

令和元年5月29日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09960

研究課題名(和文)ヘッジホッグシグナル異常症に対するゲノム編集と先制医療

研究課題名(英文)Hedgehog signaling in human diseases

研究代表者

藤井 克則 (FUJII, KATSUNORI)

千葉大学・大学院医学研究院・講師

研究者番号：70344992

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ヘッジホッグ経路は高度に保存された細胞増殖シグナルであり、その異常はヒト奇形と発癌を来す。Gorlin症候群4名の皮膚線維芽細胞より作製したiPS細胞(GS-iPSC)と正常iPS細胞(WT-iPSC)を用い、SFEbq法により神経前駆細胞(GS-NPCおよびWT-NPC)を作製した。WT-NPCはWT-iPSCと比較して非常に低いGLI1発現レベルを示す一方、GS-NPCではiPSCと同様のGLI1発現レベルを示した。GS-NPCではSMO阻害剤により著明にGLI1発現が抑制された一方、WT-NPCではGLI1の発現自体が著明に亢進しており薬剤スクリーニング系としての有用性が判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、世界初のGorlin症候群iPS細胞を作製し、ヘッジホッグシグナルの発生段階での特性を解明したことは大きな学術的成果といえる。特にGorlin iPS細胞を分化誘導させることで、未分化な状態から神経分化に移行した時点でヘッジホッグシグナルが最も亢進し阻害剤が効果的に働くこと、また遺伝子変異がある場合には亢進が持続して癌化に至ることが解明したことは、個体が発生から組織分化する過程でヘッジホッグ経路を始めとした多様なシグナル系が選択的に活性化されることを示した点で興味深い。本研究でGorlin症候群由来のiPS細胞はヘッジホッグシグナル異常症の疾患モデルとして有用であることが示された。

研究成果の概要(英文)：The hedgehog signaling pathway is a vital factor for embryonic development and stem cell maintenance. Dysregulation of its function results in tumor initiation and progression. The aim of this research was to establish a disease model of hedgehog-related tumorigenesis with Gorlin syndrome-derived induced pluripotent stem cells (GS-iPSCs). Induced neural progenitor cells from GS-iPSCs (GS-NPCs) shows constitutive high GLI1 expression and higher sensitivity to smoothed (SMO) inhibition compared to wild-type induced neural progenitor cells (WT-NPCs). The differentiation process from iPSCs to NPCs may have similarity in gene expression to Hedgehog signal related-carcinogenesis. Therefore, GS-NPCs may be useful for screening compounds to find effective drugs to control Hedgehog signaling activity.

研究分野：小児神経学

キーワード：ヘッジホッグ Gorlin症候群 基底細胞母斑症候群 基底細胞癌 髄芽腫

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヘッジホッグシグナルは高度に保存された細胞の増殖シグナルであり、その異常はヒトの先天奇形と発癌（基底細胞癌と髄芽腫）に深く関与する。本経路はリガンドであるヘッジホッグ、受容体の PTCH1、隣接タンパクの SMO、転写因子の GLI から構成される。

Gorlin 症候群は 1960 年に報告された発達奇形（二分肋骨、大脳鎌石灰化、皮膚小陥凹）と発癌性（角化嚢胞性歯原性腫瘍、基底細胞癌）を特徴とする常染色体優性遺伝疾患である。責任遺伝子は PTCH1 であり、この変異により SMO 以下のシグナルが亢進して奇形や癌腫を来す。

我々は Gorlin 症候群の研究を継続して行い、日本人における罹患率が 23 万人に 1 人であること、様々な PTCH1 遺伝子変異が存在すること、PTCH1 遺伝子変異をもつ皮膚線維芽細胞の特性を明らかにしてきた。しかし今もって経年的に発症する基底細胞癌や髄芽腫に対する対処法が確立されておらず、その対策は急務となっている。

