

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：32650

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K10170

研究課題名(和文) Hajdu-Cheney症候群特異的iPS細胞を用いた病態解明と治療法の開発

研究課題名(英文) Induction of osteoclast differentiation of Hajdu Cheney Syndrome specific iPS cells.

研究代表者

間 奈津子 (Aida, Natsuko)

東京歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：90615379

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：Hajdu-Cheney症候群は、重度の骨粗鬆症、頭蓋骨変形を主病態とする希少性常染色体顕性の先天性骨疾患である。歯科領域症状には、異常な歯周組織の発疹や重度の歯周病を認め患者のQOLに大きく影響している。しかし、臨床症状は多岐に渡り、患者の症状だけでは診断が困難である場合が多く、決まった治療法も現在のところない。本疾患発症メカニズムを検索するため、患者由来のiPS細胞の樹立に成功し、Notch2遺伝子のPEST配列部分であるエキソーム34に変異を確認している。さらに、マクロファージを誘導し、コントロールのiPS細胞を比較すると破骨細胞分化が亢進することを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Hajdu-Cheney症候群は、未節骨の骨吸収や進行性の骨破壊を起こし、重度の骨粗鬆症、頭蓋骨変形を主病態とする稀な常染色体顕性遺伝子疾患である。歯科領域では、重度な歯周病、歯の早期喪失を認め、患者のQOLに大きく影響を及ぼす。疾患特異的iPS細胞を樹立し、発症メカニズムを検索することは、現在も確立した治療法のない本疾患に対する有効薬剤を同定し治療開発に結びつけることが可能となる。また、破骨細胞への分化亢進など骨リモデリングの異常をきたすことから、近年社会的問題になっている高齢者の骨粗鬆症の治療にも関与することとなる。従って、本疾患のみならず、新たな骨粗鬆症治療法の開発に重要となる。

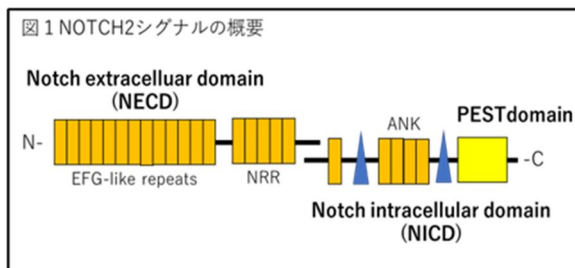
研究成果の概要(英文)：Hajdu-Cheney syndrome is a rare autosomal manifestation of a congenital bone disorder characterized by severe osteoporosis and skull deformity. Dental manifestations include abnormal periodontal tissue eruption and severe periodontal disease, which significantly affects the patient's quality of life. However, the clinical manifestations of the disease vary widely, and it is often difficult to diagnose the disease based on patient symptoms alone. To search for the pathogenic mechanism of this disease, we have succeeded in establishing patient-derived iPS cells and have confirmed mutations in exome 34, the PEST sequence portion of the Notch2 gene. Furthermore, we induced macrophages and confirmed that osteoclast differentiation was enhanced when compared to control iPS cells.

研究分野：生化学

キーワード：Hajdu-Cheney 症候群 iPS細胞 破骨細胞 遺伝子解析

1. 研究開始当初の背景

Hajdu-Cheney 症候群では、痛みや腫れを引き起こす炎症を伴った末端骨溶解症をしばしば認め、また圧迫骨折や変型などを含む脊椎異常や扁平頭蓋底などの進行性骨破壊、特に柔道の骨粗鬆症が知られている。歯科領域では異常な歯周組織の発赤や齲蝕、重度の歯周病、歯の早期喪失などを認める。臨床症状は多岐に渡り、患者自身が感じる症状だけでは診断をすることは困難である。またきわめて希少で臨床治験の蓄積も少なく現在までに確立された治療法はない。通常、骨芽細胞による骨形成と破骨細胞による骨吸収が連動して骨リモデリングが起こり、骨組織の恒常性は保たれる。しかし、Hajdu-Cheney 症候群では破骨細胞による骨吸収活性が異常に亢進する。原因は NOTCH2 遺伝子(図1)でC末端側の最終エキソンに位置する PEST 配列にあるエキソン 34 に遺伝子変異があり、フレームシフトを起こすことで PEST 配列以降が欠失することに起因すると考えられている。それにより、NOTCH2 の正常な分解が行われず、骨吸収を促進する働きを持つ NOTCH2 遺伝子が過剰に蓄積し、骨破壊を進行させると推測される。しかし、どのように破骨細胞の増加を導き、破骨細胞機能が亢進するのか、解明されていない。



