

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23501269

研究課題名(和文)ヘッジホッグシグナル伝達異常により発症する腫瘍の腫瘍化機序の解析

研究課題名(英文)Dysregulation of hedgehog signaling and tumorigenesis

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) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：母斑基底細胞癌症候群(NBCCS)に発症する腫瘍の発症機序を明らかにするため、NBCCS症例に発症した歯原性腫瘍(KCOT)10例、髄芽腫1例、髄膜腫2例、卵巣平滑筋腫1例について血液及び腫瘍組織の遺伝子解析を行なった。髄芽腫、髄膜腫、卵巣平滑筋腫のそれぞれ1例においてはPTCH1の配偶子変異に加えて同遺伝子の正常アレルの欠損、あるいは配偶子変異と別のアレルのフレームシフト変異が認められ、これが腫瘍化につながる2nd hitと考えられた。一方でKCOTにおいては、1例で2nd hitの可能性のある変異が認められたのみであったことから、他の腫瘍とは異なる分子機序で生じている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In order to investigate the molecular mechanism of tumor formation in NBCCS patients, we analyzed gene mutations in 10 cases of KCOT, 2 cases of meningioma and 1 case each of medulloblastoma and ovarian leiomyoma. As a result, 1 sample each of meningioma, medulloblastoma and ovarian leiomyoma had a pathogenic somatic mutation (2nd hit), whereas only one out of ten KCOT samples carried a possible pathogenic mutation. Therefore, KCOT is suggested to arise through a mechanism distinct from that for other tumors.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍生物学

キーワード：母斑基底細胞癌症候群 PTCH1 癌抑制遺伝子 歯原性腫瘍

1. 研究開始当初の背景

母斑基底細胞癌症候群 (Nevoid basal cell carcinoma syndrome、以下 NBCCS と省略) (別名 Gorlin 症候群) は、1960 年 Gorlin らによって報告された小奇形と高発癌性を併せ持つ常染色体優性遺伝疾患である。発達上の奇形には肋骨椎骨異常、合・多指症などがあり、腫瘍では基底細胞癌 (Basal cell carcinoma、以下 BCC と省略)、角化嚢胞性歯原性腫瘍 (Keratocystic odontogenic tumor、以下 KCOT と省略)、髄芽腫の発生が有名である。KCOT は顎骨内に発症する 20~30 歳代で頻度の高い良性腫瘍である。1992 年の WHO の分類では、KCOT は歯原性角化嚢胞の名称で嚢胞に分類されていた。その後、顎骨を侵襲的に破壊し増大すること、再発しやすいことなどから、2005 年の WHO による組織分類では歯原性腫瘍として分類された。

NBCCS の責任遺伝子は *PTCH1* であり、既に我々の研究室からの報告も含めて 100 以上の遺伝子変異が報告されている。多くは挿入、欠失変異であり、*PTCH1* のハプロ不全で発症する。*PTCH1* タンパク質は分泌型タンパク質ソニックヘッジホッグ (Shh) をリガンドとする抑制性受容体であり、その機能不全の結果起こる Shh シグナル伝達の恒常的な亢進が小奇形や高発癌の原因と考えられている。

しかしながら NBCCS に発症する腫瘍の分子メカニズムを系統的に解析した報告はなく、これを明らかにすることが孤発性の上記腫瘍の発症メカニズムの解明に貢献するものと思われる。

2. 研究の目的

最近、Shh シグナル伝達に關与する遺伝子のジェネティックな、あるいはエピジェネティックな異常と発癌との関連が前立腺癌、消化器癌等で報告されているが、詳細は不明な点が多い。従来腫瘍化の分子機構は家族性腫瘍をモデルとして解明されてきたものが多い。家族性網膜芽細胞腫がその例である。本研究では NBCCS 患者に好発する各種腫瘍の遺伝子解析をすることにより、腫瘍化における Shh シグナル伝達系の役割を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) NBCCS 症例の末梢血と、同一症例に発症した腫瘍組織をペアで解析を行った。解析を行った症例は KCOT10 例、髄芽腫 1 例、髄膜腫 2 例、卵巣平滑筋腫 1 例であった。

まず、*PTCH1* 遺伝子について PCR-シーケンス法で変異を解析し、必要に応じて Shh シグナル伝達関連遺伝子である *Smoothened (SMO)*、*Suppressor of fused (SUFU)* 遺伝子の解析も行った。

末梢血にみられる変異は配偶子変異、腫瘍のみで見られる変異は体細胞変異と考え、両変異とアレルのとの関係を可能な限り解析した。

(2) 通常の PCR-シーケンス法で変異が見出されなかった場合、*PTCH1* プロモーター領域の CpG アイランドのメチル化の有無を QIAGEN の EpiTect Bisulfite Kit を用いて解析し、*PTCH1* 遺伝子がエピジェネティックに不活化されていないかを検討した。

