

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 24 日現在

機関番号：12501  
研究種目：基盤研究(C)  
研究期間：2012～2014  
課題番号：24591502  
研究課題名(和文)ヘッジホッグシグナリングにおける分子調節機構の解明

研究課題名(英文)Hedgehog signaling in murine and human

研究代表者  
藤井 克則(Fujii, Katsunori)  
千葉大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：70344992  
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：ヘッジホッグ経路は形態形成や細胞増殖において高度に保存された経路であり、その阻害薬は抗腫瘍薬として既に臨床応用されている。Gorlin症候群はヘッジホッグ受容体のPTCH1変異により発症するが、シグナルを亢進させて奇形形成・高発癌性を示す。我々はマウス胎児間葉系細胞(C3H10T1/2)を用いて酸化ストレスはリン酸化JNK1によるGLI1の抑制を介してヘッジホッグ経路依存性の骨芽細胞分化を抑制すること、またPTCH1変異が同定されているGorlin症候群患者の皮膚線維芽細胞を用いてヘッジホッグ経路は定常的に亢進しており刺激薬・阻害薬に対する反応が皮膚線維芽細胞でも保持されていることを見出した。

研究成果の概要(英文)：Hedgehog signaling is a pivotal developmental pathway that comprises hedgehog, PTCH1, SMO, and GLI proteins. Mutations in PTCH1 are responsible for Gorlin syndrome, which is characterized by developmental defects and tumorigenicity. In order to elucidate the mechanism by which transduction of the hedgehog signal is regulated in tissues, we employed murine C3H10T1/2 cells and human fibroblasts. We investigated GLI1 transcription to assess native signal transduction, and then treated cells with a recombinant human hedgehog protein with or without serum deprivation. Hedgehog stimulation and nutritional deprivation synergistically enhanced GLI1 transcription levels, which was blocked more efficiently by vismodegib. These results indicated that the hedgehog stimulation and nutritional deprivation synergistically activated the hedgehog signaling pathway. These fibroblasts may become a significant tool for predicting the efficacies of hedgehog molecular-targeted therapies such as vismodegib.

研究分野：小児神経学

キーワード：ヘッジホッグ 形態形成 癌形成 高発癌性遺伝 Gorlin症候群 ゴーリン症候群 PTCH1

1. 研究開始当初の背景

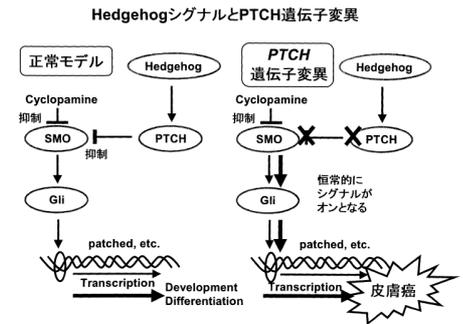
ヘッジホッグシグナル経路は細胞の増殖経路であり、種を超えて高度に保存されている。経路はリガンドのヘッジホッグ、受容体の PTCH、隣接遺伝子の SMO、転写因子の Gli から構成される。

1996 年のノーベル医学生理学賞が個体発生遺伝子制御メカニズムの解明に与えられたように種を超えて存在する共通の分子機構の解明はヒト疾患の治療・予防上、極めて重要である。中でもヘッジホッグ経路は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 から成り、細胞の分化増殖を抑制的に制御し、胎生期には形態形成に、発達・成人期には癌形成に深く関与する(右図)。近年皮膚癌、髄芽腫や上部消化管癌(胃癌、食道癌、膵臓癌)の発生に本経路が必須であることが判明し、さらに構成分子である SMO を抑制する小分子に皮膚癌への治療効果があることも報告され(N Engl J Med 2009)。本分野の国際競争は熾烈さを極めて

