

平成 30 年 5 月 21 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10481

研究課題名(和文)患者由来iPS細胞を用いたTGFシグナル異常骨系統疾患の治療法の開発

研究課題名(英文) Development of new treatments for bone dysplasia caused by a mutation in TGFB1 utilizing patient-derived iPS cells

研究代表者

木下 晃 (KINOSHITA, Akira)

長崎大学・原爆後障害医療研究所・講師

研究者番号：60372778

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：Transforming growth factor-1(TGF-1)が変異により恒常的に活性化することでカムラチ-エンゲルマン病(以下CAEND)が発症する。CAENDの特徴として遺伝的背景により表現型が大きく異なることがある。ゲノム編集技術によりCAEND患者から樹立したiPS細胞の変異を除去を行ない、遺伝的背景が同一細胞の作製を行なった。変異解析により新規のCAEND患者2名に218番目のアルギニンがシステインに置換した患者を同定した。また次世代型シーケンサーを用いた変異解析により、TGFシグナル系遺伝子の変異で骨系統疾患が発症することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Camurati-Engelmann disease (CAEND) is a rare, autosomal dominant, progressive diaphyseal dysplasia, which is characterized by hyperostosis and sclerosis of the diaphyses of long bones. CAEND is caused by a mutation in the gene TGFB1, encoding TGF-1. We established induced pluripotent stem (iPS) cells derived from an individual with CAEND. These cells were easier to differentiate than those derived from a healthy individual. Since genetic background strongly affects the CAEND phenotype, we attempted to correct the arginine-to-histidine mutation at residue 218 (R218H) in TGFB1 utilizing a genome editing system. Although we successfully obtained homologous recombinant clones of HEK293T cells, we failed to obtain recombinant clones of iPS cells so far. Furthermore, we discovered new Japanese CAEND cases that had an arginine-to-cysteine mutation at residue 218 in TGFB1. We also identified a de novo mutation in a gene involved in the TGF signaling pathway, which causes hyperostosis.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：カムラチ-エンゲルマン病 TGF-1 iPS細胞 ゲノム編集

1. 研究開始当初の背景

Camurati-Engelmann disease (カムラチ-エンゲルマン病、以下 CAEND、OMIM Entry #1313100)は非常に稀な常染色体優性遺伝形式の骨系統疾患である。この疾患の特徴は頭蓋骨や長管骨の過剰な膜性骨化を原因とする骨皮質の肥厚や長管骨の紡錘形肥大である。加えて四肢の骨痛、筋力の低下、難聴などを伴う。

連鎖解析による領域の絞り込みおよび機能から予測される遺伝子の変異解析により、その責任遺伝子が transforming growth factor- β 1(TGF- β 1)をコードする *TGFB1*であることを明らかにした。TGF- β 1 は翻訳後3つのジスルフィド結合を介して2量体形成する。TGF- β 1 タンパク質は N 端側から順番にシグナルドメイン、TGF- β 1 の活性を抑える latency associated peptide (LAP)ドメイン、そして活性を持つ TGF- β 1 ドメインから構成されている。CAEND 患者で同定された変異は全て LAP ドメインに集中しており、特に2量体形成に必要な2つのシステイン残基(223番目と225番目のシステイン残基)の近傍に変異のホットスポットがある(Nature Genetics, 2000)。このことから変異により TGF- β 1 の活性化を抑制する LAP ドメインが不安定化し、CAEND 患者では常に TGF- β 1 が活性化していると予想される。

責任遺伝子の同定以来10年以上の月日が経つが、CAENDの根本的な治療法は未だ無く、ステロイド(プレドニン)の経口投与による対症療法が行なわれている。CAEND 患者の QOL 向上のためにも更なる研究が必要とされる。

CAEND の症状の特徴的な点として、同じ変異を持つ患者間でもその表現系が大きく異なることである。例えば遺伝的背景が比較的近いと考えられる CAEND 家系内でも、その表現型は軽症型から重症型まで様々である。*TGFB1* の変異に加えて、何らかの遺伝的修飾

因子(モディファイアー)の存在が示唆されるが、現在の解析技術では同定は困難である。

2. 研究の目的

前述の通り CAEND の根本的治療法の確立を目指して、報告者はモデルマウスの作製に取り組んで来た。ES 細胞を用いたジーンターゲット法により CAEND 患者で最も高頻度で同定される R218C 変異(218番目のアルギニンがシステインに変異)をノックインしたマウスの作製を行なった。組換え ES 細胞の樹立およびキメラマウスの作製には成功したが、全てのキメラマウスは不妊でありモデルマウスの確立は出来なかった。またマルファン症候群2型(現在では Loey-Dietz 症候群)の責任遺伝子である TGFII 型受容体のモデルマウスも同様に失敗している。

