

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：17501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591517

研究課題名(和文)十二指腸閉鎖発症機序の解明：ダウン症候群におけるソニックヘッジホッグ経路の関与

研究課題名(英文) The Sonic Hedgehog signaling pathway involves duodenal atresia in patients with Down syndrome

研究代表者

秋吉 健介 (Akiyoshi, Kensuke)

大分大学・医学部・客員研究員

研究者番号：70305043

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)：Down症候群(DS)の十二指腸閉鎖合併機序についてSonic Hedgehog(SHH)経路関連因子の発現を検討した。対象はDS21例で、うち十二指腸閉鎖合併2例であった。血漿中のアミロイド(A)をELISAにて測定し、DSではコントロールの1.67倍高値だった。血漿PTCH1蛋白量はPTCH1 mRNA発現量との相関はなく、Aが高値である症例がPTCH1蛋白量が高値であった。十二指腸狭窄部位の病理ではPTCH1、GLI3が強発現していた。DSの十二指腸閉鎖は、Aが高値であるためPTCH1が高発現し、SHH経路が抑制されることが一因であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We examined relevance of the Sonic Hedgehog pathway for the duodenal atresia in Down syndrome because its signaling plays an important role in development of the gastrointestinal tract. The subjects were used plasma and leukocytes for material specimen from 21 patients of Down syndrome included a patient with duodenal atresia and 10 healthy individuals. Amyloid protein levels were elevated 1.67 fold high value in patients with Down syndrome as compared with healthy controls by ELISA. Furthermore, overexpression of PTCH1 and GLI3 were immunohistologically confirmed at a lesion of duodenal atresia in a Down syndrome patient. There is no correlation in the PTCH1 mRNA expression level and the amount of PTCH1 proteins. Western blot analysis revealed that the PTCH1 proteins became high levels when amyloid proteins was high value in plasma of Down syndrome. We suggested that the duodenal atresia in Down syndrome might be caused by high expression of PTCH1 protein.

研究分野：小児科学

キーワード：Down症候群 十二指腸閉鎖 Sonic Hedgehog経路 アミロイド PTCH1

1. 研究開始当初の背景

十二指腸閉鎖は 10,000 人のうち 1 人に発症し、そのうち、およそ 1/3 が Down 症候群である。一方、Down 症候群で十二指腸閉鎖を合併するのは 1-5% であり、Down 症候群全員に認められる異常ではない。Down 症候群においては十二指腸閉鎖だけでなく、鎖肛、食道閉鎖など、合併しやすい消化管奇形は全て閉鎖もしくは狭窄性病変である。なぜ Down 症候群が十二指腸閉鎖を合併しやすいのかという点について言及された過去の報告はない。

十二指腸は、発生 2 か月頃に内皮細胞の増殖により一旦閉鎖し、その後再開通する³⁾。十二指腸をはじめとする腸管の発生メカニズムには Sonic Hedgehog シグナル伝達経路が関与しており、構成遺伝子のノックアウトマウスは種々の消化管狭窄や低形成を生じる。

Sonic Hedgehog シグナル伝達経路は中枢神経系、特に小脳の発生にも深く関与している。Down 症候群のモデルマウスは Hedgehog シグナルへの反応が乏しく、小脳の顆粒細胞や Purkinje 細胞が減少しており、発育が悪い。Down 症候群が Alzheimer 病を合併しやすい理由として、21 番染色体上にある Amyloid β (A β) precursor protein 遺伝子が過剰発現するためであることが明らかになっている。近年、A β precursor protein が Down 症候群モデルマウスにおいて Sonic Hedgehog 経路の P $tch1$ を過剰発現させ、細胞分化・増殖を抑制することが示された。我々は、21 番染色体がトリソミーであることが、Sonic Hedgehog 経路が正常に伝達することを阻害し、十二指腸の発生に問題が生じるという仮説を立て、A β と Sonic Hedgehog 経路に着目し、研究を行った。

