

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08252

研究課題名(和文)ヘッジホッグ異常症の病態解明と効果的阻害薬の同定

研究課題名(英文)Identification of hedgehog signal inhibitors in tumors

研究代表者

藤井 克則 (FUJII, KATSUNORI)

千葉大学・大学院医学研究院・特任教授

研究者番号：70344992

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ヘッジホッグ異常症はヘッジホッグシグナル構成分子の異常により発症する疾患群である。今回ヘッジホッグの受容体PTCH1の変異で発症するGorlin症候群の患者細胞を用い、阻害薬は千葉大学薬学部石橋研究室の天然化合物ライブラリーを用い、Gorlin症候群患者由来皮膚線維芽細胞に対して48時間添加し、細胞を破碎してRT-PCRにより下流のGli1 mRNAを測定することで阻害効果を判定した。効果判定には阻害剤として確立しているvismodegibとcyclopamineを用いて合計10種類の天然化合物を同定した。興味深いことに6種で共通の中心構造を有しておりこれが阻害効果を示していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヘッジホッグシグナル異常症の効果的阻害薬は将来発症する癌の治療および予防に不可欠である。既存のvismodegibが粘膜症状や消化管障害のために臨床応用が滞る状況で、今回の新たな阻害薬の同定は今後の治療薬確立の第一歩となると考えられる。現在阻害効果の分子的部位の同定のため、PTCH1, SMO, Gli2, およびGli3のmRNA測定を行っており、vismodegibの抑制効果と比較することで臨床応用の可能性について検討している。本経路の異常で発症する基底細胞癌や髄芽腫の今後の治療に新たな展望を与えるとともに、将来のGorlin症候群を始めとする遺伝病治療の契機になることに異議深いと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Hedgehog signaling disorder is usually caused by the abnormal hedgehog signaling due to genetically mutations in these component genes. In this study, we utilized skin fibroblasts derived from the patients with Gorlin syndrome, a hereditary neurocutaneous syndrome with palmar and plantar pits, rib abnormalities, falx calcification, medulloblastoma, and keratocystic odontoid tumors, to this study in order to find novel small compounds which inhibit hedgehog signaling. Dr. Ishibashi, pharmacologist in the Chiba University kindly gave us his natural compound library. We applied these small compounds to the fibroblasts, and analyzed Gli1 mRNA by RT-PCR. We finally found 10 small compounds, and interestingly six compounds had similar central structures. These inhibitory effects were compared to those of cyclopamine and vismodegib, resulting in identifying novel compounds showing anti-signaling effect.

研究分野：小児神経学、遺伝性腫瘍

キーワード：ヘッジホッグシグナリング Gorlin 症候群 PTCH1 ヘッジホッグ 基底細胞癌 髄芽腫 基底細胞母斑症候群 Gli1

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヘッジホッグシグナルは細胞の増殖経路であり、分泌タンパクのヘッジホッグ、受容体の PTCH1、隣接タンパクの SMO、下流の GLI から成る。これらは細胞の分化増殖を抑制的に制御し、胎生期には身体奇形発生に、成人発達期には皮膚癌形成に関与する。すなわちヘッジホッグシグナルは生物種間で保存された増殖経路であり、その亢進はヒトで Gorlin 症候群(身体奇形)と癌発生を来す。発生する癌には皮膚癌と小脳腫瘍があるが難治で再発も多いため特異的な経路阻害薬が待望されている。2012 年にヘッジホッグシグナル初の阻害薬 vismodegib が FDA に認可されたが重度の副作用が判明したため、用量を抑えた combination therapy が提唱されている。我々は 2017 年に世界で初めて Gorlin 症候群の iPS 細胞を作製報告し、また 2018 年に microRNA を用いた新たな阻害経路を同定した。同意を得て採取した患者由来線維芽細胞とそれから作成した疾患 iPS 細胞に対して、千葉大学の天然化合物ライブラリーおよび合成化合物ライブラリーから得た候補薬剤を用い経路の RT-PCR を行うことで効果的な阻害薬の同定を目指すこととした。

2. 研究の目的

Gorlin 症候群は PTCH1 遺伝子変異で発症する高発癌性遺伝疾患であり、亢進したヘッジホッグ経路のモデル疾患である。この亢進シグナルをいかに抑制するかが「核心をなす学術的「問い」」である。ヘッジホッグシグナルには標準的経路 (canonical pathway) と非標準的経路 (non-canonical pathway) の 2 つが存在し、vismodegib が標準的経路を阻害するのに加えて非標準的経路を組み合わせることで、効果的に阻害できることが報告されている (2018 Nature)。microRNA のいくつかのタイプは non-canonical pathway で阻害することを見出したが (unpublished data) その阻害効果は十分でなく canonical pathway の強力な阻害薬がやはり不可欠と考えられている。ヘッジホッグシグナル異常症の効果的阻害薬は将来発症する癌の治療および予防に不可欠である。既存の vismodegib が粘膜症状や消化管障害のために臨床応用が滞る状況にある。新たな阻害薬の同定は今後の治療薬確立の第一歩となると考えられる。本研究の目的はヘッジホッグ経路の異常で発症する基底細胞癌や髄芽腫の今後の治療に新たな展望を与え、将来の Gorlin 症候群を始めとする遺伝病治療の契機となる阻害剤の探索である。

