

令和 3 年 5 月 18 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19642

研究課題名(和文)線維性骨異形成症におけるシグナル伝達異常の解明と創薬シーズの探索

研究課題名(英文)Research for abnormal cellular signaling in fibrous dysplasia and its drug discovery

研究代表者

豊澤 悟 (Toyosawa, Satoru)

大阪大学・歯学研究科・教授

研究者番号：30243249

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：線維性骨異形成症(FD)は、機能亢進型GNAS変異によるシグナル伝達異常が骨髄間質細胞等の間葉系幹細胞系譜に起こって発症する骨疾患である。本研究では、FDの病態解明と創薬に有効なFDモデルを作製するため、各種のCreマウスと交配させると、目的細胞に機能亢進型GNAS変異を起こすGNAS変異floxマウスを作製した。このマウスと骨細胞/成熟骨芽細胞にCreが発現するDmp1-Creマウスを交配したGNAS変異；Dmp1-Creマウスでは骨増生が認められ、機能亢進型GNAS変異による作用として矛盾しない表現型を示した。今後、このGNAS変異floxマウスを用いて、FDモデルの作製が可能と思われる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の意義は、ヒトの線維性骨異形成症(FD)と全く同じシグナル伝達異常を起こす機能亢進型GNAS変異を目的細胞に誘導できるノックイン(KI)マウスを作製した事にある。KIマウスを用いてFDマウスモデルが作製できれば、ヒトの病態解析と薬効判定をマウスモデルで実施できる。すなわち、このFDマウスモデルから得られた病態情報や創薬シーズは、ヒトのFD治療に有効である。

研究成果の概要(英文)：Fibrous dysplasia (FD) is a bone disease that develops when abnormal signal transductions due to GNAS gain-of-function mutations occur in the bone marrow stromal cell etc. In order to elucidate the pathobiology of FD and create FD model that is effective for drug discovery, we created GNAS mutant floppy mice that cause GNAS gain-of-function mutations in target cells when crossed with some Cre mice. When the GNAS mutant floppy mice were crossed with Dmp1-Cre mice expressing Cre in osteocyte/mature osteoblast, GNAS mutant; Dmp1-Cre mice had an increased bone mass, and these changes were compatible with those of GNAS gain-of-function mutations. Therefore, we will be able to create FD model using the GNAS mutant floppy mice.

研究分野：口腔病理学

キーワード：機能亢進型GNAS変異 線維性骨異形成症 floxマウス

# 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

線維性骨異形成症(FD)は、顎顔面骨に高頻度で発症する骨病変である。患者さんは、骨膨隆による不正咬合や審美障害のため、歯科に来院する機会も多く、主な治療法は、骨膨隆部を外科的に削除する減量術であるが、病変による神経圧迫や多発性の重症例が含まれるため、非侵襲性の内科的治療法の開発が望まれる。FDの原因は、機能亢進型GNAS変異により、その翻訳産物である促進性G蛋白質 サブユニット変異体が恒常的に活性化して細胞内cAMPが過剰となることにある。その下流で、cAMP依存蛋白キナーゼ(PKA)活性化を介したシグナル伝達異常が、骨髄間質細胞等の間葉系幹細胞系譜に生じて本病態が発症すると考えられている。このようなFDにおけるシグナル伝達異常を解明し、そのシグナル経路上にある活性分子の阻害薬を探索する事は、内科的治療薬の開発に繋がると思われる。

## 2. 研究の目的

本研究では、ヒトFDのシグナル伝達異常を明らかにして、内科的治療薬の創薬シーズを探索するため、機能亢進型GNAS変異を用いて、ヒトFDと全く同じシグナル伝達異常を起こすマウスFDモデルを作製する。そのため、機能亢進型GNAS変異が、各Creマウスと交配すると目的の間葉系幹細胞に誘導されるGNAS変異floxマウスを作製する。交配により得られた機能亢進型GNAS変異マウスは、GNAS遺伝子診断にてFDと診断された患者さんとその発症メカニズムについて相等関係にあり、マウスFDモデルを用いて、ヒトFDのシグナル伝達異常を明らかにし、創薬シーズを探索する。

