

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：32650

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15791

研究課題名(和文) McCune-Albright症候群からの疾患特異的iPS細胞の樹立とその応用

研究課題名(英文) Establishment of iPS cells from McCune-Albright syndrome and its application

研究代表者

山口 朗 (Yamaguchi, Akira)

東京歯科大学・歯学部・客員教授

研究者番号：00142430

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：McCune-Albright 症候群(MAS)の病変部は正常細胞と変異細胞との体細胞モザイクであるために、本研究ではCRISPR/Cas9遺伝子編集技術を用いてヒト正常iPS細胞にGNAS1突然変異を導入し、MSA型ヒトiPS細胞の作成を試みた。その結果、得られたクローン24個中2個のクローンで、ゲノムDNAのGNAS1遺伝子変異を確認できた。得られたiPS細胞の未分化マーカーと三胚葉性分化マーカーの発現をRT-PCRを用いて確認し、MAS表現型を有するGNAS1変異iPS細胞の樹立に成功した。これらのiPS細胞の骨芽細胞およびメラニン産生細胞への分化誘導実験および解析を行なっている。

研究成果の概要(英文)：Since distribution of the gene mutated cells in McCune-Albright syndrome (MAS) occurs depending somatic mosaicism, we applied gene editing technique using CRISPR/Cas9 system to generate human iPS cells exhibiting GNAS1 mutation observed in MAS. We obtained 2 clones exhibiting GAS1 mutation among 24 clones. These iPS cells showed undifferentiated markers and those identifying three germ layers. Thus we successfully established human iPS cells retaining GNAS1 mutation observed in MAS.

研究分野：口腔病理学

キーワード：McCune-Albright 症候群 iPS細胞 GNAS

## 1. 研究開始当初の背景

McCune-Albright 症候群は、線維性骨異形成症、カフェオレ斑、思春期早発症を主要症状とする希な症候群で、GNAS 遺伝子領域の GTP 結合タンパク質 サブユニット(Gs $\alpha$ )をコードする遺伝子のミスセンス変異で発症する。この変異は Gs $\alpha$  を恒常的に活性化し、アデニル酸シクラーゼの活性化と cAMP の過剰産生を惹起して、種々の徴候を発現させると考えられているが、そのメカニズムは明らかにされていない。

線維性骨異形成症は、未熟な骨の形成を伴った線維性結合組織が増生する疾患で、顎骨は好発部位である。本症は、McCune-Albright 症候群の主要な徴候の 1 つで、単骨性の線維性骨異形成症でも GNAS 遺伝子の変異が認められるが、本症発症のメカニズムは明らかにされていない。

## 2. 研究の目的

本申請では、McCune-Albright 症候群患者と単発性線維性骨異形成症患者から疾患特異的 iPS 細胞を樹立し、それらを用いて線維性骨異形成症の病態発現における GNAS 遺伝子変異の役割を明らかにすることを目的とする。具体的には、1) 線維性骨異形成症における過剰骨形成発症メカニズムと、2) 皮膚におけるメラニン異常沈着のメカニズムの解明を目指す。本研究の推進により、本症候群の病態の理解に重要な情報を発信できるとともに、新たな治療法への道も開ける可能性がある。

## 3. 研究の方法

### 1) iPS 細胞の樹立

McCune-Albright 症候群患者より採取した末梢血は単球分画を細胞培養用ディッシュに播種する。70%コンフルエントの状態の研究分担者の東が産業総合研究所の中西真人博士より既に供与を受けている Sendai virus

vector (*J Biol Chem* 286:4760-4771,2011)を感染させ、mouse embryonic fibroblasts (MEF)上に播種し、コロニーを形成させ、それらを単離後、継代培養する。iPS 細胞の未分化マーカーについては理化学研究所のプロトコルに従い解析する。線維性骨異形成症患者の病変部より採取した細胞または組織塊はコラゲナーゼ処理の後、細胞培養用ディッシュに播種し、上記方法に従って iPS 細胞を作成する。

### 2) 未分化性の検討

McCune-Albright 症候群と線維性骨異形成症患者より樹立した細胞を免疫染色(SSEA4, TRAI-60, NANOG, OCT3/4, SOX2)と real time PCR(DNMT3B, TDGF, GABRB3, GDF3)で解析する。

### 3) 多能性の評価

・培養系における胚様体(Embryonic body)形成の確認。

・奇形腫作成：NodScid マウス精巣に iPS 細胞を移植し、2ヶ月後に組織を摘出し、10%中性緩衝ホルマリン液で固定後、パラファン包埋して、組織標本を作成し、解析する。パラフィン包埋前に摘出検体を軟 X 線撮影し、石灰化部が見られたら EDTA で脱灰後にパラフィン包埋して、切片を作成する。一部の組織はテクノビットに包埋し、樹脂包埋し、非脱灰標本を作成する。

