

令和元年6月3日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16241

研究課題名(和文) microRNAによるGorlin症候群の新規経路阻害剤とバイオマーカーの開発

研究課題名(英文) Explorative study inhibitor therapies and biomarkers targeting microRNAs for Gorlin syndrome

研究代表者

塩浜 直 (SHIOHAMA, TADASHI)

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10737034

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：Gorlin症候群(GS)は、Hedgehog経路の恒常的亢進により、形態異常と腫瘍形成を来す先天奇形症候群である。新規治療標的として、microRNAに着目した。GS患者及び正常対照の皮膚線維芽細胞におけるmicroRNA発現を、マイクロアレイで網羅的に解析して候補遺伝子を同定し、GS群においてmiR-196a-5pの低下、及びその標的遺伝子のMAP3K1の発現増加を見出した。細胞株ではHedgehog経路の亢進により、miR-196a-5p低下とmap3k1上昇を認め、map3k1のKnock-downにより細胞増殖は低下した。GSのmiR-196a-5p低下と腫瘍増殖の関与が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究を通して、Gorlin症候群(GS)患者における細胞内microRNAの発現パターンを明らかにし、Hedgehog経路がmicroRNA発現量の変化を介して、細胞増殖に関与している可能性が示唆された。GSの新規治療とHedgehog経路活性のバイオマーカーの探索に有用な知見を得ることができた。本研究で得られた知見は乳癌、髄芽腫、腭癌などのHedgehog経路亢進が関与する固形腫瘍の治療にも応用できる可能性がある。また、他疾患における経路阻害療法へも応用可能な研究手法と考える。このように、本研究は他の増殖経路が関与する先天奇形症候群や固形腫瘍の経路阻害療法への研究の広がりが期待される。

研究成果の概要(英文)：Gorlin syndrome (GS) is a congenital disorder with morphologic anomalies and tumorigenicity, caused by constitutive hyperactivity of hedgehog signaling (HS). While SMO antagonists have been effectively used in the clinical treatment of HS-related cancer, these treatments have severe adverse reactions. To explore a novel therapeutic target for controlling hyper-activated HS, we profiled microRNAs in GS fibroblasts.

We analyzed dermal fibroblasts using microarray comparative genomic hybridization to screen human microRNAs in GS fibroblasts, and identified 35 down- or upregulated microRNAs. Among them, the decrease of hsa-miR-196a-5p and the increase of the target gene, MAP3K1, exhibit significant difference in GS fibroblasts. Additionally, HS induction with exogenous components decreased miR-196a-5p expression and increased map3k1 expression, and map3k1 knock-down induced decreased in cell proliferation. Decreased hsa-miR-196a-5p in GS may contribute to the cell proliferation.

研究分野：小児神経学

キーワード：Hedgehog経路 microRNA 線維芽細胞 マイクロアレイ

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

1. 研究開始当初の背景

Gorlin 症候群(GS)は、Hedgehog 経路の恒常的亢進により、形態異常と腫瘍形成を来す先天性形症候群である。Hedgehog 経路は、細胞増殖と腫瘍形成に関する主要な経路であり、リガンドである Hedgehog とその受容体である PTCH、隣接蛋白の SMO、その下流の GLI からなる。

同経路の体細胞レベルでの活性亢進は、様々ながん増殖において主要な原因となっており、欧米では基底細胞や髄芽腫に対する Hedgehog 経路阻害剤の臨床試験が行われている。その一方で、Hedgehog 経路は骨分化、創傷治癒、心筋保護など精利的な活動にも必よな経路でもあり、過剰な経路阻害は副作用につながるものが危惧される。実際に、欧米における進行性基底細胞癌に対する SMO 阻害剤の臨床研究では、高い有効性が湿れた一方で、25%の患者で死亡例も含む副作用を認めている[Selcovic et al., 2012]。

そこで、申請者は 新規機序の Hedgehog 経路阻害剤と(2) Hedgehog 経路活性を評価するバイオマーカーの候補として、転写後発現調整に重要な役割を果たす microRNA に着目した。

2. 研究の目的

本研究では Hedgehog 経路が恒常的に亢進する代表的疾患である GS 患者やそのモデルマウス (PTCH ヘテロ欠失マウス)の皮膚由来線維芽細胞及び血清を用いて、Hedgehog 経路の亢進による microRNA 発現を網羅的に解析することを目的とした。これにより GS を初めとした Hedgehog 経路関連疾患に対する、治療および病勢評価に役立つ microRNA を特定することを目指した。研究期間中には、GS 患者の線維芽細胞を用いた解析を主に行った。GS 患者血清は解析に十分な検体数が集まらなかったため、行うことが出来なかった。

