

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 15 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21591313

研究課題名（和文） PTCH 遺伝子による形態形成・発癌機構の解明

研究課題名（英文） Morphogenesis and Carcinogenesis regulated by PTCH1 gene

研究代表者 藤井 克則

(Fuji Katsunori)

千葉大学・大学院医学研究院・講師

研究者番号：70344992

研究成果の概要（和文）：

我々は Gorlin 症候群患者由来細胞を用いて紫外線ないし放射線照射実験を行った。PTCH の免疫染色は内因性 PTCH が少なく、通常の PTCH ポリクローナル抗体では染色精度が低かった。内因性ヘッジホッグタンパクの検出では、ヒト皮膚線維芽細胞におけるヘッジホッグシグナル構成分子（Gli1, Gli2, Gli3）の RT-PCR を行いシグナリングの線維芽細胞内での機能を確認した。これらは紫外線・放射線照射を行うことで増幅され阻害剤 cyclopamine で阻害された。

研究成果の概要（英文）：We performed cytological and genetic examinations in our study. In cytological analysis, we tried to reveal PTCH molecule in the cells by using in situ immunostaining. However, we could not reveal them maybe due to the low affinity of PTCH antibodies, although we tried to use multiple antibodies made by some companies. In genetic analysis, we revealed many PTCH mutations in Gorlin syndrome patients. In particular, we also could identify tandem repeat in the PTCH gene, resulting in Gorlin syndrome.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：小児科学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：ゲノム、遺伝学、遺伝子、癌、放射線

1. 研究開始当初の背景

1995 年のノーベル医学生理学賞が個体発生の遺伝子制御メカニズムの解明に与えられたように種を超えて存在する共通の分子機構の解明はヒト疾患の治療・予防上、極めて重要である。中でもヘッジホッグ経路は分泌タンパクのヘッジホッグ、受容体の PTCH、隣接タンパクの SMO、下流の Gli から成り、細胞の分化増殖を制御し、胎生・成長期には形態形成に、成人期には癌形成に深く関与す

る（右図）。近年皮膚癌や髄芽腫のみならず、上部消化管癌（胃癌、食道癌、膵臓癌）の発生に本経路が重要であることが判明し、構成分子である SMO を抑制する cyclopamine に治療効果があることも報告され（Nature 2003）、本分野における国際競争は熾烈さを極めている。このような状況にあって、PTCH 遺伝子が本経路に果たす役割を新たに見出して治療につなげることを目的とした。

2. 研究の目的

本研究の目的は、発癌および形態形成に関与する PTCH 遺伝子がヒト生体内で果たす役割を解明することである。PTCH 遺伝子は高度に保存された増殖シグナルの構成分子であるが、1) 放射線照射により誘発される発癌機構を PTCH タンパク、DNA/RNA の系統的解析により明らかにし、2) 骨代謝を初めとする形態形成における PTCH 遺伝子の役割を解明することが本研究の目的である。

3. 研究の方法

- 1) 放射線照射による PTCH タンパクの細胞内局在性の変化の観察
患者由来リンパ芽球細胞ないし皮膚線維芽細胞に対して 1Gy から 10Gy までの放射線を照射し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて PTCH タンパクの細胞内局在を明らかにする。PTCH タンパクが X 線照射 (量) ならびに照射後の時間経過によりその分布が変化するかどうかを観察する。細胞質内に分布していれば、各種特異抗体を用いてその分布域が、滑面小胞体、ゴルジ体、ミトコンドリア、核等どこに一致するのか明らかにする。
- 2) PTCH タンパクと細胞周期因子 (p53, p21, p27, Rb) との共免疫沈降
患者由来リンパ芽球細胞ないし皮膚線維芽細胞から X 線照射前後で lysate を採取し、抗ヒト PTCH 抗体を用いて、共免疫沈降実験 (PTCH-IP) を行なう。結合した beads を用いて引き続き SDS-PAGE ならびに Immunoblot を行い、各種細胞周期調節因子 (p53, p21, p27, Rb) を probe として PTCH との結合を検討する。この結合は双方向免疫沈降法で確認し、結合が認められれば in vitro binding assay を行ない確認する。本実験でも X 線照射前後で細胞を 2 群にわけ、一方は共免疫沈降反応を、もう一方はフローサイトメトリーを用いた細胞周期解析を行い本症候群患者で細胞周期異常の有無を確認する。
- 3) Cyclopamine による上記の局在性変化およびタンパク相互作用への影響の有無
PTCH 下流シグナル阻害剤である cyclopamine を当初細胞培養液に加え、X 線照射前後で細胞内局在およびタンパク結合で変化があるかどうかを確認する。cyclopamine は培養液中濃度を 1pmol/L から 1 mmol/L まで変化させ反応を観察する。細胞に対する cyclopamine の実際の効果の確認は PTCH 下流の Gli に対する RT-PCR 法を行い、阻害効果を確認する。
- 4) GS 患者における骨密度 (骨塩定量) 測定 : 近年我々は 22 家系 25 名の GS 患者の表現型と遺伝子型を明らかにした。これら患者の同意を得て骨密度測定を行い、モデル動物で認められた骨塩量増加が年齢ごとに存在するかどうかを確認する。
- 5) GS 患者における発癌頻度と表現型の全国調査の施行:すでに我々の Gorlin 症候群

