

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592854

研究課題名(和文) Gorlin症候群由来細胞を用いたヘッジホッグ情報伝達系の解析

研究課題名(英文) Analysis of Hedgehog signaling using Gorlin syndrome derived cells

## 研究代表者

中野 芳朗 (Nakano, Yoshiro)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：30360267

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：初期発生や成体の維持、そしてその破綻として起こる形態異常や発癌に関与するヘッジホッグ受容体PTCH1の機能解明を最終目標として、PTCH1遺伝子異常で発症するGorlin症候群患者の同定と共に、患者由来試料の解析を行った。現在までに15家系のPTCH1遺伝子異常を見出した。またPTCH1機能変化により引き起こされる細胞内現象を探るため、DNA損傷時における反応性や代謝産物の解析を行った。さらに解析の遅れているGorlin症候群で90%以上の頻度で発症する角化嚢胞性歯原性腫瘍(KCOT)由来の細胞株を樹立し、培養条件・分化条件などを確立し、KCOT発症のメカニズム解明への足掛かりを築いた。

研究成果の概要(英文)：Hedgehog signaling plays pivotal roles in animal development and the control of adult organ homeostasis. Defect of Hedgehog receptor PTCH1 function causes Gorlin syndrome, which is a rare, dominantly inherited disease characterized by developmental anomalies and increased the risk of cancers. We have identified PTCH1 mutations in 15 Gorlin syndrome families. In order to understand the cellular events that are induced by the PTCH1 dysfunction, we have analyzed metabolites and the response against the DNA damages using Gorlin syndrome patient derived cells and non-syndromic cells. Furthermore, we established hereditary and sporadic keratocystic odontogenic tumor (KCOT) cell lines by introducing mutant CDK4, cyclin D1, and TRET. These cell lines show parakeratosis or nodule formation by increasing calcium concentration. Using these KCOT cell lines, it will be possible to analyze the mechanism of development of KCOT and the differences in sporadic or hereditary KCOT.

研究分野：腫瘍遺伝学

キーワード：Gorlin症候群 Hedgehog signal PTCH1 角化嚢胞性歯原性腫瘍

### 1. 研究開始当初の背景

ヘッジホッグ (Hh) 情報伝達系は、初期発生から成体の維持まで、多岐にわたり多くの組織でその正常な働きが必須な情報伝達系である。一方その破綻の結果として、多くの腫瘍の形成に参与する。Gorlin 症候群は骨格異常と共に髄芽腫 (medulloblastoma, MB)、角化嚢胞性歯原性腫瘍 (keratocystic odontogenic tumor, KCOT)、皮膚基底細胞癌 (basal cell carcinoma, BCC) などが高頻発する常染色体優性遺伝病であり、責任遺伝子として、Hh の受容体である PTCH1 が同定されている。Hh の受容体である PTCH1 蛋白は、下流のアクチベーターである Smoothed (SMO) 蛋白を抑制する働きがあるが、この活性は Hh の結合によって解除される。PTCH1 はトランスポーター様構造を持つことから、なにかしらの小分子の輸送に参与していることが予想されているが、その実態は明らかでない。また MB や BCC に比べ KCOT はまだ遺伝子・細胞両レベルの解析が遅れている。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は PTCH1 蛋白の機能を探ることである。そのためにまず Gorlin 症候群はどのような PTCH1 の変異により発症するのかを変異を同定する事により明らかにする。引き続き PTCH1 蛋白が制御すると考えられている小分子を同定することにより、PTCH1 による SMO 蛋白制御のメカニズムを解明し、その成果をヘッジホッグ情報伝達系の関与する癌の治療に将来応用する事を一つの目的とする。また Gorlin 症候群患者では、放射線を使用する治療によって、照射部位に癌を誘導したりする事が知られているが、このメカニズムはまだわかっていないので、DNA damage 後の細胞内での分子の変化を調べ、メカニズムの解明を目的とする。さらに良性腫瘍として知られる角化嚢胞性歯原性腫瘍 (KCOT) 発症のメカニズムを遺伝子レベルで解明する。また KCOT を試験管内で研究できるよう培養系及び培養方法の確立を目指す。

### 3. 研究の方法

- (1) Gorlin 症候群患者の同定は PTCH1 遺伝子のコーディング領域の塩基配列決定により行う。
- (2) Gorlin 症候群由来の細胞 (皮膚の線維芽細胞及び KCOT 細胞) を用いて細胞内小分子の同定を CE-TOFMS 及び LC-TOFMS を用いて行う。
- (3) Gorlin 症候群由来の細胞に DNA 損傷因子

