

平成30年6月11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：16K20428

研究課題名(和文)疾患特異的iPS細胞を用いた鎖骨頭蓋異形成症の病態解明

研究課題名(英文)Elucidation of the pathophysiology of cleidocranial dysplasia using disease-specific iPS cells

研究代表者

齋藤 暁子(Saito, Akiko)

東京歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：90722835

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)：鎖骨頭蓋骨異形成症(CCD)由来iPS細胞(CCD-iPSCs)とCCD-iPSCsのRUNX2変異をCRISPR/Cas法により正常化したRevertant-iPSCsを樹立し、これらのiPSCsが多能性を示すことを確認した。骨分化誘導解析では、Revertant-iPSCsでのみALP、OSX、OCN、DLX5などの骨芽細胞分化マーカーの発現上昇を認め、Revertant-iPSCsでのみALP、OSX、OCN、DLX5などの骨芽細胞分化マーカーの発現上昇を認め、Revertant移植群より低下していた。以上の結果から、樹立したCCD-iPSCsは骨芽細胞分化異常に伴う骨石灰化障害を呈することがわかった。

研究成果の概要(英文)：We established cleidocranial dysplasia (CCD)-derived iPS cells (CCD-iPSCs) and also established Revertant-iPSCs in which RUNX2 mutation of CCD-iPSCs was corrected by CRISPR / Cas method. These iPSCs had pluripotency. In osteogenic induction analysis, expression of osteoblast differentiation markers such as ALP, OSX, OCN, and DLX5 was increased only in Revertant-iPSCs. In the rat calvarial bone defects transplantation experiment, the bone closure delay was observed in the CCD transplant group, and both bone volume and bone mineral content were lower than Revertant transplant group. From the above results, it was confirmed that the established CCD-iPSCs exhibited bone mineralization disorder accompanying osteoblast differentiation abnormality.

研究分野：生化学

キーワード：疾患iPS細胞 骨芽細胞分化 鎖骨頭蓋骨異形成症

## 1. 研究開始当初の背景

iPS 細胞は多能性と増殖性に優れ、多方面へ応用が期待される。なかでも疾患特異的 iPS 細胞は希少疾患の病態解明と治療法の開発に大きな手掛かりとなる可能性が期待される。口腔領域は比較的多くの先天性疾患が知られ疾患特異的 iPS 細胞の開発が重要であるが報告はない。口腔領域先天性疾患のうち、鎖骨頭蓋異形成症 (CCD) の原因遺伝子はすでに解明されているものの、病態は未解明な点も多い。CCD は骨組織発生の必須遺伝子 Runx2 に変異を有し、骨格異形成、頭蓋縫合閉鎖遅延、鎖骨低形成または無形性、多発性歯異常が特徴である。本疾患モデル動物 Runx2 ノックアウト (KO) マウスの検討では過剰埋伏歯は認められず、ヒトだけに特徴的な表現型も指摘されている。申請者が行った研究でもヒト iPS 細胞から骨芽細胞への分化誘導ではマウス iPS 細胞と異なり、BMP2 に反応せず TGF が有効であった (未発表)。従って、CCD 病態解明におけるヒト iPS 細胞の有用性は高い。Komori らの研究から Runx2 が骨形成に必須であることは Runx2 欠損マウスが完全に骨を欠如することから明らかであるが、本疾患の骨格異形成の機序と Runx2 遺伝子変異において、特にヒトでの関連については不明な点が多い。そこで、ヒト CCD 由来 iPS 細胞を作製し骨芽細胞分化の機序を検討し、CCD の病態解明を目指すこととした。

## 2. 研究の目的

我々はヒト iPS 細胞から効率よく骨芽細胞さらには骨細胞を分化誘導する技術を確立した (文献 1)。そこで本研究では、この分化誘導技術をもとに CCD 由来 iPS 細胞の機能的評価を行い、病態との関連を解明すること、さらには遺伝子編集技術を応用し変異塩基を正常塩基に入れ替えた変異正常化 iPS 細胞を作製し臨床応用への道を開くことを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) 本研究は本学倫理審査委員会および動物実験委員会で承認済みである (承認番号 533、290401)。本学を受診した CCD 患者より同意を得た後、口腔粘膜組織を採取し線維芽細胞の初代培養を行った。産総研より提供を受けたセンダイウイルスベクター SeVdp (KOSM) 302L を用いて 4 因子 (OCT3/4, SOX2, KLF-4, c-MYC) を線維芽細胞へ導入し、CCD-iPS 細胞を樹立し、RT-PCR にて ES 細胞マーカー (OCT3/4, SOX2, c-MYC, KLF4, NANOG, REX1) および胚様体 (EB) 形成後の三胚葉マーカー (内胚葉: AFP, FOXA2, SOX17, 中胚葉: T, MSX1, 外胚葉: MAP2) の確認を行った。また SCID マウス精巣部への iPS 細胞の移植を行い、テラトーマ形成による三胚葉分化を評価した。

