

平成 29 年 5 月 24 日

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名：(日本語) 革新的先端研究開発支援事業ソロタイプ「画期的医薬品等の創出を目指す脂質の生理活性と機能の解明」研究開発領域
(英語) Advanced Research and Development Programs for Medical Innovation (PRIME), “Studies on Specific Activities and Functions of Lipid Molecules to Develop Innovative Medical Technologies”

研究開発課題名：(日本語) コレステロールが制御する繊毛機能とその破綻
(英語) Physiological and pathological roles of cholesterol in primary cilia

研究開発担当者 (日本語) 広島大学 原爆放射線医科学研究所 講師 宮本達雄

所属 役職 氏名：(英語) Tatsuo Miyamoto
Lecturer, Research Institute for Radiation Biology and Medicine,
Hiroshima University

実施期間：平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

II. 成果の概要(総括研究報告)

本研究開発では、コレステロールによる繊毛を介した細胞外シグナル受容機構とその破綻による繊毛病発症機構の解明を行い、「繊毛病」や「がん」を標的とした医薬品開発の基盤整備を研究目標としている。コレステロールが繊毛を介して細胞外シグナル受容を担うためには、(1) 小胞体でのコレステロールの生合成、(2) 小胞体から繊毛膜への輸送、(3) 繊毛でのシグナル受容体との相互作用の3つのステップが必要であり、各過程の破綻によって生じる遺伝病の病理機構の解明を通じて新たなコレステロールの生理機能の解明を目指している。

平成 28 年度の研究開発では、小胞体でのコレステロール生合成の最終段階を担う 7-デヒドロコレステロール還元酵素をコードする *DHCR7* 遺伝子の変異によって発症する Smith-Lemli-Opitz (SLO) 症候群患者の皮膚線維芽細胞を用いて、コレステロール欠乏状

態における繊毛の構造および機能解析を行った。本疾患は、コレステロール欠乏による性腺発達不全を示すだけでなく、繊毛病を特徴づける多発性腎嚢胞や軸後性多指症を合併するため、SLO 症候群が繊毛病の一つであることが示唆される。繊毛マーカー・抗アセチル化チューブリン抗体を用いた免疫染色および電子顕微鏡観察から、健常者細胞と SLO 症候群患者細胞の繊毛形成には大きな違いは認められなかった。さらに、メチル- β -シクロデキストリンを処理した低コレステロール状態の健常者細胞においても、繊毛形成は障害されなかったことから、コレステロールは繊毛形成に必須ではないことが示唆された。

次に、SLO 症候群患者細胞の繊毛関連シグナルである Sonic hedgehog (Shh) シグナルに対する応答能を検討した。Shh シグナルアゴニスト (SAG) を処理した健常者細胞では、Shh シグナル経路の活性化受容体である Smoothened (Smo) の繊毛膜への高度な集積が観察されるのに対して、SLO 症候群患者細胞では SAG 依存的な Smo の一次繊毛への局在が著しく阻害され、Shh シグナル応答遺伝子の発現低下が認められた。興味深いことに、SLO 症候群患者細胞の培地にコレステロールを添加することによって、Smo の繊毛集積が回復することを確認した。これらの結果から、コレステロールは一次繊毛のシグナル応答能に必要であり、SLO 症候群の繊毛病発症に対する予防や治療にコレステロール補充が有用であることが示唆された。

また、平成 28 年度の研究開発として、平成 27 年度に樹立した繊毛形成培養細胞株における高効率な遺伝子ターゲティング法である CRISPR/Cas9 技術 (*Scientific reports* 2017, in press) を用いたコレステロール代謝・繊毛形成関連遺伝子群 135 遺伝子の欠損細胞株ライブラリーを作製した。この遺伝子破壊細胞株ライブラリーについて、コレステロール検出プローブ Filipin と繊毛マーカーを用いた蛍光免疫染色を行い、繊毛コレステロールが低下する表現型を指標にして、繊毛にコレステロールを輸送する分子として 11 遺伝子を同定した。次年度以降に、これらの遺伝子機能を解析して、繊毛へのコレステロール輸送経路の解明に繋げる予定である。

Summary

Primary cilium is a microtubule-based, hair-like antenna structure developed at the apical membranous surface in G0-phase quiescent cells. Germline mutations of primary cilia-related genes cause ciliopathies characterized by a range of clinical features including polycystic kidney, obesity, postaxial polydactyly, neuronal and other developmental abnormalities. Previous studies have demonstrated that ciliary membrane contains a variety of cell signaling receptors for the control of embryogenesis and tissue maintenance. However, little is known about the physiological role of lipids in the membrane of primary cilia.

