

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：32622

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H07198

研究課題名(和文) 原発性萌出不全特異的iPS細胞を用いた疾患機序の解明

研究課題名(英文) Elucidation of mechanism of disease using primary failure of tooth eruption specific iPS cells.

研究代表者

泉田 恵理 (IZUMIDA, ERI)

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：70783497

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は原発性萌出不全(PFE)の発症メカニズムの解明を目的としている。そのため、PFE特異的人工多能性幹細胞(iPS細胞)を作製した。さらに対照ヒトiPS細胞およびPFE特異的iPS細胞を骨芽細胞分化誘導培地中で培養し、骨芽細胞分化マーカーの発現および石灰化能を比較した。両iPS細胞から得られた骨芽細胞様細胞において、同等の石灰化能および分化マーカー遺伝子の発現が観察された。したがって、PFE特異的iPS細胞は対照iPS細胞と同等の骨芽細胞分化能を有すると考えられた。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to elucidate the pathogenic mechanism of primary failure of tooth eruption (PFE) using PFE-specific induced pluripotent stem (iPS) cells. PFE-specific iPS cells were prepared from hematopoietic precursor cells isolated from blood of a PFE patient by introducing Yamanaka factors (OCT3/4, SOX2, and KLF4) using a Sendai virus vector. Osteoblast-like cells were obtained after cultivation of PFE-specific and control iPS cells in the osteoblastic differentiation medium. Expression of osteoblast marker genes as well as mineralization by osteoblast-like cells derived from PFE-specific iPS cells was comparable to those obtained in cells derived from control iPS cells. These results indicate that the mutation in PTH1R gene found in the PFE patient does not affect osteoblast differentiation.

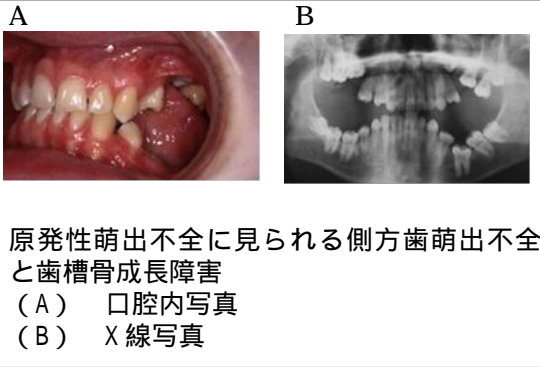
研究分野：歯科矯正学

キーワード：iPS細胞 原発性萌出不全 PTH1R遺伝子 ミスセンス変異

1. 研究開始当初の背景

永久歯萌出は健全な咀嚼機能や顎発育の獲得にとって重要である。

原発性萌出不全(PFE)は側方歯開咬を特徴とする成長障害であり、これまでに PFE 患者で特異的に副甲状腺ホルモン(PTH)/副甲状腺関連ペプチド(PTHrP)受容体 1(PTH1R)遺伝子のミスセンス変異が同定されているが、PFE 発症の詳細なメカニズムについては未だ不明である。



2. 研究の目的

本研究は、PFE 特異的な人工多能性幹細胞(iPS 細胞)を作製し、本疾患の発症メカニズムを解明することを目的とした。PFE は、側方歯開咬を特徴とする成長障害で、これまでに本疾患患者に特異的に *PTH1R* 遺伝子にヘテロ接合体の変異が報告されている。申請者は、4 名の PFE 患者の *PTH1R* 遺伝子でそれぞれ同定されている、356C>T (P119L)、395C>T (P132L)、439C>T (R147C)および 1148G>A (R383Q) のミスセンス変異が *PTH1R* の機能を低下させることを見出した。PFE の病態を明らかにするためには、*PTH1R* 遺伝子のみならず、患者のゲノム情報をすべて有する骨芽細胞や破骨細胞などの歯の萌出に深くかかわる骨構成細胞を解析する必要があった。そこで本研究では、PFE 特異的 iPS 細胞から分化誘導される骨構成細胞について、増殖・分化ならびに PTH 応答を含めた機能を解析し、PFE の発症メカニズムを明らかにすることとした。

3. 研究の方法

PFE 特異的 iPS 細胞を樹立した。山口らが *PTH1R* 遺伝子の変異を同定した PFE 患者および PFE を持たない健常者の造血系細胞にセンダイウイルスベクターを用いて山中 4 因子を導入し、それぞれ複数クローンを樹立した。