(1) GS 患者由来の皮膚線維芽細胞における microRNA 発現の網羅的解析

GS 患者及び正常対照由来の線維芽細胞をプールし、それぞれマイクロアレイで網羅的解析し、両群を比較する。さらに発現量に優位差を認める microRNA を real-time RT-PCR で同定する。

(2) 候補遺伝子に対する機能解析

細胞株を用いて、(1)で同定された候補 microRNA 及びその標的 RNA の発現量が、Hedgehog 経路の亢進によりどのように変化するかを解析する。これにより、Hedgehog 遺伝子に関連する microRNA を同定する。

(3) PTCH ヘテロ欠失マウスを用いた解析

GS モデルマウスである PTCH ヘテロ欠失マウスを用いて、上記(2)で同定された microRNA のマウスのアナログについて発現量を比較し、ヒトで得られた知見が種を超えて保存されたものかを検討する。

3. 研究の方法

(1) GS 患者由来の皮膚線維芽細胞における microRNA 発現の網羅的解析

すでに *PTCH1* 変異が同定された GS 患者及び正常対照の生検皮膚から樹立された線維芽細胞をプールして使用した。まず、各群の線維芽細胞から miRNeasy Kit®を用いて microRNA を抽出し、分光光度計とバイオアナライザを用いて RNA の品質を確認し、microRNA 用逆転写酵素で cDNA を調製した。

マイクロアレイ(GeneChip® miRNA 4.0 Array)で網羅的解析を行う。解析データから Microarray data analysis tool を使用して、Heat map を作成し、高発現かつ正常対称との間で変化の大きい候補 microRNA を同定する。Target genes database(Target Scan, miRanda, RNAhybrid)を用いて標的遺伝子を特定する。

さらに個々の線維芽細胞において、特定された microRNA 及びその標的遺伝子の発現量を real-time RT-PCR で解析する。また、標的遺伝子のタンパク発現について、SDS-PAGE を用いた Immunoblotting 及び densitometric analysis により測定する

(2) 候補遺伝子に対する機能解析

Hedgehog 経路活性の機能解析に頻用されるマウス間質系細胞株である C3H10T1/2 細胞 [Spinella-Jaegle et al., 2001]を用いて、Hedgehog 経路活性と候補 microRNA 遺伝子及びその標的遺伝子の発現量の解析を行った。具体的には、PTCH のリガンドである recombinant sonic hedgehog protein もしくは SMO 刺激剤である SAG により、Hedgehog 経路を刺激し、real time RT-PCR で評価した。Hedgehog 経路の活性については、Gli1 の mRNA 発現量で評価した。

さらに、GS 患者でも発症し、hedgehog 経路の活性亢進に関連する髄芽腫における影響を評価した。髄芽腫の細胞株である TE-671[Carignani et al., 2002]において、候補標的遺伝子を shRNA を lentivirus で導入することで、Knock-down し、BrdU を用いて細胞増殖を測定し、non-silencing コントロールと比較した。

(3) PTCH ヘテロ欠失マウスを用いた解析

系統維持されている PTCH ヘテロ欠失マウス及び同胎の正常対照マウスから、生後 10 週間時

に耳介から皮膚組織を採取し線維芽細胞を樹立した。

各線維芽細胞から miRNeasy kit を用いて、microRNA を抽出し、GS 患者で同定された microRNA の発現量について、real time RT-PCR で測定した。

4. 研究成果

(1) GS 患者由来の皮膚線維芽細胞における microRNA 発現の解析

GS 患者 5 名および正常対照者 3 名の皮膚線維芽細胞から RNA を抽出し、マイクロアレイを用いて各群で human microRNA 発現を網羅的に解析し、2 倍以上の発現量の差を有する 35 遺伝子を同定した (図 1)。

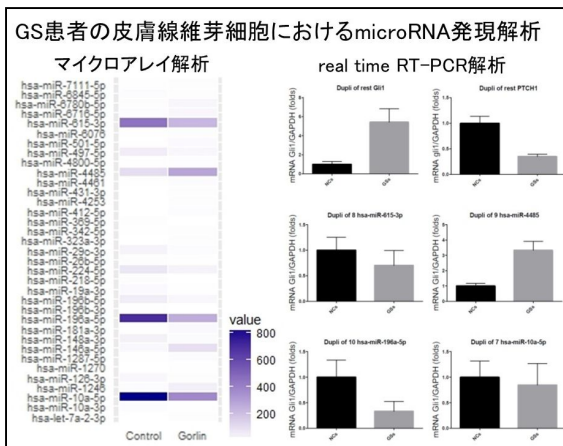


図 1 Gorlin 症候群患者及び正常対照患者由来の皮膚線維芽細胞における microRNA 発現量の Heatmap(左)、real time RT-PCR による発現量(右)