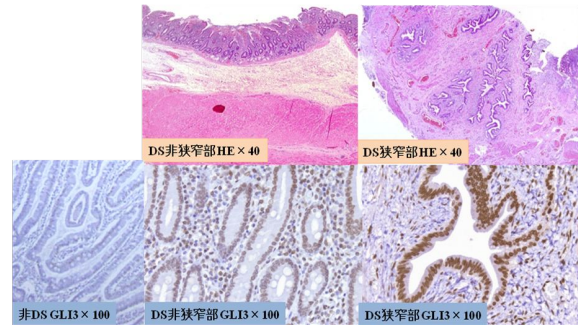
2. 研究の目的

Down 症候群における十二指腸閉鎖の合併機序に Sonic Hedgehog 経路が関与していることを明らかにすること。

3. 研究の方法

対象は大分大学附属病院小児科で管理している Down 症候群 21 例(男:女 = 12:9、年齢:0.17-29.3 歳(中央値 8.6 歳))で、そのうち十二指腸閉鎖合併 2 例、非合併 19 例である。末梢血液を採取後、遠心分離法にて白血球と血漿に分離後、血漿を A β 蛋白測定、PTCH1 蛋白 Western blotting に使用し、白血球から抽出した mRNA をリアルタイム PCR に使用した。健常コントロールは 10 例(男:女 = 4:6、年齢:0.3-33.2 歳(中央値 6.3 歳))のデータと比較検討した。病理学的には Down 症候群の十二指腸閉鎖合

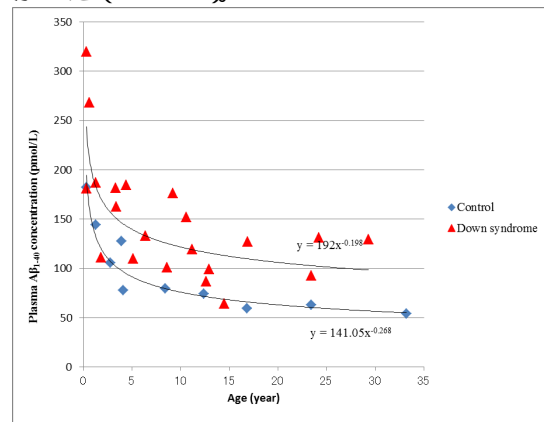
併 1 例の手術標本のうち狭窄部位と非狭窄部位、非 Down 症候群例として結節性硬化症剖検例の正常十二指腸部位を比較検討した。



4. 研究成果

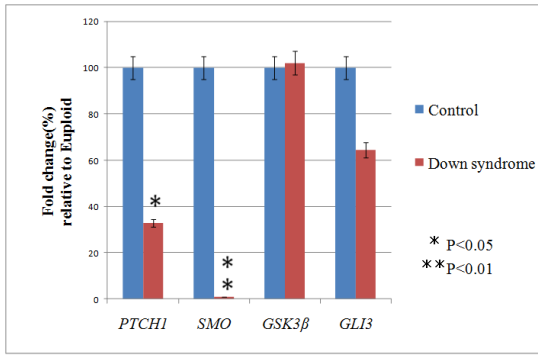
Level of β Amyroid β 1-40 & 1-42 by ELISA

血漿中の A β 蛋白 1-40 は、健常児でも Down 症候群児でも、乳児期において最も高く、小児期にかけて減少し、成人期にはプラトー値であった。Down 症候群児では健常児よりおよそ 1.5 倍高値であった。アミロイド β 蛋白 1-42 においても、Down 症候群は健常人より高かった ($P < 0.05$)。A β 蛋白 1-42 においても、DS 群はコントロール群より、有意に高かった ($P < 0.05$)。



The expression of PTCH1, SMO, GLI3, GSK3 β mRNA and its receptors in the lymphocytes of control and Down syndrome

Real-time PCR を行い、Down 症候群患者と正常コントロールのリンパ球における PTCH1、SMO、GLI3、GSK3 の mRNA 発現量を比較した。Down 症候群では、白血球内 Sonic Hedgehog 経路構成因子の遺伝子発現量が抑制されており、特に PTCH1 ($p < 0.05$) と SMO ($p < 0.01$) に関しては、有意に発現量が低いという結果が得られた。PTCH1 と A β 蛋白の間に相関は認められなかった。PTCH1 と年齢の間に有意な相関はなかったが、A β 蛋白と同様に、年齢に伴い発現が低くなる傾向があった。