2006年にはマウスで、2007年にはヒトで線維芽細胞から人工多能性幹細胞、induced pluripotent stem cells (iPS 細胞)が作製された。再生医療だけでなく、疾患モデルの研究にも有用な iPS 細胞は本研究にも必須なものと考えた。

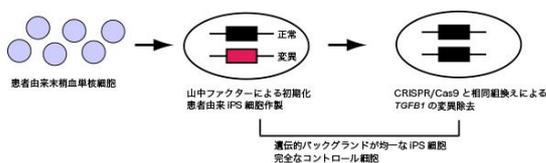
本研究では CAEND 患者由来の血球から iPS 細胞を樹立し、CAEND 治療に向けた研究を目指す。

3. 研究の方法

(1) iPS 細胞の作製は線維芽細胞からだけでなく採取の際に比較的負担が少ない血液からも可能である。学内の倫理委員会の手続きと主治医によるインフォームド・コンセント後に、文書による同意書を得た。報告者がこれまでに報告した CAEND 患者(218番目のアルギニンがヒスチジンに変異)の血液から、iPS 細胞を樹立する。

(2) CAEND の特徴の一つが、遺伝的背景により表現系が大きく異なることである。現在はゲノム編集により患者の変異を除いて、正常に戻すことも可能である。この作業によっ

て遺伝的背景が全く同一な iPS 細胞を作製する。



(3) (2)の細胞を用いて TGF-β1 の骨芽細胞への分化過程を分子生物学的手法で明らかにする。

(4) 現在では CRISPR/Cas9 法によるマウス受精卵内でゲノム編集も可能になっている。マウス受精卵に guide RNA、Cas9 mRNA もしくはタンパク質、CAEND 変異を含む一本鎖オリゴヌクレオチドを同時に注入し、モデルマウスの作製を行なう。

(5) 新規の CAEND 患者の探索と変異解析、次世代型シーケンサーを用いた骨系統疾患の変異解析を行なう。

4. 研究成果

(1) CAEND 患者から iPS 細胞の樹立

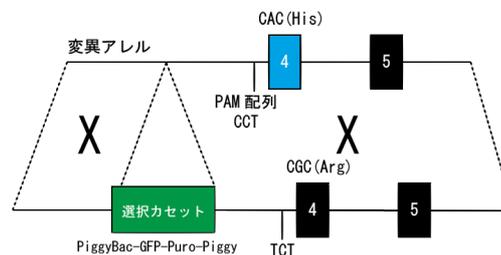
学内の倫理委員会からの研究計画の了承を受けた後に、主治医による十分な説明と文書による同意書を得た後に、R218H 変異をもつ CAEND 患者から血液を採取した。採取した血液から京都大学 iPS 細胞研究所・戸口田淳也教授のもとで iPS 細胞株 (CiRA00166, CiRA00167, CiRA00168) が樹立された。これらの細胞株は分化しやすい傾向があると考えられる。フィーダーフリーの細胞培養条件に順化させている。

CAEND で最も高頻度で同定される R218C 変異患者からも iPS 細胞の樹立を計画中である。

(2) ゲノム編集による R218H 変異から野生型へのノックイン

CRISPR/Cas9 システムにより CAEND 患者由来 iPS 細胞は R218H 変異を野生型に修正 (ノックイン) するために以下のコンストラクト

を作製した。



このコンストラクトは PiggyBac システムにより、選択カセット遺伝子を完全に除去し痕跡を残さない利点がある。このコンストラクトを guide RNA と Cas9 mRNA を発現する pX330 ベクターと共に HEK293T 細胞にトランスフェクションを行い、GFP シグナルおよび PCR 法により相同組換えが起きていることを確認した。しかし、患者 iPS 細胞はピューロマイシンによる選択で死滅した。濃度を希釈しても同じ結果だった。2つの loxP 配列でネオマイシン耐性遺伝子を挟んだコンストラクトを自作し再度実験中である。

(3) ゲノム編集による R218C 変異ノックインマウスの作製

ES 細胞内での相同組換えを利用したノックインマウスの作製はキメラマウスの不妊が原因で失敗している。CRISPR/Cas9 システムを利用してマウス受精卵に Cas9 mRNA、標的配列特異的 guide RNA、R218C 変異を入れた一本鎖オリゴを同時にインジェクションした。しかし、妊娠を確認したが出産が近づくに従い流産し出生するマウスはごく少数で、ジェノタイプングの結果、誕生したマウスは野生型のみであった。

(4) CAEND 患者の変異解析および類似疾患のエキソーム解析

以前行なった疫学調査の結果、国内の CAEND 患者は 50-60 名程度と推定されている。研究期間中に CAEND が疑われる患者とその父母 (2 トリオ) の解析をサンガーシーケン

スで遺伝子診断を行なった。その結果、両家系共に R218C の de novo 変異であった。

また頭蓋骨の肥厚を伴う疾患をもつ患者とその両親のエキソーム解析を行なった。この家系では TGF シグナル系の重要遺伝子にミスセンス変異が同定された。この患者から採取した線維芽細胞とゲノム編集した細胞を用いて、発症機序解明のための機能解析を行っている。

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 10 件)

Sato S, Itonaga H, Taguchi M, Sawayama Y, Imanishi D, Kinoshita A, Yoshiura KI, Miyazaki Y.