Heatmap をもとに、高発現な 4 つの microRNA (hsa-miR-10a-5p、hsa-miR-196a-5p、hsa-miR-615-3p、hsa-miR-4485) を同定した。そのうち、GS 群における hsa-miR-196a-5p の低下、hsa-miR-4485 の上昇が real time-RT PCR で確認された。

そのうち、hsa-miR-196a-5p にのみ優位な標的遺伝子が認め、3' UTR 領域の 2 か所と相補的に結合し、皮膚組織に発現があり、Hedgehog 経路と相互作用の既報がある MAP3K1 を候補遺伝子と考えたが、実際に GS 患者由来の線維芽細胞では mRNA レベル及び Protein レベルで MAP3K1 の発現が高値であった (図 2)。

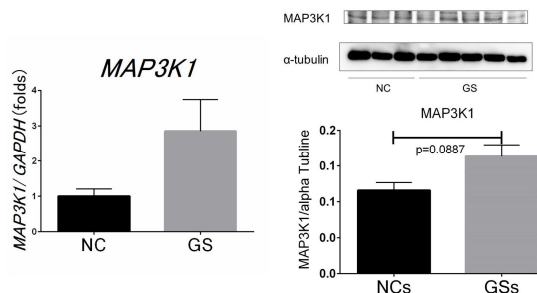


図 2 MAP3K1 の mRNA (左) 及び Protein (右) レベルでの発現量

(2) Cell Line を用いた Hedgehog 経路と miR-196a-5p 及び map3k1 の相互作用の解析

C3H10T1/2 細胞を用いて、Hedgehog 経路と mm-miR-196a-5p の相互作用を検討した。Hedgehog 経路を ligand、SMO レベルの刺激によって亢進させると、miR-196a-5p の低下と map3k1 の上昇を認めた。

さらに髄芽腫の Cell Line である TE671 細胞において map3k1 を Knockdown すると細胞増殖の低下を認め、GS における miR-196a-5p の低下が、map3k1 を介して腫瘍増殖に寄与することが示唆された。

(3) PTCH ヘテロ欠失マウスを用いた解析

PTCH ヘテロ欠失マウス及び正常対照マウスから、線維芽細胞の樹立を行った。miR196a-5p の発現量を比較したが、同遺伝子の発現量が低値のため、両群を評価することは困難であった。低血清下での培養により、線維芽細胞における Hedgehog 経路の活性は高くなること、知られており [Mizuochi et al., 2015]、今後は培養条件を調整することで、マウス線維芽細胞における hedgehog 経路活性及び miR196a-5p の評価の至適条件を見つける予定である。

[参考論文]

Carignani C, Roncarati R, Rimini R, Terstappen GC. Pharmacological and molecular characterisation of SK3 channels in the TE671 human medulloblastoma cell line. *Brain Res* 2002; 939:11-18.

Mizuochi H, Fujii K, Shiohama T, Uchikawa H, Shimojo N. Hedgehog signaling is synergistically enhanced by nutritional deprivation and ligand stimulation in human fibroblasts of Gorlin syndrome. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015;457:318-323.

Sekulic A, Migden MR, Oro AE, et al. Efficacy and safety of vismodegib in advanced basal-cell carcinoma. *N Engl J Med*. 2012;366:2171-2179.

Spinella-Jaegle S, Rawadi G, Kawai S, et al. Sonic hedgehog increases the of pluripotent mesenchymal cells into the osteoblastic lineage and abolishes adipocytic differentiation. *J Cell Sci* 2001; 114: 2085-2094.

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計2件)

1) Shiohama T, Fujii K, Miyashita T, Takatani T, Ikehara H, Uchikawa H, Motojima T, Uchida T, Shimojo N MicroRNAs profiling in fibroblasts derived from patients with Gorlin syndrome. *J Human Genet* 2019 *in press* (査読あり)

2) 塩浜直 . Gorlin 症候群の歴史 . *医学のあゆみ* 2019;268(2):111-113. (査読なし)

[学会発表](計2件)

1) Shiohama T, et al. MicroRNA analysis in dermal fibroblasts derived from Gorlin syndrome patients. 第 59 回日本小児神経学会総会 . 2017 年 6 月 15-17 日 . 大阪国際会議場(大阪).

2) Shiohama T, et al. miR-196a-5p down-regulation in fibroblasts derived from Gorlin syndrome patients. 第 62 回日本人類遺伝学会 .2017 年 11 月 15-18 日 . 神戸国際会議場(神戸).

[図書](計0件)

[産業財産権] 特になし

[その他] 特になし