対照ヒトおよび PFE 特異的 iPS 細胞から骨芽細胞分化を誘導し、骨芽細胞の機能を比較解析した。

) 骨芽細胞分化マーカーの発現および石灰化を指標に骨芽細胞分化を比較した。

) 誘導された骨芽細胞を PTH で刺激し、増殖および分化マーカーの発現を比較した。

) 誘導された骨芽細胞を PTH で刺激し、RANKL の発現と破骨細胞分化支持能を比較した。

4. 研究成果

PFE の *PTH1R* 変異体では糖鎖修飾の変化と PTH 親和性の低下が観察された

申請者は、*PTH1R* を発現していない HeLa 細胞に、野生型または 356C>T (P119L)、395C>T (P132L)、439C>T (R147C)、1148G>A (R383Q) の変異を導入した *PTH1R* 遺伝子を組込んだレンチウイルスベクターを用いて強制発現させ、PFE 患者で同定された *PTH1R* 変異の機能解析を行った。PTH 刺激後の野生型および 4 種の変異を導入した HeLa 細胞における cAMP 産生量を評価したところ、P119L、P132L のアミノ酸置換を導入した *PTH1R* を発現させた細胞では、PTH 刺激後の cAMP 産生は、野生型 *PTH1R* に比べて強く抑制されていた。また R147C、R383Q 変異 *PTH1R* 発現細胞でも、cAMP 産生は野生型の約 1/2 に低下した。さらに、野生型および *PTH1R* の発現を Western blot 分析を行い、野生型および 4 つの変異 *PTH1R* 遺伝子を導入した HeLa 細胞における *PTH1R* タンパク質の発現を確認した結果、野生型 *PTH1R* の分子量は 8.7 万、P119L および P132L 変異体のそれは 6.9 万、R147C および R383Q 変異体は 8.7 万と 6.9 万の 2 種類の分子量が混在していた。野生型 *PTH1R* のペプチド部分のみの分子量は 6.3 万だが、リガンド結合領域に存在する 4 カ所の Asn 残基が *N*-グリコシル化を受けることが知られている。

そこで、*N*-グリコシダーゼで処理したところ、これらすべてがペプチド部分とほぼ一致する分子量 6.2 万になったことから、PFE 患者で検出された *PTH1R* のアミノ酸置換、特に P119L と P132L のアミノ酸置換は *N*-グリコシル化を強く抑制すると考えられた。さらに、P119L、P132L、R147C の 3 つの変異体の蛍光ラベル PTH に対する親和性は野生型 *PTH1R* に比べ低下していた。

PFE 特異的 iPS 細胞を樹立した

4 人の PFE 患者から見出された *PTH1R* の 4 種類のアミノ酸置換は、*PTH1R* の *N*-グリコシル化と PTH 親和性および PTH 応答性において、それぞれ異なる結果を導いた。このことは、見出された *PTH1R* 遺伝子の変異以外に PFE の発症に係わる重要な因子が存在することを示唆する。また、PFE の患者の *PTH1R* 遺伝子はヘテロ接合体変異であることから、野生型の *PTH1R* と変異 *PTH1R* の両方のタンパク質を発現していると考えられる。*PTH1R* は二量体で機能することが知られていることから、PFE 患者の細胞では、野生型と変異型の *PTH1R* の相互作用も予想される。そこで申請者

は PFE 患者の細胞から iPS 細胞を誘導し、病態形成メカニズムを解析することとした。*PTH1R* 遺伝子の 395C>T ミスセンス変異 (P132L) を持つ PFE 患者から末梢血を 30 mL 採取し、セルソーターを用いて造血幹細胞ないし造血前駆細胞画分を分離した。得られた細胞画分にセンダイウイルスベクターを用いて、山中 4 因子 (*OCT3/4*, *SOX2*, *KLF4*, *cMYC*) を導入し、iPS 細胞を誘導した。iPS 細胞の樹立は、*OCT4* および *SSEA4* の発現で確認した。さらにゲノム DNA のシーケンシングにより、患者に特有の *PTH1R* 遺伝子のヘテロ変異を確認した。さらに疾患特異的 iPS 細胞の培養条件はそれぞれ最適化する必要がしばしばあるため、395C>T の変異を有する PFE 特異的 iPS 細胞のフィーダー細胞を用いない培養条件を詳細に検討し、良好な増殖が見られる培養条件を見出すことに成功した。



対照ヒトおよび PFE 特異的 iPS 細胞由来の骨芽細胞を誘導し、骨芽細胞の機能を比較解析した

PFE に特徴的にみられる *PTH1R* 遺伝子のミスセンス変異が PFE 発症に関わるか否かを PFE 特異的 iPS 細胞由来骨芽細胞と対照ヒト iPS 細胞由来骨芽細胞の PTH 応答を比較することで明らかにしようと考え、まず対照ヒトおよび PFE 特異的 iPS 細胞から骨芽細胞分化を誘導することとした。各 iPS 細胞をアスコルビン酸、グリセロリン酸およびデキサメタゾンを含む骨芽細胞分化誘導培地を用いて 3 週間培養し、骨芽細胞分化を誘導し、それぞれの iPS 細胞から骨芽細胞への分化過程を比較した。その後アルカリフォスファターゼ活性測定および活性染色を実施するとともに、石灰化をアリザリンレッド染色にて評価したところ、対照ヒトおよび PFE 特異的 iPS 細胞由来の骨芽細胞共に石灰化結節の形成を確認した。さらに、*RUNX2*, *OSX* などの骨芽細胞分化マーカー遺伝子の発現を定量的 PCR にて評価したところ、3 週間骨芽細胞分化誘導培地で培養した対照ヒトおよび PFE 特異的 iPS 細胞由来の骨芽細胞様細胞で同様の *RUNX2*, *OSX* の発現が認められた。また、両者における *PTH1R* mRNA の発現を確認した。したがって、PFE 特異的 iPS 細胞は対照ヒト iPS 細胞と同等の骨芽細胞分化能を有すると考えられた。

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 0 件)

[学会発表](計 1 件)

1. 泉田恵理, 宮本洋一, 山口徹太郎, 山田 篤, 須澤哲夫, 斉藤琢, 大津真, 上條竜太郎, 榎宏太郎: 原発性萌出不全特異的 iPS 細胞を用いた疾患発症機序の解明、第 75 日本矯正歯科学会大会、徳島、2016 年 11 月 7 日~9 日
第 75 回日本矯正歯科学会大会 優秀ポスター受賞

[図書](計 0 件)

[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:
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
泉田 恵理 (IZUMIDA ERI)
昭和大学・歯学部・助教
研究者番号: 70783497

(2) 研究分担者 ()
研究者番号:

(3) 連携研究者 ()

研究者番号:

(4)研究協力者

()