

氏名	ふくだ たかし 福田 高士		
学位の種類	博士（医学）		
報告番号	甲第 1661 号		
学位授与の日付	平成 29 年 3 月 21 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当（課程博士）		
学位論文題目	Augmented Growth Hormone Secretion and Stat3 Phosphorylation in an Aryl Hydrocarbon Receptor Interacting Protein (AIP)-Disrupted Somatotroph Cell Line (Aryl Hydrocarbon Receptor Interacting Protein (AIP)を破壊した somatotroph cell line において GH 分泌と Stat3 のリン酸化が亢進している)		
論文審査委員	(主査) 福岡大学	教授	柳瀬 敏彦
	(副査) 福岡大学	教授	小林 邦久
	福岡大学	教授	白澤 専二
	福岡大学	講師	石倉 周平

内容の要旨

【目的】

Aryl hydrocarbon receptor interacting protein (AIP) の生殖細胞変異は家族性下垂体腺腫の素因となる。AIP 変異を認める下垂体腺腫患者では AIP 変異を認めない患者と比較して発症年齢が若く、腫瘍サイズが大きく、血中 GH 濃度が高く、治療薬であるソマトスタチンアナログに対する抵抗性を認める。AIP の不活化により下垂体の腫瘍形成をもたらす分子メカニズムは不明である。今回、GH 産生細胞における内因性 AIP の役割を明らかにするためにラット下垂体腫瘍の cell line である GH3 の AIP をノックアウトし検討を行った。

【対象と方法】

ラット下垂体腫瘍 cell line である GH3 を使用した。AIP をノックアウトする方法としては CRISPR/Cas9 を使用した。CRISPR/Cas9 は特定の遺伝子配列を示す部位に挿入や欠失を生じさせることが可能である。作成された cell line (GH3-FTY) を用いて AIP の機能解析を行った。growth hormone (GH) 分泌能を培地中の GH 濃度を測定することで評価し、GH の mRNA 発現を RT-PCR を用いて検討を行った。4 週齢の BALB/c ノードマウスを control (medium のみ) 群 (n=5)、GH3 群 (n=8)、GH3-FTY 群 (n=8) の 3 群に分け皮下接種させ 8 週間経過を観察し AIP の生体内での腫瘍形成における役割の検討を行った。

【結果】

GH3 に対して CRISPR/Cas9 システムを用いた。作成された cell line (GH3-FTY) は両ア

リルの AIP にフレームシフト変異が生じており、exon4 の途中で stop codon が作成されることで短縮した AIP が生じる cell line であった。ウエスタンブロットによる AIP の発現検討では AIP のバンドは検出されなかった。GH3-FTY は GH3 と比較し GH 分泌が 43 倍に亢進し ($p=0.0024$) GH の mRNA は 36 倍に増加した ($p=0.0018$)。GH3-FTY に対してレンチウイルスを介して AIP を強制発現させることにより亢進した GH 分泌、mRNA は有意に抑制された ($p=0.0082$)。GH3-FTY は GH3 と比較し有意に細胞増殖能が亢進し ($P=0.00066$) そして AIP の強制発現により増殖した細胞増殖能は抑制された。GH 分泌及び細胞増殖能亢進のメカニズムを検討するため Stat3 のリン酸化の検討を行った。ウエスタンブロットによる検討では GH3-FTY では GH3 と比較し Stat3 のリン酸化が有意に亢進し、AIP の強制発現により亢進した Stat3 のリン酸化は有意に抑制された。

control 群, GH3 群と比較し GH3-FTY を皮下接種されたマウスはマウスの体長は有意に増加していた (87.9 ± 2.1 mm vs 89.3 ± 1.2 mm vs 95.8 ± 0.9 mm)。体重も有意に増加していた (28.8 ± 2.3 g vs 30.8 ± 3.0 g vs and 35.3 ± 5.3 g, $p=$). GH3-FTY 群の血中 GH 濃度は増加し、IGF-I 濃度も有意に増加していた。体重の増加も認め GH3-FTY 皮下接種マウスはより GH 分泌亢進による症状を反映したものとなった。

【結論】

下垂体腫瘍の cell line である GH3 の AIP をノックアウトすることにより GH 分泌能が亢進した cell line が作成された。作製された cell line を検討することにより Stat3 のリン酸化が腫瘍形成や GH 分泌亢進に関与している可能性が示唆された。

