

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20911

研究課題名(和文) 巨脳症-毛細血管奇形症候群におけるPI3K/AKT経路の網羅的解析とその制御

研究課題名(英文) Transcriptomics profiling in megalencephaly capillary malformation with impaired PI3K/AKT signaling

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) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：巨脳症-毛細血管奇形症候群は、PI3K/AKT経路の遺伝子異常により巨脳症、結合織の異常、手指の数的異常を来す先天奇形症候群であり、PI3KCA関連過成長スペクトラムに包括される。本疾患患者から樹立した皮膚繊維芽細胞を用いてアレイ解析を行った。創傷治癒時などの皮膚組織増殖に関するWFDC1、KRT17などの10遺伝子の発現増加を認めた。さらにmicroRNAでは、miR-10aの低発現やmiR-27b、miR-138、miR-486の高発現を認め、結合織や骨組織の過剰増殖への関与が示唆された。また巨脳症の臨床像の客観的な評価法の一つとして、脳MRI画像による測定法を確立した。

研究成果の概要(英文)：Megalencephaly capillary malformation (MCAP), caused by impaired PI3K/AKT signaling, is a congenital disease with megalencephaly, abnormal connective tissue, and polydactyly. MCAP is involved in PI3KCA related overgrowth spectrum (PROS). We analyzed transcriptome profiling with fibroblasts, which were derived from healthy and abnormal skin lesion of a PROS patient. In mRNA array, we found 10 genes with over 5-folds upregulation, including WFDC1 and KRT17. In microRNA array, we found down-regulated miR-10a, and up-regulated miR-27b, miR-138, and miR-486. These microRNAs may contribute to pathological overgrowth in PROS via excessive proliferation of fibroblast and osteoblast. Moreover, we established measurement methods to evaluate brain morphology of megalencephaly patients using brain MRI.

研究分野：小児科

キーワード：巨脳症-毛細血管奇形症候群 PI3K/AKT経路 PI3KCA関連過成長スペクトラム microRNA Hedgehog経路

1. 研究開始当初の背景

巨脳症 - 毛細血管奇形症候群 (Megalencephaly-CAPillary malformation: MCAP) は、PI3K/AKT 経路の遺伝子異常により巨脳症、結合織の異常、手指の数的異常を来す先天奇形症候群である。出生後も中枢神経の異常増殖は続き、外科手術を要する高度な水頭症を高率に合併するが、現時点で組織増殖を抑制する特異的な治療薬はない。AKT3、PIK3R2、PIK3CA 遺伝子のミスセンス変異により、PI3K/AKT 経路の恒常的亢進が生じることが原因と推定されているが、下流経路がどのように活性化するか、その詳細な分布は不明であった。本研究では、MCAP における PI3K/AKT3 の下流経路や関連するヘッジホッグ経路の活性化の分布を解析し、分子標的治療の標的部位となる経路を特定することを目標に本研究を開始した。

2. 研究の目的

(1) PI3K/AKT3 経路と Hedgehog 経路(Hh 経路)の相互作用

現在 MCAP は、CLOVES 症候群などの PI3K/AKT 経路に関連する他の過成長疾患と共に PROS に包括させられている。¹

PROS では PI3K/AKT 経路のリン酸化が生じるが、その下流経路は多岐にわたり、実際どのような遺伝子発現の変化がきたすかは不明であった。

そこでヒト検体における PI3K/AKT 変異が遺伝子発現に与える影響を明らかにすることを目的として、PI3K/AKT モザイクに起因する PROS 患者検体を解析した。PI3K/AKT 変異のある病変部位、および変異のない正常部位から樹立した皮膚線維芽細胞を用いて、mRNA 及び microRNA 発現の変化を網羅的に解析することで、さらに 3 人の正常対象者から樹立した線維芽細胞を pool したものを、正常対照群とした。