2. 研究の目的

ヘッジホッグシグナル異常が疾患発症にどのように関与するのか遺伝子変異が解明された現在においても不明な点が多い。本研究ではこの Gorlin 症候群の臨床的な特徴を明らかにするとともに、患者由来細胞（皮膚線維芽細胞、リンパ球）を用いて近年確立した iPS 細胞技術とゲノム編集技術を適用することで、ヘッジホッグシグナル異常症の病態解明および疾患治療への創薬スクリーニングを進めることを目的とした。

3. 研究の方法

Gorlin 症候群患者 4 名の皮膚線維芽細胞より山中 4 因子をセンダイウイルスを用いて細胞内に導入することで誘導した iPS 細胞を用いる (GS-iPSC)。正常対照 iPS 細胞 (WT-iPSC) としては、健常人肺線維芽細胞から誘導した iPS 細胞である MRC5 細胞と、健常人月経血から誘導した iPS 細胞である Edom22 細胞を用いる。GS-iPSC、WT-iPSC それぞれから神経前駆細胞を誘導・作製する (GS-NPC および WT-NPC)。神経前駆細胞の誘導方法としては、確立された誘導法である SFEBq 法を用いる。GS-iPSC、WT-iPSC、GS-NPC、WT-NPC に対してヘッジホッグシグナルの主要活性化因子である SMO の阻害剤 (Vismodegib) および活性化剤 (SAG) を添加し、ヘッジホッグシグナル経路の関連遺伝子発現を定量 RT-PCR 法を用いて評価した。

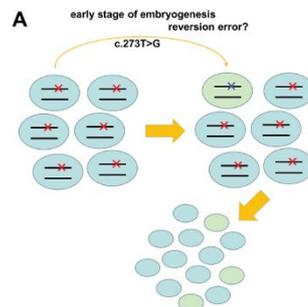
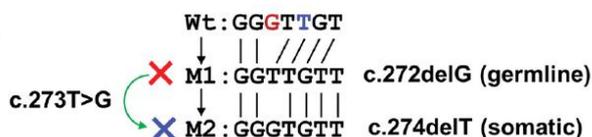
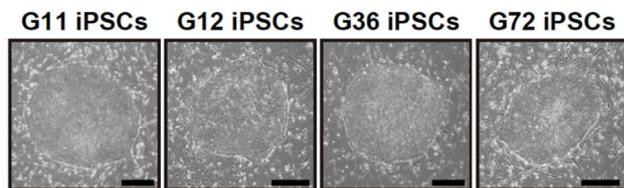
また Gorlin 症候群由来 iPS 細胞を用いて遺伝子編集により残る正常アレルを破壊した細胞を作製しそれらの細胞生物学的特性を解析した。NBCCS 患者由来 iPS 細胞 (PTCH1+/- iPSCs) に CRISPR/Cas9 発現ベクターをエレクトロポレーション法により導入してクローンを単離後、患者由来の変異アレルに加えて、残存する正常アレルにも変異を生じた iPS 細胞を得た (PTCH1-/- iPSCs)。作製した iPS 細胞について増殖能を MTT アッセイで、SHH シグナル伝達系標的遺伝子の発現量を qPCR で解析した。また、これらの iPS 細胞を免疫不全マウスの皮下に移植して得られたテラトーマについて病理組織学的な解析を行った。