3. 研究の方法

ヘッジホッグの受容体 PTCH1 の変異で発症する Gorlin 症候群の患者由来線維芽細胞とそれから作成した疾患 iPS 細胞に対して、千葉大学薬学部石橋研究室の天然化合物ライブラリーおよび合成化合物ライブラリーから得た候補薬剤を 48 時間添加し、細胞内容液の RT-PCR により下流の GLI mRNA を測定することで阻害効果を判定する。さらに疾患由来 iPS 細胞を用いて組織分化時期による阻害効果の変化を測定する。

新たな天然・合成ライブラリーと阻害薬の同定：阻害剤の探索に千葉大学薬学部が保有する天然化合物ライブラリーと、千葉大学理学部が保有する合成化合物ライブラリーを用いる。すでにマウス細胞を用いて、天然化合物ライブラリーから複数の候補阻害薬を同定していたが、阻害効果の確立した cyclopamine と vismodegib を用いることで、小化合物の阻害作用を比較しその効果を同定する。

Gorlin 症候群由来ヒト iPS 細胞の作製：我々はヘッジホッグシグナルが亢進している Gorlin iPS 細胞を 4 クローン作製し、神経と皮膚への臓器分化に成功している (2017 J Med Genet)。また 2 クローンでゲノム編集にも成功し (PTCH (+,+), (+,-), (-,-)) 薬剤による阻害効果を的確に判定できる遺伝的背景が同一なヒト細胞がある。これらを用いることで阻害効果を認めた小化合物が発生のどの時期に効果を発揮するか判定する。

非標準的経路での阻害分子の同定：今までに microRNA 解析により、mir196a が非標準経路である MAP キナーゼを介してヘッジホッグシグナルを抑制することを報告し (2018 J Hum Genet) Gorlin iPS 細胞の解析より、分化段階でこの非標準的回路が抑制することを見出している。これら mir196a がヒト線維芽細胞においても阻害効果があるかどうかを検証し、臨床応用が可能かどうかを検討する。

4. 研究成果

天然化合物ライブラリーから 10 種類の候補薬剤を同定し、その阻害効果と至適薬量を確認中である。興味深いことにこれら 10 化合物の 6 つにおいて中心に同じ化学構造式を有しており、その派生構造で阻害効果が変わることを見出した。阻害の分子部位同定のため、PTCH1, SMO, GLI2, および GLI3 の mRNA 測定を行っており、vismodegib と cyclopamine と比較することで阻害効果を確かめており、阻害データに基づいた臨床応用を検討している。Gorlin 症候群患者由来 iPS 細胞では未分化の状態ではヘッジホッグ経路が活性化していないことが判明し

この時期の阻害剤による阻害効果は認めなかった。しかし iPS 細胞の分化に伴いヘッジホッグ経路は活性化すること、この時期に阻害剤は有効であることが明らかとなった。これにより阻害剤の投与時期は経路が活性化している状態が最も効果あり、細胞の GLI1mRNA を測定し亢進していることが確認できた時点で最も効果が見られることを見出した。このように阻害剤を用いる時期と評価方法が明らかになった点が本研究の成果と考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

| | |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名 Ikemoto Yu, Miyashita Toshiyuki, Nasu Michiyo, Hatsuse Hiromi, Kajiwara Kazuhiro, Fujii Katsunori, Motojima Toshino, Kokido Ibuki, Toyoda Masashi, Umezawa Akihiro | 4. 巻 12 |
| 2. 論文標題 Gorlin syndrome-induced pluripotent stem cells form medulloblastoma with loss of heterozygosity in PTCH1 | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Aging | 6. 最初と最後の頁 9935 ~ 9947 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18632/aging.103258 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------|--|--------------------------------|----|
| 研究分担者 | 宮下 俊之 (MIYASHITA TOSHIYUKI) (60174182) | 北里大学・医学部・教授 (32607) | |
| 研究分担者 | 塩浜 直 (SHIOHAMA TADASHI) (10737034) | 千葉大学・医学部附属病院・助教 (12501) | |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| | |
|---------|---------|
| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|