

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：32650

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11948

研究課題名(和文) Apert症候群に対する疾患特異的iPS細胞の樹立とその応用

研究課題名(英文) Establishment and application of disease-specific iPS cells for Apert syndrome

研究代表者

石井 武展 (Ishii, Takenobu)

東京歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：80433978

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)： Apert症候群は、線維芽細胞成長因子受容体(以後FGFR2)の変異が報告されており、IgIIドメインの変異Ser252Trpが2/3、IgIIIドメインの変異Pro253Argが1/3に認められる頭蓋顎顔面に変形をきたす遺伝性疾患である。未だヒト由来の疾患モデルは作製されておらず、本疾患の病態は不明な部分が多い。そこで、Apert症候群の患者の口腔粘膜上皮または血中リンパ球より、疾患特異的iPS細胞の樹立を行い、この細胞から骨あるいは軟骨への分化異常機序の解明、および正常FGFR2を導入したiPS細胞による正常骨分化誘導を確認することによりApert症候群の発症機序の解明を行う。

研究成果の学術的意義や社会的意義

疾患特異的iPS細胞の樹立は病態解明、治療法の開発、薬剤の開発などへの応用が可能であるが、現在までにApert疾患特異的iPS細胞の樹立の報告はないため、新規性の高い研究である。

FGFR2は人体の発生機序において多くの細胞機能を制御する重要な遺伝子であるため、本研究で得られる結果はApert症候群のみならず多くの細胞生物分野にとって有意義な情報の提供を可能とする。特に、近年FGFR2遺伝子は、スキルス胃癌、胆道癌、子宮体癌などの癌治療薬のターゲットとして注目されているので、本研究は、口腔顎顔面領域だけではなく全身的な新たな癌治療法の開発にも重要な結果を提供することが期待できる。

研究成果の概要(英文)： Apert syndrome is a mutation in the fibroblast growth factor receptor (FGFR2) has been reported, in which the IgII domain mutation Ser252Trp is 2/3 and the IgIII domain mutation Pro253Arg is 1/3. Apert Syndrome is a genetic disorder that causes craniofacial deformity. A human-derived disease model has not yet been created, and the pathophysiology of this disease is largely unknown.

Therefore, we established disease-specific iPS cells from the oral mucosal epithelium or blood lymphocytes of patients with Apert syndrome, elucidated the mechanism of abnormal differentiation of these cells into bone or cartilage, and introduced iPS cells into which normal FGFR2 was introduced. This study will elucidate the pathogenic mechanism of Apert syndrome by confirming the induction of normal bone differentiation.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：Apert症候群 iPS細胞 FGFR2

1. 研究開始当初の背景

頭蓋顎顔面に変形をきたす遺伝性疾患は、頭蓋顎顔面の健常者と異なる成長様式を示し頭蓋顎顔面領域の醜形を惹起する。また、頭蓋顎顔面形態の異常は、脳神経や気道など生命維持に必要な器官への影響が強く治療が難しい。その中でも、Apert 症候群は、線維芽細胞成長因子受容体(以後 FGFR2)の変異が報告されており、IgII ドメインの変異 Ser252Trp が 2/3、IgIII ドメインの変異 Pro253Arg が 1/3 に認められる。これらは Gain of function の病態を示す。

FGFR2は特に骨や軟骨形成に関与していることが示されており FGFR2 が上記の部位で点変異すると通常では結合しない FGF が FGFR2 に結合することにより、細胞内にシグナルを入れることが判明している。臨床所見として、15 万人に 1 人の割合で出生し、早期頭蓋の癒合、口蓋裂、気道閉塞、ファロー四徴症および精神遅滞を伴い、生後 1 歳から 10 回以上もの外科的な処置が必要な重篤な難病である。Apert 症候群の臨床上的問題点として、生命予後を脅かすような外科的な治療が主となっており非侵襲的な治療が不可避である。本邦では国の指定難病とされており文部科学省と厚生労働省より速やかな疾患発症機序の解明、創薬研究および治療法の開発が推進されている疾患の一つである。

