

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592801

研究課題名(和文)患者口腔粘膜由来 iPSC細胞を用いた疾患モデルシステムの構築と治療法の開発

研究課題名(英文) Establishment of disease model system using patient-derived oral mucosa fibroblast-iPSCs and development of new therapy

研究代表者

三好 圭子 (MIYOSHI, Keiko)

徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・講師

研究者番号：20304537

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)：難治性遺伝性疾患であり、リソソーム蓄積病の一つであるゴーシェ病患者の口腔粘膜線維芽細胞から疾患 iPSC細胞を樹立するとともに、口腔粘膜線維芽細胞を用いて既知の原因遺伝子である GBA1 遺伝子の SNPs を検索した結果、本モデルが異型ゴーシェ病モデルである可能性を見出した。また口腔粘膜線維芽細胞は、GCCase 活性を再現性よく測定することが可能であり、マイクロアレイによる網羅的解析により、リソソーム関連遺伝子の発現が、現在臨床で GCCase 活性測定に用いられている皮膚線維芽細胞とほぼ同等の発現レベルを示すことが判明したことから、リソソーム病研究に適した細胞であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Gaucher disease (GD) is one of the rare inherited lysosomal storage disorders. In this study, we established the human induced pluripotent stem cells (iPSCs) from oral mucosa fibroblasts (OFs) derived from a patient diagnosed as "GD". We also screened the SNPs of GBA1 gene using OFs, and found that this is an atypical GD-type. Furthermore, we found OFs were also reproducible materials for GCCase activity. OFs have high lysosome related gene expressions similar to dermal fibroblasts, which used for checking GCCase activity in the clinics. Therefore, we propose that OFs are suitable materials for the study for lysosomal disease.

研究分野：口腔生化学、分子生物学、細胞生物学

キーワード：遺伝学 ゴーシェ病 口腔粘膜線維芽細胞 疾患特異的 iPSC細胞

1. 研究開始当初の背景

ゴーシェ病は細胞内リソソームの加水分解酵素の一つである β -グルコセレブロシダーゼ(GCase)の活性低下により、グルコセレブロシドが細胞内に蓄積し、肝脾腫、けいれん、貧血、血小板減少や中枢神経症状等を呈する。そのため観血処置を伴う歯科治療では特に注意を要するが、逆にその臨床所見から歯科受診により未診断のゴーシェ病に気付く場合がある。ゴーシェ病は常染色体劣性の遺伝性疾患で、世界的には5-10万人に1人、我が国では神経症状を伴わないものが50万人に1人、神経症状を伴うものが120万人に1人と報告されている稀少難病であり (Ida et al., *J.Inher.Metab.Dis.*,1997)、現在国内に約150名の患者が同定されている (厚生労働省難治性克服事業ライソゾーム病に関する調査ホームページ)。

原因とされる *GBAI* 遺伝子の変異は300を超えて報告され、臨床症状の頻度は人種間で異なることから、日本には未だ原因変異が不明の患者も多い。治療としては哺乳類培養細胞由来組換えヒト酵素製剤を用いた酵素補充療法が臨床応用されているが、中枢神経障害を伴う疾患への無効性、継続投与に基づく中和抗体の出現などが問題になっており、我が国でも患者の遺伝子診断の充実や、治療法開発のためのヒトの細胞による *in vitro* 疾患モデル系の構築の重要性が高まっている。

申請者は最近、口腔粘膜由来の線維芽細胞を用いて iPS 細胞を樹立し、ドナーへの侵襲度の低さや創傷治癒の早さ、また効率の点からも細胞ソースとして有用であることを示した (Miyoshi et al., *J Biosci Bioeng*, 2010)。この実績をふまえて、患者の負担は最小限の形で検体を採取し、ゴーシェ iPS 細胞株が樹立できれば、ゴーシェ病のヒトモデル細胞として細胞を分化誘導し、疾患の分子メカニズムの解明および治療薬の効果の検討に役立つとともに、患者の細胞を用いた新規治療薬のスクリーニング、さらには新規治療法の開発へと利用できることから、難病医学の発展に大きく貢献できると考えた。また、日本人 *GBAI* 遺伝子の新規ホットスポットが発見できれば、遺伝子診断の有用な情報を提供するものと期待できる。

