

令和 2 年 5 月 9 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10061

研究課題名(和文) iPS細胞と遺伝子改変技術を用いたGorlin症候群の病態解析と治療法の開発

研究課題名(英文) Investigation of molecular pathogenesis of nevoid basal cell carcinoma syndrome using disease-specific and gene-edited iPSCs

研究代表者

宮下 俊之 (Miyashita, Toshiyuki)

北里大学・医学部・教授

研究者番号：60174182

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)：母斑基底細胞癌症候群(NBCCS)4症例より樹立したinduced pluripotent stem cell (iPSC)を免疫不全マウスに移植して発生した奇形腫には、全例で髄芽腫が含まれており、LOHや塩基の欠失といったセカンドヒットとなる変異がPTCH1遺伝子の正常アレルに生じていた。これはNBCCSに発症する髄芽腫の新たなモデルと考えられた。

またCRISPR/Cas9システムを用いてPTCH1遺伝子の両アレルともに変異をもつiPS細胞を作製し同様に移植したところ、髄芽腫を含む外胚葉組織が大部分を占め、内胚葉及び中胚葉組織が少なく、外胚葉への分化が優先的に誘導されることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、母斑基底細胞癌症候群(NBCCS)に発症する髄芽腫の新たな実験モデルがヒト細胞を用いて確立されたと考えられる。今後iPS細胞をある程度分化させた後でマウスの移植することで、基底細胞癌など、髄芽腫以外の腫瘍の発症モデルの確立も期待される。

また本モデルは将来NBCCSに発症する腫瘍に有効な薬剤のスクリーニングにも応用可能と思われる。

研究成果の概要(英文)：Induced pluripotent stem cells (iPSCs) have been established from nevoid basal cell carcinoma syndrome (NBCCS) patients (PTCH1+/- iPSCs). Teratomas that developed from these iPSCs contained medulloblastoma tissues. Interestingly, these medulloblastomas carried second hit mutations in the normal allele of the PTCH1 gene.

Furthermore, using CRISPR/Cas9 system, we established iPSCs carrying mutations in both alleles of PTCH1 (PTCH1-/- iPSCs). Teratomas that developed from PTCH1-/- iPSCs mostly consisted of ectoderm tissues including medulloblastoma. Endoderm and mesoderm tissues were rarely observed, indicating that PTCH1-/- iPSCs have a strong tendency to differentiate into ectoderm cells.

These results are expected to contribute to the understanding the molecular mechanism of tumor formation in NBCCS patients and screening candidate drugs for the treatment of these tumors.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：母斑基底細胞癌症候群 iPSC細胞 CRISPR/Cas9

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

最近次世代シーケンサー等のハイ・スループット解析機器とバイオインフォマティクスの進歩により、多くの遺伝性疾患の原因遺伝子が明らかとなった。しかしながら未だ発症の分子機序が不明で有効な治療法のないものがほとんどである。最近進行性骨化性線維異形成症のように、induced pluripotent stem cell (iPSC) を用いて発症機序の解明や治療法の開発に光明が見いだされた例が出てきた (引用文献①)。

母斑基底細胞癌症候群 (NBCCCS、Gorlin 症候群) はソニックヘッジホッグ (SHH) 受容体をコードする *PTCH1* 遺伝子の変異によって生ずる常染色体優性遺伝病である。NBCCCS は骨を主とする小奇形と基底細胞癌、髄芽腫、卵巣線維種などの腫瘍の好発を特徴とする家族性腫瘍症候群の 1 つである。

当研究室では以前より、NBCCCS の 100 家系以上で遺伝子解析を行ってきた (引用文献②)。SHH シグナル伝達の分子機構はまだ議論の多い分野であり、従って NBCCCS の発症機序にも不明な点が多い。我々は NBCCCS 患者の線維芽細胞から疾患特異的 iPSC を樹立し (*PTCH1*^{+/+}iPSCs)、生殖細胞系列変異の復帰エラーにより生じた新たな体細胞変異により、2 種類の変異をもつモザイク症例の発見等を報告してきた (引用文献③)。

2. 研究の目的

- (1) NBCCCS 特異的 iPSC である *PTCH1*^{+/+}iPSCs を免疫不全マウスに移植して生じた髄芽腫様組織の詳細な解析を行う。
- (2) CRISPR/Cas9 システムを用いて、*PTCH1*^{+/+}iPSCs に残る正常アレルを破壊して *PTCH1*^{-/-}iPSCs を作製し、その特性を解析する。