2. 研究の目的

近年、マウスモデルの作製による本疾患の病態解明が報告されているが、ヒト由来の疾患モデルは未だ作製されておらず、本疾患の病態は不明な部分が多い。そこで、当院矯正歯科に来院している Apert 症候群の患者の口腔粘膜上皮より、疾患特異的 iPS 細胞の樹立を行い、この細胞から骨あるいは軟骨への分化異常機序の解明、および正常 FGFR2 を導入した iPS 細胞による正常骨分化誘導を確認することにより Apert 症候群の発症機序の解明を行う。

3. 研究の方法

Apert 症候群患者より採取した頬粘膜から線維芽細胞を分離後、ゲノム DNA を抽出しサンガー法により FGFR2 の Ser252Trp 変異であることを確認した。その後、Apert 症候群患者由来線維芽細胞へ山中 4 因子発現 SeVdp( KOSM302L) ベクターを感染させ、iPS 細胞を樹立した。樹立後の iPS 細胞について未分化マーカー( NANOG, REX1 など)の発現や、胚様体形成後の三胚葉分化マーカー( AFP, T, MAP2)の発現を RT-PCR で確認し、iPS 細胞が万能性を有するか否かを Scid マウスへ移植しテラトマ形成の有無により確認する。次にこの細胞を用いて、PLoS One. 2014 9(6):e99534 の方法に従って骨芽細胞分化誘導する。分化の確認として骨芽細胞分化マーカー( ALP, OSX, OCN, BSP など)の発現を qPCR 法にて検討、また ALP 活性を酵素法にて検討、さらに石灰化の指標として Von Kossa 染色を行い、骨芽細胞分化の促進、石灰化の亢進という Apert 症候群の表現型について調べる。

4. 研究成果

1) 樹立後の iPS 細胞について未分化マーカー( OCT3/4, SOX2, KLF4, c-MYC, NANOG, REX1)の発現と胚様体形成後の三胚葉分化マーカー( AFP, T, MAP2, hSOX, FOXA2,PAX6)の発現を RT-PCR で確認した。また、Scid マウスへ移植しテラトマ形成を確認し、樹立した iPS 細胞が未分化性、万能性を有することを確認した( 図1)。

2) 樹立した iPS 細胞を骨芽細胞分化誘導したところコントロール細胞である Nips-B2( HPS0223)と比較して、有意な骨芽細胞分化マーカーの上昇は確認されなかった。これは従来報告されていた結果と異なるものであった。そこで、変異型 FGFR2 における骨芽細胞分化について詳細に調べるためにヒト間葉系幹細胞( hMSC)に Apert 症候群患者由来 cDNA ライブラリからクローニングした野生型および変異型 FGFR2 遺伝子をレンチウイルスを用いて導入して解析を行った。その結果やはり、野生型に比べ、有意な骨芽細胞分化マーカーの上昇は確認できなかった( 図2)。

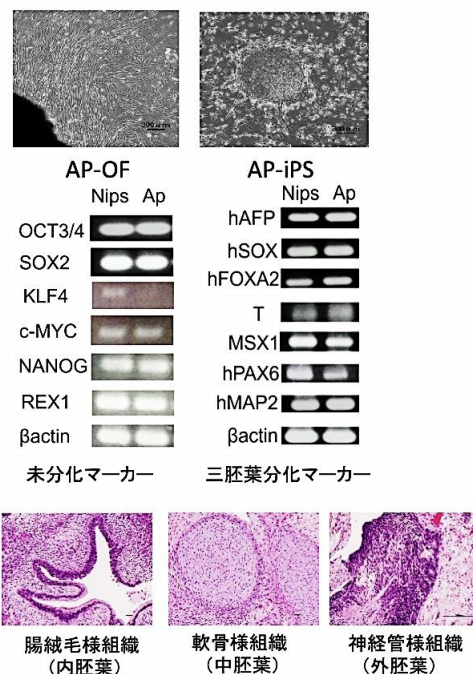


図1 iPS細胞樹立の確認

3) FGF ファミリーのなかで変異型 FGFR2 の下流シグナル経路に強く影響をあたえているのかを調べた。変異型 FGFR2 で FGF2,6,7,10 において結合特異性が増加することが知られている。そこで野生型および変異型線維芽細胞それぞれに FGF2,6,7,10 を加えて FGFR2 の下流である ERK の動きをウエスタンブロットにて比較した。その結果、FGF2, FGF6 では野生型よりも変異型で活性化していることが確認できた( 図3)。

