

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 3 日現在

機関番号：32650

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20379

研究課題名(和文) 口腔疾患特異的iPS細胞作製による病態機序の解明

研究課題名(英文) Establishment of iPSCs and osteoblast differentiation of fibroblasts from Gorlin syndrome patients.

研究代表者

篠 宏美 (Shino, Hiromi)

東京歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：00445446

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：基底細胞母斑症候群(Gorlin症候群)はHedgehogの受容体であるPTCH1を原因遺伝子とし、骨形成異常や腫瘍病変を呈する。本研究では、Gorlin症候群患者由来線維芽細胞を用いてiPS細胞を樹立し、我々が以前報告したiPS細胞からの骨芽細胞分化誘導法を応用し、正常ヒト由来iPS細胞との比較によりPTCH1の変異が骨芽細胞分化に与える影響を検討した。リアルタイムPCRの結果より、分化誘導後ではHedgehogターゲット遺伝子の発現減少が認められた。一方、WNTシグナル関連遺伝子の発現は増加することからiPSCsからの骨芽細胞分化においてWNTシグナルが活性化することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Disease-specific pluripotent stem cells (iPSCs) allow in vitro investigation of genetic diseases with unclear phenotype-genotype associations, such as Gorlin syndrome. We generated iPSCs from four unrelated Gorlin syndrome patients, all with genetic functional loss of PTCH1, using the SeVdp (KOSM302L) vector. Activation of the Hedgehog (Hh) effector Smoothened (SMO) by SAG plus osteo-induction induced significantly higher ALP expression in patient-derived iPSCs than control iPSC lines. Patient-derived iPSCs had lower basal expression of Hhs, Wnts, and BMPs than control iPSCs before osteogenic induction, but much greater increases under osteogenic treatment, indicating osteogenic hypersensitivity. We propose that iPSCs from Gorlin syndrome patients have constitutively active Hh signaling, which confers enhanced susceptibility to osteogenesis and contributes to disease-associated abnormalities.

研究分野：生化学

キーワード：疾患特異的iPS細胞 iPS細胞 骨芽細胞 骨細胞 Hedgehog

1. 研究開始当初の背景

Gorlin症候群は母斑性基底細胞癌症候群

(NBCCS) または基底細胞母斑症候群

(BCNS) とも呼ばれており、1960年にゴーリンとゴルツによって最初に報告された常染色体優性疾患である。原因遺伝子としてヘッジホッグシグナルに関連するPatched1

(PTCH1) の変位及びいくつかの関連する遺伝子が同定されている。臨床所見として、手掌や足底の小陥凹、二分肋骨ないし癒合肋骨や大脳鎌石灰化などの骨形成異常、歯原性嚢胞や基底細胞癌等の腫瘍病変を呈する。このように、様々な症状を有するGorlin症候群患者由来iPS細胞は骨形成、石灰化の異常機構の解明とその病態の解明に有用であると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、Gorlin症候群患者由来線維芽細胞を用いてiPS細胞を樹立し、我々が以前報告したiPS細胞からの骨芽細胞分化誘導法

(Plos one, 2014, 9(6)) を応用し、正常ヒト由来iPS細胞との比較によりPTCH1の変異が骨芽細胞分化に与える影響を検討した。

3. 研究の方法

(1) iPS細胞樹立

Gorlin 症候群でインフォームドコンセントに署名した患者の口腔粘膜から採取した線維芽細胞(G-OF) (東京歯科大学倫理委員会承認番号：527、575)を使用し、産総研より提供を受けたセンダイウィルスベクター：

SeVdp(KOSM)302LでiPS細胞を樹立した。

(2) 未分化能・多分化能確認

樹立したiPS細胞についてQiagenにてRNA抽出後、RT-PCRにて未分化マーカーの発現を確認した。胚葉体 (EB) 形成後、ヒトiPS培地 (bFGF不含)で21日間培養し、上記と同様にして三胚葉分化マーカーの発現を確認した。

ヒトiPS用培地： DMEM/F12 + 20% KSR, 1% P/S, 1% NEAA, 1% L-glutamine, 1% 2-ME, 5 ng/ml bFGF

(3) Hedgehog関連遺伝子のPCR array

G-iPSCs、正常ヒトiPS細胞を使用し、フィーダー細胞上での通常培養後、通法に従い細胞を剥離し非接着培養皿での浮遊培養によって胚様体 (EB) を得た。EBを酵素処理により単一細胞に分離し培養皿に播種した。翌日、骨芽細胞分化培地 (OBM) に交換しSMO agonist (SAG) 添加、および非添加で10日間分化誘導し、骨芽細胞分化マーカー遺伝子、Hedgehog経路関連遺伝子およびWNT経路関連遺伝子をPCR array及びリアルタイムPCRにて検出した。