2. 研究の目的

NOTCH2 の変異は、近年社会的問題になっている高齢者の骨粗鬆症の治療にも関与することが考えられ、本研究によりもたらされる結果は Hajdu-Cheney 症候群のみならず、新たな骨粗鬆症治療法の開発に重要な結果をもたらすと期待できる。また、疾患特異的 iPS 細胞の樹立は、病態モデルの in vivo での再威厳することによる病態解明、治療法の開発、薬剤の選択など多くの有用性が報告されている。我々は口腔顎顔面領域の希少疾患特異的 iPS 細胞を樹立し、新たな病態解明を報告してきた。Hajdu-Cheney 症候群も大変希少な常染色体顕性先天性骨疾患であり、iPS 細胞を樹立して検討する有用性がある。NOTCH2 遺伝子改変マウスの検討はいくつか行われているものの、ヒトとは共通性を認めない症状も多く病態解明は困難な場合がある。また、疾患特異的 iPS 細胞を用いることにより、ヒト症候群を模することが可能となり、より vivo に近い検討が可能である。従って、遺伝子変異を有する患者由来の iPS 細胞を樹立し、それを用いて Hajdu-Cheney 症候群発症のメカニズムの解明と有効薬剤候補を同定し治療法開発に結び付けることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) iPS 細胞の作製

東京歯科大学口腔外科を受診した Hadju Cheney 患者に研究内容を文書で示した上、口頭での説明を加え、インフォームドコンセントを行い、同意を得た。2017 年の法改正に伴いゲノム DNA の取り扱いに関して記載を加え、東京歯科大学倫理委員会 (No.887) の承認を得た。Hajdu Cheney 症候群患者から血液、歯肉を採取した。採取した 3 mm x 3 mm の大きさの歯肉をエタノールにて消毒し、PBS および DMEM にて洗浄した。その後ミンチ状に細かく裁断し、6 cm ディッシュに入れ、10% ウシ胎児血清 (FBS) と 1% ペニシリン・ストレプトマイシンを添加したダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM) (Fujifilm Wako) で培養した。採取した血液はヒト末梢血単核細胞 (Peripheral Blood Mononuclear Cells P BMC) を単離した。1 x 10⁶ 個で 6 well plate にまき、15ml の X-VIVO10 に 15µl の IL-2 (10µg/ml) 添加した血球培地で 37 °C、5% CO₂ 条件下にて培養した。対照となるヒト iPS 株 201B7-Ff (HPS4290) は、バイオリソースセンター (つくば、日本) から購入した。その後、センダイウィルスを用いて、山中 4 因子 (OCT3/4、SOX2、KLF4、c-MYC) を導入した。

(2) マクロファージへの分化誘導

得られた iPS 細胞は STEMdiff Monocyte Kit を用いて 14 日間培養し、マクロファージへの分化を誘導した。Hajdu-Cheney 症候群 iPS 細胞およびコントロールとしてヒト上皮由来 iPS 細胞 HPS4290 を用いて、CD45、CD14、CD11b positive を指標としたフローサイトメトリー法を行い、マクロファージの分化誘導を確認した。

(3) 破骨細胞分化誘導

RANKL および m-CSF 刺激を 14 日間行い、破骨細胞分化誘導を行った。破骨細胞分化・骨吸収活性について蛍光標識リン酸カルシウム固着プレートを用いた蛍光強度、TRAP 染色、qPCR 法を用いて比較検討した。

4. 研究成果

(1) iPS細胞樹立および遺伝子変異の検索

未分化マーカーの発現をPCRにて確認後、Hajdu-Cheney症候群患者由来iPS細胞由来EB細胞は、テラトーマ形成による三胚葉分化能を示した。樹立したiPS細胞のNotch2遺伝子変異をWhole exome sequenceにより同定した結果、エキソン34にヌクレオチド変異によるdeletionが起こり、フレームシフトを生じることを確認した。(図2)