The goal of this study is to elucidate the unique physiological roles of cholesterol accumulated at the ciliary membrane in the context of cell signaling. To clarify the molecular basis of cholesterol-mediated cilia functions, we focus on the three biological steps; 1)

cholesterol synthesis at ER, 2) intracellular transport of cholesterol to primary cilia, and 3) physical interaction between cholesterol and signaling receptors.

In the financial year 2016, we evaluated the structure and function of primary cilia in the skin fibroblasts from patients with Smith-Lemli-Opitz (SLO) syndrome caused by germline mutations of *DHCR7* gene, which encodes 7-dehydrocholesterol reductase at the final step of cholesterol synthesis. Immunofluorescent staining with anti-acetylated tubulin antibody revealed that primary cilia formation in the patient cells is not impaired. In addition, normal cells treated with methyl- β -cyclodextrin also form primary cilia normally. These findings suggest that cholesterol is dispensable for ciliogenesis. Next, we measured the cellular competence for a cilia-related sonic hedgehog (Shh) signaling in the patient cells. In normal cells, a Shh agonist (SAG) treatment induces the accumulation of Shh activation receptor Smoothened (Smo) into the ciliary membrane, thereby transducing the signal to up-regulate the downstream genes. In contrast, the patient cells did not show the SAG-dependent Smo accumulation into the ciliary membrane and activate the expression of Shh-target genes. Importantly, exogenous cholesterol restored the Shh signal competence in SLO syndrome patient cells. Taken together, our data demonstrate that cholesterol in primary cilia is necessary for the proper signal competence, implying that the complementation of cholesterol is useful for the development of prevention and therapy in ciliopathy-like features of SLO syndrome.

Moreover, we used a high-efficient gene-targeting method in human cultured cells “CRISPR-ObLiGaRe” developed in the last year to disrupt 135 genes associated with cholesterol metabolism and primary cilia formation. Of this cell library, we identified 11 genes involved in intracellular transport of cholesterol to primary cilia. We are going to analyze these genes to verify the molecular mechanism of cholesterol targeting to primary cilia.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 2 件、国際誌 3 件)

1. Royba E, Miyamoto T, Akutsu SN, Hosoba K, Tauchi H, Kudo Y, Tashiro S, Yamamoto T, Matsuura S. Evaluation of ATM heterozygous mutations underlying individual differences in radiosensitivity using genome editing in human cultured cells. Scientific Reports. 2017, in press.
2. Matsuura S, Royba E, Akutsu SN, Yanagihara H, Ochiai H, Kudo Y, Tashiro S, Miyamoto T. Analysis of individual differences in radiosensitivity using genome editing. Ann ICRP. 2016, 45 (1 suppl):290-296