細胞：KD iPS(control)、G-OF1iPS1,6、G-OF2iPS5,8

培地：ヒトiPS用培地 (DMEM/F12 + 20%

KSR, 1% P/S, 1% NEAA, 1% L-glutamine, 1% 2-ME, 5 ng/ml bFGF) 、

Embryoid Body (EB) 用培地 (DMEM/F12 + 20% KSR, 1% P/S, 1% NEAA, 1% L-glutamine, 1% 2-ME)

骨芽細胞誘導培地 (OBM、 α MEM + 10% FBS, 1% P/S, 50 μ g/ml aa, 10 mM β -GP)

4. 研究成果

(1) iPS細胞樹立

(2) 未分化能・多分化能確認

樹立したES細胞様細胞について未分化マーカーをRT-PCR法にて検出し確認した (図1)。また、in vitroでの胚様体形成 (図2)、及びin vivoでのテラトーマ形成によって三胚葉分化能 (図3) を確認した。

図1 未分化性の確認

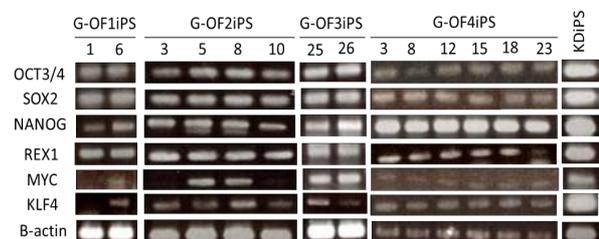


図2 多分化能の確認

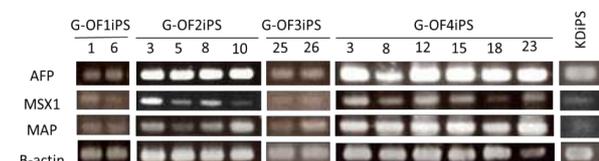
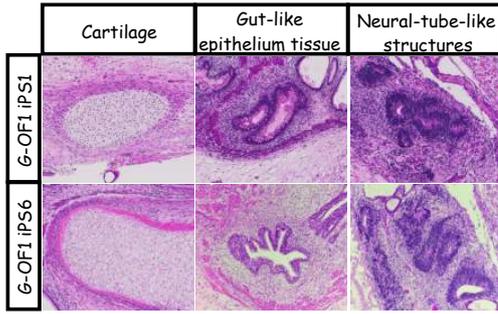


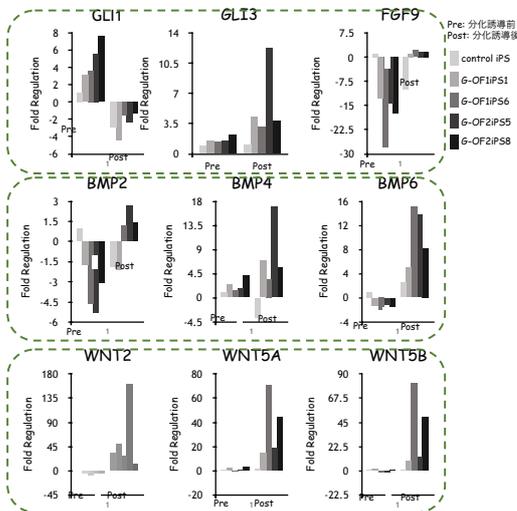
図3 テラトーマ形成



(3) Hedgehog関連遺伝子のPCR array

GLI1発現はcontrol iPSCsに比べ、すべてのG-OE iPSCsにおいて高発現していた。BMP2、4、6は、G-OE iPSCsにおいて骨芽細胞分化に伴い増加した。また、WNT2、5A、5Bの発現は骨芽細胞分化にともない、G-OE iPSCsにおいては著しく増加したがcontrol iPSCsではあまり増加は認められなかった(図4)。control iPSCsと比べG-OE iPSCsは骨芽細胞分化が有意に促進していることが考えられた。

