

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592763

研究課題名(和文)変異GNAS1遺伝子導入マウスを用いた線維性骨異形成症の解析

研究課題名(英文)Research for fibrous dysplasia using mutated GNAS1 transgenic mouse model

研究代表者

佐藤 淳(SATO, Sunao)

大阪大学・歯学研究科(研究院)・講師

研究者番号：70335660

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文):線維性骨異形成症の原因であるR201H変異GNAS遺伝子を骨芽細胞特異的に発現させるトランスジェニックマウスを作製し、組織学的な検討を行ったところ、骨の組織像に形態学的変化が観察された。さらにR201H変異GNAS遺伝子を細胞株に遺伝子導入し、この細胞株の遺伝子発現の変化を検討したところ、cAMPの過剰発現が認められた。さらに、これまでに線維性骨異形成症で変化が報告されている遺伝子の発現を検索したところ、同様の発現変化がこの細胞株でも認められた。本研究で作製したR201H GNAS遺伝子を発現するトランスジェニックマウスと細胞株は、線維性骨異形成症の病態解明モデルとして有用であると考えられる。

研究成果の概要(英文): Fibrous dysplasia (FD) is common fibro-osseous lesions and activating point mutation of the alpha subunit of the stimulatory G protein gene (GNAS) causes FD. For FD patients, main medical treatment is surgical resection. Design of new effective ways of pharmacological intervention relies on appropriate FD animal model, however, to date there is no animal model suitable for reproduction of FD lesion. In this study, we produced cell line with GNAS point mutation and transgenic mice expressing GNAS point mutation with osteoblast specific. We examined the feature of these cell line and transgenic mice. Cell line with GNAS point mutation showed the similar gene expression with FD patients and transgenic mice had bone morphological change compared to wild type mice.

These results suggest that cell line with GNAS point mutation and transgenic mice with osteoblast specific GNAS point mutation are a useful FD model.

研究分野：口腔病理

キーワード：線維性骨異形成症

1. 研究開始当初の背景

線維性骨異形成症 (Fibrous dysplasia:FD)は、未熟な骨形成を伴った線維性結合組織が骨組織を置換して増生する良性病変で、病理学では腫瘍類似病変に分類される。FD の発症部位は顎骨で最も頻度が高く、全身中での約 27%を占め、歯科口腔外科を受診する患者も多いため、口腔領域では重要な研究対象となっている疾患である。

FD の原因は、GNAS1 遺伝子の体細胞変異であり、変異 GNAS1 遺伝子から産生された Gs α タンパク質に恒常的な活性化が生じ、それに引き続いてアデニル酸シクラーゼの活性化が生じて、細胞内の cAMP が過剰に産生される。この cAMP の増加の結果、c-fos 発現が増加し、AP-1 も増加することで、細胞増殖が促進される一方、細胞分化は抑制され、最終的に FD の病態効果が現れることが明らかにされている。

しかしながら、FD の病態には不明な点も多く存在し、骨格の成長後の病変は停止傾向を示す点や、さらには FGF-23 が誘導され、低リン血症性くる病を示す点、稀ではあるが悪性転化を来す点などに関する詳細な機構は明らかにされていない。

2. 研究の目的

骨芽細胞特異的に変異 GNAS1 遺伝子を発現する FD トランスジェニックマウスを作製することにより、安定した FD 病態をマウス動物モデルで再現することが可能となる。作製された FD 動物モデルを用いて、FD 病態の病態解明を行うとともに、将来的には薬剤による FD の治療効果や副作用の判定が可能になると考える。

同時に、FD 動物モデルで使用したものと同様な遺伝子変異を有する変異 GNAS1 遺伝子を細胞に導入し、細胞株のモデルを作製し、FD における遺伝子発現変化について細胞株を利用して詳細な検討を行い、FD 病態の解明を行う。

3. 研究の方法

(1)タイプ I コラーゲンプロモーターの下流に変異 GNAS1 遺伝子を組換えた遺伝子を作成後、マウスへの組換え遺伝子導入操作を行い、タイプ I コラーゲンプロモーターの誘導により、骨芽細胞特異的に変異 GNAS1 遺伝子を発現させ、FD を発症するトランスジェニックマウスを作製する。

