

平成28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 難治性疾患実用化研究事業
(英語) The Practical Research Project for Rare/Intractable Diseases

研究開発課題名： (日本語) MIRAGE 症候群の治療法開発に向けた基礎的研究
(英語) Basic Research on MIRAGE Syndrome Toward Development of the Therapeutic Strategies

研究開発担当者 (日本語) 国立成育医療研究センター 分子内分泌研究部 室長 鳴海 覚志
所属 役職 氏名： (英語) National Research Institute for Child Health and Development
Department of Molecular Endocrinology Chief Satoshi Narumi

実施期間： 平成28年4月1日 ～ 平成31年3月31日

分担研究 (日本語) MIRAGE 症候群モデル細胞を用いた小分子化合物スクリーニング
開発課題名： (英語) Small Compound Screening using HEK293 Cell Model of MIRAGE Syndrome.

研究開発分担者 (日本語) 国立成育医療研究センター 分子内分泌研究部 室長 鳴海 覚志
所属 役職 氏名： (英語) National Research Institute for Child Health and Development
Department of Molecular Endocrinology Chief Satoshi Narumi

分担研究 (日本語) プロテオミクスによる SAMD9 たんぱく質と共役する因子の探索
開発課題名： (英語) Proteomics Screening to Identify Interacting Partners of SAMD9

研究開発分担者 (日本語) 国立成育医療研究センター 分子内分泌研究部 室長 鳴海 覚志
所属 役職 氏名： (英語) National Research Institute for Child Health and Development
Department of Molecular Endocrinology Chief Satoshi Narumi

分担研究 (日本語) MIRAGE 症候群モデル細胞を用いた網羅的ゲノム編集スクリーニング
開発課題名： (英語) Genome-scale CRISPR/Cas9 Knockout Screening using HEK293 cell model of MIRAGE Syndrome

研究開発分担者 (日本語) 東京医科大学分子病理学 講師 金蔵 孝介
所属 役職 氏名 : (英語) Tokyo Medical University Department of Molecular Pathology
Assistant Professor Kohsuke Kanekura

分担研究 (日本語) MIRAGE 症候群モデルメダカの作製・解析
開発課題名 : (英語) Generation and Characterization of Medaka Model of MIRAGE Syndrome

研究開発分担者 (日本語) 京都大学農学研究科応用生物科学専攻海洋生物生産学 助教 木下政人
所属 役職 氏名 : (英語) Kyoto University Graduate School of Agriculture, Division of Applied
Biosciences Assistant Professor Masato Kinoshita
(日本語) 杏林大学医学部衛生学公衆衛生学 教授 谷口 善仁
(英語) Kyorin University School of Medicine, Department of Preventive
Medicine and Public Health Professor Yoshihito Taniguchi

分担研究 (日本語) MIRAGE 症候群モデルマウスの作製・解析
開発課題名 : (英語) Generation and Characterization of Mouse Model of MIRAGE Syndrome

研究開発分担者 (日本語) 慶應義塾大学医学部小児科 専任講師 石井 智弘
所属 役職 氏名 : (英語) Keio University School of Medicine Department of Pediatrics
Assistant Professor Tomohiro Ishii

分担研究 (日本語) MIRAGE 症候群の全国実態調査
開発課題名 : (英語) Nationwide Survey of MIRAGE Syndrome

研究開発分担者 (日本語) 慶應義塾大学医学部小児科 教授 長谷川奉延
所属 役職 氏名 : (英語) Keio University School of Medicine Department of Pediatrics Professor
Tomonobu Hasegawa

II. 成果の概要（総括研究報告）

MIRAGE 症候群は6つの主要徴候（造血異常 Myelodysplasia、易感染性 Infection、成長障害 Restriction of growth、先天性副腎低形成症 Adrenal hypoplasia、性腺症状 Genital phenotypes、消化器症状 Enteropathy）にちなんで名づけられた先天性疾患であり、機能未知遺伝子 *SAMD9* の変異を病因とする。MIRAGE 症候群は稀少疾患であり、これまで本邦で 11 名が診断されている。MIRAGE 症候群の生命予後は極めて不良であり、半数以上の患者は 2 歳未満で亡くなる。本研究班の活動目的は、MIRAGE 症候群の治療法開発につながる基礎的知見の集積である。

