

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11098

研究課題名(和文) Gorlin症候群由来細胞を用いた良性・悪性腫瘍成立に関するメカニズムの解析

研究課題名(英文) Analysis of Gorlin syndrome derived benign or malignant tumor

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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ヘッジホッグ情報伝達系の関与する腫瘍形成のメカニズム解明を最終目標として、良性および悪性の腫瘍が同一の個体の異なる組織に発生するGorlin症候群によって引き起こされる腫瘍群の解析を行い、ヘッジホッグ情報伝達系のPTCH1およびSMO遺伝子変異だけでは腫瘍の悪性化・良性化、組織特異性は説明できないことを見出した。さらに研究の遅れているGorlin症候群由来良性腫瘍である角化嚢胞性歯原性腫瘍(KCOT)細胞株の樹立、3次元培養法の確立に成功し、この細胞株が幹細胞および間葉系細胞の性質を持ち、カルシウムによって上皮系、ケラチノサイト系とその性質が変化することを見出した。

研究成果の概要(英文)：Gorlin syndrome is a dominantly inherited autosomal disease with a high frequency of tumor induction caused by the hedgehog receptor PTCH1. We analyzed PTCH1 and SMO alternation in Gorlin syndrome-associated tumors, such as malignant basal cell carcinoma, benign keratocystic odontogenic tumor (KCOT), and ovarian fibroma, revealing that the mutational status of PTCH1 or SMO itself does not account for differences in malignancy and tissue-specificity of these tumors.

KCOT is the most frequent benign tumor in Gorlin syndrome patients. We established KCOT cell lines from sporadic and Gorlin syndrome-derived KCOTs. Both lines showed stem and mesenchymal cell characteristics. However, in the presence of calcium, cells showed parakeratosis and epithelial or keratinocyte-related proteins were induced. These features were similar to those of in vivo KCOTs. Using these cell lines and 3-D hydrogel culture, we may be able to advance understanding of the nature and origin of KCOTs.

研究分野：腫瘍遺伝学

キーワード：Gorlin症候群 角化嚢胞性歯原性腫瘍 hedgehog情報伝達 PTCH1 SMO 基底細胞癌

1. 研究開始当初の背景

次世代シーケンサーの普及と共に多くの腫瘍における遺伝子変異が解析されてきている。多くの変異が同定されてきているが悪性度や発症組織の特異性などを規定する因子に関してはまだよくわかっていないのが現状である。Gorlin 症候群は小児期に悪性の髄芽腫 (medulloblastoma, MB) 10代で良性の角化嚢胞性歯原性腫瘍 (keratocystic odontogenic tumor, KCOT) 20代以降で悪性の皮膚基底細胞癌 (basal cell carcinoma, BCC) などを発症する優性遺伝病で、ヘッジホッグの受容体である PTCH1 遺伝子の異常によって引き起こされる。孤発性の MB、KCOT、BCC においても PTCH1 や SMO、SUFU などのヘッジホッグ情報系遺伝子変異が報告されている。欧米では BCC は最も多い腫瘍の一つで発症に関与する PTCH1、薬剤耐性に関与する SMO 遺伝子変異の解析などをも含め精力的な解析がされている。一方良性の KCOT に関しては遺伝子・細胞両レベルで解析が遅れている。ヘッジホッグ情報伝達系は primary cilia がその情報伝達の場合であることが報告されている。しかし腫瘍形成に関してはまだ不明な点が多い。

2. 研究の目的

良性腫瘍及び悪性腫瘍発症に関与する因子の探索を、両者を発症する Gorlin 症候群試料を用いて解析することを目的とする。Gorlin 症候群では悪性の MB や BCC と良性の KCOT や卵巣線維腫が同じ患者さんに発症する。そこで同一患者さんの正常組織とこれら腫瘍を比較することにより腫瘍発症に関与する遺伝子群の同定を目指す。さらに Gorlin 症候群において発症する腫瘍の中で最も頻度が高いのに in vitro の系が無いため解析が遅れている KCOT の解析を、我々が樹立した細胞株を用いて行う。特に培養条件の検討 (培地の組成の違いや hydrogel を用いた三次元培養法の利用) により、より vivo に近い KCOT を再現することを目的とする。さらに樹立 KCOT 細胞株の基本的な性質を明らかにするために、発現タンパク質の解析や網羅的な遺伝子発現の解析を行う。またヘッジホッグ情報伝達系の場合として知られる primary cilia における SMO タンパクの動態を通して、ヘッジホッグ情報伝達系の腫瘍形成あるいは維持における役割を探る。これらの解析を通して KCOT の起源を同定し、薬剤による治療法の開発あるいは早期発見への足がかりとする。