を作用させ、その変化を生化学的及び細胞生物学的に解析する。

- (4) KCOT 細胞を樹立し、その特徴を生化学的・細胞生物学的に解析する。

### 4. 研究成果

#### (1) Gorlin 患者における PTCH1 遺伝子変異の同定

現在までに Gorlin 症候群 15 家系の遺伝子診断を行い全家族において PTCH1 遺伝子の変異を認められた (図 1)。変異はナンセンス、フレームシフト、大きな欠損などがみられたが、ミスセンス変異は見つかっていない。変異部位は PTCH1 蛋白の前半部に多く見られたが、特にホットスポットなどは見当たらなかった。これは今までの報告と同じである。また病徴と変異部位との関連も見当たらなかった。白人ではほぼ 100% 発症の見られる BCC は、日本人患者では非常に少ない事が確認できた。一方 KCOT の発症はあまり差がないことが判明した。さらに同じ変異を持った親子・兄妹間でも症状の多様性が見られる事から、PTCH1 変異以外の遺伝子が関与することが示唆され、今後の研究における一つのターゲットとなることが判明した。

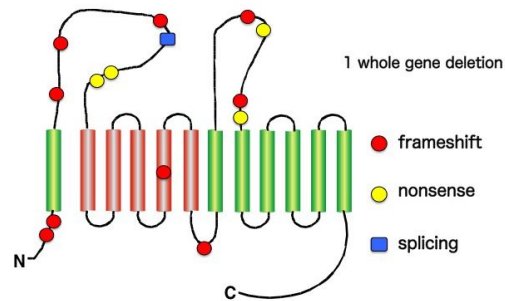


図1 PTCH1遺伝子の変異部位

#### (2) Gorlin 患者由来細胞を用いたメタボローム解析

Gorlin 症候群患者由来細胞 (PTCH1+/-) と患者家族由来細胞 (PTCH1+/+) を用いて、その代謝産物・小分子の解析を行った。初代培養系を用いたため細胞間の違いが大きく特徴的な分子の同定には至らなかった。この分子の同定は世界中で精力的に行われているがまだうまくいっていない。その後の解析の結果、KCOT 由来の KCOT2 細胞株は PTCH1-/- である事が判明した (後述)。この細胞に Tet-Express System を用いて PTCH1 遺伝子の発現を制御できる形で導入したので、PTCH1 のある状態と無い状態を直接比較できるようになった。

### (3) Gorlin 患者由来細胞を用いた DNA damage に関する反応性の解析

Gorlin 症候群患者由来の皮膚の線維芽細胞及び我々が今回樹立した KCOT 由来細胞を用いて DNA 損傷時における反応性の検討を行った。Gorlin 症候群の病態モデルとなる Ptc1+/- マウスを用いた実験では、ATR-Chk1 シグナル系の異常が報告されている (Leonard et al 2008) ので、この系を中心に解析を行った。DNA 損傷を放射線、Etoposide、Bleomycin を用いて誘導し、2 時間後及び 20 時間後の細胞における ATR、Chk1、Chk2、HistoneH2Ax のリン酸化及び細胞内分布を調べた。DNA 損傷刺激により ATR、Chk1、Chk2、ATK、HistoneH2Ax はいずれもリン酸化が 20 時間後も見られ、Gorlin 症候群由来細胞と正常細胞とでは違いが見られなかった。また細胞における局在も両者で差はみつけられなかった。

### (4) 良性腫瘍である卵巣線維腫と KCOT における PTCH1 遺伝子の関与

卵巣線維腫と KCOT はいずれも Gorlin 症候群に伴って発症する良性の腫瘍である。今回筑波大学と共同で Gorlin 患者とその患者から発症した卵巣線維腫における PTCH1 遺伝子解析を行った。その結果血液及び線維腫に共通の欠損変異 (c3055delG) が PTCH1 遺伝子に認められ、この患者が Gorlin 症候群であることが分子レベルで確認された。またこの患者由来の卵巣線維腫では PTCH1 のもう片方の allele の欠損が認められたことから、卵巣線維腫では PTCH1 の機能が両方とも無くなっていることが確認された。同様に良性腫瘍である KCOT 発症のメカニズムを探る為に、Gorlin 症候群由来の KCOT 細胞と弧発性の KCOT 細胞における PTCH1 遺伝子の状態を調べた。その結果 Gorlin 症候群由来の KCOT 細胞株 NS11 においては PTCH1 の splicing 異常である c.584+2T>G 変異を持ち、もう一つの allele の変化は認められなかった。一方弧発性の KCOT 由来細胞株 KCOT2 においては 2 つの変異 (c1120G>T の nonsense 変異および c3064\_3065delAT の frameshift 変異) が存在し、cDNA の解析によりこれらはそれぞれ異なる allele の変異であることが判明できた。このことから KCOT2 細胞では PTCH1-/- になっていることが判明した。悪性腫瘍の BCC では PTCH1 の両 allele の欠損が知られているが今回良性腫瘍である卵巣の線維腫や KCOT でも両 PTCH1 allele の変異が認められたことから、PTCH1 (あるいは Hh 情報伝達系) 以外の因子が細胞の悪性化あるいは良性化