22 家系 25 名の臨床症状の検討により、基底細胞癌の発生頻度が欧米人種に比較して格段に低いことが判明しており、有色人種では放射線・紫外線応答能が欧米人と異なることが予想され全国調査によりこの傾向が正しいことを確認する。また同意が得られれば、新たに同定された GS 患者における骨密度測定を行い、前項 4) の補足データとして構成する。

4. 研究成果

PTCH 遺伝子は細胞の増殖シグナルに関わる遺伝子であり、その変異は神経皮膚症候群である Gorlin 症候群 (以下 GS) を発症させる。我々は Gorlin 症候群患者の皮膚に放射線を照射すると基底細胞癌が発症することに着目し、GS 由来細胞 (皮膚線維芽細胞およびリンパ芽球細胞) を用いて紫外線ないし放射線照射実験を行い、シグナル特異的反応を検討している。細胞はすでに変異を報告している患者由来細胞 (del 915 C) を使用し、正常コントロールと比較して変化を観察している。PTCH の免疫染色については内因性 PTCH がかなり少なく、通常の PTCH ポリクローナル抗体では染色精度が低かったため複数の各社抗体を比較使用し、実験条件を変更して染色を試みたが差異は認めなかった。

1) 放射線照射による PTCH タンパクの細胞内局在性の変化の観察

昨年度に引き続き、患者由来リンパ芽球細胞ないし皮膚線維芽細胞に対して放射線を照射し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて PTCH タンパクの細胞内局在を観察した。PTCH タンパクが X 線照射 (量) ならびに照射後の時間経過によりその分布が変化するかどうかを観察したが、染色精度が低く明らかな局在の変化は認めなかった。各社の PTCH ポリクローナル抗体を使用したがいずれも同様の結果だった。

2) PTCH タンパクと細胞周期因子 (p53, p21, p27, Rb) との共免疫沈降

PTCH タンパクに対する有効な抗体がないため内因性の PTCH タンパクの捕捉が困難になっている。RT-PCR でその変動を追うことは可能であるが、細胞周期因子との相互作用については追跡することが困難であった。今後細胞内強制発現させたベクタータンパクに対する抗体を利用することで共免疫沈降を行うことを考慮している。

3) Gorlin 症候群における PTCH 遺伝子変異およびタンパク相互作用への影響の有無

Gorlin 症候群における主要組織における PTCH 遺伝子変異とその腫瘍病型について解析を行っているが現在までに表現型と遺伝子の関連は認めていない。Gorlin 症候群の PTCH 遺伝子解析を行う上で、エクソン 10 から 17 にいたる tandem duplication の症例を

遺伝学的に証明し報告した。PTCH 遺伝子は長大であるため、従来遺伝子内部での再構成を我々は報告しており新たな変異様式を見出すことができた。

4) 内因性ヘッジホッグタンパクの検出：ヒト皮膚線維芽細胞におけるヘッジホッグシグナルを構成する分子 (Gli1, Gli2, Gli3) の RT-PCR を行い、ヘッジホッグシグナリングが線維芽細胞内で機能していることを確認した。これらは紫外線照射ならびに放射線照射を行うことで増幅され、阻害剤 cyclopamine で阻害を確認した。現在培養液中にヘッジホッグタンパクを加えることでシグナルがどのように変化するか引き続き調査中である。

5) 骨塩量については現在も症例を集積中であり、遺伝子型による表現型の変化が示唆されている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 3 件)

1, Endo M, Fujii K, Sugita K, Saito K, Kohno Y, Miyashita T. Nationwide survey of nevoid basal cell carcinoma syndrome in Japan revealing low frequency of basal cell carcinoma. *Am J Med Genet A* 2012;158A:351-7. (査読有) doi: 10.1002/ajmg.a.34421

2, Tanaka T, Sugaya S, Kita K, Arai M, Kanda T, Fujii K, Imazeki F, Sugita K, Yokosuka O, Suzuki N. Inhibition of cell viability by human IFN- β is mediated by microRNA-431. *Int J Oncol* 2012;40:1470-6. (査読有) doi: 10.3892/ijo.2012.1345.