3. 研究の方法

(1) 樹立 KCOT 細胞株発現タンパク、遺伝子を western blot 法および RNA-seq 法を用いて解析する。

(2) 樹立細胞株の培養および分化条件の検討を様々な培地を用いて行う。また vivo に近い細胞群を得るために三次元培養を

hydrogel や matrigel を用いて行う。

(3) KCOT におけるヘッジホッグ情報伝達系の発現解析を qPCR 法 RNA-seq 法を用いて行う。また SMO-GFP タンパクを細胞に導入することにより primary cilia における SMO タンパクの動態を検定する。

(4) Gorlin 症候群患者で引き起こされる KCOT 及び BCC と sporadic な KCOT 及び BCC における違いがあるかどうかを PTCH1 SMO 遺伝子を中心に解析する。

4. 研究成果

(1) 遺伝性および孤発性角化嚢胞性歯原性腫瘍 (KCOT) 由来細胞株の解析

樹立した KCOT 細胞株におけるカルシウム存在下および非存在下におけるタンパク発現解析を western blotting で行った。KCOT 細胞株では CD44 BMI1 SOX2 など幹細胞を示す遺伝子および CDH2 VIM CTNNA1 SNAI2 など間葉系の遺伝子発現が見られた。カルシウムの濃度を上げるとこれらの遺伝子発現は減少し、代わりに CDH1 KRT10 CLDN1 INV などの上皮系および keratinocyte 系の遺伝子発現の上昇が見られた (図 1)。

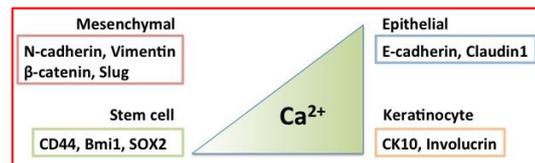


図 1 樹立 KCOT 細胞の特徴

さらに網羅的に遺伝子発現を調べるために RNA-seq による解析を行った。カルシウムによる誘導により Spinous layer のマーカーである DGS3 TGM1 TGM5 の発現が、Granular layer のマーカーとして知られる DSC1 DSC2 DSG1 KRT1 KRT10 KRT2 TGM3 の発現が、さらに Cornified layer のマーカーとして知られる LOR IVL S100 遺伝子群 SPRR 遺伝子群の発現が顕著に増加していた。一方、Basal cell layer での発現が認められている遺伝子 KRT5 KRT14 KRT15 などの発現の変化は非常に少ないことが判明した。また両細胞株とも基本的には同様の発現パターンを示した。これらのことから遺伝性および孤発性の KCOT 細胞は同じ細胞系由来であることが予想された。また sporadic な KCOT 細胞株では PTCH1 遺伝子が両アレル共変異していることから、keratinocyte への分化にはヘッジホッグ情報伝達系の関与は少ない可能性が示唆された。KCOT の起源はまだよくわかっていないがこれら樹立 KCOT の特徴から Epithelial rests of Malasses (ERM) を起源とするのではと考えている。ERM の細胞系の確立や ERM での遺伝子発現の解析が今後重要になって来ると思われる。

(2) KCOT 細胞の 3 次元培養とその解析

樹立した KCOT 細胞株を高カルシウム存在下で通常の培養をすると細胞が盛り上がり、

上部は錯角化を起こすことが確認できた。そこで嚢胞の形成を *in vitro* で再現するために、hydrogel を用いた三次元培養を試みた。その結果 hydrogel を使うことにより spheroid の形成が可能になった。spheroid の内部では核が凝縮し細胞膜のない状態になり空洞化が起こることが解った(図2)。これらの凝縮した核の周辺は Cleaved caspase 3 の抗体により染色されるので apoptosis による細胞死が起こっていることが確認された。つまり spheroid 内部の空洞化には、栄養不足などによるネクローシスによるものではないことが判明した。