研究開発代表者である鳴海覚志室長（国立成育医療研究センター研究所分子内分泌研究部）は、MIRAGE 症候群における細胞増殖障害を再現可能な疾患モデル細胞を用いた治療薬候補化合物の探索を行った。具体的には、この細胞を小型容器で培養し、既存薬約 1,500 種類を 1 つずつ添加し、細胞増殖への影響を検証した。しかし、この検討では、疾患モデル細胞の増殖異常を改善する効果を有する化合物の特定には至らなかった。

MIRAGE 症候群の病態を分子レベルで解明するには、*SAMD9* 分子の機能の解明が必須である。このため、鳴海覚志室長と金蔵孝介講師（東京医科大学医学部分子病理学）が協力し、基礎的手法による *SAMD9* の機能解析を行った。行った実験のひとつはプロテオミクススクリーニングである。上述の疾患モデル細胞の抽出液から *SAMD9* と *SAMD9* に結合しているタンパク質とをあわせて捕捉し、質量分析法を用いて同定する方法である。この実験を通じて、*SAMD9* に結合する分子の候補を複数個単離できたため、今後、検証を進める予定である。行った実験のもうひとつは、ゲノミクススクリーニングである。これは、ゲノム編集技術を応用した遺伝子機能スクリーニングと上記疾患モデル細胞を組み合わせて用いる手法であり、*SAMD9* がどのような生物学的パスウェイで働く分子かの特定につながることを期待できる。平成 28 年度、本手法による解析技術を確立し、スクリーニング実験に着手している。

MIRAGE 症候群の分子、細胞レベルの病態解明には、上述の疾患モデル細胞が有用である。一方、器官、個体レベルの病態解明には細胞レベルの解析のみでは不十分であり、患者臨床像の詳細解析と生体レベルの疾患モデル（モデル動物）の構築が必要である。患者臨床像の詳細解明のため、まずは本邦における未診断の MIRAGE 症候群患者を一人でも多く診断することが必要と考え、長谷川奉延教授（慶應義塾大学医学部小児科）を中心に、日本小児内分泌学会、日本新生児成育医学会との連携のもと、本邦における MIRAGE 症候群の診療実態調査を開始した。また、MIRAGE 症候群のモデル動物として、本研究班では、生殖サイクルが速く遺伝子改変技術が整備されている小型魚類（メダカ）のモデルを木下政人助教（京都大学農学研究科応用生物科学専攻海洋生物生産学）と谷口善仁教授（杏林大学医学部 衛生学公衆衛生学）が、また、哺乳類の遺伝子改変モデルとして確立しているマウスモデルを石井智弘専任講師（慶應義塾大学医学部小児科）がそれぞれ担当し、系統樹立へ向け実験を進めている。本年度は、遺伝子改変に用いるターゲティングベクターの構築に注力した。次年度以降、遺伝子改変動物の系統樹立および評価へと進む予定である。

MIRAGE syndrome is a recently discovered genetic disorder that is hallmarked by six key features, including Myelodysplasia, Infection, Restriction of growth, Adrenal hypoplasia, Genital phenotypes, and Enteropathy. “MIRAGE” is an acronym of the six features. MIRAGE syndrome is caused by mutations of *SAMD9*, encoding a protein of unknown function. MIRAGE syndrome is a rare/intractable disease. Only eleven patients have been found in Japan. MIRAGE syndrome is a life-threatening disease, and in fact, more than half of the patients have died before age 2 years. The aims of our investigation “Basic Research on MIRAGE Syndrome Toward Development of the Therapeutic Strategies” are to gain basic knowledge and insights into MIRAGE syndrome that will contribute to development of therapeutic approaches.