Clonal dynamics in a case of acute monoblastic leukemia that later developed myeloproliferative neoplasm. (査読あり)

Int J Hematol. 2018.

doi: 10.1007/s12185-018-2419-1.

Morimoto Y, Shimada-Sugimoto M, Otowa T, Yoshida S, Kinoshita A, eckert J, Umekage T, Tochigi M, Kaiya H, Okazaki Y, Tokunaga K, Sasaki T, Yoshiura KI, Ono S. Whole-exome sequencing and gene-based rare variant association tests suggest that PLA2G4E might be a risk gene for panic disorder. (査読あり)

Transl Psychiatry. 2018 Feb 2;8(1):41.

doi: 10.1038/s41398-017-0088-0.

Horai M, Mishima H, Hayashida C, Kinoshita A, Nakane Y, Matsuo T, Tsuruda K, Yanagihara K, Sato S, Imanishi D, Imaizumi Y, Hata T, Miyazaki Y, Yoshiura KI.

Detection of de novo single nucleotide variants in offspring of atomic-bomb survivors close to the hypocenter by whole-genome sequencing. (査読あり)

J Hum Genet. 2018 Mar;63(3):357-363.

doi: 10.1038/s10038-017-0392-9.

Morimoto Y, Ono S, Imamura A, Okazaki Y, Kinoshita A, Mishima H, Nakane H, Ozawa H, Yoshiura KI, Kurotaki N.

Deep sequencing reveals variations in somatic cell mosaic mutations between monozygotic twins with discordant psychiatric disease. (査読あり)

Hum Genome Var. 2017 4:17032.

doi: 10.1038/hgv.2017.32.

Smith AL, Kousa YA, Kinoshita A, Fodor K, Yang B, Schutte BC.

Generation and characterization of a conditional allele of Interferon Regulatory Factor 6. (査読あり)

Genesis. 2017 Jul;55(7).

doi: 10.1002/dvg.23038.

Uchiyama Y, Nakashima M, Watanabe S, Miyajima M, Taguri M, Miyatake S, Miyake N, Saito H, Mishima H, Kinoshita A, Arai H, Yoshiura KI, Matsumoto N.

Ultra-sensitive droplet digital PCR for detecting a low-prevalence somatic GNAQ mutation in Sturge-Weber syndrome. (査読あり)

Sci Rep. 2016 Mar 9;6:22985.

doi: 10.1038/srep22985.

Matsuda K, Tateishi S, Akazawa Y, Kinoshita A, Yoshida S, Morisaki S, Fukushima A, Matsuwaki T, Yoshiura KI, Nakashima M.

Rapid growth of mitotically active cellular fibroma of the ovary: a case report and review of the literature. (査読あり)

Diagn Pathol. 2016 Oct 22;11(1):101.

Wada H, Matsuda K, Akazawa Y, Yamaguchi Y, Miura S, Ueki N, Kinoshita A, Yoshiura KI, Kondo H, Ito M, Nagayasu T, Nakashima M.

Expression of Somatostatin Receptor Type 2A and PTEN in Neuroendocrine Neoplasms Is Associated with Tumor Grade but Not with Site of Origin. (査読あり)

Endocr Pathol. 2016 Sep;27(3):179-87.

doi: 10.1007/s12022-016-9436-5.

Kinoshita A.

Camurati-Engelmann disease (査読なし)

Nihon Rinsho. 2015 Dec;73(12):2149-59.

Tomoshige K, Matsumoto K, Tsuchiya T, Oikawa M, Miyazaki T, Yamasaki N, Mishima H, Kinoshita A, Kubo T, Fukushima K, Yoshiura KI, Nagayasu T.

Germline mutations causing familial lung cancer. (査読あり)

J Hum Genet. 2015 Oct;60(10):597-603. doi:

10.1038/jhg.2015.75.

[学会発表](計 0 件)

[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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木下 晃 (KINOSHITA, Akira)
長崎大学・原爆後障害医療研究所・講師
研究者番号：60372778

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

木下 直江 (KINOSHITA, Naoe)
長崎大学・病院 (医学系)・助教
研究者番号：50380928

吉浦 孝一郎 (YOSHIURA, Koh-Ichiro)
長崎大学・原爆後障害医療研究所・教授
研究者番号：00304931

(4) 研究協力者

()