

1. 報告者氏名 鈴木 滋
2. 所属施設名 (留学時) 旭川医科大学小児科
(現 在) 旭川厚生病院小児科
3. 留学先の国及び地名 アメリカ合衆国メリーランド州

4. 留学先の施設及び所属(部門)の名称

Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health & Human Development,
National Institutes of Health (Program in Reproductive and Adult Endocrinology)

5. 指導者名(指導教官名) Dr. Tomoshige Kino
6. 留学期間 2013年1月 - 2015年3月

7. 留学の趣旨・目的

グルココルチコイド感受性の変化に関わる分子機構の解明を目的とし、グルココルチコイド受容体と代謝に関する領域で最先端の研究を行いたいと考えた。グルココルチコイドは成長、発達において生理的、薬理的にも多様な作用を与えることから、将来的には同研究所で行う研究を基盤とし発展させることで、申請者の専門としている小児内分泌学の進歩に貢献したいと考えた。

8. 研究課題とその成果

(1) 季節的な体内時計リズム変化を伴う倦怠感、睡眠異常を来す家系の病態解明

上記の表現系を持つ三世代にわたる常染色体優性遺伝形式を呈する家系の原因遺伝子の探索を行った。対象、これら罹患者3名と家系内の健常者5名とし、ゲノムDNAを用いて、全エクソンをキャプチャーし、次世代シーケンサーを用いてエクソームシーケンスをペアエンド法にて行った。平均58coverageでヒトゲノムレファレンスシーケンスにマッピングされ、86942個のバリエーションが同定された。このうち、quality filterで抽出かつ罹患者だけに認められたものは、100個で、既知variantを除くと、4つのvariantが抽出された。このうち、1つはintergenicに位置し、二つはnonsynonymous変異であり、一つだけがミスセンス変異であった。この変異が罹患者のみ存在することをサンガーシーケンスで確認した。In silico解析では、中等度の機能障害を認めた。さらに、発端者の夫および発端者の娘の夫の全ゲノムアレイデータと上記8例のエクソームデータを用いた連鎖解析により、このミスセンス変異近傍のLODスコアは1.0425であった。また、他の3つのvariantのLODはいずれも0未満であった。今後、このミスセンス変異の機能解析を予定している。

(2) SIRT1によるグルココルチコイド受容体 (GR) 機能調節機構の解明

グルココルチコイド (GC) は、種々の代謝作用、免疫反応、ストレス応答など生命活動維持に必須であり、その作用は核内受容体であるグルココルチコイド受容体 (GR) を介して発揮され、GR はリガンド依存性に標的遺伝子群の発現を転写レベルで調節する。SIRT1 は抗老化因子と知られる NAD⁺ 依存性のヒストン脱アセチル化酵素であるが、ヒストンのみならず種々の転写因子に結合することで、それらの機能を制御する。SIRT1 もまた代謝、免疫、心血管系等の標的遺伝子発現調節を介して、広く生理機能に寄与する。今回、GR の標的遺伝子発現を SIRT1 が修飾しているとの仮説を立て、SIRT1 が GR の転写活性に与える影響を解析した。HeLa、HepG2 および HCT116 細胞に MMTV-luc reporter を一過性発現させたルシフェラーゼアッセイにて、SIRT1 は GR の転写活性を上昇させ、SIRT1 ノックダウンにより、GR の転写活性は減少した。一方、脱アセチル化酵素活性を欠く変異体も、野生型と同様に GR 転写活性を上昇させ、SIRT1 活性化薬および阻害薬は、SIRT1 の GR 転写活性上昇に対する効果に影響を与えなかった。GST pull-down アッセイにて、SIRT1 は GR の DNA 結合領域と結合することを見だし、免疫共沈降にて GR と SIRT1 は細胞核内でデキサメサゾン (DEX) 依存性に結合することを確認した。SIRT1 をノックダウンした HeLa 細胞を用いた RNA-seq において、SIRT1 は、GR により陽性に制御される遺伝子のうち 21% の発現に関与し、さらにそのうちの 74% の遺伝子の発現を促進した。このノックダウン実験にて見出された SIRT1 感受性の GR 応答遺伝子である GILZ 遺伝子の GR 応答配列 (GRE) を用いた ChIP-qPCR にて、SIRT1 は DEX 依存性に GRE にリクルートされた。以上から、SIRT1 はその脱アセチル化酵素非依存性にアダプターとして働く GR のコアクチベーターであることが示唆され、SIRT1 に関わる種々の生理機能が、この分子を介して GC 作用に影響を与えているものと考えられた。

9. まとめ (感想及びコメント)

留学先の NIH では、自分自身の研究だけでなく、毎週、他大学や研究機関から招待された著名な研究者のレクチャーがオープンに開催されており、様々な分野の最先端の話しを聞くことができ、刺激を受ける機会が多くあった。また、自分のラボの同じフロアには小児内分泌・遺伝分野のセクションもあり、NIH で行われている臨床研究などに関するカンファレンスにも参加して、知見を深めることができた。さらに、研究分野の異なる日本人と知り合いになれる機会が多かったのも有意義であった。

この度は、成長科学協会の助成を受け、留学によるこのような貴重な研究生活を遂行させていただくことができましたことに、心より感謝申し上げますとともに、今後の臨床、研究に微力を尽くせるよう今後とも精進したいと思う次第です。