を決めているのではということが考えられた。

### (5) 遺伝性及び弧発性 KCOT 細胞株の樹立と解析

角化嚢胞性歯原性腫瘍 (KCOT) は歯原性腫瘍の約 20% を占め、弧発性のものと遺伝性の Gorlin 症候群 (基底細胞母斑症候群) の症状の一つとして発症するものがある。Gorlin 症候群の責任遺伝子である PTCH1 の変異が弧発性 KCOT の 30% 以上に關与していることがわかっている。我々は弧発性及び遺伝性由来の KCOT に CDK4、cyclinD1 並びに hTERT を導入することにより 2 つの細胞株 (NS11、KCOT2) の樹立に成功した。さらに培地の組成を変える事によって、安定で扱い易い培養条件を見出した。弧発性 KCOT 由来の KCOT2 株では錯角化及び nodule 形成が、遺伝性 KCOT 由来の NS11 株では nodule 形成が培養液中のカルシウム濃度を上げるにより通常の 2 次元培養で観察された (図 2)。また両細胞株とも 3-D Life Hydrogel 中で spheroid 形成が認められた。これらの細胞株は世界的に見ても非常に貴重で KCOT 発症のメカニズム解明に大きく貢献すると思われる。

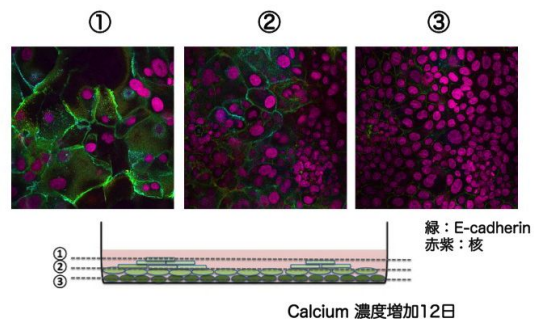


図2 KCOT2細胞はCa<sup>2+</sup>により分化誘導される

### (6) Gorlin 症候群由来細胞における一次繊毛 (primary cilia)

ヘッジホッグ情報伝達系の働く場として一次繊毛が注目されている。ヘッジホッグ情報系の活性化が起こると、通常 PTCH 蛋白に抑えられていた SMOH 蛋白は一次繊毛中に移動する事が知られている。そこで PTCH1 遺伝子のコピー数の異なる Gorlin 症候群由来細胞などにおける SMOH 蛋白の局在を調べることとした。しかしながら既存の抗体は primary cilia における蛋白の動態を解析出来ない事が判明したので、GFP タグを付けた SMOH、PTCH1 蛋白を細胞に導入し、その動態を解析した。Ptc-GFP mSmo-GFP はいずれも primary cilia 中へ移行出来る事が判明した。また KCOT 細胞株 NS11 及び KCOT2 においては primary cilia の存在が確認できた。今後こ

のシステムを使って primary cilia 中における PTCH1 及び SMOH の動態が可能になった。

#### 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 7 件)

Yoshikawa Kyohei, Noguchi Kazuma, Nakano Yoshiro, Yamamura Michiyo, Takaoka Kazuki, Hashimoto-Tamaoki Tomoko, Kishimoto Hiromitsu. The Hippo pathway transcriptional co-activator, YAP, confers resistance to cisplatin in human oral squamous cell carcinoma. International Journal of Oncology 2015 ; 46(6):2364-70 査読有  
DOI: 10.3892/ijo.2015.2948.

Yoshikawa Yoshie, Sato Ayuko, Tsujimura Tohru, Otsuki Taiichiro, Fukuoka Kazuya, Hasegawa Seiki, Nakano Takashi, Hashimoto-Tamaoki Tomoko. Biallelic germline and somatic mutations in malignant mesothelioma: Multiple mutations in transcription regulators including mSWI/SNF genes. International Journal of Cancer. 2015;136(3):560-71 査読有  
DOI: 10.1002/ijc.29015.

Jimbo Takahiro, Masumoto Kouji, Urita Yasuhisa, Takayasu Hajime, Shinkai Toko, Uesugi Toru, Gotoh Chikashi, Sakamoto Naoya, Sasaki Takato, Oto Tatsuyuki, Fukushima Takashi, Noguchi Emiko, Nakano Yoshiro. Nevroid basal cell carcinoma syndrome with a unilateral giant ovarian fibroma in a Japanese 6-year-old girl. European Journal of Pediatrics 2014 ;173(5):667-70 査読有  
DOI: 10.1007/s00431-013-2200-7.