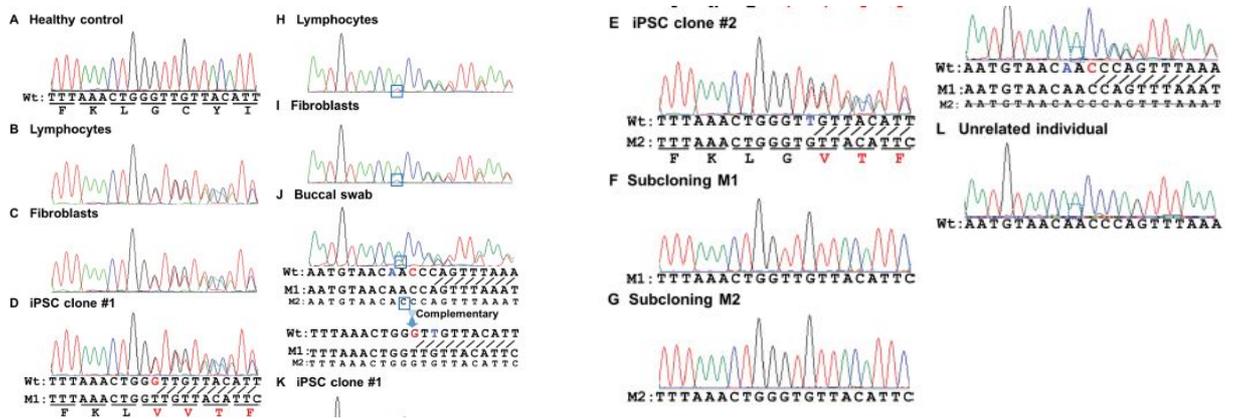
発生・細胞増殖・細胞死における重要な調整因子として microRNA が近年着目されている。そこで Gorlin 症候群患者由来皮膚線維芽細胞から全 RNA を採取して microRNA gene chip array にかけて RNA 解析を行うことで Gorlin 症候群特異的 microRNA を同定する。

Gorlin 症候群患者における PTCH1 遺伝子解析も従来に引き続き行う。リンパ球から核酸を分離し、direct sequencing 法でゲノム配列を解析する。PTCH1 遺伝子の全配列に異常がない場合は MLPA 法によりエクソン欠失の有無を解析する。同様の検査を PTCH2 についても行う。

4. 研究成果

(1) Gorlin 症候群患者から提供された皮膚線維芽細胞に山中 4 因子を細胞内導入してプロトコルに従い iPS 細胞を作製に成功し、報告した (2017 J Med Genet)。この中で iPS 細胞の培養経過で当初同定された genomic mutation が補正されること、その補正のエラーが生じうることを iPS 細胞の成長過程で確認した。患者組織ごとの変異率も解析し、iPS 細胞の増殖・分化過程で変異内容が変化しうる興味ある変化も報告した (2017 J Med Genet)。





組織ごとに異なる PTCH1 変異率を解析した (上図・右図)

Table 2 Number of reads containing mutant versus wild-type base at position of interest

Sample	M1 (germline) c.272delC, p.G91VfsX26 (Chr. 9: 95506527*)										M2 (somatic) c.274delT, p.C92VfsX25 (Chr. 9: 95506529*)										Allele (%)†	
	Total reads	Wild-type reads (G)				Mutant type reads (delG)						Total reads	Wild-type reads (T)				Mutant type reads (delT)		Wt- a-d	M1- b-d		
	Fwd.	Rev.	Total	%(a)	Fwd.	Rev.	Total	%(b)	Fwd.	Rev.	Total	%(c)	Fwd.	Rev.	Total	%(d)						
Blood	4468	1280	1431	2711	60.7	876	881	1757	39.3	4509	2026	2079	4105	91.0	201	203	404	9.0	51.7	39.3	9.0	0
Fibroblasts	7158	2209	2485	4694	65.6	1232	1232	2464	34.4	7295	3066	3134	6200	85.0	547	548	1095	15.0	50.6	34.4	15.0	0
Oral mucosa	6141	1724	1596	3320	54.1	1597	1224	2821	45.9	6350	3203	2579	5782	91.1	341	227	568	8.9	45.1	45.9	8.9	0
Hair roots	6072	1643	1918	3561	58.6	1271	1240	2511	41.4	6284	2969	2971	5940	94.5	178	166	344	5.5	53.2	41.4	5.5	0
Gastric cancer	6032	1929	2189	4118	68.3	945	969	1914	31.7	6218	2584	2665	5249	84.4	459	463	926	15.6	52.7	31.7	15.6	0

*Nucleotide number is based on Human Genome Assembly GRCh38.p8.
†Wt: Wt allele: GGGTGT, M1-Wt allele: GG-TGT, Wt-M2 allele: GGGT-GT, M1-M2 allele: GG-T-GT. * in sequence represents deletion. †also calculated as c-b or 100-(b+d).