いる。Gorlin 症候群は PTCH1 を責任遺伝子(癌抑制遺伝子)とする奇形症候群である。本疾患は高発癌性疾患としても知られるが、興味ある現象として皮膚に対し放射線照射すると照射皮膚領域に新たな基底細胞癌が群発することが知られている(次項写真)。我々は Gorlin 症候群患者由来の細胞に X 線を照射すると、DNA 複製が亢進し(Biochem Biophys Res Commun 1997)、照射に起因するアポトーシスが著明に抑制される(Jpn J Cancer Res 1999)ことを見出した。また放射線等で誘発されるアポトーシスシグナルはタンパク相互作用によって調節され(Proc Natl Acad Sci U S A 2001)、キナーゼ調節のリン酸化部位が存在すること(Oncogene 2003)を報告した。さらに日本人 Gorlin 症候群患者における PTCH 遺伝子変異を体系的に明らかに

し(Hum Mutat 2003)、PTCH1 遺伝子は形態形成において臓器特異的にアイソフォームを形成すること(Hum Mol Genet 2005)、PTCH1 スプライシング異常は U7RNA を用いて補正可能であること(Biochem Biophys Res Commun, 2007)、PTCH1 変異が Alu

配列を介して行われること(Hum Genet 2007)、骨形成コントロールに PTCH1 遺伝子が不可欠



であること(Dev Cell 2008)、PTCH1 全欠損が患者の 16%で見られること(Clin Genet 2011)を相次いで示してきた。近年では本邦 Gorlin 症候群の全国調査(厚労省班研究 2010)を行い国内に 308 名の Gorlin 症候群患者が存在すること(Child Neuropsychiatr 2010)、欧米に比して日本では基底細胞癌発症率が極端に低く、保健行政上留意すべきこと(Europediatrics 2011)を報告している。しかし一連のヘッジホッグ/PTCH 研究の中で、Gorlin 症候群のモデル動物(PTCH +/- mouse)を用いた実験は多いもののヒト Gorlin 症候群の組織での検討は極めて少なく、その意義はヒトでは十分に確かめられていない。我々は NBCCS 患者の検討の中でヒト組織(線維芽細胞、リンパ芽球細胞)を数多く保有している。本研究ではモデル動物で確認された事実を我々の持つヒト Gorlin 症候群細胞を用いて解析することで、本経路阻害剤を利用した治療応用を目指すとともに、ヘッジホッグシグナリングがヒト形態形成および恒常性維持に及ぼす影響について幅広く検証することを目的とした。

2. 研究の目的

ヘッジホッグ経路は、形態形成や細胞増殖、腫瘍形成において重要な経路であり、

その経路阻害薬は抗腫瘍薬として開発・使用されている。Gorlin 症候群はヘッジホッグ受容体である PTCH1 変異を有するため、ヘッジホッグシグナルが亢進し、奇形形成・高発癌性を示す。Gorlin 症候群患者におけるヘッジホッグシグナル伝達の解明、経路阻害薬の効果を確かめることを目的とした。また一方で、形態形成と発癌を制御するヘッジホッグ経路は、骨芽細胞分化を促進性に制御する。骨粗鬆症の発症において酸化ストレスの関与が指摘されており、その一部はヘッジホッグ経路依存性の骨芽細胞分化の抑制に起因する。しかし酸化ストレスがヘッジホッグ経路を抑制する機序は不明であり、本研究によりその詳細な機序を明らかにする。

### 3. 研究の方法

PTCH1 変異が同定されている Gorlin 症候群患者の皮膚線維芽細胞を用い、ヘッジホッグ経路刺激薬・阻害薬、臨床使用されているビスモデギブによる刺激を行い、細胞内シグナル伝達の変化を GLI1 の mRNA を定量的に測定した。また、Gorlin 症候群患者皮膚線維芽細胞において、ヘッジホッグ経路の伝達に必須である一次線毛を免疫染色し、飢餓時、経路刺激時の一次線毛保持細胞の割合を検討した。

またマウス胎児間葉細胞 (C3H10T1/2) を用いて recombinant sonic hedgehog (shh) による骨芽細胞分化誘導を行い、過酸化水素による酸化ストレスの影響を検討した。ヘッジホッグ経路の活性は Real time RT-PCR 及び 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を用いたルシフェラーゼアッセイにより定量化した。骨芽細胞分化は骨芽細胞関連の遺伝子の評価と von Kossa 染色による石灰化の検出により評価した。