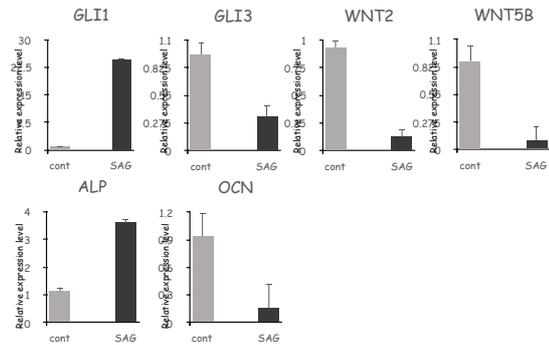
図4 PCR arrayを用いた網羅的解析



また、SMO agonist SAG添加によりGLI1発現の増加とGLI3発現の減少が認められることからHedgehogシグナルの活性化が示された。SAG添加によりWNT2およびWNT5Bの減少が認められた。このとき骨芽細胞分化初期のマーカであるアルカリホスファターゼ (ALP) 発現は増加し、後期マーカである

オステオカルシン (OCN) は減少した(図5)。このことから、Hedgehogシグナルの活性化は骨芽細胞分化初期に、WNTシグナルの活性化は分化後期に参与していることが示唆された。

図5 Hedgehogシグナル活性化による骨芽細胞分化への影響



以上より、Hedgehogシグナルが恒常的に活性化しているGorlin症候群iPS細胞では骨芽細胞分化にともない各種BMPの発現増加とWntシグナルの活性化が誘導された。Hedgehogシグナルの恒常的活性化はBMP、WNT両経路のbidirectionalな活性化を引き起こすことが示唆された。

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 3件)

① Kamichika Hayashi, Hiroimi Ochiai-Shino, Takeaki Shiga, Shoko Onodera, Akiko Saito, Takahiko Shibahara, Toshifumi Azuma. Transplantation of human induced pluripotent stem cells carried by self-assembling peptide nanofiber hydrogel improves bone regeneration in rat calvarial bone defects. *BDJ Open*, 査読有, 2, 15007, 2016. DOI: 10.1038/bdjopen.2015.7

② Hiroshi Kato, Hiroimi Ochiai-Shino, Shoko Onodera, Akiko Saito, Takahiko Shibahara, Toshifumi Azuma. Promoting effect of 1,25(OH)₂ vitamin D₃ in osteogenic differentiation from induced pluripotent stem cells to osteocyte-like cells. *OPEN BIOLOGY*, 査読有, vol.5: 14021,

③ Yuusei Yoshizawa, **Hiromi Ochiai-Shino**, Takashi Tsukinowa, Shoko Okada, Takashi Muramatsu, Masahiro Furusawa, Toshifumi Azuma. The comparison between single vs repeated administration of Wnt3a of HPDL cells. Journal of Hard Tissue Biology, 査読有, vol.24(4), p.331-339, 2015, https://www.jstage.jst.go.jp/article/jhtb/24/4/24_331/_article/-char/ja/

〔学会発表〕（計 5件）

① 篠宏美、長谷川大悟、小野寺晶子、齋藤暁子、大高真奈美、渡邊章、西村健、中西真人、片倉朗、柴原孝彦、東俊文. Gorlin症候群患者由来を用いたiPS細胞の樹立と骨芽細胞分化の検討. 第15回日本再生医療学会総会、2016年3月、大阪府

② 齋藤暁子、大木章生、中村貴、小野寺晶子、篠宏美、長谷川大悟、小崎健次郎、柴原孝彦、末石研二、東俊文. 鎖骨頭蓋異形成症患者由来iPS細胞の樹立と機能解析. 第15回日本再生医療学会総会、2016年3月、大阪府

③ 小野寺晶子、大庭伸介、長谷川大悟、齋藤暁子、篠宏美、渡邊章、大高真奈美、西村健、中西真人、片倉朗、鄭雄一、柴原孝彦、東俊文. Gorlin症候群患者由来iPS細胞を用いた骨芽細胞分化応答. 第15回日本再生医療学会総会、2016年3月、大阪府

④ 齋藤暁子、中村貴、小野寺晶子、篠宏美、大木章生、長谷川大悟、渡邊章、小崎健次郎、柴原孝彦、末石研二、東俊文. 鎖骨頭蓋異形成症患者由来細胞を用いた疾患特異的iPS細胞の樹立と機能解析. 第33回日本骨代謝学会学術集会、2015年7月、東京都

⑤ 東俊文、小野寺晶子、齋藤暁子、篠宏美、中西真人. Gorlin症候群iPS細胞における情報伝達経路の検討. 第67回日本細胞生物学会大会、2015年6月、東京都

6. 研究組織

(1)研究代表者

篠 宏美 (SHINO HIROMI)
東京歯科大学・歯学部・助教
研究者番号：00445446