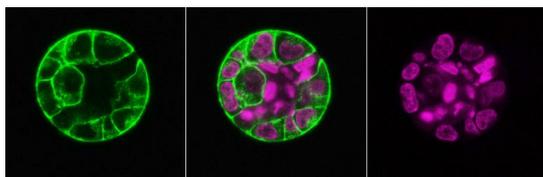


図2 3次元培養した KCOT 細胞
左：アクチン 中：アクチン+核 右：核

(3) KCOT 成立におけるヘッジホッグ情報伝達系の解析

我々の樹立した KCOT 細胞株はいずれも PTCH1 の変異が認められたことから、ヘッジホッグ伝達系の活性化が起こっていると考えられた。しかしながら qPCR を用いた解析及び RNA-seq を用いた解析で、通常活性化されているとされる PTCH1、GLI1 などのヘッジホッグ情報伝達系活性化の指標遺伝子の転写量は非常に少ないことが判明した。さらに pmSmoEGFP を KCOT 細胞に導入した研究から、通常では SMO タンパクの cilia への集積は認められない。つまり活性化が強しくは起こっていないが、ヘッジホッグ情報伝達系の活性化剤である SAG で処理すると SMO タンパクが cilia に集積することがわかった。このことは KCOT 細胞株ではヘッジホッグ情報伝達系の強い活性化は見られないこと、しかし活性化に関与する因子は保持されていることを示している。

(4) 悪性と良性を決める因子の探索：悪性である基底細胞癌 (BCC) におけるヘッジホッグ情報伝達系の解析

基底細胞癌 (BCC) は Gorlin 症候群患者で高頻度に見られる腫瘍である。白人では罹患率の高い腫瘍として有名であるが、有色人種では少なく紫外線の関与などが知られている。日本人由来 BCC の遺伝子解析はほとんど行われていない。我々は 6 例の BCC (sporadic 5 例、Gorlin 症候群 1 例) の PTCH1 および SMO を解析した。その結果 sporadic な BCC 4 例で SMO の変異 W535L 2 例、L412F 2 例を見出した。これらの変異は oncogenic な driver 変異として知られている。この 4 例では PTCH1 遺伝子の異常は見られなかった。また残りの sporadic 1 例では PTCH1 の変異が 2 箇所存在

した。さらに Gorlin 症候群患者の BCC では PTCH1 の生殖細胞系列変異と共に、もう一つのアレルが欠失していることを見出した。この 2 例では SMO の変異は見出だせなかった。これらのことは BCC ではヘッジホッグ系の活性化がその成立に大きく関与していることを示している。しかしながら 2 アレルの PTCH1 活性の喪失は良性腫瘍の KCOT や卵巣線維腫でも起こっていることを見出している。細胞の悪性化には PTCH1 のコピー数の違いだけでは説明できないと思われる。今後はこれら腫瘍におけるヘッジホッグ系以外の変異の可能性を探ることが一つ重要になるとと思われる。また sporadic な BCC で見つかった SMO 遺伝子の L412F 変異は、良性腫瘍として知られる髄膜腫で高頻度に見られる変異である。このことは同じ変異でも細胞種が異なると悪性であったり良性であったりする可能性を示している。今後ヘッジホッグ系以外の遺伝子の関与を調べて行くことが良性、悪性を解析する上で大切であろうことが判明した。

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 6 件)

Noguchi K, Wakai K, Kiyono T, Kawabe M, Yoshikawa K, Hashimoto-Tamaoki T, Kishimoto H, Nakano Y. Molecular analysis of keratocystic odontogenic tumor cell lines derived from sporadic and basal cell nevus syndrome patients. *Int J Oncol*. 51(6) 2017 1731-1738. 査読有
10.3892/ijo.2017.4146.