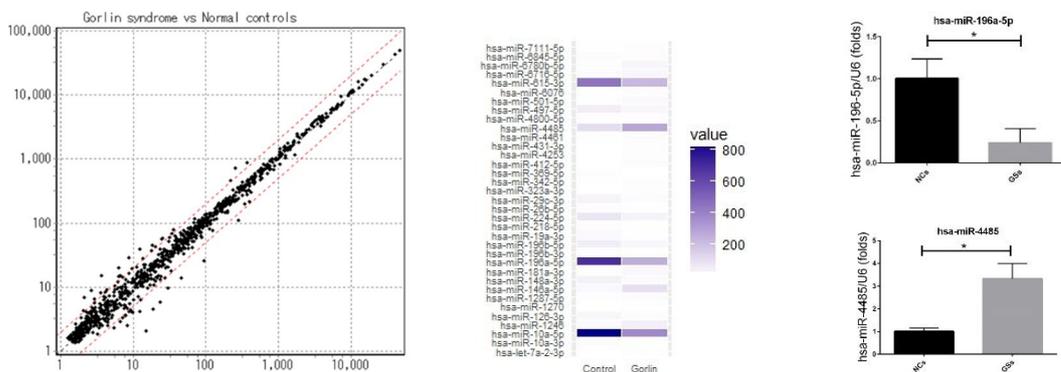
(2) GS-iPSC と WT-iPSC は非刺激状態においてヘッジホッグ標的遺伝子 (GLI1, HHIP, PTCH1) の発現レベルに差は認めなかったが、WT-NPC は、WT-iPSC と比較して非常に低い GLI1 発現遺伝子レベルを示す一方、GS-NPC では iPSC と同様の GLI1 発現レベルを示した。

(3) GS-iPSC、WT-iPSC は SMO 阻害剤加えても標的遺伝子の発現には変化を認めず、GS-NPC では SMO 阻害剤により著明に GLI1 発現が抑制された一方、WT-NPC では SMO 刺激剤を加えて GLI1 の発現が著明に上昇した。これらより Gorlin 症候群患者由来 iPSC 細胞から分化誘導した神経前駆細胞はヘッジホッグ関連腫瘍発生のモデルであり、薬剤スクリーニング系として有用であることが示唆された。

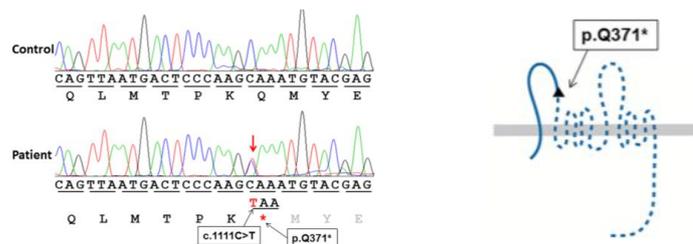
(4) 遺伝子編集により得られた PTCH1^{-/-} iPSCs では PTCH1^{+/-} iPSCs と比べて増殖速度が増加した。また、PTCH1^{-/-} iPSCs は PTCH1^{+/-} iPSCs よりも PTCH1、GLI1、HHIP1 などの SHH シグナル伝達系標的遺伝子の発現量が上昇していた。これらのことから、作製した iPSC 細胞では PTCH1 両アレルを欠損することで SHH シグナル伝達系が亢進し、GLI が恒常的に活性化していると考えられた。

(5) PTCH1^{-/-} iPSCs を免疫不全マウスに移植して得られたテラトーマは PTCH1^{+/-} iPSCs から形成したテラトーマに比して成熟した組織が減少しており、未熟型であった。さらに、PTCH1^{+/-} iPSCs から形成したテラトーマに比べて神経系細胞などの外胚葉組織を多く含み、骨などの中胚葉組織が少ないといった特徴が認められたことから、今回得られたテラトーマでは外胚葉への分化が誘導されていたことが示唆された。