審査の結果の要旨

本論文は家族性下垂体腺腫、特に先端巨大症の病因として示唆されている Aryl hydrocarbon receptor interacting protein (AIP) 遺伝子を CRISPR/Cas9 システムを用いて、ラット下垂体腫瘍 cell line の GH3 で完全ノックアウトした細胞株を樹立し、その GH 産生能や増殖能力を検討した論文である。樹立した AIP 欠失 GH3 細胞を GH3-FTY と命名した。GH3-FTY は、original の GH3 細胞より、約 40 倍の GH 分泌能を示し、AIP 遺伝子のレンチウイルスベクターを用いた外的発現によりその過剰な GH 産生能を reverse できた。さらに GH3-FTY の GH 産生亢進機序として、Stat3 のリン酸化亢進が腫瘍形成や GH 分泌亢進に関与していることを明らかにした。control 群, GH3 群と比較し GH3-FTY を皮下接種されたマウスはマウスの体長や体重は有意に増加した。また、GH3-FTY 群の血中 GH 濃度は増加し、IGF-I 濃度も有意に増加し、インスリン抵抗性病態を呈した。すなわち、皮下接種マウスを用いて GH3-FTY の GH 分泌能の亢進を in vivo モデル系でも証明し得た。

1. 斬新さ

過去、AIP が完全破壊された下垂体細胞の報告はなく、世界で最初の AIP 欠低下下垂体ソマトトロフ系クローン化細胞として、現在、特許申請中である。

2. 重要性

AIP の不活化と GH 産生との関係は、先端巨大症患者の手術下垂体組織で、AIP の不活性化変異が同定されている事実から示唆されていたが、AIP の関与を直接的に証明した報告はなかった、今回、この直接的リンクを証明した点で、新規性が極めて高い。また、本樹立細胞を用いて、先端巨大症の GH 分泌亢進機序のより詳細な研究が可能になることや先端巨大症治療薬の開発にも使える細胞であることなどが、この論文の重要な点である。

3. 研究方法の正確性または実験方法の正確性

最新の遺伝子工学的手法を用いて、クローン化細胞の樹立、その性状解析を正確に行った。実験方法も細胞生物学的解析、病理学的解析、動物実験と多岐にわたったが、その全ての研究方法において、論理的構成と正確性で適切に実験が行われていた。

4. 表現の明確さ

実験方法、統計も含めた結果の提示、考察の全てにおいて、論理的展開で、明確な表現がなされていた。

5. 主な質疑応答

査読者から以下のような多くの質問が出たが、的確に回答した。

Q1, AHR の生体内における役割について説明を。

A1, AHR は HSP90 と AIP と結合した状態で存在しているが、機能は不勉強である。

Q2, AIP が Stat3 のリン酸化を亢進させるメカニズムは？

A2, HSP90 の下流に Stat3 があり、AIP が HSP90 を阻害しているという報告がある。

Q3, GH 分泌にくらべ、IGF-1 の上昇が顕著でないのは何故か？

A3, IGF-1 は肝臓で産生されるが、その産生が plateau に達していると考えている。

Q4, AIP ノックアウト細胞の単離において、なぜ CD4 陽性細胞なのか？

A4, transfection 効率の問題があり sorting するために CD4 を用いて sorting を行った。

Q5, GH3 の GH 分泌亢進の機序は何か？

A5, Stat3 のリン酸化が機序の一つと報告されている。GH3-FTY はそれがさらに顕著となる。

Q6, GH3-FTY で GH 分泌が亢進する機序にポジティブフィードバックがあるのではないか？

A6, 直接証明はないが、報告からポジティブフィードバックの影響もあると考えている。

- Q7, インスリン抵抗性の機序以外に、インスリン分泌自体が増えているのではないか？
- A8, β 細胞に GH 受容体が存在し、GH がインスリン分泌を増加させるという報告もある。
- Q9, AIP の強制発現で Sstr2 の発現が増加していないのはなぜか？
- A9, GH3 細胞に heterogeneous な細胞群であり、採取した clone が、AIP のノックアウトと無関係に偶然 Sstr2 の発現低下した細胞 clone であった可能性はあると考えている。
- Q10, Clone2 はどうだったか
- A10, Clone2 は PRL 分泌細胞であったが、同様に AIP を強制発現させることで PRL の分泌低下を認めた。今後の研究で解析対象としている。
- Q11, AIP 抗体の認識部位はどこか？短縮したタンパクは検出されないのか？
- A11, 抗体の認識部位は FKBP ドメインである。以前の検討で、タンパク分解系を阻害することで、ウェスタンで短縮したタンパクが検出されたことから、短縮した AIP は不安定構造で、容易に分解されてしまうと考えている。
- Q12, AIP の強制発現により、なぜオリジナルの GH3 まで GH 分泌が低下しないのか？Sorting できなかったのか
- A12, Sorting した結果として一致した結果を得ることができなかった。
- Q13, レンチウイルスベクターの導入効率について
- A13, 60-70%である。
- Q14, GH 分泌細胞だけ最初に取りってきたらいいのではないか？AIP を stable で発現させたほうがいいのではないか？
- A14, その方法も考えたが、結果として、強力な GH 分泌能を示す細胞がとれたので、ヘテロな GH3 細胞から、GH 産生細胞だけを選択することは、行わなかった。

本論文は、新規性が高く、実験結果の提示や考察も適切で、学位論文に値すると評価された。