### 4. 研究成果

Gorlin 症候群患者では、非刺激状態においても GLI1 の上昇を認め、定常状態におけるヘッジホッグ経路の亢進が示された。また、ヘッジホッグ刺激時では、細胞を飢餓状態にすることでより著明に GLI1 が亢進した。一次線毛を有する細胞の割合は細胞を飢餓状態にすることで上昇したが、Gorlin 症候群患者と非疾患ヒト線維芽細胞では差は認めなかった。抗腫瘍薬であるビスモデギブ刺激では、ヘッジホッグにより亢進した GLI1 が著明に減少し、その抑制効果はシクロパミンと比較し顕著であった。またヘッジホッグ関連遺伝子の網羅的解析では、シグナル亢進状態で ZIC1、ZIC2 が上昇、BMP4 が著明に低下していた。これらより、Gorlin 症候群患者線維芽細胞において、Hh 経路は定常的に亢進しており、刺激薬・阻害薬に対する反応が保持されている。また、血清飢餓状態で薬剤の効果は相乗的に亢進することが確認された。今後、治療薬への反応性や抵抗性、副作用の確認において、ヒト皮膚線維芽細胞の使用が有用であると考えられた。

また、shh により *Gli1* 及び骨芽細胞関連遺伝子である *Alp*、*Bsp* の転写が誘導される一方、これらは酸化ストレスにより抑制された。酸化ストレスは JNK1 のリン酸化を誘導し、JNK 活性作用を持つアニソマイシンや JNK1 の一過性強制発現によっても骨芽細胞分化は抑制された。また GLI1 の一過性強制発現による活性化されたヘッジホッグ経路も、同様に酸化ストレスや一過性強制発現された JNK1 で抑制された。これらの抑制効果は JNK 阻害剤によって回復したことから、GLI1 と JNK1 の相互作用がヘッジホッグ経路の抑制の機序と考えられた。これらの結果より、shh は GLI1 の発現亢進を介して骨芽細胞分化を誘導することが判明した。酸化ストレスは、リン酸化 JNK1 による GLI1 の抑制を介して、ヘッジホッグ経路依

存性の骨芽細胞分化を抑制すると考えられる。

#### 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 11 件)

Mizuochi H, Fujii K, Shiohama T, Uchikawa H, Shimojo N. Hedgehog signaling is synergistically enhanced by nutritional deprivation and ligand stimulation in human fibroblasts of Gorlin syndrome. *Biochem Biophys Res Commun*, 査読有 2015;457:318-23. doi:10.1016/j.bbrc.2014.12.108.

Tanaka T, Arai M, Jiang X, Sugaya S, Kanda T, Fujii K, Kita K, Sugita K, Imazeki F, Miyashita T, Kaneda A, Yokosuka O. Downregulation of microRNA-431 by human interferon- $\beta$  inhibits viability of medulloblastoma and glioblastoma cells via upregulation of SOCS6. *Int J Oncol*, 査読有 2014;44:1685-90. doi: 10.3892/ijo.2014.2317.

Shiohama T, Fujii K, Uchikawa H, Takatani T, Mizuochi H, Kohno Y. Oxidative stress-induced JNK1 phosphorylation inhibits hedgehog signaling and osteoblast differentiation. *Cell Biol Int Report*, 査読有 2014;21:53-62. doi: 10.1002/cbi3.10017.

Fujii K, Miyashita T. Gorlin syndrome (nevoid basal cell carcinoma syndrome) -an update and literature review-. *Pediatr Int*, 査読有, 2014;56:667-74. doi: 10.1111/ped.12461.

Fujii K, Ohashi H, Hatsuse H, Uchikawa H, Miyashita T. Frameshift mutation in the *PTCH2* gene can cause nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Fam Cancer* 査読有、2013;12: 611-4. doi:10.1007/s10689-013-9623-1.