(2)作製した FD 動物モデルから骨組織を採取し、病理組織学的検索を行い、実際の FD 疾患との比較検討を行う。

(3)変異 GNAS1 遺伝子を骨芽細胞株 MC3T3 に導入し、細胞の石灰化能の変化を検討するとともに遺伝子発現の変化についての検索を行う。

4. 研究成果

(1)GNAS1 変異遺伝子トランスジェニック

マウスの作製

遺伝子バンクより購入したヒト GNAS1 遺伝子を用いて遺伝子変異体を作製した。変異は、ヒトの FD 病変を用いた検索で多くの報告がされている 201 番目のコドン CGT に CAT の変異を起こし、アルギニンヒスチジンに変異させたもの(R201H 変異体)を生じさせた。この変異体がトランスジェニックマウスにおいて、骨芽細胞特異的に発現するようにタイプ I コラーゲンプロモーターの下流への組換えを行った。(図 1)

図 1

型コラーゲンプロモーター

変異GNAS1遺伝子 [R201H]

(2)FD 動物モデルの病態解析

マイクロ CT を用いて大腿骨遠位端部分の解析を行った。骨断層像を元に 3D 構造を再構築し、GNAS1 トランスジェニックマウスとコントロールマウスを比較すると、GNAS1 トランスジェニックマウス(図 2)では、コントロールマウス(図 3)と比較して海面骨部分における骨形成量が減少している像が観察された。両者の皮質骨部分を比較すると、大きな変化は観察されなかった。

図 2 GNAS1 トランスジェニックマウス

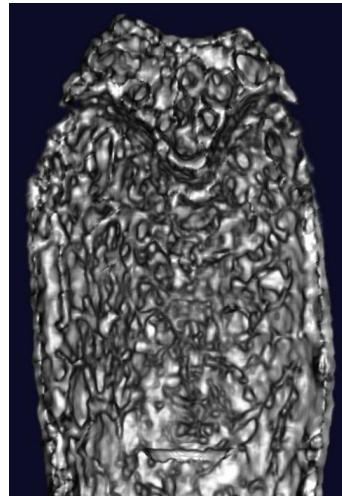
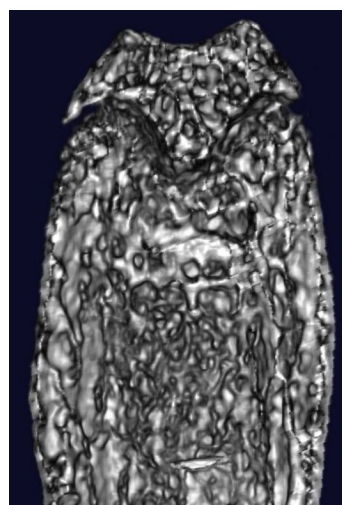


図 3 コントロールマウス



同部を脱灰処理し、薄切片作製後、HE染色により形態観察を行った。

GNAS1 トランスジェニックマウスの皮質骨とコントロールマウスの皮質骨を比較しても明らかな違いは見出されなかった。しかしながら、内部の海面骨領域を比較すると、GNAS1 トランスジェニックマウス (図 4) では、コントロールマウス (図 5) で観察される海面骨の量よりも減少した海面骨の形成が観察された。

図 4 HE 染色 トランスジェニックマウス

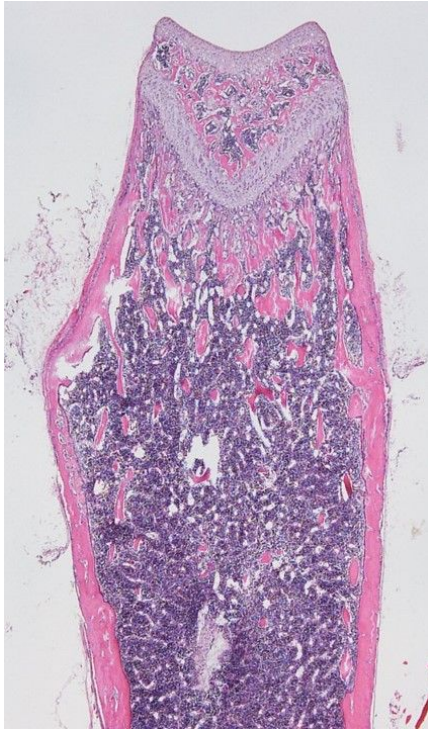
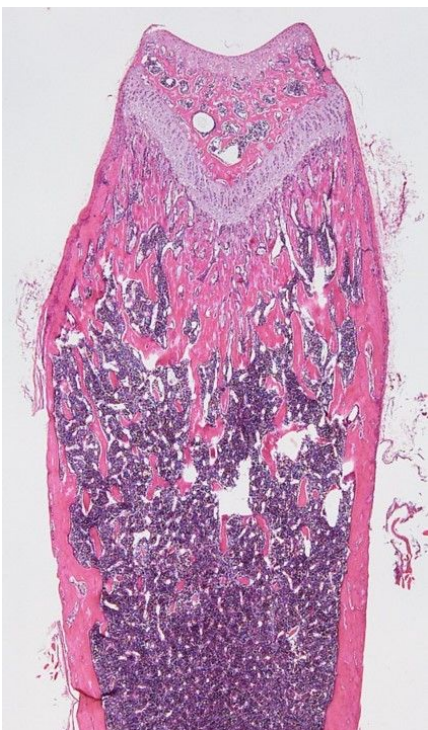