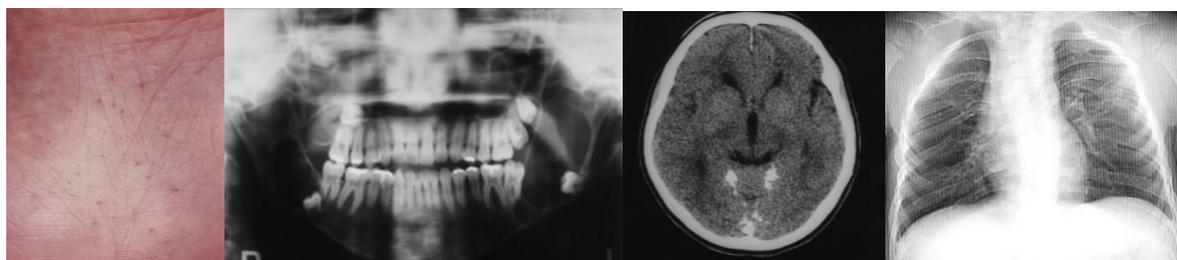
(6) Gorlin 症候群患者皮膚より樹立した線維芽細胞の microRNA profiling を行い、特異的な microRNA 発現パターンを明らかにした。HOX 遺伝子に関連する hsa-mir-196a-5p が Gorlin 症候群では対象よりも優位に低発現であることを見出した。今後は培養細胞系を中心とした機能解析を行い、Hedgehog 経路と hsa-mir-196a-5p の関連についての詳細を解析する予定である。



(7) Gorlin 症候群患者の PTCH 遺伝子変異解析を行い、新たな変異を同定した。眼間解離、手掌小陥凹、口唇口蓋裂、角化嚢胞性歯原性腫瘍を臨床上呈しており、書面による同意を得て PTCH1 遺伝子をダイレクトシーケンシング法で解析し、c.1111C>T (p.Q371X) のヘテロ接合性に不完全 PTCH1 タンパクを形成する変異を同定した。従来報告のない De novo 変異であり、顔面奇形を合併する場合にも PTCH1 遺伝子解析が有意義であることを報告した (2019 Hum Genome Variation)。



exon 8 of PTCH1 (c.1111C>T)



皮膚小陥凹

角化嚢胞性歯原性腫瘍

大脳鎌石灰化

肋骨異常

Gorlin 症候群で見られる臨床症状

現在までに 150 名を超える Gorlin 症候群患者の PTCH1 遺伝子解析を行い、90%以上の確率で PTCH1 変異を同定している。解析データからは変異が起きやすい hot spot はなく、ほぼ全コーディング領域に変異が分布していることを明らかにしている。

(8) 考察:

ヘッジホッグ経路は、非常に未分化な細胞である ES 細胞や iPS 細胞では不活性化されており、WT-iPSC においては SMO を阻害しても、活性化しても、その下流のターゲット遺伝子の発現には変化は認めなかった。ヘッジホッグターゲット遺伝子として知られる GLI1 は、iPS 細胞において高い発現レベルを認めるが、SHH-PTCH1-SMO 経路による制御ではなく、それ以外の経路により制御されている。iPS 細胞の主要な未分化維持因子である NANOG は GLI 蛋白と結合することで、GLI 自身がヘッジホッグターゲット遺伝子の活性化部位に結合することを阻害している。

GLI の iPS 細胞や ES 細胞における役割は不明だが、神経前駆細胞へ分化することで、SHH-PTCH1-SMO の経路は活性化され、GLI はその制御を強く受けることになり、WT-NPC は、WT-iPSC と比較して GLI 1 の発現が著明に低下していたことが推測される。