(2) CCD-iPS 細胞へ CRISPR/Cas9 ゲノム編集技術を用いることで、RUNX2 遺伝子変異を正常化した iPS 細胞 (Revertant-iPS 細胞) を樹立し、多能性が維持されていることを確認した。この iPS 細胞を CCD-iPS 細胞のコントロールとして以後の実験に供した。

(3) 我々の開発した方法 (文献 1) を用いてそれぞれの iPS 細胞の骨芽細胞分化誘導を行い、ALP 活性染色および qRT-PCR にて骨芽細胞分化マーカーの発現を調べた。

(4) ノードラット頭蓋冠に作製した欠損部へ、iPS 細胞から骨芽細胞分化誘導後の細胞 (OBs) を、自己組織化ペプチドとともに移植し 4 週間後の検体を  $\mu$ CT および組織学的方法 (V-G 染色) で評価した。

## 4. 研究成果

(1) 2 症例の CCD 患者由来細胞から樹立した iPS 細胞 (CCD-iPS 細胞) (図 1a) において、ES 細胞マーカーの発現 (図 1b) および EB 形成後の三胚葉マーカーの発現をそれぞれ確認した (図 1c)。さらに形成されたテラトーマにおいて三胚葉由来組織の存在を確認した (図 1d)。

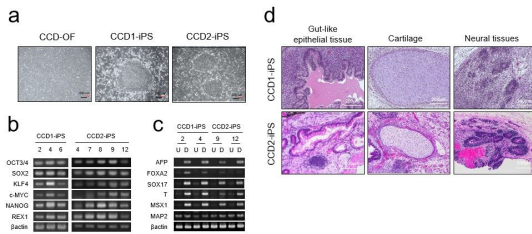


図1 CCD-iPS細胞の未分化性および多能性の確認

(2) CRISPR/Cas9 ゲノム編集技術を用いて CCD-iPS 細胞の RUNX2 遺伝子変異を正常化した iPS 細胞 (Revertant-iPS 細胞) (図 2a) についても CCD-iPS 細胞同様、ES 細胞マーカーの発現 (図 2b) および三胚葉分化能を示した (図 2c)。

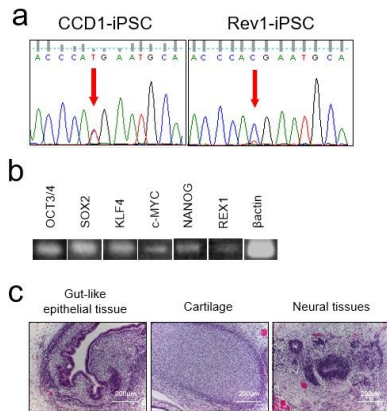


図2 Rev1-iPS細胞の未分化性および多能性の確認

(3) iPS 細胞を骨芽細胞分誘導した結果、コントロールである Revertant-iPS 細胞は経時的に ALP 活性が上昇したのに対し、CCD-iPS 細胞はその活性が減弱していた (図 3a)。また遺伝子発現解析の結果、OSX、OCN、DLX5 などの骨芽細胞分化マーカーの発現が CCD-iPS 細胞では有意に低下した (図 3b)。