図 5 HE 染色 コントロールマウス

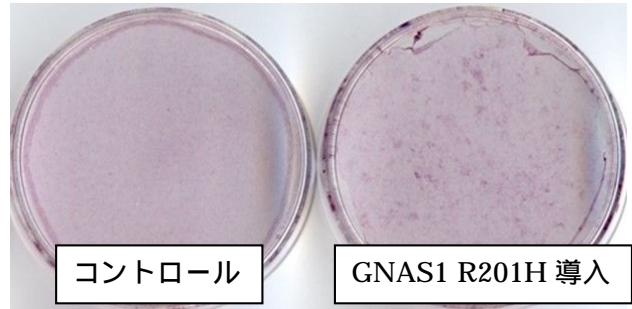


(3)変異 GNAS1 遺伝子発現細胞株

骨芽細胞株 MC3T3 にトランスジェニックマウスと同じ GNAS1 R201H 変異体遺伝子導入を行い、FD 様骨芽細胞の作製を行った。

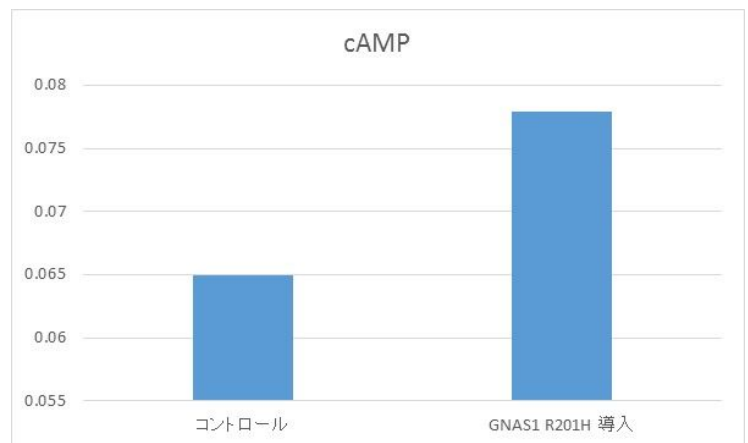
石灰化物形成能の比較検討を行うと、GNAS1 R201H 変異遺伝子を発現する MC3T3 細胞の方がコントロール群と比較して石灰化物形成能が高い (図 6) ことが明らかとなった。

図 6 石灰化物形成能の比較



次に、cAMP の発現量の変化を ELISA 法にて計測し比較した。GNAS1 R201H 遺伝子を導入した細胞では、コントロール細胞と比較して cAMP の発現が上昇していた。(図 7)

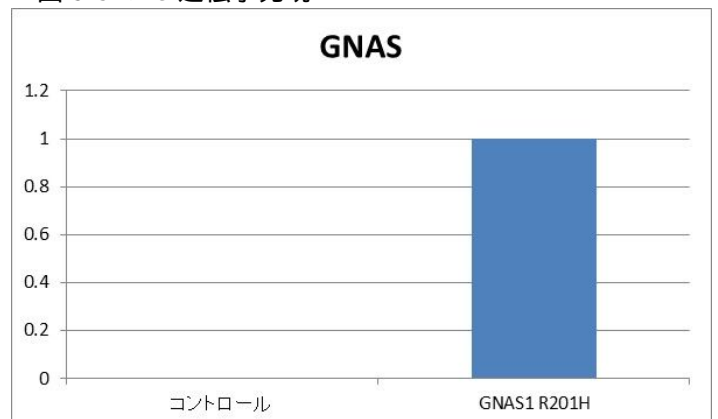
図 7 cAMP の変化



さらに、両者の細胞から RNA を抽出し、遺伝子発現の変化を検索した。

GNAS 遺伝子の発現を検索すると、GNAS1 R201H 導入細胞で GNAS 遺伝子が高い発現を示していた。(図 8)