そこで、本研究ではゴーシェ病患者由来の口腔粘膜組織から患者と同じ遺伝子背景を持つ iPS 細胞を作製し、特に神経細胞に分化誘導させることにより、現在困難とされているゴーシェ病の神経症状の改善を目標に、病態の分子メカニズムの解明と遺伝子導入法の開発のための基礎研究を行うことを目的とする。また、本患者の *GBAI* 遺伝子変異部位を決定し、組織提供者である患者とその家族の要望に応えるとともに、日本人の変異の例としてデータを提供する。

申請者はこれまでに、徳島大学倫理委員会および遺伝子組換え委員会から、患者由来細胞による iPS 細胞の樹立およびその研究につ

いての承認を得た上で、徳島大学病院に現在通院されているゴーシェ病患者1例からインフォームドコンセントの後、検体(口腔粘膜)を採取し、すでにリプログラミング4因子を導入し、iPS細胞様クローンを得たところであった。

2. 研究の目的

本研究では、難治性疾患の1つであるゴーシェ病患者の口腔粘膜から iPS 細胞を樹立し、さらに疾患モデル細胞分化系を構築して、病態メカニズムの解明および新規遺伝子治療法の開発のための基礎研究を行うこと、さらには再生医療における歯科の新たな役割を提示することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 各種委員会の承認取得

- ① 徳島大学病院臨床研究倫理委員会：承認番号#1130, 1533
- ② 徳島大学遺伝子解析組み換え実験安全管理委員会：承認番号#20-296
- ③ 徳島大学動物実験委員会：承認番号#徳動物11116
- ④ 徳島大学ヒトゲノム研究倫理委員会：承認番号#H24-15

(2) ゴーシェ病患者口腔粘膜由来 iPS 細胞の多能性解析

① 未分化マーカーの確認

ES マーカー (NANOG, OCT4, SSEA4, TRA1-60, REX1) およびリプログラミングマーカー (外因性及び内因性の OCT4, SOX2, KLF4, c-MYC) を、mRNA レベル (RT-PCR) およびタンパク質レベル (免疫染色) にて同定した。

② 多能性の確認

胚葉体形成による *in vitro* 分化系および SCID マウス精巢への iPS 細胞移植によるテラトーマ形成 (*in vivo* 分化系) の後、組織学的解析および三胚葉由来組織マーカー (Neurofilament H, α -smooth muscle actin, α -fetoprotein など) の検出により解析した。

③ 核型解析

核型の異常の有無を G-バンド解析により確認した。

(3) ゴーシェ病患者口腔粘膜線維芽細胞を用いた *GBAI* 遺伝子の変異解析

① mRNA およびゲノム DNA 由来の *GBAI* 遺伝子の変異解析

RT-PCR 法およびゲノム PCR 法により得た PCR 産物をクローニングした後、シークエンスを行い、SNaPshot 法にて確認した。

② ゲノム DNA を用いたエクソーム解析による *GBAI* 遺伝子の変異解析

③ *GBAI* RT-PCR 産物のダイレクトシークエンスによる確認

④ ご家族の口腔粘膜線維芽細胞由来ゲノム DNA を用いたエクソーム解析

(4) ゴーシェ病患者及び家族の口腔粘膜線維芽細胞での GCCase 活性測定

4-Methylumbelliferyl beta-D-glucopyranoside (4-MU-Glc)を基質とし、GCCase を含む細胞抽出液と 37°C で 40 分間反応後、生じた 4-Methylumbelliferone (4-MU)の傾向強度を測定した。

(5) 患者及び家族のゲノム DNA を用いた全ゲノムエクソーム解析による他の遺伝子変異のスクリーニング

(6) 口腔粘膜線維芽細胞の発現遺伝子プロファイルの作成と、皮膚線維芽細胞および iPS 細胞との比較検討による細胞特性の解析

健康ボランティア由来の口腔粘膜線維芽細胞 3 株、購入したヒト皮膚線維芽細胞 3 株、および当研究室で樹立した口腔粘膜線維芽細胞由来 iPS 細胞 3 株から各 RNA を抽出し、マイクロアレイ解析を行った。DAVID による FAC 解析とパスウェイ解析結果から各群の遺伝子発現プロファイルを比較検討した。