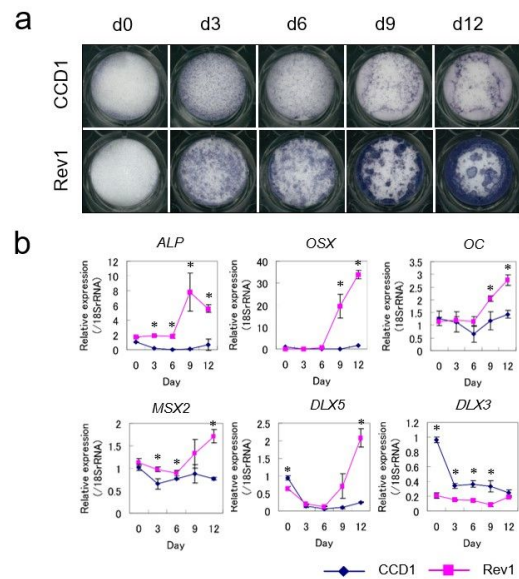


図3 骨芽細胞分化誘導後の評価

(4) ノードラット頭蓋骨欠損部への iPS 細胞移植実験の結果、骨構造解析 (図 4a) および V-G 染色 (図 4b) により、Revertant 細胞移植群では欠損部が新生骨でほぼ修復されたが、CCD 移植群では骨閉鎖の遅延が確認された。また骨体積、骨塩量ともに低下していた (図 4c)。

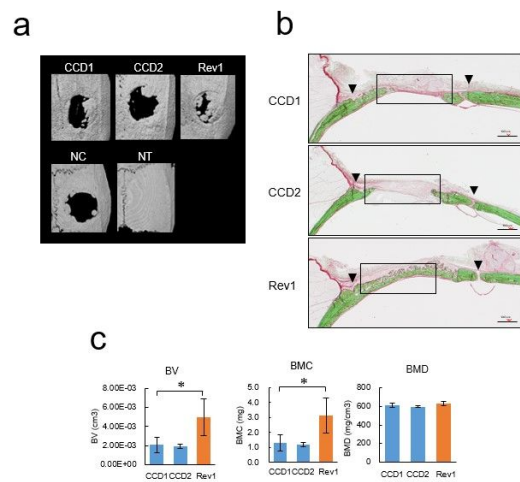


図4 骨形成能の評価

< 引用文献 >

① Ochiai-Shino et al., PLoS One 2014 9 (6):e99534 2014

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 4 件)

- ① Saito A, Ooki A, Nakamura T, Onodera S, Hayashi K, Hasegawa D, Okudaira T, Watanabe K, Kato H, Onda T, Watanabe A, Kosaki K, Nishimura K, Ohtaka M, Nakanishi M, Sakamoto T, Yamaguchi A, Sueishi K, Azuma T  
Targeted reversion of induced pluripotent stem cells from patients with human cleidocranial dysplasia improves bone regeneration in rat calvarial bone defect model.  
Stem Cell Res Ther. 2018 Jan 22;9(1):12.  
(査読有)  
Hasegawa D, 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  
Gorlin syndrome-derived induced pluripotent stem cells are hypersensitive to Hedgehog-mediated osteogenic induction.  
PLoS One. 2017 Oct 31;12(10):e0186879. (査読有)  
Hisanaga Y, Suzuki E, Aoki H, Sato M, Saito A, Saito A, Azuma T.  
Effect of the combined use of enamel matrix derivative and atelocollagen sponge scaffold on osteoblastic differentiation of mouse induced pluripotent stem cells in vitro.  
J Periodontal Res. 2018 Apr;53(2):240-249. (査読有)  
Onodera S, Saito A, Hasegawa D, Morita N, Watanabe K, Nomura T, Shibahara T, Ohba S, Yamaguchi A, Azuma T.  
Multi-layered mutation in hedgehog-related genes in Gorlin syndrome may affect the phenotype.

2017 Sep 15;12(9):e0184702. (査読有)

〔学会発表〕(計 3 件)

- ① 齋藤 暁子、大木章生、中村貴、小野寺晶子、篠宏美、長谷川大悟、小崎健次郎、恩田健志、渡邊 章、柴原孝彦、末石研二、東俊文  
鎖骨頭蓋骨異形成症患者由来 iPS 細胞の解析と骨組織分化との関連の検討、第 35 回日本骨代謝学会学術集会、2017 年 7 月 27 ~ 29 日、ホテル日航福岡 (福岡県・福岡市)
- ② 齋藤 暁子、大木章生、澤田隆、中村貴、小野寺晶子、長谷川大悟、小崎健次郎、末石研二、東俊文  
鎖骨頭蓋骨異形成症由来 iPS 細胞を用いた RUNX2 機能不全と核膜形態異常との関連、第 17 回日本再生医療学会総会、2018 年 3 月 21 ~ 23 日、パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齋藤 暁子 (SAITO, Akiko)

東京歯科大学・歯学部・助教

研究者番号： 9 0 7 2 2 8 3 5