(2) PI3K/AKT3 経路と Hedgehog 経路(Hh 経路)の相互作用

巨脳症-毛細血管奇形症候群は、巨脳症、結合織の異常、手指の数的異常を来す先天奇形症候群である。PI3K/AKT 経路の異常がどのような機序で手指の数的異常をきたすかは分かっていないが、手指発生を制御において Hh 経路が重要な役割を果たすことが分かっており、² PI3K/AKT 経路と Hh 経路の相互作用に着目して培養細胞における機能解析を行った。

(3) 巨脳症疾患の脳形態評価

巨脳症-毛細血管奇形症候群をはじめとする巨脳症疾患において原因遺伝子である AKT3、PIK3R2、PIK3CA、PTEN 遺伝子の変異は、いずれも PI3K/AKT 経路の恒常的亢進を起こすが、その遺伝子変異 - 表現型相関は明らかではない。表現型を比較するために

は、脳 MRI 画像を用いた脳形態の差異を客観的に評価法することが必要であり、評価法を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) PROS における遺伝子発現の網羅的解析

巨脳症患者 4 人の原因遺伝子として、AKT3、PIK3R2、PIK3CA、PTEN の変異が同定された。そのうち、PIK3CA モザイクによる PROS の症例について、正常皮膚及び病変皮膚から皮膚線維芽細胞を樹立した(各々 n-Fibro、m-Fibro とする)。m-Fibro でのみ PIK3CA のモザイク変異が検出された。各線維芽細胞及び健常者 3 人に由来する線維芽細胞をプールした正常対照(pool-Fibro)について解析を行った。microRNA を含む total RNA を抽出し、吸光度及び Bioanalyzer で品質チェックを行った上で、mRNA は GeneChip[®] Human Gene 2.0 ST array、microRNA は GeneChip[®] miRNA 4.0 Array を用いて網羅的発現解析を行った。

(2) PI3K/AKT3 経路と Hh 経路の相互作用

Hh 経路の機能解析に適したマウス間葉系細胞の cell line である、C3H10T1/2 cell を使用して解析を行った。C3H10T1/2 cell を 10%FBS 添加 DMEM で培養し、リコンビナントヘッジホッグ蛋白 200 ng/ml、SMO アゴニスト (SAG) の培養液への添加、もしくは GLI1 発現ベクター (His-GLI1 PCDNA3) をリポフェクタミンで Transfection することでそれぞれ Hh 経路の活性化を行った。

PI3K/AKT3 経路を特異的に活性化するために恒常活性型の AKT3 の発現ベクター (Myr-AKT3) の一過性強制発現を行った。AKT3 よりも下流の経路阻害として、mTOR、GSK3 の阻害剤をそれぞれ培養液に添加した。

Hh 経路活性の評価には、GLI の Real time RT-PCR、GLI 特異的結合部位をプロモーター領域にもつレポータープラスミド (8x3' Gli-BS Luc PCDNA3) を用いたルシフェラーゼアッセイにより定量化した。

(3) 巨脳症疾患の脳形態評価

脳 MRI 画像の各領域の大きさを客観的に評価する評価法を確立するために、巨脳症を来す Gorlin 症候群患者 9 名及び正常対象 15 名の脳 MRI 画像解析を予備的研究として行った。測定項目は以下の通りとした。

- ・大脳：大脳横径、大脳縦径、Evans Index
- ・脳梁：前後径、厚さ (膝部・体部・膨大部) 矢状断面積
- ・小脳：虫部縦径、虫部前後径、虫部矢状断面積、小脳半球体積
- ・脳幹：橋上下径、橋前後径、橋横径、第 4 脳室横径、延髄前後径