芝辻豪士, 野口一馬, 山根木康嗣, 岸本裕充, 足立了平. 多数歯の根吸収を伴った腺腫様歯原性腫瘍の 1 例 *日本口腔科学会雑誌* 66(2) 2017 137. 査読有

野口一馬, 川邊睦記, 山根木康嗣, 高岡一樹, 岸本裕充. 全身および口腔内に多発したカボジ肉腫の 1 例 *日本口腔腫瘍学会誌* 29 2017 15-21. 査読有

野口一馬, 岸本裕充, 中野 芳朗. ヘッジホッグシグナルと口腔疾患 *口腔組織培養学会誌* 25 2016 1-7. 査読有

Togo Y, Yoshikawa Y, Suzuki T, Nakano Y, Kanematsu A, Zozumi M, Nojima M, Hirota S, Yamamoto S, Hashimoto-Tamaoki T. Genomic profiling of the genes on chromosome 3p in sporadic clear cell renal cell carcinoma. *Int J Oncol*. 48 2016 1571-80. 査読有
10.3892/ijo.2016.3395

Yoshikawa K, Noguchi K, Nakano Y, Yamamura M, Takaoka K, Hashimoto-Tamaoki T, Kishimoto H. The Hippo pathway transcriptional co-activator, YAP, confers resistance to cisplatin in human oral squamous cell carcinoma. Int J Oncol. 46(6) 2015 2364-70. 査読有 10.3892/ijo.2015.2948.

[学会発表](計 9件)

Nakano Yoshiro, Noguchi Kazuma, Kishimoto Hiromitsu, Hashimoto-Tamaoki Tomoko.

Establishment and molecular analysis of immortalized keratocystic odontogenic tumor cell lines derived from sporadic and Gorlin syndrome patients. 18th International Congress of Developmental Biology 2017.6.19 (Singapore Singapore)

Nakano Yoshiro. Evolution and function of sterol sensing domain protein patched-related(PTR). Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists 50th 2017.5.11. (Tokyo Tokyo)

神田修治, 野口一馬, 川邊睦記, 高岡一樹, 岸本裕充. 角化嚢胞性歯原性腫瘍における NOTCH1 の発現から考察される腫瘍組織の性質. 第 28 回日本口腔科学会近畿地方部会 2016.12.10 (大阪 大阪)

中野 芳朗, 野口一馬, 岸本裕充, 橋本-玉置知子. 角化嚢胞性歯原性腫瘍細胞株の樹立とカルシウムによる分化誘導 第 39 回日本分子生物学会年会 2016.11.30 (神奈川 横浜)

Yoshiro Nakano, Kazuma Noguchi, Hideaki Chiyo, Ritsuko Pooh, Hiromitsu Kishimoto, Tomoko Hashimoto-Tamaoki. Hedgehog signaling and genetic diseases. The 13th International Congress of Human Genetics 2016.4.5. (京都 京都)

Nakano Yoshiro, Noguchi Kazuma, Kishimoto Hiromitsu, Tamaoki Tomoko. The hedgehog signaling pathway and Keratocystic Odontogenic Tumor BMB2015 2015.12.2. (兵庫 神戸)

中野 芳朗, 野口一馬, 千代 豪昭, 夫律子, 岸本裕充, 玉置知子. 歯科領域におけるヘッジホッグ情報伝達系関連遺伝病 日本人類遺伝学会 2015.10.16. (東京 東京)

Noguchi Kazuma, Kishimoto Hiromitsu, Hashimoto-Tamaoki Tomoko, Nakano

Yoshiro. In vitro differentiation of cells from keratocystic odontogenic tumors. The EMBO Meeting 2015 2015. 9.5. (UK Birmingham)

野口一馬, 首藤 敦史, 吉川 恭平, 西田 倫世, 頭司 雄介, 森寺 邦康, 高岡 一樹, 岸本 裕充. 角化嚢胞性歯原性腫瘍培養細胞の細胞生物学的特性. 第 69 回日本口腔科学会学術集会 2015.5.15. (大阪 大阪)

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 知子 (TAMAOKI, Tomoko)
兵庫医科大学・医学部・名誉教授
研究者番号: 10172868

山西 清文 (YAMANISHI, Kiyofumi)
兵庫医科大学・医学部・教授
研究者番号: 10182586

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