(3) *PTCH1* の大きな欠損があると、通常の PCR-シーケンス法では非欠損アレルのみが増幅され、変異陰性の結果がでる。そこで、上記の方法で陽性所見が得られなかった場合には、multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA 法)、あるいはコピー数解析用マイクロアレイを用いて、*PTCH1* 遺伝子の欠損がないかを検討した。

4. 研究成果

末梢血からは髄膜腫の 1 例から *SUFU* のナンセンス変異が、それ以外の全ての症例からは *PTCH1* の配偶子変異が同定された。*PTCH1* の変異の内訳は、フレームシフト変異 7 例、ミスセンス変異 3 例、ナンセンス変異 1 例、スプライシング変異 1 例であった。

腫瘍組織の解析では KCOT の 3 例から配偶子変異に加えて体細胞変異が見出されたが、1 つは多型として健常人から報告されており、もう一つは配偶子変異と同一アレルの変異であったため、腫瘍化に關与する 2nd hit とは考えられなかった。残る一つのフレームシフト変異については配偶子変異と体細胞変異のアレルの関係は解析できなかった。2nd hit が明らかでない症例においては *PTCH1* 遺伝子プロモーターのメチル化、*PTCH1* 遺伝子の大きな欠損、*PTCH1* 関連遺伝子である *SUFU*、*SMO* 遺伝子の変異といった可能性を追求したが、すべて陰性であった。

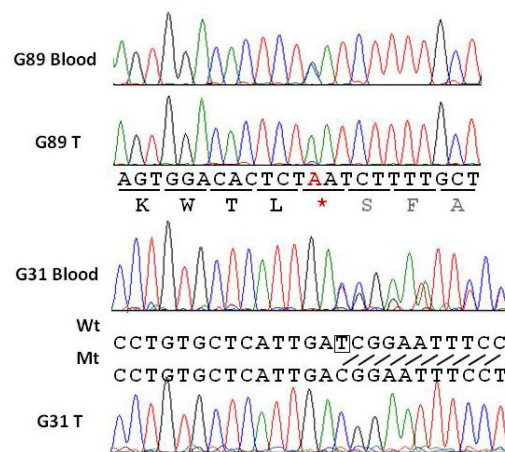


図1 腫瘍組織で *PTCH1* 遺伝子の LOH を示した 2 例血液から配偶子変異 (G89: ナンセンス変異、G31: フレームシフト変異) が見いだされたが、腫瘍組織 (G89: 髄芽腫、G31T: 卵巣平滑筋腫) においては正常アレル由来の配列が消失しており、*PTCH1* 遺伝子の LOH が 2nd hit として生じていることが明らかとなった。

一方髄芽腫、髄膜腫、卵巣平滑筋腫のそれぞれ 1 例においては *PTCH1* の配偶子変異に

加えて同遺伝子の正常アレルの欠損(すなわち LOH) あるいは配偶子変異と異なるアレルのフレームシフト変異が認められ、これが腫瘍化につながる 2nd hit と考えられた(図 1)。

以上の結果から、NBCCS に発症する KCOT 以外の腫瘍は癌抑制遺伝子と考えられる *PTCH1* の配偶子変異(1st hit)に加えて生じた 2nd hit が腫瘍化に関与することが多いことがわかった。それに対して KCOT においては明らかな 2nd hit が証明された症例がなく、他の腫瘍とは異なる分子機序で生じている可能性が示唆された(図 2)。2nd hit が証明されなかった KCOT の大部分の腫瘍化には解析した遺伝子以外の遺伝子が関与していると考えられ、今後はゲノムワイドな解析が必要であると思われた。

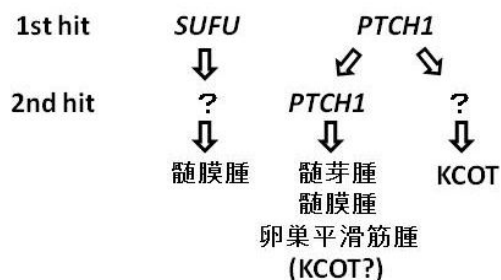


図2 NBCCSに発症する各種腫瘍の発症機序

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 14 件)

Tanaka, T., Arai, M., Jiang, X., Sugaya, S., Kanda, T., Fujii, K., Kita, K., Sugita, K., Imazeki, F., Miyashita, T., Kaneda, A., and Yokosuka, O. Downregulation of microRNA-431 by human interferon- β inhibits viability of medulloblastoma and glioblastoma cells via upregulation of SOCS6. *Int. J. Oncol.* 44, 1685-1690, 2014 doi: 10.3892/ijo.2014.2317. 査読有