4. 研究成果

(1) ゴーシェ病患者口腔粘膜由来 iPS 細胞の多能性解析

すでにゴーシェ病患者 1 例からインフォームドコンセントの後、採取した口腔粘膜組織から線維芽細胞を分離し、リプログラミング 4 因子 (OCT4, SOX2, KLF4, c-MYC) をレトロウイルスベクターで導入し、iPS 様細胞を得ていたことから、その多能性を解析した。その結果、①未分化マーカーの確認として ES マーカー(NANOG, OCT4, SSEA4, TRA1-60, REX1)およびリプログラミングマーカー (外因性及び内因性の OCT4, SOX2, KLF4, c-MYC) の mRNA(RT-PCR)およびタンパク質 (免疫染色)が検出され、ES 細胞同様の未分化能を持つことが示唆された (図 1)。

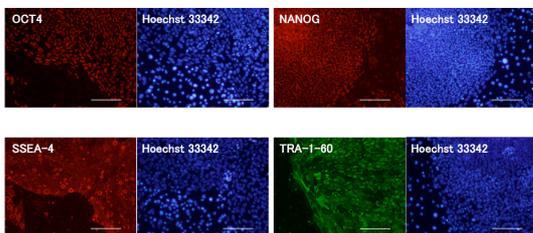


図 1 患者由来 iPS 細胞の未分化能解析

② 多能性の確認

胚葉体形成による *in vitro* 分化系および SCID マウス精巣への iPS 細胞移植によるテラトーマ形成 (*in vivo* 分化系) により組織学的解析および三胚葉由来組織マーカー (Neurofilament H, α -smooth muscle actin, α -fetoprotein など)を検出し、多能性を持つことを確認した (*in vitro*, 図 2; *in vivo*, data not shown)。

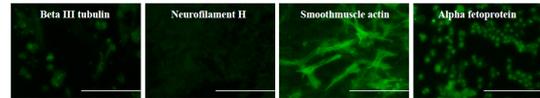


図 2 *in vitro* 分化系による多分化能解析 (左から、 β -III tubulin, Neurofilament H, α -smooth muscle actin, α -fetoprotein)

③ 核型解析

G バンド解析により、樹立した iPS 細胞クローンに染色体の異常がないことを確認した (data not shown)。

以上の結果から、ゴーシェ病患者口腔粘膜線維芽細胞由来 iPS 細胞の樹立に成功した。

(2) ゴーシェ病患者口腔粘膜線維芽細胞を用いた *GBA1* 遺伝子の変異解析

現在、ゴーシェ病の原因遺伝子とされている *GBA1* 遺伝子は、ヒト 1 番染色体に位置し、pseudogene(*GBAP*)が隣接して存在している (図 3)。



図 3 ヒト 1 番染色体 *GBA1* 遺伝子座

そこで、*GBAP* に存在しない配列を利用して (図 4) primer を設計し、患者口腔粘膜線維芽細胞から RNA およびゲノム DNA を抽出し、RT-PCR およびゲノム PCR 法により *GBA* 遺伝子をいくつかの DNA 断片としてクローニングした後、全エクソンのシーケンスを行った。



図 4 *GBA1* 遺伝子構造と、*GBAP* にない配列 (青 box)

その結果、エクソンの 2 箇所 SNP を同定した。さらに、この SNP はいずれもヘテロ接合体であった (data not shown)。そこでエクソーム解析を行い、*GBA1* 遺伝子の SNPs を確認した。以上の結果から、常染色体劣性遺伝疾患であるというゴーシェ病の定義と異なることを発見し、本患者症例が、異形ゴーシェ病である可能性が示唆された。また、本症例では *GBA1* 遺伝子以外に、疾患に関与するモディファイヤー遺伝子の存在が示唆された。