GS-NPC では、PTCH1 ヘテロ欠損より持続的にヘッジホッグシグナル経路が活性化された状態にあるが、そのため今回の研究では非刺激状態においても GLI1 が高い発現レベルを示した。さらに、SMO を阻害することでその下流の GLI 1 の発現が著明に抑制されたものと考えられる。

GS-NPC は WT-NPC と比較すると非刺激状態において、ターゲット遺伝子発現、特に GLI1 が持続的に高いレベルを示していた。動物実験において GLI1 を過剰発現することで、皮膚癌が発生させることが知られており、そのため、GS-NPC における持続的な GLI1 発現亢進状態はヘッジホッグ関連腫瘍発生における前癌細胞と類似した状態と考えられた。

以上から Gorlin 症候群患者由来 iPS 細胞から分化誘導した神経前駆細胞は、ヘッジホッグ関連腫瘍発生のモデルであり、薬剤スクリーニング系として有用と考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

Murata Y, Kurosaka H, Ohata Y, Aikawa T, Takahata S, **Fujii K**, **Miyashita T**, Morita C, Inubushi T, Kubota T, Sakai N, Ozono K, Kogo M, Yamashiro T, A novel *PTCH1* mutation in basal cell nevus syndrome with rare craniofacial features. Human Genome

Variation、査読有、6巻、2019、16. doi: 10.1038/s41439-019-0047-9.

Shiohama T, Fujii K, Miyashita T, Takatani T, Ikehara H, Uchikawa H, Motojima T, Uchida T, Shimojo. MicroRNAs profiling in fibroblasts derived from patients with Gorlin syndrome. Journal of Human Genetics、査読有、2019. (in press) doi: 10.1038/s10038-019-0607-3.

Ikemoto Y, Takayama Y, Fujii K, Masuda M, Kato C, Hatsuse H, Fujitani K, Nagao K, Kameyama K, Ikehara H, Toyoda M, Umezawa A, Miyashita T. Somatic mosaicism containing double mutations in *PTCH1* revealed by generation of induced pluripotent stem cells from nevoid basal cell carcinoma syndrome. Journal of Medical Genetics、査読有、54巻、2017、579-584. doi: 10.1136/jmedgenet-2016-104490.

Shiohama T, Fujii K, Miyashita T, Mizuochi H, Uchikawa H, Shimojo N. Brain morphology in children with nevoid basal cell carcinoma syndrome. American Journal of Medical Genetics A、査読有、173巻、2017、946-952. doi: 10.1002/ajmg.a.38115.

Kato C, Fujii K, Arai Y, Hatsuse H, Nagao K, Takayama Y, Kameyama K, Fujii K, Miyashita T. Nevoid basal cell carcinoma syndrome caused by splicing mutations in the *PTCH1* gene. Familial Cancer、査読有、16巻、2017、131-138. doi: 10.1007/s10689-016-9924-2.

〔学会発表〕(計 1 件)

藤井克則、宮下俊之、塩濱直、内川英紀、水落弘美、池原甫、内田智子、高谷具純、下条直樹。Gorlin 症候群における *PTCH1* 遺伝子変異と多彩な臨床症状 第 120 回日本小児科学会学術集会 2017.4.15 (東京)。

〔図書〕(計 2 件)

藤井 克則、医歯薬出版、Gorlin 症候群 発生から治療法まで：はじめに、2019、109
宮下 俊之、高山吉永、医歯薬出版、Gorlin 症候群における遺伝子診断、2019、123-126

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.m.chiba-u.jp/dept/pediatrics/research/group/nerve/>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：宮下 俊之

ローマ字氏名：MIYASHITA, toshiyuki

所属研究機関名：北里大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号 (8 桁)：60174182

研究分担者氏名：梅澤 明弘

ローマ字氏名：UMEZAWA, akihiro

所属研究機関名：国立研究開発法人 国立成育医療研究センター

部局名：再生医療センター

職名：副所長 / 再生医療センター長

研究者番号 (8 桁): 70213486

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。