3. 研究の方法

- (1) 4 症例の NBCCCS 患者由来の線維芽細胞よりセンダイウイルスベクター法により樹立された *PTCH1*^{+/+}iPSCs を免疫不全マウスへ移植し、奇形腫を発生させた。髄芽腫様組織の免疫組織学的解析を行い、更にレーザーマイクロダイゼクション法で髄芽腫様組織を切り出し、遺伝子解析を行った。

- (2) CRISPR/Cas9 システムを用いて、*PTCH1*^{+/+}iPSCs に残る正常アレルを特異的に破壊して *PTCH1*^{-/-}iPSCs を樹立した。*PTCH1*^{-/-}iPSCs の増殖速度を MTS アッセイで、また SHH シグナル伝達亢進の有無をルシフェラーゼアッセイで解析し、*PTCH1*^{+/+}iPSCs と比較した。また(1)と同様に奇形腫を形成させ詳細な組織学的解析を行った。

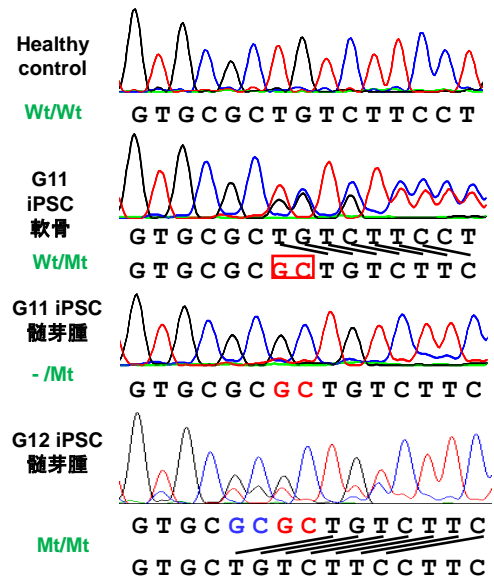


図1 G11とG12から生じた髄芽腫でそれぞれLOHと2塩基欠失が生じ、正常アレルがなくなっていた。

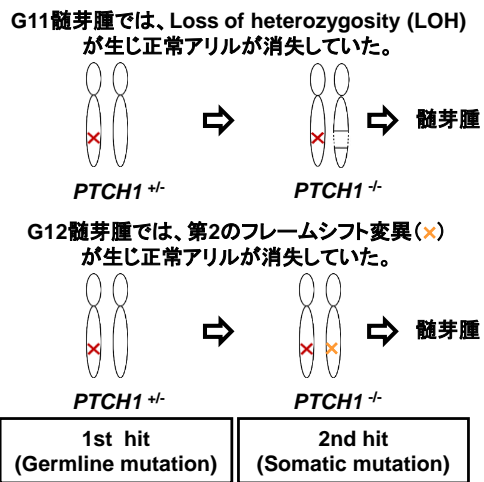


図2 G11とG12から生じた髄芽腫の発症機序

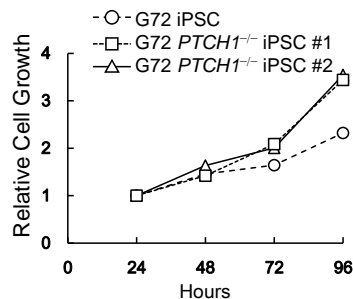


図3 *PTCH1*^{-/-}iPSCsは*PTCH1*^{+/+}iPSCsと比べて増殖速度が速かった。

4. 研究成果

(1) *PTCH1*^{+/+}iPSCs 由来の奇形腫において 4 症例全てで髄芽腫様組織が観察された。この組織は 2 施設の病理医により髄芽腫として適当であると判断された。この組織は正常人由来奇形腫では観察されなかった。免疫組織学的解析では TUJ1、synaptophysin、NESTIN、Ki67、p53 陽性であり、髄芽腫として矛盾しないものであった。髄芽腫様組織をレーザーマイクロダイゼクション法で切り出し、サンガー法で *PTCH1* の遺伝子解析を行ったところ 1 例で *PTCH1* 遺伝子の Loss of Heterozygosity (LOH) が生じており、正常アレルの欠失が見られた。もう 1 例では生殖細胞系列変異である c.3130_3131dupGC に加えて、正常アレルに 2 塩基の欠失 (c.3130_3131delGC) が認められた (図 1) (Ikemoto, Y., et al. *Aging in press*)。いずれにおいても髄芽腫組織で体細胞変異が生じて両アレルで *PTCH1* の機能喪失が生じており、これらのいわゆるセカンド・ヒットが髄芽腫発生に関与していることが示唆された (図 2)。この現象は NBCCS に発症する種々の腫瘍で報告されていることから、本研究によってヒト細胞を用いた髄芽腫発症モデルが確立されたといえる (引用文献④)。