(3) ゴーシェ病患者及び家族の口腔粘膜線維芽細胞での GCCase 活性測定

次に、ご家族からインフォームドコンセントを得た上で、口腔粘膜組織の提供を受け、患者の場合と同様に口腔粘膜線維芽細胞を

分離培養したのち、患者の細胞とともに *GBA1* 遺伝子がコードしている GCCase の酵素活性を測定した(data not shown)。その結果、コントロールとして用意した健常ボランティアの口腔粘膜線維芽細胞の GCCase 活性に比べ、患者の場合 10%ほどの活性がないことを確認した。同時に、ゴーシェ病を発症していない家族の中で、GCCase 活性がコントロールに比べ 50%前後で検出されたサンプルをみいだしたことから、家族の *GBA1* 遺伝子およびその他の遺伝子について、エクソーム解析を行って検討した。

(4) 患者及び家族のゲノム DNA を用いた全ゲノムエクソーム解析による他の遺伝子変異のスクリーニング

家族のエクソーム解析による *GBA1* 遺伝子の SNP 解析結果は、酵素活性との間に相関が見られない結果となった (data not shown)。そこで、患者およびご家族の全遺伝子のエクソーム解析結果をもとに、GCCase 活性を指標として、現在、GCCase 活性に影響を及ぼすモディファイヤー遺伝子の絞り込みを行っている。既知のモディファイヤー遺伝子については図5に示す遺伝子について検討したが、結果は変異なしであった。

Gene	Function	Reference
<i>TFEB</i>	<i>GBA1</i> mRNA expression	Science, 325, 2009
<i>HSP70, DNAJB1, DNAJB9, BAG3</i>	GBA protein folding (chaperons)	Proc Natl Acad Sci USA, 111, 2014
<i>TCP1</i>		Proc Natl Acad Sci USA, 107, 2010
<i>LIMP-2 (SCARB2)</i>	Trafficking	Hum Mutat, 32, 2011
<i>Mannose 6 phosphatase receptor (M6P-R)</i>		Nat Commun, 5, 2014
<i>PI4KIIa, PI4KIIIβ</i>		Mol Biol Cell, 23, 2012
<i>Prosaposin (PSAP), Saposin C (SAPC)</i>	GCCase activity	Hum Mol Genet, 19, 2010

図5 GCCase 活性に影響を与えると報告されているモディファイヤー遺伝子群

全体では 19,293 個の SNPs が検出されたが、現在、遺伝様式、GCCase 活性を指標に SNPs を絞り込みを進めている。今後、候補遺伝子変異の同定のためのさらなる解析が必要である。

(5) 口腔粘膜線維芽細胞の発現遺伝子プロファイルの作成と、皮膚線維芽細胞および iPS 細胞との比較検討による細胞特性の解析

従来は GCCase 活性の測定に皮膚線維芽細胞が用いられてきたが、本研究では、口腔粘膜線維芽細胞は分離培養が簡単で、増殖能力に優れていることから、維持培養が簡便であった。GCCase 活性も高く、再現よく解析できることから、口腔粘膜線維芽細胞を診断スクリーニング用の細胞として推奨できるのではないかと考え、これまで創傷治癒の観点からしか報告のなかった口腔粘膜線維芽細胞の特性について、網羅的発現遺伝子解析を行い、その特性について検討した。

その結果、口腔粘膜線維芽細胞および皮膚線維芽細胞と、iPS 細胞を比較すると、両線維芽細胞では糖脂質代謝関連遺伝子群および、リソソーム関連遺伝子の発現が高発現であった。口腔粘膜線維芽細胞と皮膚線維芽細胞を比較すると、口腔粘膜線維芽細胞では糖タンパク質群や胚発生関連の転写因子群の発現が高く、HOX 遺伝子群は低かった。また、神経堤細胞の特徴と共に、種々の情報伝達経路の発現が高いが、p53 経路、とくに老化シグナル経路が低いことを見出した。さらに iPS 細胞との比較から、口腔粘膜線維芽細胞は外来刺激に対する応答性と可塑性を有することが示唆された (図6, *Biomed Res Int.*, in press)。

