

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：32650

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20427

研究課題名(和文)疾患特異的iPS細胞を用いたGorlin症候群の病態機序の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the pathological mechanism of Gorlin syndrome using disease-specific iPS cells

研究代表者

小野寺 晶子 (Onodera, Shoko)

東京歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：90637662

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：Gorlin症候群はHh受容体遺伝子PTCH1に変異を持つ常染色体優性遺伝性疾患である。本症候群は多彩な病態を持つにもかかわらず、遺伝子変異領域と症状には特別の関係が認められない。遺伝子解析からPTCH1に変異を持つ患者においても他のHh共受容体であるPTCH2やBOCにも変異がありHh経路の活性化に影響を与える可能性が示された。またこの症候群患者細胞より樹立したGorliniPS細胞は骨芽細胞分化時にHh経路の活性の他にWNT経路、BMP経路の活性化がみられ、この相互作用がGorlin症候群患者が持つ骨形態異常に寄与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Gorlin syndrome is an autosomal dominant inherited disorder with a mutation in the Hh receptor, PTCH1. The syndrome have various conditions like bone abnormality and multiple tumor. Although relationship between mutation location and symptoms is unclear. Genetic analysis showed that there were variants in other Hh receptor receptors PTCH2 and BOC in patients with mutations in PTCH1. This additional mutation may affect activation of Hh pathway. GorliniPS cells established from this syndrome have activation of the WNT pathway and BMP pathway in addition to the activity of the Hh pathway at osteoblast differentiation. This interaction may contribute to bone morphological abnormality with Gorlin syndrome.

研究分野：疾患iPS細胞

キーワード：疾患iPS細胞 骨芽細胞分化 遺伝子解析

### 1. 研究開始当初の背景

Hedgehog の受容体である PTCH1 を原因遺伝子とする Gorlin 症候群は、大脳鎌の石灰化や二分肋骨などの骨形成異常や外胚葉系異常である手掌・足底の小窩、基底細胞癌、髄芽種などの悪性腫瘍を呈する症候群である。本症例群では PTCH1 の変異によりヘッジホッグ経路の活性化が起こり、このような表現型を呈する事が示唆されている (Fujii K et al. *Pediatr Int.* 2014)。大庭らは、Gorlin 症候群の動物実験モデルである PTCH1 ヘテロマウスにおける骨量増加を報告した (Ohba S et al. *Dev Cell.* 2008)。また Hedgehog シグナルの構成物質である GLI1 の機能喪失変異マウスにおいて骨量の低下も報告されている (Kitaura Y et al. *PLoS One* 2014)。マウスの実験モデルではヘッジホッグの関与が明らかであるが、ヒトの間葉系細胞においてはヘッジホッグ活性化剤による骨芽細胞分化抑制を示す論文 (Plaisant M et al. *Stem cells* 2009) もあり、その作用は明確ではない。癌では山口らの検討で、Gorlin 症候群の角化嚢胞性歯源性腫瘍では SMO 以下の情報経路の活性化がその発生に関与していることが示唆された (*PLoS One.* 2013 8(8):e70995)。Hedgehog シグナルは神経分化、生体内の恒常性の維持、癌の発生や骨形成に関与することが知られており (Zheng X et al. *Oncology Reports* 2013)、ヒト間葉系細胞における Hedgehog シグナルの検討は表現型を理解する上でも重要な課題である。

### 2. 研究の目的

本研究において様々な症状を持つ Gorlin 症候群を網羅的に検討するために遺伝子変異を有する患者由来 iPS 細胞の樹立を行う。また PTCH1 変異を有する iPS 細胞を用いて骨芽細胞分化誘導におけるヘッジホッグ経路の検討と基底細胞母斑症候群発生のメカニズムの検討を行う。

### 3. 研究の方法

(1) 現在進行中である基底細胞母斑症候群患者由来 iPS 細胞の樹立をさらに推進する。申請者は現在までに 4 つの患者由来 iPS 細胞の樹立がすでに完了しているが、他に 2 名の疾患患者由来線維芽細胞を獲得しており、この細胞についても順次、iPS 樹立を行う。樹立には大高・中西ら (産総研) から提供を受けたセンダイウィルスベクターを MOI=10 にて感染を行う。樹立した iPS 細胞は rt-PCR におけるセンダイウィルスサイレンシングの確認、未分化性の確認、in vitro における EB 形成、テラトーマ形成を介した in vivo での多分化能の確認を行い、iPS 細胞の樹立を確認する。