3, Fujii K, Matsuo K, Takatani T, Uchikawa H, Kohno H. Multiple cavitations in posterior reversible leukoencephalopathy syndrome associated with hemolytic-uremic syndrome. *Brain Dev* 2012;34:318-21. (査読有) doi:未

4, Kosaki R, Nagao K, Kameyama K, Suzuki M, Fujii K, Miyashita T. Heterozygous tandem duplication within the PTCH1 gene results in nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Am J Med Genet* (in press). (査読有) doi:未

5, Fujii K, Suyama M, Chiba K, Okunishi T, Oikawa J, Kohno Y. Acute disseminated encephalomyelitis associated with 2009 H1N1 influenza vaccine. *Pediatr Int* (in press). (査読有) doi:未

6, Jiang X, Sugaya S, Ren Q, Sato T, Tanaka T,

Fujii K, Kita K, Suzuki N. Prevention of Pancreatic Cancer. *Intech* (in press). (査読有) doi:未

7, Kazato Y, Fujii K, Oba H, Hino M, Ochiai H, Uchikawa H, Kohno Y. Reversible cerebral vasoconstriction syndrome associated with brain parenchymal hemorrhage. *Brain and Dev* (in press). (査読有) doi:未

8, 塩浜 直、内川英紀、水落弘美、宮下俊之、藤井克則。「ヘッジホッグシグナルと脳腫瘍」*脳神経外科速報* 第 22 巻第 1 号, 66-73, 2012. (査読有)

9, Nagao K, Fujii K, Saito K, Sugita K, Endo M, Motojima T, Hatsuse H, Miyashita T. Entire *PTCH1* deletion is a common event in point mutation-negative cases with nevoid basal cell carcinoma syndrome in Japan. *Clin Genet* 2011; 79:196-8. (査読有) doi: 10.1111/j.1399-0004.

10, 宮下俊之、桐生麻衣子、斎藤加代子、杉田克生、遠藤真美子、藤井克則。「見逃してはいけない家族性腫瘍：本邦における母斑基底細胞癌症候群の遺伝子変異と臨床的特徴」*家族性腫瘍* 第 11 巻第 1 号 14-8, 2011. (査読有)

11, Komoike Y, Fujii K, Nishimura A, Hiraki Y, Hayashidani M, Shimojima K, Nishizawa T, Higashi K, Yasukawa K, Saito H, Miyake N, Mizuguchi T, Matsumoto N, Osawa M, Kohno Y, Higashinagawa T, Yamamoto T. Zebrafish gene knockdowns imply roles for human *YWHAG* in infantile spasms and cardiomegaly. *Genesis* 48:233-43, 2010. (査読有) PMID:20146355

12, Sasaki R, Miyashita T, Saito K, Fujii K, Ando T, Akizuki T. Multiple keratocystic odontogenic tumors associated with nevoid basal cell carcinoma syndrome having distinct *PTCH1* mutations. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology* (Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod).2010;110:e41-6. (査読有) PMID: 19521425

13, 藤井克則「基底細胞母斑症候群」小児科臨床ビクシス 17 「年代別子どもの皮膚疾患」中山書店 五十嵐隆総編集、専門編集馬場直子。P34-35。2010 年 4 月 28 日刊行。(査読無)

14, 藤井克則「顎骨内嚢胞、手掌小陥凹、粗野顔貌を呈した 11 歳女児例」イメー

らせまる小児神経疾患 50 p35-36. 編集：杉田克生、林雅晴 監修：日本小児神経学会。診断と治療社 2010。(査読無)

15, **Fujii K**, Minami N, Hayashi Y, Nishino I, Nonaka I, Tanabe Y, Takanashi J, Kohno Y. Homozygous Female Becker muscular dystrophy. *Am J Med Genet* 149A:1052-5; 2009. (査読有) PMID:19396825

16, Sasaki R, Saito K, Watanabe Y, Takayama Y, **Fujii K**, Agawa K, Miyashita T, Ando T, Akizuki T. Nevoid basal cell carcinoma syndrome with cleft lip and palate associated with the novel PTCH gene mutations. *J Hum Genet* 54:398-402, 2009. (査読有) PMID:19521425