(2) *PTCH1*^{-/-}iPSCs は複数のクローンで *PTCH1*^{+/+}iPSCs と比べて増殖速度が速く、SHH 標的遺伝子 (*PTCH1*、*Gli1*、*HHIP1*) の活性化も亢進していた (図 3,4)。*PTCH1*^{-/-} iPSC 由来の奇形腫では大部分が外胚葉成分 (未熟な神経細胞) からなり、特徴的な構造 (軟骨、消化管、神経管等) を含まなかった (表 1)。また髄芽腫でしばしば観察される、好酸性の領域を囲んで腫瘍細胞が配列した Homer Wright ロゼット等のロゼット構造が確認された (図 5)。以上の点から、*PTCH1* 遺伝子が両アレルで機能的に欠失した iPSC は外胚葉系に分化する傾向があるが、未熟な段階にとどまることがわかった。(1)、(2)の実験系は今後 NBCCS に発症する髄芽腫、ひいては孤発性髄芽腫の治療薬のスクリーニングに応用可能と考えられる。また iPSC を各種細胞に分化誘導後移植することで、髄芽腫以外の腫瘍 (例えば NBCCS で最も高頻度に発生する基底細胞癌) 発生モデルを構築できる可能性もあると思われる。

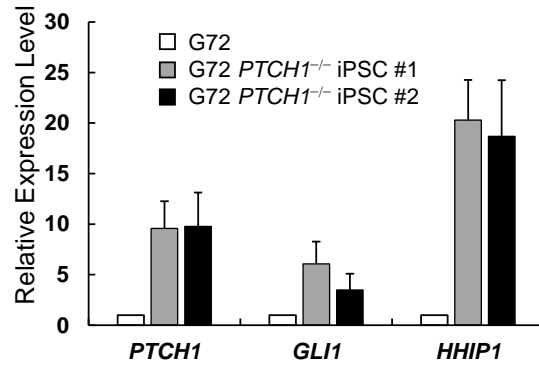


図4 *PTCH1*^{-/-}iPSCsは*PTCH1*^{+/+}iPSCsと比べてSHH標的遺伝子の発現が亢進していた。

	<i>PTCH1</i> ^{+/+}	<i>PTCH1</i> ^{+/+}	<i>PTCH1</i> ^{-/-}
neural tube	5/5	6/6	3/10
cartilage	5/5	5/6	1/10
intestine	5/5	5/6	2/10
melanocyte	4/5	4/6	0/10

表1 各種iPSCから発生した奇形腫にみられた構造の解析
分母は解析した奇形腫の数、分子は左列に示した構造がみられた奇形腫の数を表す。*PTCH1*^{-/-} iPSCからは特徴的な構造を含まない腫瘍が形成される傾向にあった。