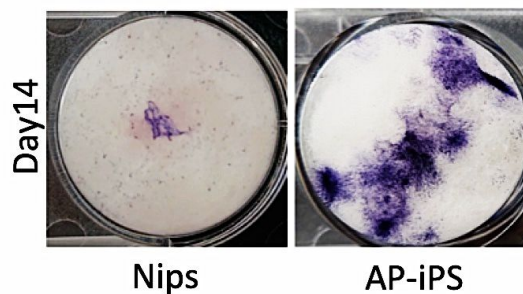


図2 骨芽細胞分化誘導によるALP活性

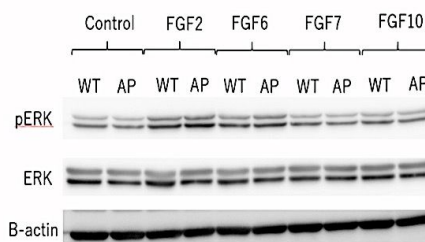


図3 FGFsによるシグナル活性について

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件(うち招待講演 0件/うち国際学会 3件)

1 . 発表者名 Takenobu Ishii, Hiroyuki Ogura, Shoko Onodera, Kenji Sueishi, Toshifumi Azuma
2 . 発表標題 Establishment of Apert syndrome disease-specific iPS cells.
3 . 学会等名 96th IADR/PER General Session & Exhibition ( 国際学会 )
4 . 発表年 2018年

1 . 発表者名 Hiroyuki Ogura, Takenobu Ishii, Nana Morita, Katsuhito Watanabe, Shoko Onodera, Kenji Sueishi, Toshifumi Azuma
2 . 発表標題 Investigation of Apert syndrome with disease-specific iPS cells
3 . 学会等名 第65回国際歯科研究学会日本部会 ( JADR ) 学術大会
4 . 発表年 2017年

1 . 発表者名 Takenobu Ishii, Hiroyuki Ogura, Shoko Onodera, Kenji Sueishi, Toshifumi Azuma
2 . 発表標題 Establishment of Apert syndrome disease-specific iPS cells.
3 . 学会等名 The 96th IADR/PER General Session & Exhibition ( 国際学会 )
4 . 発表年 2018年

1 . 発表者名 Takenobu Ishii, Hiroyuki Ogura, Shoko Onodera, Kenji Sueishi, Toshifumi Azuma
2 . 発表標題 Induction of Osteoblasts and Chondrocytes from Apert Syndrome-specific iPS Cells.
3 . 学会等名 The 97th IADR/AADR/CADR General Session & Exhibition ( 国際学会 )
4 . 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroyuki Ogura, Takenobu Ishii, Kenji Sueishi, Toshifumi Azuma
2. 発表標題 Generation of disease-specific induced pluripotent stem cells from patients with Apert syndrome
3. 学会等名 The 2019 AAO Annual Session in Los Angeles
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>コア研究 分子病態学研究部門  <a href="http://www.tdc.ac.jp/college/activity/tabid/527/Default.aspx">http://www.tdc.ac.jp/college/activity/tabid/527/Default.aspx</a></p>
--

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	山口 朗  (Yamaguchi Akira)  (00142430)	東京歯科大学・歯学部・客員教授   (32650)	
研究分担者	末石 研二  (Sueishi Kenji)  (00154427)	東京歯科大学・歯学部・教授   (32650)	
研究分担者	小野寺 晶子  (Onodera Shoko)  (90637662)	東京歯科大学・歯学部・講師   (32650)	

## 6. 研究組織（つづき）

	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	齋藤 暁子 (Saitou Akiko) (90722835)	東京歯科大学・歯学部・助教  (32650)	
連携 研究者	東 俊文 (Azuma Toshifumi) (00222612)	東京歯科大学・歯学部・教授  (32650)	