3. Sasaki T, Hanisch FG, Deutzmann R, Sakai LY, Sakuma T, Miyamoto T, Yamamoto T, Hannappel E, Chu ML, Lanig H, von der Mark K. Functional consequence of fibulin-4 mutations associated with vascular and skeletal abnormalities and cutis laxa. *Matrix Biology*. 2016, 56:132-149.
4. 宮本達雄, 松浦伸也. Seckel 症候群. 小児科診療. 2016, 79 : 61-61.
5. 宮本達雄, 柳原啓見, 落合博, 山本卓, 松浦伸也. ヒト培養細胞における 1 本鎖 DNA を用いた簡便な放射線感受性候補 SNP 導入法の開発. 広島医学. 2013, 69 : 273-276.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. *WDR62/MCPH2* mutations identified in patients with primary microcephaly by a combined approach of exome sequencing and genome editing technology, ポスター, Masatsuna Y, Akutsu SN, Hosoba K, Morino H, Kawakami H, Yamamoto T, Shimizu K, Ohashi H, Miyamoto T, Matsuura S, ICHG 2016, 2016/4/3-2016/4/7, 国内
2. CRISPR/Cas9 システムと ssODN を用いた遺伝性小頭症モデル細胞の樹立, ポスター, 宮本達雄, 福満啓博, 政綱宜規, Akutsu SN, 細羽康介, 森野豊之, 川上秀史, 山本卓, 清水健司, 大橋博文, 松浦伸也, 日本ゲノム編集学会第 1 回大会, 2016/9/6-2016/9/7, 国内
3. Molecular basis of human *BUBR1* deficiency, a central protein of the spindle assembly checkpoint, 口頭 (招待講演), 松浦伸也, 宮本達雄, 細羽康介, 落合博, 山本卓, 古谷-清木誠, 第 75 回日本癌学会学術総会, 2016/10/08, 国内
4. A combined approach of exome sequencing and genome editing identified *WDR62/MCPH2* mutations in patient with primary microcephaly, ポスター, Miyamoto T, Masatsuna Y, Fukumitsu A, Akutsu SN, Hosoba K, Morino H, Kawakami H, Yamamoto T, Shimizu K, Ohashi H, Matsuura S, ASHG 2016, 2016/10/18-2016/10/22, 国外
5. Generation of PCS (MVA) syndrome mutation knock-in mice using CRISPR/Cas9-mediated genome editing technology, ポスター, Hosoba K, Miyamoto T, Matsuura S, ASHG 2016, 2016/10/18-2016/10/22, 国外
6. *ATM* heterozygous mutations underlying individual differences in radiosensitivity in human populations, ポスター, Matsuura S, Royba E, Miyamoto T, Akutsu SN, Yamamoto T, Kudo Y, Tashiro S, ASHG 2016, 2016/10/18-2016/10/22, 国外
7. *ATM* ヘテロ遺伝子変異は放射線感受性個人差に寄与する, 口頭, 宮本達雄, Royba E, Akutsu SN, 工藤美樹, 田代聡, 松浦伸也, 日本放射線影響学会第 59 回大会, 2016/10/28, 国内
8. 遺伝性小頭症の原因遺伝子 *WDR62* による細胞分裂軸制御機構, 口頭, 福満啓博, 政綱宜規, Akutsu SN, 細羽康介, 森野豊之, 川上秀史, 山本卓, 清水健司, 大橋博文, 宮本達雄, 松浦伸也, 日本放射線影響学会第 59 回大会, 2016/10/28, 国内
9. PLK1-dependent phosphorylation of *WDR62*, a causative gene product for primary microcephaly, maintains mitotic spindle orientation, ポスター, Miyamoto T, Hosoba K, Fukumitsu A, Masatsuna Y, Akutsu SN, Morino H, Kawakami H, Yamamoto T, Shimizu K, Ohashi H, Matsuura S, The 28th CDB symposium Cilia and centrosomes, 2016/11/27-2016/11/29, 国内

10. Shortening of primary cilia length by melanin-concentrating hormone receptor 1-Gi/o mediated signaling, ポスター, Saito Y, Hamamoto A, Tomoshige S, Yamato S, Hosoba K, Miyamoto T, Kobayashi Y, The 28th CDB symposium Cilia and centrosomes, 2016/11/27-2016/11/29, 国内
11. ゲノム編集技術を用いた放射線発がんリスクの個人差を規定する遺伝素因としての *ATM* ヘテロ遺伝子変異の同定, ポスター, 宮本達雄, Royba E, Akutsu SN, 田代聡, 川上秀史, 山本卓, 松浦伸也, 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016/11/30-2016/12/2, 国内
12. 遺伝性小頭症の原因遺伝子 WDR62 による細胞分裂軸制御機構, ポスター, 福満啓博, 政綱宜規, Akutsu SN, 細羽康介, 山本卓, 宮本達雄, 松浦伸也, 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016/11/30-2016/12/2, 国内
13. Generation of PCS (MVA) syndrome mutation knock-in mice using CRISPR/Cas9-mediated genome editing technology, ポスター, Hosoba K, Tanaka T, Fukumitsu A, Miyamoto T, Matsuura S, 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016/11/30-2016/12/2, 国内
14. Insufficiency of BUB1B gene increases structure-chromosomal instability post ionizing radiation, ポスター/口頭, Akutsu SN, Royba E, Hosoba K, Miyamoto T, Matsuura S, The 6th international symposium Phoenix Resaisance from radiation disaster, 2017/2/11-2017/2/12, 国内
15. Genome editing technique as a useful tool for analysis of individual differences in radisosenstivity, ポスター/口頭, Royba E, Miyamoto T, Akutsu SN, Hosoba K, Kudo Y, Tashiro S, Matsuura S, The 6th international symposium Phoenix Resaisance from radiation disaster, 2017/2/11-2017/2/12, 国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 病因変異同定ツールとしてのゲノム編集法, 宮本達雄, 2016 アジレントゲノミクスフォーラム, 2016/6/10, 国内
2. 一塩基編集法を用いた遺伝性疾患の病因変異同定, 宮本達雄, 産業技術総合研究所-広島大学合同シンポジウム, 2016/7/4, 国内

(4) 特許出願

該当なし