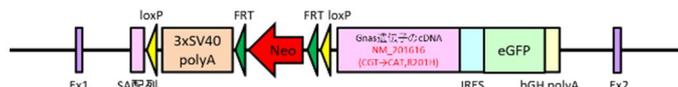
## 3. 研究の方法

### 1) GNAS変異floxマウス用のターゲティングベクター設計と構築

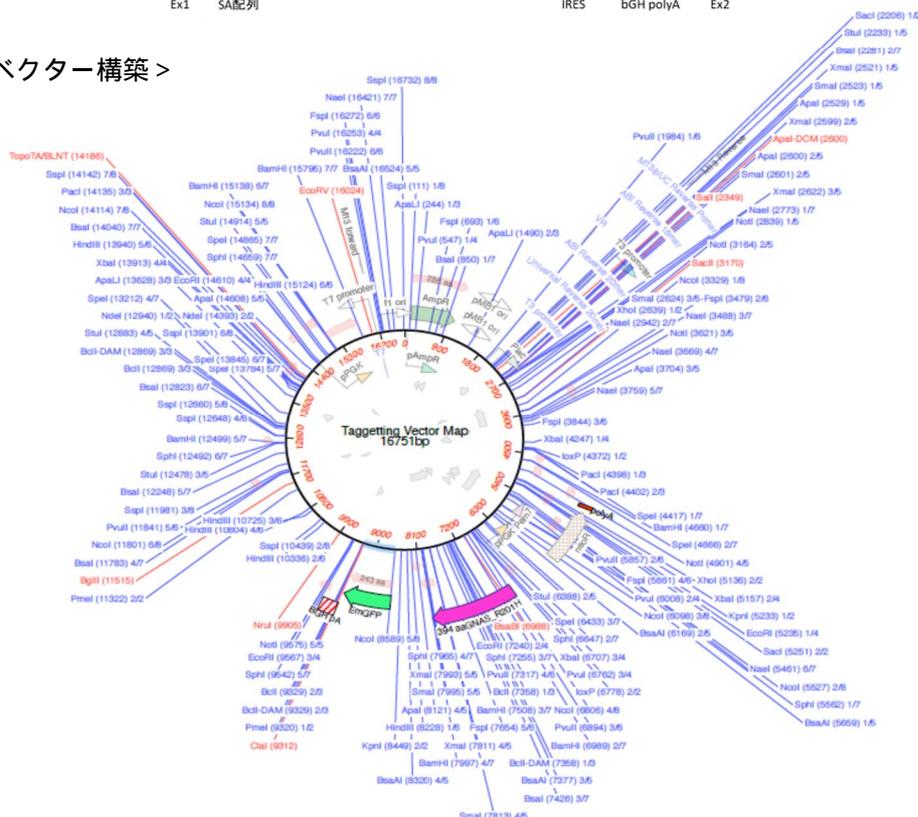
ノックインする標的遺伝子として、ヒトFDで知られているGNAS遺伝子のコドン201番のArg(R)をHis(H)に置換するGNAS変異遺伝子(CGT CAT;R201H)を用いる。また、GNAS変異細胞を標識するため、緑色蛍光蛋白質(eGFP)を発現するようGNAS変異遺伝子のstopコドン下流にIRESを介してeGFPをpBluescript II SK(+)に挿入する(図1)。

次に、特定の遺伝子座(ROSA26)のExon1とExon2の間に、標的遺伝子のGNAS変異遺伝子をノックイン(KI)するよう設計し、Creマウスと交配すると、loxPで挟まれた領域が除かれ、GNAS変異とeGFPが発現するようKIマウス用のターゲティングベクターを構築する(図1, 2)。

< 図1 . ベクター設計 >



< 図2 . ベクター構築 >



## 2) 相同組換え ES 細胞の樹立

構築したターゲティングベクターを制限酵素にて直鎖状にして、ES 細胞 (C57BL/6J 由来) へ導入した。ゲンタマイシン (G418) により選択してピックアップした ES 細胞の一部は凍結ストックした。ピックアップした ES 細胞から抽出したゲノム DNA を用いて、相同組換えの ES 細胞クローンを PCR にてスクリーニングした。得られた陽性クローンは、さらに 5' 側と 3' 側で設計した 2 組のプロンプを用いてサザンプロット法によりスクリーニングして相同組み換えの ES 細胞クローンを同定し、凍結ストックしていた同一の ES 細胞クローンを 1 継代培養した。