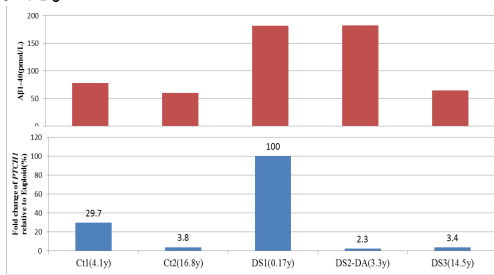


Histological and immunohistochemical findings

Down 症患児の十二指腸閉鎖合併症例においては、Hematoxylin-eosin 染色にて、膜様狭窄部が非狭窄部と比較して腸線が海綿状に入り組んだ管腔構造を形成していた(Fig. 3A)。また、粘液層、筋層も入り乱れており、一貫した層構造が形成されていないことが観察された。PTCH1 免疫染色では、非 Down 症候群では十二指腸粘膜に PTCH1 の発現が認められないのに対し、Down 症候群の粘膜上皮の細胞質において強発現していた(Fig. 3B)。また、GLI3 も、非 Down 症候群では発現が見られないのに対し、Down 症候群例の十二指腸粘膜細胞の核に強発現しており、特に狭窄部で強かった。Down 症候群例の十二指腸粘膜は Sonic Hedgehog 経路が負に制御されていることが示唆された。

Western blot analysis

血漿 PTCH1 蛋白は、健常コントロール 2 例と比較し、年齢が低い Down 症候群 1 と十二指腸閉鎖合併例 Down 症候群 2 において、強発現していた。PTCH1 は同程度の遺伝子発現量でもバンドの濃さに差があり、遺伝子の発現量と蛋白は相関していないことが示された。むしろ、アミロイド 蛋白が高ければ PTCH1 蛋白量が高いという正の相関が認められた。



Down 症候群では、Aβ 蛋白が高値であるせいで、血漿および十二指腸閉鎖部位における PTCH1 蛋白を過剰発現していた。その過剰発現により、Sonic Hedgehog 経路が抑制され、十二指腸閉鎖の成因となっていることを初めて示した。

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 3 件)

Sekiguchi K, Maeda T, Suenobu S, Kunisaki N, Shimizu M, Kiyota K, Handa YS, Akiyoshi K, Korematsu S, Aoki Y, Matsubara Y, Izumi T. A transient myelodysplastic/myeloproliferative neoplasm in a patient with cardio-facio-cutaneous syndrome and a germline BRAF mutation. Am J Med Genet A. 査読有 161:2600-3, 2013.

Yamada H, Akiyoshi K, Izumi T. The ominous sequence in patients with tuberous sclerosis complex. Brain Dev. 査読有 2014;36:254-8.

Kobayashi O, Miyahara H, Abe N, Goto C, Okanari K, Akiyoshi K, Korematsu S, Izumi T. Progressive dysautonomia in two patients with xeroderma pigmentosum group A. Pediatr Neurol. 査読有 50:619-21, 2014.

〔学会発表〕(計 6 件)

秋吉健介、山重美佳、宮原弘明、泉達郎. Down 症候群患児の十二指腸閉鎖における Sonic Hedgehog シグナル伝達経路抑制の関与. 第 115 回日本小児科学会学術集会 2012. 4. 13. 福岡国際会議場 (福岡市)

秋吉健介、南泰成、松塚敦子、泉達郎. Prader-Willi 症候群と Angelman 症候群: 遺伝子欠失領域と発現タンパク質の比較解析. 第 116 回日本小児科学会学術集会 2013. 4. 21. 広島国際会議場 (広島市)

秋吉健介、泉達郎、石川幸辰. 髄芽腫に高率に認められる脊髄性筋萎縮症遺伝子のコピー数減少. 第 55 回日本小児神経学会学術集会 2013. 6. 1. iichiko 総合文化センター (大分市)

秋吉健介、松塚敦子、加藤里絵、泉達郎. 血清アルギニン値関連性ビタミン K 依存性凝固因子欠乏症を来したアルギナーゼ欠損症の一例. 第 90 回日本小児科学会大分地方会 2013. 7. 28. 大分県医師会館 (大分市)

秋吉健介、小河和也、泉達郎. Wilms 腫瘍におけるプロテオーム解析: 新たな腫瘍マーカーの同定とその臨床応用. 第 117 回日本小児科学会学術集会 2014. 4. 13. 名古屋国際会議場 (名古屋市)

秋吉健介、岡本知子、末延聡一、泉達郎. 小児期神経上皮系腫瘍における髄液 midkine

濃度・第56回日本小児神経学会学術集会
2014.5.31.アクトシティ浜松(浜松市)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
[大分大学医学部小児科学講座]
<http://www.med.oita-u.ac.jp/pediatrics/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

秋吉 健介 (AKIYOSHI, Kensuke)
大分大学・医学部・客員研究員
研究者番号：70305043

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：