(2) 変異解析は線維芽細胞遊走後 DNA を回収し、北海道システムサイエンスに依頼しエキソームシーケンスを行う。ターゲットキャプチャーはアジレント社の Sure select XT

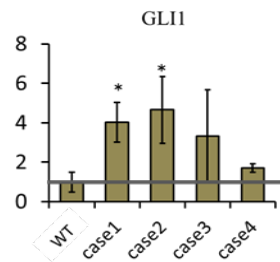
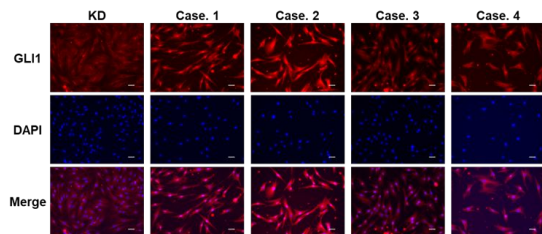
Human all Exon v5 キットを用い、Paired-End 法で塩基配列の取得を行う。採取された塩基配列は SnpEff にて変異解析を行う。

(3) 上記の方法で作成した iPS 細胞を用いて骨芽細胞分化誘導を行う。本研究では 2 つの方法を用いて骨芽細胞分化を行い骨芽細胞分化マーカーの発現を検討する。1 つは申請者らが開発した FIT 法 (*J. Biol. Chem.* 287 (27) 2012, *PLoS One.* 2014 9(6):e99534) を、もう一つは共同研究者である鄭、大庭らによって確立されたヘッジホッグ法 (*Stem Cell Reports.* 2014 May 22;2(6)) を用いる。以上の方法で、骨芽細胞分化誘導を行ったサンプルの骨芽細胞分化マーカーの検討を行う。

### 4. 研究成果

#### 遺伝子変異の探索

本疾患遺伝子変異が PTCH1 以外の Hh 情報経路にも重複して存在するか否か、次世代シーケンス技術を用いて遺伝子解析を行った。Kimonis の Gorlin 症候群診断基準により診断が確定し、インフォームドコンセントを得た 4 名の患者より採取したゲノム DNA を次世代シーケンス解析した。その結果 4 症例すべてで PTCH1 遺伝子の変異を確認し、その内 3 症例は今まで報告のない新規変異であった。



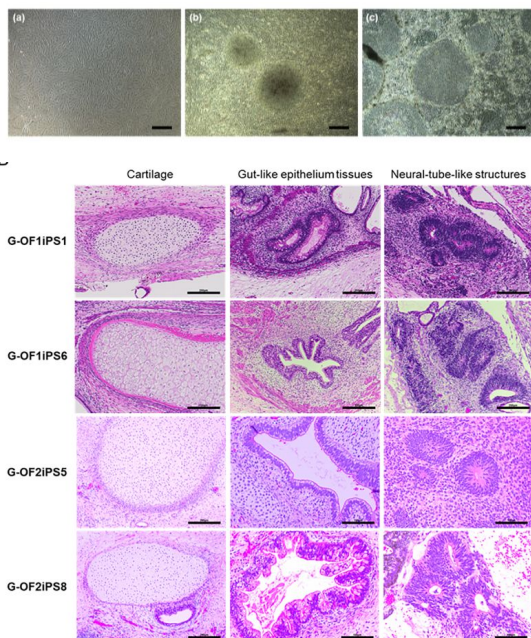
また、患者の線維芽細胞は正常人線維芽細胞に比べ Hh 経路のターゲットである GLI1 遺伝子発現が上昇していることを確認したが、発現の程度は異なっていた。これまで、Hh 遺伝子変異部位と症状には関連が無いといわれており、PTCH1 以外の Hh 情報伝達経路の関連する遺伝子異常が重複して存在する可能性を疑い、Hh 関連 84 遺伝子のデータを解析した。このとき遺伝子変異が機能的異常に関連するか否かを判定する MutationTaster および Polyphen2 解析を行いタンパク質機能異常が強く疑われる遺伝子変異のみに着目した。すると面白いことに case1 には PTCH1 と遺伝子が 54% 相同である PTCH2 にも変異が重複して存在し、case3, 4 には PTCH1, 2 とは異なる Hh 受容体である BOC にも変異が存在することを確認した。Case2