## 3) キメラマウスの作製

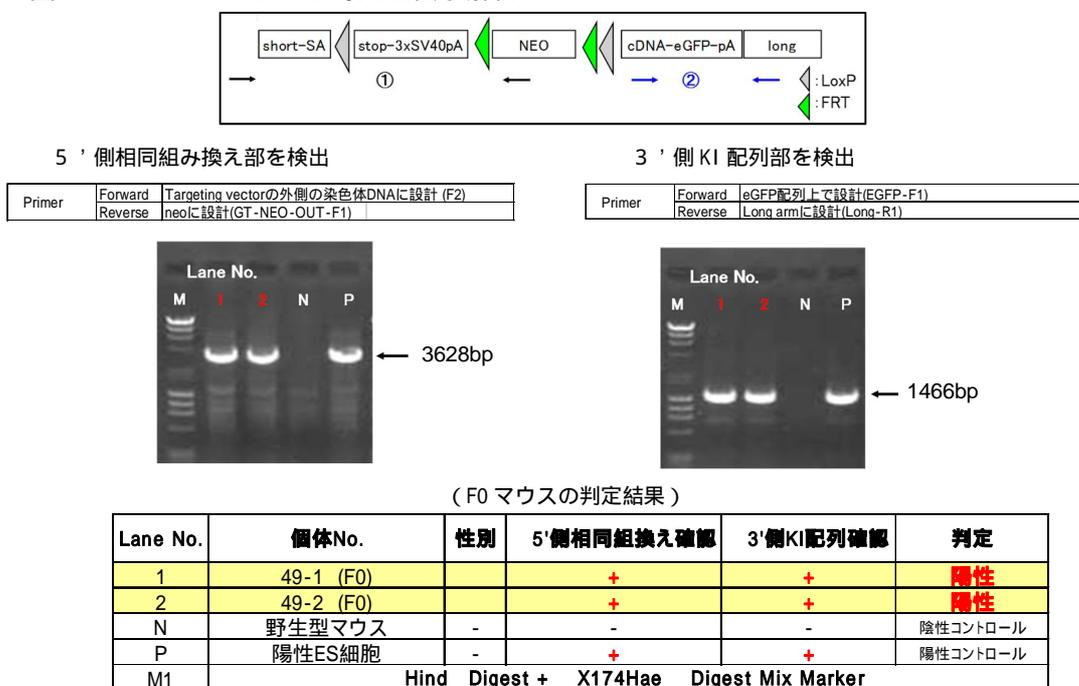
雌マウス (Balb/c: アルビノ) から採卵した胚盤胞へ、上記で得た相同組換え ES 細胞をインジェクションし、仮親 ICR マウスの子宮に移植して両細胞の混在した状態のキメラマウス (雄) を作製した。この過程で、ES 細胞由来細胞のキメラ寄与率の高いキメラマウスを作出することは、目的遺伝子が germline に挿入されたマウスを選択する確率に寄与する重要なステップになる。そこで、相同組換え ES 細胞の胚盤胞へのインジェクションを多数回繰り返して、キメラ寄与率 50~70% の F0 ヘテロマウスを獲得することができた。

## 4. 研究成果

### 1) F0 ヘテロマウスの解析

ES 細胞由来細胞のキメラ寄与率 50~70% の F0 ヘテロマウスの 5' 側相同組み換え部と 3' 側 KI 配列部を PCR にて確認し、2 匹の F0 マウス雄 (個体 No. 49-1, 2) を得た (図 3)。