Fujii, K., Ohashi, H., Suzuki, M., Hatsuse, H., Shiohama, T., Uchikawa, H., and Miyashita, T. Frameshift mutation in the *PTCH2* gene can cause nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Fam. Cancer* 12, 611-614, 2013 査読有

Fujita Y., Fujita T., Fujii, K., and Miyashita, T. Falx cerebri calcification and microphthalmia in Gorlin syndrome. *Neurol. Clin. Neurosci.* 1, 88-89, 2013 査読有

Suzuki, M., Nagao, K., Hatsuse, H., Sasaki, R., Saito, K., Fujii, K., and Miyashita, T. Molecular pathogenesis of keratocystic odontogenic tumors developing in nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol.* 116, 348-353, 2013 査読有

Kijima C., Miyashita, T., Suzuki M., Oka H., and Fujii K. Two cases of nevoid basal cell carcinoma syndrome associated with

meningioma caused by a *PTCH1* or *SUFU* germline mutation. *Fam. Cancer* 11, 565-570, 2012 査読有

Suzuki, M., Hatsuse, H., Nagao, K., Takayama, Y., Kameyama, K., Kabasawa, Y., Omura, K., Yoshida, M., Fujii, K., and Miyashita, T. Selective haploinsufficiency of longer isoforms of *PTCH1* protein can cause nevoid basal cell carcinoma syndrome. *J. Hum. Genet.* 57, 422-426, 2012 査読有

Kosaki, R., Nagao, K., Kameyama, K., Suzuki, M., Fujii, K., and Miyashita, T. Heterozygous Tandem Duplication Within the *PTCH1* Gene Results in Nevoid Basal Cell Carcinoma Syndrome. *Am. J. Med. Genet. A.* 158A, 1724-1728, 2012 査読有

Ishitsuka, Y., Furuta, J., Miyashita, T., and Otsuka, F. Splicing aberration in nevoid basal cell nevus syndrome. *Acta Derm. Venereol.* 92, 619-620, 2012 査読有

Endo, M., Fujii, K., Sugita, K., Saito, K., Kohno, Y., and Miyashita, T. Nationwide survey of nevoid basal cell carcinoma syndrome in Japan revealing the low frequency of basal cell carcinoma. *Am. J. Med. Genet. A.* 158A, 351-357, 2012 査読有

Nagao, K., Fujii, K., Saito, K., Sugita, K., Endo, M., Motojima, T., Hatsuse, H. and Miyashita, T. Entire *PTCH1* deletion is a common event in point mutation-negative cases with nevoid basal cell carcinoma syndrome in Japan. *Clin. Genet.* 79, 196-198, 2011 査読有

〔学会発表〕(計 21 件)

長尾和右, 宮下俊之, Functional analysis of a sonic hedgehog signaling pathway inhibitor *SUFU*, 第 72 回日本癌学会学術総会、2013.10.3-5、横浜

志村将人、鈴木麻衣子、初瀬洋美、長尾和右、高山吉永、亀山孝三、藤井克則、宮下俊之、母斑基底細胞癌症候群で見出されたスプライシング変異と異常 mRNA の分解、第 35 回日本分子生物学会年会、2012.12.11-14、福岡

鈴木麻衣子、長尾和右、高山吉永、岡秀宏、藤井克則、宮下俊之、*PTCH2* と *SUFU* 遺伝子に配偶子変異をもつ母斑基底細胞癌症候群の検討、第 71 回日本癌学会学術総会、2012.9.19-21、札幌

鈴木麻衣子、宮下俊之、木島千尋、岡秀宏、藤井清孝、*Suppressor of fused (SUFU)* 遺伝子の配偶子変異は高い髄芽腫の発症リスクをもたらす、第 16 回日本家族性腫瘍学会学術集会、2012.6.15-16、大阪

宮下俊之、母斑基底細胞癌症候群の分子遺伝学、第 56 回日本人類遺伝学会・第 11 回東アジア人類遺伝学会共同大会、2011.11-9-12、千葉

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、2011.10-3-5、名古屋

宮下俊之、桐生麻衣子、佐々木亮、齋藤加代子、藤井克則、母斑基底細胞癌症候群に発症した歯原性腫瘍の遺伝子解析、遺伝医学合同学術集会、2011.6.16-19、京都

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.kitasato-u.ac.jp/~molgen/>

6. 研究組織

(1)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

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

亀山 孝三 (KAMEYAMA, Kohzoh)

北里大学・医学部・講師

研究者番号：40214556

長尾 和右 (NAGAO, Kazuaki)

北里大学・医学部・助教

研究者番号：60392487