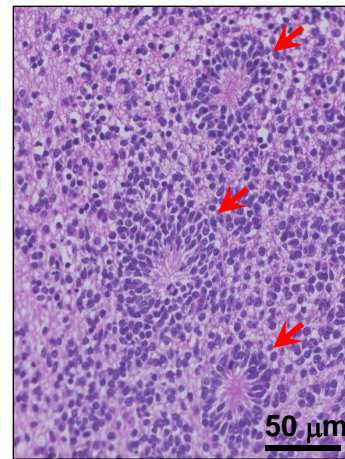


図5 *PTCH1*^{-/-}iPSCから生じた奇形腫にしばしば見られたHomer-Wright rosette様構造

<引用文献>

- ① Hino, K., Horigome, K., Nishio, M. et al. Activin-A enhances mTOR signaling to promote aberrant chondrogenesis in fibrodysplasia ossificans progressiva. *J. Clin. Invest.* 2017, 127: 3339-3352
- ② Kato, C., Fujii, K., Arai, Y. et al. Nevoid basal cell carcinoma syndrome caused by splicing mutations in the *PTCH1* gene. *Fam. Cancer* 2017, 16: 131-138
- ③ Ikemoto, Y., Takayama, Y., Fujii, K. et al. Somatic mosaicism containing double mutations in *PTCH1* revealed by generation of induced pluripotent stem cells from nevoid basal cell carcinoma syndrome. *J. Med. Genet.* 2017, 54: 579-584
- ④ Ikemoto Y., Miyashita T., Nasu M. et al. Gorlin syndrome-induced pluripotent stem cells form medulloblastoma with loss of heterozygosity in *PTCH1*. *Aging in press*