17, Okumura A, Kidokoro H, Shoji H, Nakazawa T, Mimaki M, **Fujii K**, Oba H, Shimizu T. Kernicteroid Syndrome of Preterm Infants. *Pediatrics* 123(6):e1052-8, 2009. (査読有) PMID:19433515

18, Hashimoto Y, Takanashi J, Kaiho K, **Fujii K**, Okubo T, Ota S, Kohno Y. A splenic lesion with transiently reduced diffusion in clinically mild encephalitis is not always reversible. A case report. *Brain Dev* 31:710-2; 2009. (査読有) PMID:19046838

19, **藤井克則**、内川英紀、杉田克生、河野陽一。「顎骨嚢胞および大脳鎌の石灰化を契機に診断された Gorlin 症候群の 1 例」小児疾患アトラス 目で見る小児科 150 小児科別冊 46: 288-9; 2009。(査読無)

20, **藤井克則**、宮下俊之。「ヘッジホッグと形態形成 —発生生物学から臨床医学への応用—」脳と発達 41: 247-252; 2009. (査読有)

21, **藤井克則**、宮下俊之。「ヘッジホッグと形態形成 —Gorlin 症候群と PTCH 遺伝子変異—」日本小児皮膚科学会雑誌 28:65-71; 2009. (査読有)

22, 田辺良、**藤井克則**、宮下俊之、杉田克生、内川英紀、遠藤真美子、新井ひでえ、河野陽一。「Gorlin 症候群における臨床的検討—主要症状を中心とした多様な症候スペクトラム—」脳と発達 41: 253-257; 2009. (査読有)

23, 遠藤真美子、**藤井克則**、宮下俊之、杉田克生、内川英紀、田辺良、新井ひでえ、河野陽一。「Gorlin 症候群における分子遺伝学的検討—PTCH 遺伝子変異とその多様な変異ス

ペクトラム—」脳と発達 41: 259-263; 2009. (査読有)

[学会発表] (計 19 件)

1, **藤井克則**、宮下俊之「日本における母斑性基底細胞癌症候群における基底細胞癌発症率」第 70 回日本癌学会学術総会 (2011. 10. 4)

2, 鈴木麻衣子、長尾和右、高山吉永、**藤井克則**、宮下俊之「母斑基底細胞癌症候群に発症する角化嚢胞性歯原性腫瘍の腫瘍化機序の解析」第 70 回日本癌学会学術総会 (2011. 10. 4)

3, **Fujii K**, Endo M, Mizuochi H, Uchikawa H, Sugita K, Kohno Y, Saito K, Miyashita T. Nationwide survey of Gorlin syndrome in Japan. 2011 5th Europediatrics 23-26, June, 2011 Vienna, Austria.

4, Mizuochi H, **Fujii K**, Miyashita T, Suyama M, Endo M, Uchikawa H, Kohno Y. Bone mass density in patients with Gorlin syndrome is partially regulated by hedgehog signaling. 2011 5th Europediatrics 23-26, June, 2011 Vienna, Austria.

5, Uchikawa H, **Fujii K**, Miyashita T, Endo M, Mizuochi H, Kohno Y. Identification of *PTCH1* mutations in Japanese Gorlin syndrome patients. 2011 5th Europediatrics 23-26, June, 2011 Vienna, Austria.

6, 遠藤真美子、**藤井克則**、水落弘美、須山麻衣子、内川英紀、宮下俊之、斎藤加代子、杉田克生、河野陽一。「本邦における Gorlin 症候群 157 例の臨床的検討」第 53 回日本小児神経学会総会 (横浜) 2011. 5. 26-28

7, 本島 敏乃、**藤井克則**、宮下俊之、引間昭夫、遠藤真美子、河野陽一。「*Alu* 配列を介した *PTCH* 遺伝子全欠失の Gorlin 症候群親子例」第 53 回日本小児神経学会総会 (横浜) 2011. 5. 26-28

8, 内川英紀、**藤井克則**、大場洋、宮下俊之、遠藤真美子、須山麻衣子、水落弘美、河野陽一。「Nasal glioma を合併した Gorlin 症候群の 1 男児例」第 53 回日本小児神経学会総会 (横浜) 2011. 5. 26-28

9, 水落弘美、**藤井克則**、宮下俊之、須山麻衣子、遠藤真美子、内川英紀、河野陽一。「Gorlin 症候群と骨形成の検討—動物モデルと骨密度との関連—」第 53 回日本小児神経学会総会 (横浜) 2011. 5. 26-28

〔その他〕
ホームページ等
Gorlin 症候群のホームページ開設
http://gorlin.chibadai-shonika.net/gorlin_syndrome/

6. 研究組織

(1) 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