では Wnt9b に変異が存在した。Gorlin 症候群では PTCH2 変異単独の報告もある。しかし、PTCH1 変異が存在した場合その他の Hh 受容体変異は十分調べられていない可能性が高い。多彩な Gorlin 症候群疾患病態の背景には複数の Hh 受容体遺伝子変異や Hh 関連遺伝子変異が重複して存在し、結果として Hh 経路の活性化の違いを生み異なる表現型を誘導する可能性もあると結論づけた。

row	SNP	Gene	nucleotide acid change	type	AA change	Exon number	MAP	Mutation/Taster	polyphen2
1	rs76481384	TAT1	589A>C	MISSENSE	Trp190Leu	9	C-0.009448	disease causing	benign (0.011)
		PTCH2	524G>T	MISSENSE	Arg175Leu	4		disease causing	probably damaging (0.999)
		PTCH2	221G>A	MISSENSE	Arg74His	2		disease causing	possibly damaging (0.899)
2	rs148851425	WNT9B	TGG>A	MISSENSE	Arg19His	4	A-0.00393	disease causing	probably damaging (0.979)
		PTCH1	201G>T	MISSENSE	Arg71Leu	14		disease causing	probably damaging (0.999)
3	rs23011975	BUNCE2	ATT>C		Pro28Leu	1	C-0.00472	disease causing	
		PTCH1	201G>T	MISSENSE	Arg71Leu	14		disease causing	probably damaging (0.999)
4	rs3914401	BCC	GGG>A	MISSENSE	Gly30Arg	1	A-0.002920	disease causing	probably damaging (0.999)
		BCC	271C>T	MISSENSE	Pro105Ser	17	T-0.007636	disease causing	benign (0.995)

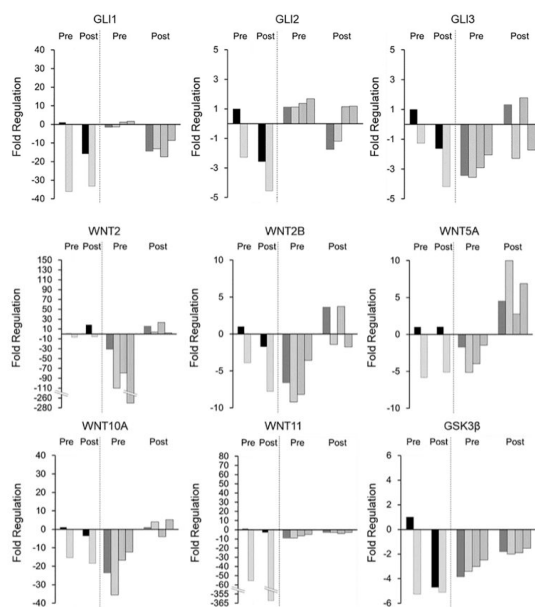
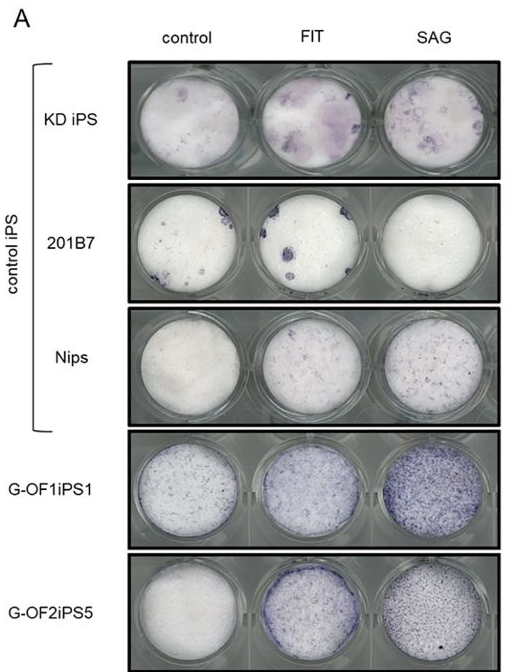
### 疾患由来 iPS 細胞の樹立