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 9件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Ikemoto Yu, Miyashita Toshiyuki, Nasu Michiyo, Hatsuse Hiromi, Kajiwara Kazuhiro, Fujii Katsunori, Motojima Toshino, Toyoda Masashi, Umezawa Akihiro	4. 巻 -
2. 論文標題 Gorlin syndrome-induced pluripotent stem cells form medulloblastoma with loss of heterozygosity in PTCH1	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Aging in press	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/858555	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yamada Hikari, Shimura Masaru, Takahashi Hidekuni, Nara Shonosuke, Morishima Yasuyuki, Go Soken, Miyashita Toshiyuki, Numabe Hironao, Kawashima Hisashi	4. 巻 -
2. 論文標題 A familial case of overgrowth syndrome caused by a 9q22.3 microdeletion in a mother and daughter	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 European Journal of Medical Genetics	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ejmg.2020.103872	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yanagisawa Hiroko, Hossain Mohammad Arif, Miyajima Takashi, Nagao Kazuaki, Miyashita Toshiyuki, Eto Yoshikatsu	4. 巻 126
2. 論文標題 Dysregulated DNA methylation of GLA gene was associated with dysfunction of autophagy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Genetics and Metabolism	6. 最初と最後の頁 460-465
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ymgme.2019.03.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 宮下 俊之	4. 巻 18
2. 論文標題 遺伝子バリエーションの表記法 第3回	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 家族性腫瘍	6. 最初と最後の頁 12-14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18976/jsft.18.1_12	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 宮下俊之、高山吉永	4. 巻 268
2. 論文標題 Gorlin症候群の遺伝子診断	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 123-126
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shiohama T., Fujii K., Miyashita T., Takatani T., Ikehara H., Uchikawa H., Motojima T., Uchida T. and Shimojo N.	4. 巻 64
2. 論文標題 MicroRNAs profiling in fibroblasts derived from patients with Gorlinsyndrome	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Human Genetics	6. 最初と最後の頁 757-765
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yanagisawa Hiroko, Ishii Tomohiro, Endo Kentaro, Kawakami Emiko, Nagao Kazuaki, Miyashita Toshiyuki, Akiyama Keiko, Watabe Kazuhiko, Komatsu Masaaki, Yamamoto Daisuke, Eto Yoshikatsu	4. 巻 7
2. 論文標題 L-leucine and SPNS1 coordinately ameliorate dysfunction of autophagy in mouse and human Niemann-Pick type C disease	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-15305-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ikemoto Yu, Takayama Yoshinaga, Fujii Katsunori, Masuda Mokuri, Kato Chise, Hatsuse Hiromi, Fujitani Kazuko, Nagao Kazuaki, Kameyama Kohzoh, Ikehara Hajime, Toyoda Masashi, Umezawa Akihiro, Miyashita Toshiyuki	4. 巻 54
2. 論文標題 Somatic mosaicism containing double mutations inPTCH1revealed by generation of induced pluripotent stem cells from nevoid basal cell carcinoma syndrome	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Medical Genetics	6. 最初と最後の頁 579 ~ 584
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/jmedgenet-2016-104490	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shiohama Tadashi、Fujii Katsunori、Miyashita Toshiyuki、Mizuochi Hiromi、Uchikawa Hideki、Shimojo Naoki	4. 巻 173
2. 論文標題 Brain morphology in children with nevoid basal cell carcinoma syndrome	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 American Journal of Medical Genetics Part A	6. 最初と最後の頁 946 ~ 952
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ajmg.a.38115	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Mitani Atsushi、Fukuda Atsushi、Miyashita Toshiyuki、Umezawa Akihiro、Akutsu Hidenori	4. 巻 25
2. 論文標題 The serine 106 residue within the N-terminal transactivation domain is crucial for Oct4 function in mice	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Zygote	6. 最初と最後の頁 197 ~ 204
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1017/S0967199417000053	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計14件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 宮下 俊之
2. 発表標題 ヘッジホッグシグナル伝達の亢進と疾患
3. 学会等名 お茶の水がん学アカデミア第161回集会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宮下 俊之
2. 発表標題 ヘッジホッグ異常症のiPS細胞とゲノム編集
3. 学会等名 第61回日本小児神経学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 志村優、山田ひかり、長谷川里奈、高橋英城、奈良昇乃助、森島靖行、呉宗憲、宮下俊之、沼部博直、河島尚志
2. 発表標題 PTCH1遺伝子の全欠失を伴うGorlin症候群(9q22.3微細欠失)の親子例
3. 学会等名 第122回日本小児科学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中村 茜里、福田 篤、阿久津 英憲、宮下 俊之
2. 発表標題 マウスのインプリンティング型X染色体不活化においてRNFI2はREX1の抑制によって父由来non-coding RNA Tsix を抑制する
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 兼友裕大、高山吉永、初瀬洋美、藤谷和子、長尾 和右、亀山 孝三、宮下 俊之
2. 発表標題 次世代シーケンサーを用いたGorlin症候群患者に発症した各種腫瘍の遺伝子解析
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 長尾 和右、加藤 千勢、初瀬 洋美、高山 吉永、亀山 孝三、梅澤 明弘、藤井克則、宮下 俊之
2. 発表標題 Generation of iPSC cells as a model for NBCCS by using CRISPR/Cas9 system
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 長尾 和右、加藤 千勢、初瀬 洋美、高山 吉永、亀山 孝三、梅澤 明弘、藤井克則、宮下 俊之
2. 発表標題 母斑基底細胞癌症候群患者由来細胞を用いた腫瘍の作製
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高山 吉永、初瀬 洋美、長尾 和右、亀山 孝三、藤井克則、宮下 俊之
2. 発表標題 母斑基底細胞がん症候群（NBCCS）の責任遺伝子に見られる遺伝子変異解析
3. 学会等名 第50回 日本臨床分子形態学会総会・学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宮下 俊之、長尾 和右、藤井克則
2. 発表標題 ゲノム編集を行った母斑基底細胞癌症候群由来iPS細胞の細胞生物学的特性の解析
3. 学会等名 第24回日本家族性腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shiohama, T. Fujii, K. Takatani, T. Miyashita, T. Ikehara, H. Fujita, M. Fukuhara, T. Shimojo, N.
2. 発表標題 MicroRNA analysis in dermal fibroblasts derived from Gorlin syndrome patients
3. 学会等名 第59回小児神経学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 宮下 俊之、高山吉永、藤井 克則、梅澤 明弘
2. 発表標題 疾患特異的iPS細胞の解析を契機に発見された母斑基底細胞癌症候群のモザイク症例
3. 学会等名 第23回日本家族性腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 高山吉永、長尾 和右、宮下 俊之、藤井 克則
2. 発表標題 母斑基底細胞癌症候群患者由来のiPS細胞に見いだされたPTCH1遺伝子の体細胞モザイク変異
3. 学会等名 第76回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 増田 木理、兼友裕大、高山吉永、初瀬洋美、藤谷和子、長尾 和右、亀山 孝三、藤井 克則、宮下 俊之
2. 発表標題 Gorlin症候群責任遺伝子PTCH1のディープシーケンス解析
3. 学会等名 第40回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 荒井佑斗、加藤千勢、長尾和右、初瀬洋美、高山吉永、亀山孝三、梅澤 明弘、藤井 克則、宮下 俊之
2. 発表標題 CRISPR/Cas9システムを用いたNBCCS疾患モデルiPS細胞の作製
3. 学会等名 第40回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

北里大学医学部分子遺伝学
<http://www.med.kitasato-u.ac.jp/~molgen/>
NBCCS mutations found in our laboratoty
<http://www.med.kitasato-u.ac.jp/~molgen/sub10.html>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	亀山 孝三 (Kameyama Kouzou)		
研究協力者	高山 吉永 (Takayama Yoshinaga)		
研究協力者	長尾 一右 (Nagao Kazuaki)		