Satoshi Narumi (Chief, Department of Molecular Endocrinology, National Research Institute for Child Health and Development) have established the HEK293 cell model of MIRAGE syndrome, by which researchers can recapitulate the growth-restricting condition of the patient’s cells. Using the model, he tested about 1,500 previously characterized small compounds to find potential drugs for MIRAGE syndrome. However, no effective compounds have been identified in the initial screening.

The function of *SAMD9* is largely unknown at present. It is pivotal to characterize the function of *SAMD9* to clarify the molecular mechanisms of MIRAGE syndrome. To this end, Satoshi Narumi and Kohsuke Kanekura (Assistant Professor, Department of Molecular Pathology, Tokyo Medical University) have started two types of cell-based experiments. One is proteomics screening. In this experiment, cell extract from the above mentioned HEK293 cell model of MIRAGE syndrome was subject for capturing *SAMD9* with the antibody-conjugated resin, and molecules that bind to *SAMD9* were searched. Several candidate molecules were identified and now under verification. The other is the genomics screening. Narumi and Kanekura applied a novel gene knockout screening method using the gene editing technology, and are now trying to define the biological pathway responsible for the *SAMD9* function.

The cell-based approaches are effective to investigate the molecule- and cell-level pathogenesis of MIRAGE syndrome. On the other hand, these approaches are not suitable to clarify the organ- and body-level pathogenesis. It requires in-depth characterization of the MIRAGE syndrome patients, and animal models that recapitulate the disease. To perform in-depth analyses of patients, Tomonobu Hasegawa (Professor, Department of Pediatrics, Keio University School of Medicine) have started nationwide survey of MIRAGE syndrome along with The Japanese Society for Pediatric Endocrinology, and Japan Society for Neonatal Health and Development. The survey will help finding further patients, and will contribute to delineating the clinical manifestations of the syndrome. Furthermore, to establish animal models of MIRAGE syndrome, Masato Kinoshita (Assistant Professor, Division of Applied Biosciences, Kyoto University Graduate School of Agriculture) and Yoshihito Taniguchi (Professor, Department of Preventive Medicine and Public Health) are generating genetically engineered *Oryzias latipes* (Medaka). Tomohiro Ishii (Assistant Professor, Department of Pediatrics, Keio University School of Medicine) is also generating genetically engineered mice. In this year, construction of targeting vectors was finished. These experiments will be followed by establishing mutant animal lines in the next year.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 2件、国際誌 0件）

1. 鳴海 覚志, 長谷川 奉延. MIRAGE 症候群の発見. 成長代謝 Review. 2016, 7: 1-4.
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. 2017, 70: 13-18.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. MIRAGE 症候群の発見と今後の展望. 口頭, 鳴海 覚志, 日本内分泌学会北海道支部学術集会, 2016/11/6, 国内.
2. 成育疾患 MIRAGE 症候群の分子病態. 口頭, 鳴海 覚志, 日本分子生物学会, 2016/11/30, 国内.
3. 次世代シーケンシングによる先天性内分泌疾患の機序解明. 口頭, 鳴海 覚志, 西日本小児内分泌研究会, 2017/3/11, 国内.
4. MIRAGE syndrome: A mystery of *SAMD9* mutations and acquired monosomy 7. 口頭, 鳴海 覚志, 日本生理学会, 2017/3/29, 国内.
5. Monogenetic Causes of Primary Adrenal Insufficiencies. 口頭, Satoshi Narumi, Annual Meeting of the Endocrine Society, 2017/4/1, 国外.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

「MIRAGE 症候群の治療法開発に向けた基礎的研究」班の専用ホームページ (<http://plaza.umin.ac.jp/nge/>) を作成し、研究計画概要を一般市民向けに平易に解説するページを設けている他、研究に関連した最新情報の解説も行っている。研究代表者の連絡先を公開しており、メール問い合わせに対し随時返答している。

(4) 特許出願

該当なし