Suzuki M, Nagao K, Hatsuse H, Sasaki R, Saito K, Fujii K, Miyashita T. Molecular pathogenesis of keratocystic odontogenic

tumors developing in nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 査読有、2013;116:348-53. doi:10.1016/j.oooo.2013.06.017.

Fujita Y, Fujii K, Miyashita T. Falx cerebri calcification and microphthalmia in Gorlin syndrome. *Neurol Clin Neurosci* 査読有、2013; 1:88-9. doi: 10.1002/ncn3.17

古賀陽子, 藤井克則, 西條英人, 平松信旭, 森良之, 高戸毅. PTCH1 遺伝子のスプライシング変異を認めた母斑基底細胞癌症候群の 1 例. *日本歯科口腔外科学会雑誌*, 査読有、第 59 巻、2013、367-371.

Tanaka T, Sugaya S, Kita K, Arai M, Kanda T, Fujii K, Imazeki F, Sugita K, Yokosuka O, Suzuki N. Inhibition of cell viability by human IFN- $\beta$  is mediated by microRNA-431. *Int J Oncol* 査読有 2012;40: 1470-6. doi: 10.3892/ijo.2012.1345.

Kosaki R, Nagao K, Kameyama K, Suzuki M, Fujii K, Miyashita T. Heterozygous tandem duplication within the *PTCH1* gene results in nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Am J Med Genet* 査読有、2012;158A:1724-8. doi:10.1002/ajmg.a.35412.

Suzuki M, Hatsuse H, Nagao K, Takayama Y, Kameyama K, Kabasawa Y, Omura K, Yoshida M, Fujii K, Miyashita T. Selective haploinsufficiency of longer isoforms of *PTCH1* protein can cause nevoid basal cell carcinoma syndrome. *J Hum Genet* 査読有、2012;57:422-6. doi: 10.1038/jhg.2012.45.

〔学会発表〕(計 4 件)

第 56 回日本小児神経学会学術総会:アクトシティ浜松(静岡県・浜松市)2014.5.29 - 5.31

Shiohama T, Fujii K, Mizuochi H, Uchikawa H, Kohno Y. Oxidative-stress induced JNK1 phosphorylation inhibits hedgehog signaling

and osteoblast differentiation

Keystone Symposium on Cilia,  
Development and Human Disease (C1), March  
2-7, 2014, Tahoe City ( USA ) . Hedgehog  
signaling is enhanced by nutritional  
deprivation in human fibroblasts of Gorlin  
syndrome.

Ikehara H, Mizuochi H, **Fujii K**, Shiohama T,  
Uchikawa H, Shimojo N.

7<sup>th</sup> IGAKUKEN International Symposium  
on “Fever, Inflammation, and Epilepsy”  
東京都医学総合研究所( 東京 ) February 21,  
2014.

Mizuochi H, Shiohama T, Uchikawa H, **Fujii  
K**. Hedgehog signaling is enhanced by  
nutritional deprivation in human fibroblasts of  
Gorlin syndrome

〔図書〕(計 3 件)

1. **藤井克則**、宮下俊之。「ゴーリン症候群」  
日本臨床 新領域別症候群シリーズ No.  
28。神経症候群(第2版) 581-4。日  
本臨床社(東京)2014。
2. **藤井克則**、宮下俊之。「Gorlin 症候群」  
日本臨床 新領域別症候群シリーズ No.  
29。神経症候群(第2版) その他の  
神経疾患を含めて 744-7。日本臨床社  
(東京)2014。
3. **藤井克則**、宮下俊之。「ゴーリン症候群」  
p. 704-711。「稀少疾患・難病の診断/治  
療技術と製品開発」技術情報協会(東  
京)2012。

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.pediatrics-chiba-u.org/research/group\\_nerve.html](http://www.pediatrics-chiba-u.org/research/group_nerve.html)

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

藤井 克則 (FUJII Katsunori)

千葉大学・大学院医学研究院・講師

研究者番号 : 70344992