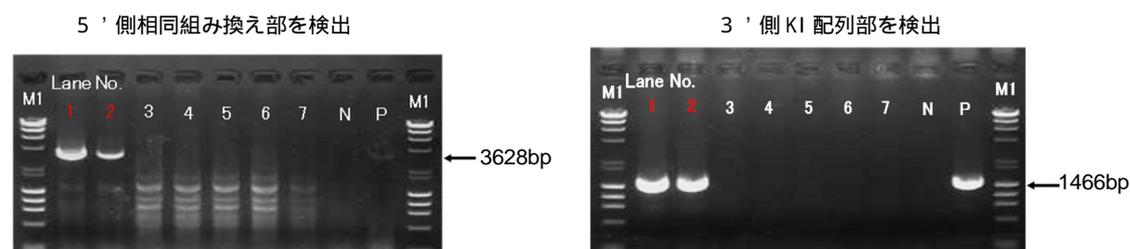
< 図 3 . F0 マウスにおける導入遺伝子解析 >



### 2) F1 ヘテロマウスの解析

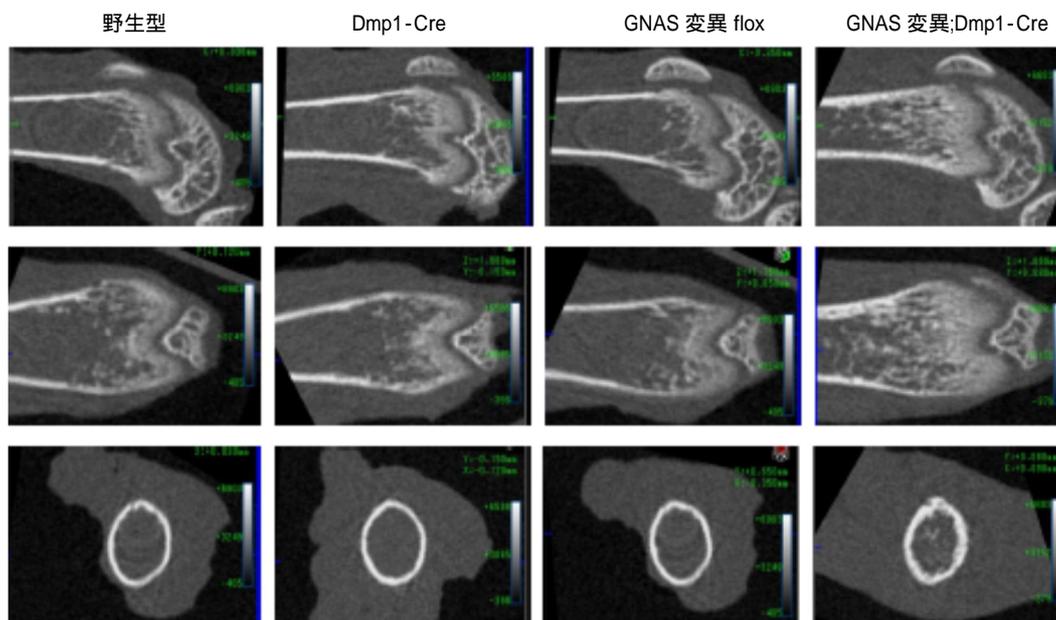
F0 マウス雄 (個体 No. 49-1, 2) を C57BL/6J 雌と交配させた F1 マウスでは、個体 No. 49-1 由来の 4 匹の F1 マウスに黒色マウス、個体 No. 49-2 由来の 3 匹の F1 マウスに黒色マウスが確認されたため、両個体由来の黒色 F1 マウスについて、5' 側相同組み換え部と 3' 側 KI 配列部を前述と同様に PCR にて確認した。その結果、2 匹の F1 マウス (No. 49-1-1, 2) を得た (図 4)。

< 図 4 . F1 マウスにおける導入遺伝子解析 >



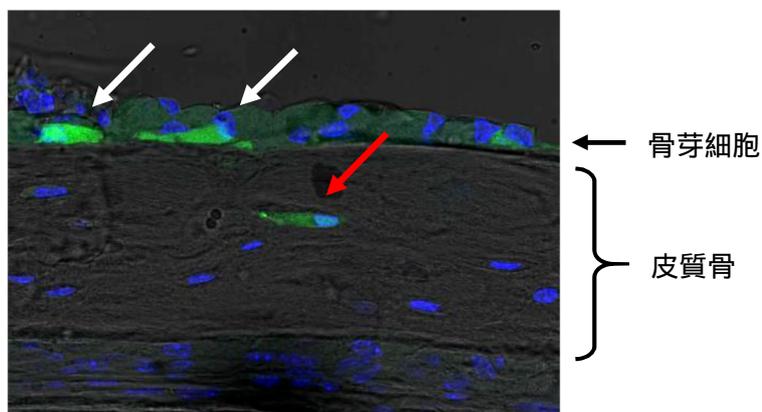


μCT 解析では、GNAS 変異;Dmp1-Cre マウス(4週齢)の大腿骨は、野生型マウス、GNAS 変異 flox マウスおよび Dmp1-Cre マウスと比較して、海綿骨量が増加し、皮質骨厚さも増加していた。従って、GNAS 変異;Dmp1-Cre マウスでは、機能亢進型 GNAS 変異が骨細胞/成熟骨芽細胞に発現してシグナル伝達異常が誘導されて想定通りに骨形成が促進しており、目的細胞に GNAS 変異によるシグナル伝達異常が起きていると考えられた。



機能亢進型 GNAS 変異細胞を同定するため、GNAS 変異遺伝子の下流に IRES を介して挿入した eGFP が発現していることを確認するため、GNAS 変異;Dmp1-Cre マウス(4週齢)の脱灰凍結の骨組織切片を蛍光顕微鏡にて観察した。その結果、骨表面の骨芽細胞(白矢印)と骨内部の骨細胞(赤矢印)に GFP 発現が認められ、機能亢進型 GNAS 変異細胞を同定可能である事が分かった。

GNAS 変異;Dmp1-Cre マウスの大腿骨



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	鷗澤 成一  (Uzawa Narikazu)  (30345285)	大阪大学・歯学研究科・教授   (14401)	
研究分担者	阿部 真土  (Abe Makoto)  (40448105)	大阪大学・歯学研究科・講師   (14401)	
研究分担者	宇佐美 悠  (Yusami Yu)  (80444579)	大阪大学・歯学研究科・講師   (14401)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	廣瀬 勝俊  (Hirose Katsutoshi)		
研究協力者	佐藤 淳  (Sato Sunao)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------