次にヘッジホッグ情報経路恒常的活性化がもたらす Gorlin 症候群骨病変メカニズムの解明のために患者由来 iPS 細胞の樹立を行った。センダイウィルスを用いた山中 4 因子の導入により患者由来線維芽細胞は ES 用形態を示した。単利したクローンは未分化性を示し、マウスに移植したところ 3 胚葉由来組織をすべて観察し iPS 細胞の樹立を確認した。



4 症例の骨病変と Hh 関連遺伝子異常の関係を明らかにするため、iPS 細胞を用いた検討を行った。患者由来 iPS 細胞は Hh 経路の活性化剤である SAG に対し高い反応性を有していた。この細胞を用いて骨芽細胞分化を行うと、コントロール iPS 細胞に比べ ALP 活性が高く、骨芽細胞マーカーである RUNX2 発現が高かった。さらに iPS 細胞においては WNT、BMP 群の遺伝子発現が低く、骨芽細胞誘導を

行うと WNT、BMP 群の遺伝子発現が優位に高くなることから、Gorlin 症候群では Hh 経路に加え WNT、BMP 群も協調的に亢進させることで骨芽細胞誘導に過剰に反応し石灰化が亢進し骨組織病態を生じさせる可能性が考えられた。



### 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 2 件)

- 1) Multi-layered mutation in hedgehog-related genes in Gorlin syndrome may affect the phenotype Onodera S, Saito A, Hasegawa D, Morita N, Watanabe K, Nomura T, Shibahara T,

Ohba S, Yamaguchi A, Azuma T, PLOS ONE 2017 vol: 12 (9) pp: e0184702

- 2) Gorlin syndrome-derived induced pluripotent stem cells are hypersensitive to hedgehog-mediated osteogenic induction  
Hasegawa D, Ochiai-Shino H, Onodera S Nakamura T, Saito A, Onda T, Watanabe K, Nishimura K, Ohtaka M, Nakanishi M, Kosaki K, Yamaguchi A, Shibahara T, Azuma T PLOS ONE 2017 vol: 12 (10) pp: e0186879

[学会発表](計 5 件)

- ・第 34 回日本骨代謝学会学術集会・第 3 回アジア太平洋骨代謝学会議  
Gorlin 症候群患者由来 iPS 細胞の GLI3 による骨芽細胞分化制御  
小野寺 晶子、大庭 伸介、齋藤 暁子、篠 宏美、大高 真奈美、西村健、中西 真人、長谷川 大悟、片倉 朗、鄭 雄一、柴原 孝彦、東 俊文
- ・esa-srb-anzbms 2016  
Gorlin Syndrome iPS cells demonstrate strong activation of Hedgehog, WNT and BMP pathways in Osteogenesis.  
Shoko Onodera, Hiromi Shino-Ochiai, Daigo Hasegawa, Akiko Saito, Akira Katakura, Takahiko Shibahara, Toshifumi Azuma
- ・第 39 回日本分子生物学会年会  
Whole Eexome Sequence 解析を用いた Gorlin 症候群における新規関連遺伝子の検討  
Shoko Onodera, Daigo Hasegawa, Akiko Saito<sup>1</sup>, Katuhiko Shibahara, Kenjiro Kosaki, Toshifumi Azuma<sup>1</sup>
- ・第 35 回日本骨代謝学会学術集会  
Gorlin 症候群患者由来 iPS 細胞の骨芽細胞分化能の異常とその分子メカニズム  
小野寺 晶子、東 俊文、齋藤 暁子、大高 真奈美、西村 健、中西 真人、長谷川 大悟、片倉 朗、野村 崇、小崎 健次郎、鄭 雄一、柴原 孝彦、大庭 伸介
- ・第 17 回再生医療学会総会  
Anomaly of osteoblast differentiation ability and its molecular mechanism of iPS cells derived from Gorlin syndrome patient  
小野寺 晶子、東 俊文、齋藤 暁子、長谷川 大悟、片倉 朗、野村 崇、小崎 健次郎、鄭 雄一、柴原 孝彦、大庭 伸介

[その他]

ホームページ等  
東京歯科大学私立大学ブランディング事業  
<http://www.tdc.ac.jp/college/activity/branding/tabid/659/Default.aspx>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小野寺 晶子 (ONODERA, Shoko)  
東京歯科大学・歯学部・講師  
研究者番号：90637662

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：

(4) 研究協力者

( )