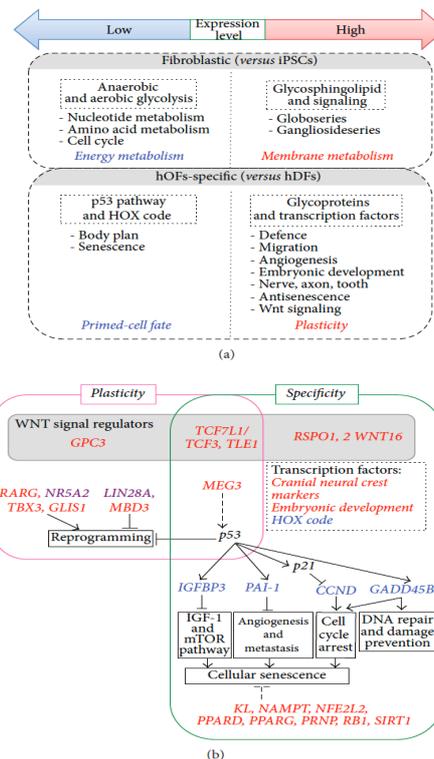


図6 口腔粘膜線維芽細胞での発現遺伝子プロファイルのまとめ(a)と、細胞特性を示唆する遺伝子ネットワークの提案 (b) (*Biomed Res Int.*, in press)

以上、本研究結果を総括すると、当初の計画とは異なるが、本研究での症例が、想定していた典型的なゴーシェ病症例ではなく、異型ゴーシェ病モデルとなる可能性が見出された。さらに新規モディファイヤー遺伝子変異の同定は、病態メカニズム解明や治療法の開発のシーズとなる可能性があり、本来の目的に沿うものと考えられる。また、その研究成果は本邦のみならず世界のゴーシェ病研究において重要なシーズとなる可能性があることから、本研究はさらなる発展と継続が必須である。また、本研究材料として使用した口腔粘膜線維芽細胞が組織再生やリソソーム病研究に適した細胞である事を見出し

たことにより、歯科領域の細胞を広く世界に発信できたと考える (*Biomed Res Int., in press*)。

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1件)

1. Miyoshi K, Horiguchi T, Tanimura A, Hagita H, Noma T. Gene signature of human oral mucosa fibroblasts: comparison with dermal fibroblasts and induced pluripotent stem cells. *Biomed Res Int.*, 査読有, 2015, in press.

[学会発表] (計6件)

1. 三好圭子, 堀口大吾, 谷村綾子, 萩田浩子, 野間隆文. ヒト口腔粘膜線維芽細胞の特性: 皮膚線維芽細胞, iPS 細胞との網羅的遺伝子発現の比較解析. 第14回日本再生医療学会総会, 2015年3月20日, パシフィコ横浜 (神奈川・横浜市)
2. Miyoshi K, Horiguchi T, Tanimura A, Hagita H, Toda Y, Kagami S, Mori K, Tsuji D, Itoh K, and Noma T. Gaucher disease caused by possible atypical mechanism. Gordon Research Conference, Lysosomal Diseases, March 15th and 17th, 2015, Galveston, TX (USA)
3. 三好圭子. 新規異型ゴーシェ病疾患メカニズム解明の試み. 平成26年度革新的特色研究シンポジウム「再生医学研究プラットフォームの構築と臨床応用への展開」, 2015年3月4日, 徳島大学 (徳島・徳島市)
4. 三好圭子. 口腔粘膜線維芽細胞の有用性と iPS 細胞を用いた再生歯科学へのアプローチ. 第12回日本再生歯科医学会学術大会・総会, 2014年8月26日, 徳島大学 (徳島・徳島市)
5. 三好圭子. 疾患 iPS 細胞の樹立と遺伝子変異の同定. 平成25年度革新的特色研究シンポジウム「再生医学研究プラットフォームの構築と臨床応用への展開及び産官学連携推進報告会」, 2014年3月17日, 徳島大学 (徳島・徳島市)
6. 三好圭子. 口腔粘膜線維芽細胞を用いた疾患 iPS 細胞の樹立と今後の展望 —口腔から再生医学・再生医療をめざして—. 第10回HBS公開シンポジウム「再生医学研究の現状と臨床応用への課題」, 2013年11月12日, 徳島大学 (徳島・徳島市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三好 圭子 (MIYOSHI, Keiko)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・講師

研究者番号: 20304537

(2) 研究分担者

野間 隆文 (NOMA, Takafumi)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

研究者番号: 40189428