図 8 GNAS 遺伝子発現



さらにFDの病変において、発現上昇が報告されている遺伝子であるc-fosとc-junの遺伝子発現を検索すると、どちらもコントロールの細胞と比較して、GNAS1 R201H導入細胞において発現が高くなっていることが明らかとなった。(図9, 10)

図9 c-fos

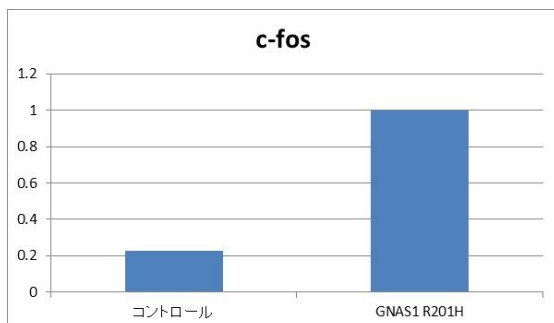
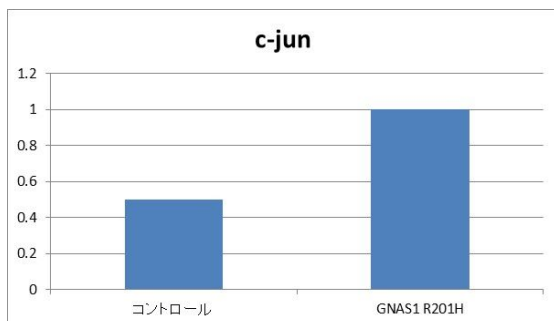


図10 c-jun



さらに、FDの疾患において、発現の変化が検討されているIL-6とRunx2の発現を検索すると、どちらもコントロールの細胞と比較して、GNAS1 R201H導入細胞において発現が低くなっていることが明らかとなった。(図11, 12)

図11 IL-6

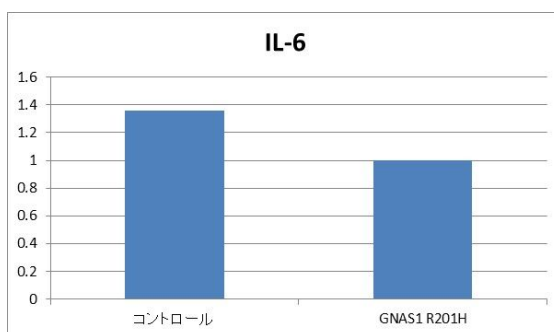
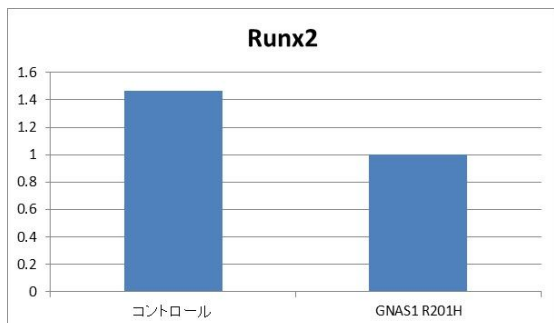


図12 Runx2



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 0件)

〔学会発表〕(計 3件)

Sato S, Noda Y, Oya K, Usami Y, Kishino M, Ogawa Y, Toyosawa S. Establishment of therapeutic effect assessment animal model of fibrous dysplasia. 17th International Congress on Oral Pathology and Medicine. 2014. 5. 25-30. Istanbul (Turkey).

豊澤悟、佐藤淳、岸野万伸、宇佐美悠、野田百合、松本由香、小川裕三 A case of spontaneous malignant transformation of fibrous dysplasia on the right mandible. 第24回日本臨床口腔病理学会総会・学術大会 2013年8月28-30日 日本大学理学部1号館CSTホール(東京都・千代田区)

佐藤淳、岸野万伸、宇佐美悠、小川裕三、豊澤悟 下顎骨腫瘍の一例 第23回日本臨床口腔病理学会総会・学術大会 2012年8月29-31日 東京医科歯科大学M&Dタワー鈴木章夫記念講堂(東京都・文京区)

〔図書〕(計 1件)

佐藤淳、岸野万伸 文光堂 病理と臨床 2015年臨時増刊号(33巻)病理診断クイックリファレンス 2015年 56-56

〔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：
出願年月日：
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

佐藤 淳(SATO, Sunao)

大阪大学・大学院歯学研究科・講師
研究者番号：70335660

(2)研究分担者

阿部 真土 (ABE, Makoto)
大阪大学・大学院歯学研究科・講師
研究者番号：40448105

岸野 万伸 (KISHINO, Mitsunobu)
大阪大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号：60346161

(3)連携研究者

()

研究者番号：