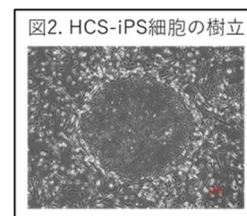


図2. HCS-iPS細胞の樹立

(2) マクロファージ分化誘導

STEMdiff Monocyte Kitで14日間培養した後、CD45、CD14、CD11b positiveを指標としたフローサイトメトリー法を行った結果、HC iPSおよびHPS4290から誘導されたマクロファージ数はともに全細胞中の約50%と同定度であり、本実験条件下でマクロファージ分化能に差は認められなかった。しかし、約半数以上がマクロファージへと分化誘導できることが分かった。

(3) 破骨細胞分化

RNKL、m-csfを50ng/ml濃度添加したRPMI1640培地を用いて、リン酸カルシウムと結合した蛍光標識コンドロイチン硫酸上で培養し、骨吸収作用により上清中に溶出した蛍光を測定した。その結果、Plate Readerにて培養14日間で最も強い蛍光強度を示した。骨吸収活性法により検討した蛍光強度測定においてもHajdu-Cheney症候群iPSで強い蛍光強度を認めた。そこで、14日間培養した際にTRAP染色を行った。破骨細胞分化では、Hajdu-Cheney症候群iPSの方がTRAP+の破骨細胞数が多く認められた。(図3)従って、Hajdu-Cheney症候群iPSで、マクロファージおよび破骨細胞分化系を確立できた。

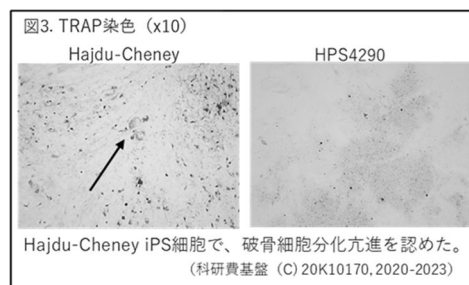


図3. TRAP染色 (x10)

RANKL依存的な破骨細胞分化はコントロールより促進していた。得られた破骨細胞の骨吸収能がコントロールより亢進していた。Hajdu-Cheney症候群由来iPS細胞由来破骨細胞分化機能がNOTCH2シグナルの増強により、亢進する可能性が示された。

(引用文献)

1. 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* 12(10):e0186879, 2017
2. 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. *PLOS ONE* 2017 Sep 15;12(9):e0184702.
3. 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 a rat calvarial bone defect model. *Stem Cell Res Ther.* 2018 Jan 22;9(1):12.
4. Odashima A, Onodera S, Saito A, Ogihara Y, Ichinohe T, Azuma T. Stage-dependent differential gene expression profiles of cranial neural crest-like cells derived from mouse-induced pluripotent stem cells. *Med Mol Morphol.* 2019 Jul 11. doi: 10.1007/s00795-019-00229-2.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Aida Natsuko, Ohno Tatsukuni, Azuma Toshifumi	4. 巻 23
2. 論文標題 Progress and Current Status in Hajdu-Cheney Syndrome with Focus on Novel Genetic Research	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 11374 ~ 11374
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms231911374	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Natsuko Aida, Tatsukuni Ohno, Takashi Nakamura, Akiko Saito, Shajedul Isram, Shoko Onodera, Tshifumi Azuma
2. 発表標題 Induction of Hajdu-Cheney syndrome-specific iPS cells to osteoclast.
3. 学会等名 The 74th Annual Meeting of the Japan Society for Cell Biology
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 間 奈津子、大野 建州、中村 貴、齋藤 暁子、小野寺 晶子、加藤 宏、青木 栄人、東 俊文
2. 発表標題 Hajdu-Cheney症候群疾患特異的iPS細胞を用いた破骨細胞分化誘導
3. 学会等名 第54回日本臨床分子形態学会総会・学術集会
4. 発表年 2022年

〔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	東 俊文 (Azuma Toshifumi) (00222612)	東京歯科大学・歯学部・教授 (32650)	

6. 研究組織（つづき）

	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	中村 貴 (Nakamura Takashi) (80431948)	東京歯科大学・歯学部・講師 (32650)	

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