開始した。

D. 考察

1. ヒト成長遺伝子 SHOX 導入マウスの成長解析：以上の成績は、SHOX 遺伝子発現調節にかかわるエンハンサーが、800 bp 領域に存在することを示唆するものである。この成績は、エンハンサーが遺伝子から 10-1,000 kb 離れた部位に存在するという報告に一致する。このエンハンサーの同定は、発現調節異常症という概念を提唱しうるものである。SHOX 遺伝子導入マウス作製は、性線抑制療法と組み合わせた新規治療法の可能性を開く。

2. 胎児期後期・乳児期の成長機序の原因解明：子宮内発育不全症患者の一部において、第7染色体全域の母親性ダイソミーが存在することを示すものである。そして、PEG1 遺伝子の DMR において過剰なメチル化が存在し、Peg1 遺伝子ノックアウトマウスが変異を雄から受け継いだときのみ重度の成長障害を生じることから、PEG1 遺伝子の発現低下が SRS に特徴的な成長障害や先天奇形発症に関与する可能性が推測される。また、胎盤低形成は、インプリンテ

ィング遺伝子が必須である胎盤発育の障害が胎児期そして生後の成長障害を招く可能性を世界で初めて示唆するデータである。

精巣摘出雄ラットと卵巣摘出雌ラットの比較は、性腺ステロイドが共に存在しないことから、Y 成長遺伝子の効果を観察モデルとなる、さらに、この両者間において、内分泌データが同等であったことは、この概念を支持する。そして、両者間において有意の体長差が認められたことは、Y 成長遺伝子が、ラットの成長にも関与することを示唆する所見である。

3. 低身長児における包括的遺伝子・染色体異常スクリーニング：今回、特発性低身長同胞例においては、成長ホルモン遺伝子は認められなかった。これは、これらの遺伝子のヘテロ頻度が低いことを示唆する。一方、成長ホルモン受容体のヘテロ変異は3家系で認められた。ヘテロ変異は一定の浸透率で低身長発症率を高めることから、これらのヘテロ変異は低身長感受性遺伝子とみなしうる。

成長ホルモン分泌障害患者では、血中成長ホルモン濃度が生物学的活性を反映しない症例が存在することが明確となったことは、見かけ上成長ホルモン低値であるにもかかわらず、生物学的には成長ホルモン分泌不全状態になく、そのために成長ホルモン反応性が不良である患者が存在することにも関与する成績であり、今後のより効果的な成長ホルモン治療のあり方を模索する契機となる。

今回、特発性低身長において機能変動が *in vitro* で知られている成長ホルモン受容体プロモーターの rs4314405 は、感受性因子とはみなされなかった。しかし、このようなアプローチは、一般的に有効であり、特発性低身長の場合、成長ホルモン効果が、受容体機能に依存することから、成長ホルモンに良好に反応する低身長と反応しない低身長を同定できる可能性がある。

ゲノムワイドアプローチは、終了していないが、未知の遺伝子を同定しうる手法である。

E. 結論

本研究の主要成果は、以下のように集約される。

1. 成長遺伝子 SHOX の発現調節領域を SHOX 3' 領域の 800 bp 領域に局限しえた。
2. SHOX 遺伝子導入マウスが作製された。
3. 成長における性ステロイドと Y 成長遺伝子の関与が明確となった。
4. 子宮内発育不全症患者の一部において、インプリンティング異常症が認められ、さらに胎盤低形成が見出された。これは、胎盤とインプリンティング以上の関係、さらに、胎盤低形成と子宮内および生後の成長障害の関連を示唆する世界で初めての所見である。
5. 特発性低身長において、主要成長遺伝子のヘテロ変異（成長ホルモン受容体遺伝子）が関与することを見出した。一方、機能変動が知られている成長ホルモン受容体の多型頻度は成長障害に関与していなかった。
6. 血中成長ホルモン濃度が生物学的活性を反映し

ない症例が存在することが明確となった。

F. 研究発表

1. Ogata T, Fukami M. Clinical features in SHOX haploinsufficiency: diagnostic and therapeutic implications. *Growth, Genetics & Hormones* 20 (2): 17–23, 2004.
2. Fukami M, Nishi Y, Hasegawa Y, Miyoshi Y, Okabe T, Haga N, Nagai T, Tanaka T, Ogata T. Statural growth in 31 Japanese patients with SHOX haploinsufficiency: support for a disadvantageous effect of gonadal estrogens. *Endocrine Journal* 51 (2): 197–200, 2004.
3. Fukami M, Okuyama T, Yamamori S, Nishimura G, Ogata T. Microdeletion in the SHOX 3' Region Associated With Skeletal Phenotypes of Langer Mesomelic Dysplasia in a 45,X/46,X,r(X) Infant and Leri-Weill Dyschondrosteosis in her 46,XX Mother. *Am J Med Genet A* 137 (1): 72–76, 2005

特許

1. エストロゲン受容体 α 遺伝子におけるハプロタイプブロックの同定および特定ハプロタイプによる男児外陰部異常症発症感受性亢進 (2004年7月9日、国立成育医療センター職務発明認定) 2004年8月30日提出 (特願: 2004-250832)
2. 尿道下裂および他のストロゲン依存性疾

4. Fukami M, Kato F, Tajima T, Yokoya S, Ogata T. Transactivation function of a ~800 bp evolutionally conserved sequence at the SHOX 3' region: implication for the downstream enhancer. *American Journal of Human Genetics* 2006;78:167-170.
5. Ogata T, Fukami M. Clinical features in SHOX haploinsufficiency: diagnostic and therapeutic implications. *Growth, Genetics & Hormones* 20 (2): 17–23, 2004.
6. Ogata T, Yoshida R. *PTPN11* mutations and genotype-phenotype correlations in Noonan and LEOPARD syndromes. *Pediatric Endocrinology Reviews* 2 (4): 669–674, 2005.
7. Ogata T. Genetics of human growth. *Clinical Pediatric Endocrinology* 15 (2): 45–53, 2006.
8. Ogata T, Fukami M. Clinical lessons from SHOX mutation research. *International Growth Monitor* 16 (1): 2–6, 2006.

患発症のリスクとエストロゲン製剤効果の評価法としてのエストロゲン受容体 α 遺伝子のSNP解析法の開発 (2006年4月7日、国立成育医療センター職務発明認定)

3. 新規性分化異常症責任遺伝子MHX (Cxor6) によるNotchリポーター遺伝子転写活性化の同定 (2006年4月7日、国立成育医療センター職務発明認定)

平成18年度

政策創薬総合研究
重点研究報告書(Ⅰ)

平成19年7月31日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号
共同ビル（小伝馬町駅前）4F
電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社