4. 研究成果

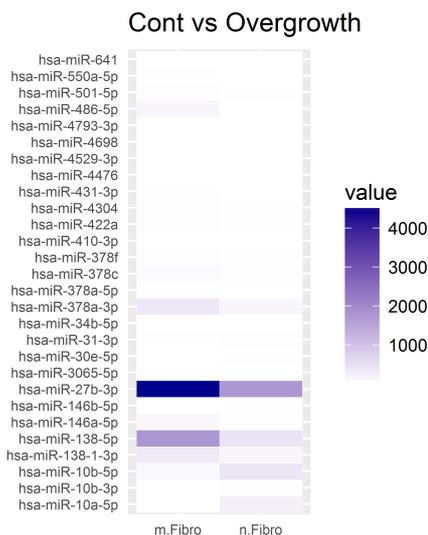
(1) PROS における遺伝子発現の網羅的解析
 まず mRNA 発現については、PIK3CA のモザイク変異を伴う m-Fibro で、n-Fibro と pool-Fibro の何れよりも 5 倍以上発現が亢進している遺伝子を抽出した。WFDC1、L1CAM、IGFBP2、CORIN、PDE1C、MT1F、OLFM2、MYH11、MX1、KRT17 の発現増加を認めた。特に WFDC1、KRT17 は創傷治癒時などの皮膚組織増殖に関与することが知られており、PROS 発症への関与が疑われる。

次に microRNA 発現については、m-Fibro で、n-Fibro と pool-Fibro の何れよりも 2 倍以上の変化を来した microRNA をその発現量と共に Heat map で提示した(図 1)。miR-10a を含む 6 つの microRNA の低発現と、miR-27b、miR-138、miR-486 を含む 22 個の microRNA の高発現を認めた。

miR-10a は頸部腫瘍³、食道癌⁴、慢性骨髄性白血病⁵ で低発現なことが報告されており、また miR-10a は骨芽細胞分化に抑制的に働くことが知られている⁶。miR-27b は頸部腫瘍で高発現で細胞増殖に促進的に働く⁷。miR-138 は過剰な癒痕形成における細胞分化に関与している⁸。また、miR-486 は石灰化した心臓弁で高発現であり、筋芽細胞において Runx2、Osx などの石灰化関連遺伝子を誘導することが報告されている⁹。

このことから PROS においても miR-10a の低発現や miR-27b、miR-138、miR-486 の高発現が結合織や骨組織の過剰増殖に関与している可能性が示唆された。

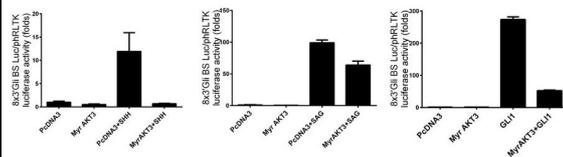
図 1 PROS 患者の病変部から樹立した線維芽細胞で 2 倍以上の変化を来した microRNA



(2) PI3K/AKT3 経路と Hh 経路の相互作用
 PI3K/AKT3 経路と Hh 経路の相互作用について C3H10T1/2 細胞で評価した。恒常的活性型の AKT3 発現ベクター (Myr-AKT3

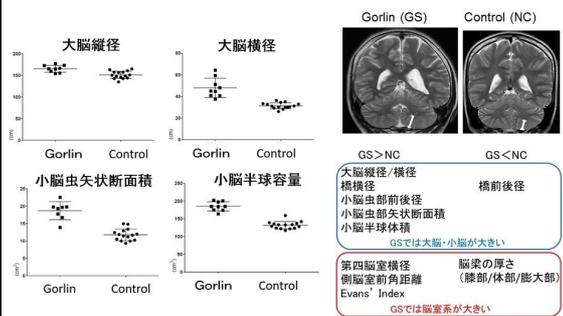
PCDNA3) もしくは Backbone vector の一過性強制発現を行い、それぞれ リコンビナントヘッジホッグ蛋白刺激、SMO 刺激薬 (SAG)、GLI1 発現 vector の一過性強制発現により Hh 経路の刺激を行い、ルシフェラーゼアッセイ及び real time RT-PCR により Hh 経路活性を評価した。何れの Hh 経路亢進も、PI3K/AKT3 経路の活性化により強く抑制された。PI3K/AKT3 経路の亢進が Hh 経路を抑制することを初めて確認した(図 2)。さらに PI3K/AKT3 活性による Hh 経路の抑制効果は、mTOR 阻害剤・GSK3 阻害剤のいずれの投与でも不変であり、Hh 経路の抑制は PI3K/AKT 経路の下流蛋白ではなく、AKT と Hh 経路構成蛋白の蛋白相互作用の可能性が示唆された。

