

厚生労働科学研究費補助金  
難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業）  
分担研究報告書

ミトコンドリア機能を制御する primary cilia に関する研究

研究分担者 藤井 克則 千葉大学大学院医学研究院小児病態学 講師

研究要旨

ミトコンドリアがエネルギー産生をするためには、外部からの増殖刺激によりシグナル伝達が適切に行われる必要がある。中でもヘッジホッグシグナリングは高度に保存されたシグナル伝達経路であり、細胞の増殖に深く関与している。近年、このヘッジホッグシグナリングが primary cilia を介して伝達されることが明らかになり、分子標的薬の開発が進むようになった。ミトコンドリアによるエネルギー産生が行われるための増殖経路であるヘッジホッグシグナルの意義を検証し、primary cilia のヒト細胞における役割をヒト線維芽細胞を用いて解析した。

A. 研究目的

ミトコンドリアは細胞内におけるエネルギー産生を司る細胞内小器官である。細胞が恒常性を保つためには、外部からの増殖シグナルに応じて適切にエネルギー産生が行われる必要がある。ヘッジホッグシグナリングは細胞増殖において重要なシグナル伝達経路であり、primary ciliaを介することが判明している。本研究ではヒト線維芽細胞を用いてヘッジホッグシグナリングの伝達経路を検証し、ミトコンドリアエネルギー産生能にどのような影響を与えているかを明らかにすることとした。

B. 研究方法

正常ヒト線維芽細胞とヘッジホッグ経路の構成分子であるPTCH1に遺伝子変異をもつ線維芽細胞を用いて血清飢餓およびligandであるヘッジホッグ刺激を加え、下流のGLI 1の発現量の変化をRT-PCRで定量化し、primary ciliaの形成を免疫染色で確認した。血清飢餓およびヘッジホッグ刺激によって生じるmRNA変化をパスウェイキットで解析し、ヘッジホッグシグナリングと相互作用をもつ分子群を同定した。ミトコンドリア電位変化をこれらヘッジホッグシグナリングに対する刺激で観察し、外的刺激によるエネルギー産生能の変化を解析した。

（倫理面への配慮）

一連の研究計画およびPTCH1変異細胞は千葉大学医学部生命倫理委員会の承認を得て実行した。正常コントロール線維芽細胞はATCCより購入し使用した。本研究では遺伝子導入は行わず、内因性分子の解析のみを行っている。

C. 研究結果

ヒト線維芽細胞において、コントロールと比較してヘッジホッグ受容体であるPTCH1変異をもつヒト線維芽細胞ではその最下流であるGliならびにSmo mRNAが増加していた。このGli mRNAはヘッジホッグ添加により増加し、加えて栄養枯渇状態にするとさらに増加した。これらの反応は3種類のPTCH1変異細胞で同様に確認された。栄養飢餓状態の細胞において、アセチル化tubulin抗体により細胞表面上のprimary ciliaが確認されたが、これはコントロール線維芽細胞とPTCH1変異細胞で同様に観察され有意差は

認めなかった。mRNAを用いたパスウェイ解析ではPTCH1変異細胞において有意にGli, FGF4, Zic1, Zic2の発現亢進が認められた。

D. 考察

細胞におけるエネルギー産生が適切に行われるためには、細胞自体の増殖シグナルが正しく核に伝達される必要がある。ヘッジホッグシグナルはそのため必須な経路であり、細胞が栄養枯渇状態になるとその下流シグナルが増大してミトコンドリアに恒常性変化を伝えることが示唆された。Primary ciliaは細胞膜表面上のアンテナとして近年明らかになった小器官であるが、今回の私たちの検討ではその数の変動は認めなかった。今後ミトコンドリア形態異常を検査することでその意義を確かめてゆきたい。

E. 結論

ヒト細胞におけるミトコンドリアエネルギー産生には細胞増殖シグナルが正しく核に伝達される必要がありヘッジホッグシグナルはその中核に存在する。

F. 研究発表

1. 論文発表

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* 2013;12:611-4.

2. 学会発表

Ikehara H, Fujii K et al. Hedgehog signaling is enhanced by nutritional deprivation in human fibroblasts of Gorlin syndrome. *Keystone symposium of cilia, development, and human diseases* (2014.3.2-7, CA, USA)

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