野口一馬, 中野芳朗, 山村倫世, 吉川恭平, 浦出雅裕, 岸本裕充. 角化嚢胞性歯原性腫瘍細胞株の樹立と病態モデル作成の試み. 口腔組織培養学会誌 2013;22(2):27-34 査読有

野口一馬, 寺田友紀, 中野芳朗, 山村倫世, 吉川恭平, 頭司雄介, 森寺邦康, 高岡一樹, 浦出雅裕, 岸本裕充. 口腔扁平上皮癌の発生における Human papillomavirus (HPV)

感染の関与と診断法の検討. 日本口腔感染症学会雑誌 2013;20(2):70-6 査読有

中野芳朗. ヘッジホッグ情報伝達の破綻による形態異常と腫瘍形成. 兵医大医会誌 2013;37(2):29-34 査読無

Yamamura Michiyo, Noguchi Kazuma, Nakano Yoshiro, Segawa Emi, Zushi Yusuke, Takaoka Kazuki, Kishimoto Hiromitsu, Hashimoto-Tamaoki Tomoko, Urade Masahiro. Functional analysis of Zyxin in cell migration and invasive potential oral squamous cell carcinoma cells. International Journal of Oncology 2013;42(3):873-80 査読有  
DOI: 10.3892/ijo.2015.2948.

[学会発表](計 8 件)

Nakano Yoshiro, Noguchi Kazuma, Chiyo Hideaki, Pooh Ritsuko, Kishimoto Hiromitsu, Tamaoki Tomoko. Hedgehog signaling and human disease. The 37th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan 2014.11.26 Pacifico Yokohama (Kanagawa Yokohama)

中野芳朗, 玉置知子[橋本], 久保秀司, 吉川良恵, 振津かつみ, 若林一郎, 今西宏安, 高橋敬子, 成瀬均, 鈴木敬一郎. 次世代シーケンサーの地域医療教育への導入. 第46回日本医学教育学会大会 2014.7.18 和歌山医科大学(和歌山・和歌山)

玉置知子[橋本], 覚道真理子, 佐藤智佳, 振津かつみ, 吉川良恵, 久保秀司, 中野芳朗, 高橋敬子, 成瀬均, 鈴木敬一郎. 臨床遺伝学分野での臨床実習 遺伝カウンセリング、次世代シーケンサー解析の導入. 第46回日本医学教育学会大会 2014.7.18 和歌山医科大学(和歌山・和歌山)

玉置知子[橋本], 千代豪昭, 夫律子, 岸本裕充, 覚道真理子, 佐藤智佳, 井上佳代, 振津かつみ, 三村博子, 中野芳朗. Greig 症候群の家系例. 第38回日本遺伝カウンセリング学会学術集会 2014.6.27 近畿大学(大阪・東大阪)

Nakano Yoshiro, Noguchi Kazuma, Kishimoto Hiromitsu, Hashimoto-Tamaoki Tomoko. Characterization of Golin syndrome-derived cells. Keystone Symposium, Developmental Pathways and Cancer : Wnt, Notch and Hedgehog.

2014.2.4 Banff Springs Hotel (Canada・Banff)

玉置知子, 中野芳朗, 高橋千晶, 覚道真理子, 佐藤智佳, 三村博子, 千代豪昭. 基底細胞母斑症候群(Gorlin-Golz 症候群)の家族例30年にわたる遺伝カウンセリング. 第37回日本遺伝カウンセリング学会学術集会 2013.6.21 川崎市産業振興会館 (神奈川・川崎)

野口一馬, 藤井碧, 頭司雄介, 山村倫世, 吉川恭平, 岸本裕充, 浦出雅裕. 角化嚢胞性歯原性腫瘍細胞の細胞株の樹立と病態モデル作成の試み. 第49回日本口腔組織培養学会学術大会 2012.11.17 広島大学医学部 (広島・広島)

野口一馬, 藤井碧, 頭司雄介, 山村倫世, 吉川恭平, 岸本裕充, 浦出雅裕. 病態モデル作成を目指した角化嚢胞性歯原性腫瘍細胞の不死化の試みと細胞株の樹立. 第57回日本口腔外科学会総会・学術大会 2012.10.20 パシフィコ横浜会議センター (神奈川・横浜)

6. 研究組織

(1)研究代表者

中野 芳朗 (Nakano, Yoshiro)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：30360267

(2)研究分担者

玉置(橋本)知子 (Hashimoto-Tamaoki, Tomoko)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：10172868

岸本 裕充 (Kishimoto, Hiromitsu)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：30291818

野口 一馬 (Noguchi, Kazuma)

兵庫医科大学・医学部・准教授

研究者番号：50309473