図 2 PI3K/AKT3 経路亢進による Hedgehog 経路活性の抑制



(3) 巨脳症疾患の脳形態評価
 脳形態の客観的評価を行うための解析法を確立するために、本疾患と同様に巨脳症を呈する Gorlin 症候群患者の脳 MRI 画像の解析を行った。大脳・小脳が優位に大きい一方で、脳室系は拡大し、脳梁などの菲薄化を認める傾向が明らかとなり、学会・論文報告を行った(図 3)¹⁰。今後は本解析法を用いて、すでに原因遺伝子の同定された巨脳症症例について遺伝子変異 - 表現型の関連について解析する予定である。

図 3 Gorlin 症候群の脳形態分析



[参考論文]
 1. Keppler-Noreuil KM, et al. PIK3CA-related overgrowth spectrum (PROS): Diagnostic and testing eligibility criteria, differential diagnosis, and evaluation. Am J Med Genet A 2015; 167A:287-95.
 2. Malik S. Polydactyly: phenotypes, genetics and classification. Clin Genet.

- 2014; 85:203-12.
3. Zou D, et al. The Downregulation of MicroRNA-10b and its Role in Cervical Cancer. *Oncol Res.*2016;24:99-108
 4. Li J, Zhang Y, Zhao Q, Wang J, He X. MicroRNA-10a Influences Osteoblast Differentiation and Angiogenesis by Regulating β -Catenin Expression. *Cell Physiol Biochem.* 2015;37:2194-208.
 5. Agirre X, et al. Down-regulation of hsa-miR-10a in chronic myeloid leukemia CD34+ cells increases USF2-mediated cell growth. *Mol Cancer Res.* 2008;6:1830-40.
 6. Inoue N, et al. Down-regulation of microRNA 10a expression in esophageal squamous cell carcinoma cells. *Oncol Lett.* 2010;1:527-31.
 7. Yao J, et al. miR-27b is upregulated in cervical carcinogenesis and promotes cell growth and invasion by regulating CDH11 and epithelial-mesenchymal transition. *Oncol Rep.* 2016;35:1645-51.
 8. Xiao YY, et al. MiR-138/peroxisome proliferator-activated receptor β signaling regulates human hypertrophic scar fibroblast proliferation and movement in vitro. *J Dermatol.* 2015;42:485-95.
 9. Song R, et al. Altered MicroRNA Expression Is Responsible for the Pro-Osteogenic Phenotype of Interstitial Cells in Calcified Human Aortic Valves. *J Am Heart Assoc.* 2017;6:e005364.
 10. Shiohama T, et al. Brain morphology in children with nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Am J Med Genet A.* 2017; 173A:946-52.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Shiohama T, Fujii K, Miyashita, Mizuochi H, Uchikawa H, Shimojo N. Brain morphology in children with nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Am J Med Genet A.*2017;173:946-952.doi:10.1002/ajmg.a.38115.(査読あり)

〔学会発表〕(計3件)

Shiohama T. Brain morphology in children with nevoid basal cell carcinoma syndrome. The 13th International Congress of Human Genetics. 2016年4月3日, 京都国際会議場(京都府, 京都市)

塩浜 直. Gorlin 症候群における脳形態解析 - ヘッジホッグシグナルのヒト脳への影響 - .第58回日本小児神経学会学術集会.2016年6月3日, 京王プラザホテル(東京都, 新宿区)

Shiohama T. Brain morphology in children with Gorlin syndrome. The 45th

Annual Child Neurology Society Meeting. 2016.10.26. (Vancouver, BC, Canada.)

〔図書〕(計0件)

6. 研究組織

(1)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