### 4) 遺伝子変異部の確認

樹立した iPS 細胞の GNAS 遺伝子変異を次世代シーケンサーで確認する。

### 5) iPS 細胞の分化能の解析

- ・ cAMP 量の確認：各 iPS 細胞における cAMP 量を cAMP EIA キットで測定する。
- ・ 各 iPS 細胞の骨芽細胞(osterix, osteocalcin など)、メラノサイト(melan A など)を免疫染色で解析する
- ・ 各 iPS 細胞を骨形成誘導培地、メラノサ

イト成長培地などで培養し、骨芽細胞、メラノサイトへの分化能を解析する。

#### 4 . 研究成果

McCune-Albright 症候群(MAS)の病変部は正常細胞と変異細胞との体細胞モザイクであるために、本研究ではCRISPR/Cas9 遺伝子編集技術を用いてヒト正常 iPS 細胞にGNAS1 突然変異を導入し、MSA 型ヒト iPS 細胞の作成を試みた。その結果、得られたクローン 24 個中 2 個のクローンで、ゲノム DNA のGNAS1 遺伝子変異を確認できた。得られた iPS 細胞の未分化マーカーと三胚葉性分化マーカーの発現を RT-PCR を用いて確認し、MAS 表現型を有する GNAS1 変異 iPS 細胞の樹立に成功した。これらの iPS 細胞の骨芽細胞およびメラニン産生細胞への分化誘導実験および解析を行なっている。

#### 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 15 件)

1. Sugie-Oya A, Shimomura A, Takao-Kawabata R, Sano H, Shimazu Y, Isogai Y, Yamaguchi A, Ishizuya T: Comparison of treatment effects of teriparatide and the bisphosphonate risedronate in an aged, osteopenic, ovariectomized rat model under various clinical conditions. *J Bone Miner Metab* 34:303-314,2016
2. Tohyama R, Kayamori K, Sato K, Hamagaki M, Sakamoto K, Yasuda H, Yamaguchi A: Xenograft model of the mandibular bone destruction of human oral cancers. *J Oral Patholog Med* 45:356-364,2016. doi: 10.1111/jop.12376
3. Mandasari M, Sawangarun W, Ktsube K, Kayamori K, Yamaguchi A, Sakamoto K: A ficile one-step strategy for the generation of conditional knockout mice to explore the role of Notch1 in oroesophageal tumorigenesis. *Biochem Bioph Res Co* 469:761-767,2016. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.12.006
4. Ogura K, Iimura T, Makino Y, Sugie-Oya A, Shimomura A, Takao-Kawabata R, Ishizuya T, Moriyama K, Yamaguchi A: Parathyroid hormone facilitates osteogenesis differently in cancellous and cortical bones. *Bone Reports* 5:7-14,2016. doi: 10.1016/j.bonr.2016.01.002
5. Pal SK, Nguyen CTK, Morita, K, Miki Y, Kayamori K, Yamaguchi A, Sakamoto K: THBS1 is induced by TGFB1 in the cancer stroma and promotes invasion of oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 45:730-739,2016. doi: 10.1111/jop.12430
6. Kayamori K, Katsube K, Sakamoto K, Tohyama R, Yamaguchi A: NOTCH3 is induced in cancer-associated fibroblasts and promotes angiogenesis in oral squamous cell carcinoma. *PLoS One* 11(4):e0154112, 2016. doi: 10.1371/journal.pone.0154112.
7. Nguyen CTK, Okamura T, Morita K, Miki Y, Izumo T, Kayamori K, Yamaguchi A, Sakamoto K. LAMC2 is a predictive marker for malignant progression of leukoplakia. *J Oral Pathol Med* 46:223-231,2017. doi: 10.1111/jop.12485.
8. Sakamoto K, Matsushita Y, Minamizato T, Katsuki Y, Katsube KI, Yamaguchi A. The Bone Regeneration Model and Primary Osteoblastic Cell Culture Used in the Analysis of Ccn3 Transgenic and Knockout Mice. *Methods Mol Biol* 1489:309-324,2017
9. Ono M, Oshima M, Ogawa M, Sonoyama W, Hara ES, Oida Y, Shinkawa S, Nakajima R , Mine A, Hayano S, Fukumoto S, Kasugai S, Yamaguchi A, Tsuji T, Kuboki T: Practical whole-tooth restoration utilizing autologous bioengineered tooth germ transplantation in a postnatal canine model. *Scientific Reports* 7:44522,2017. doi: 10.1038/srep44522

10. Yukimori A, Oikawa Y, Morita K, Nguyen CTK, Harada H, Yamaguchi S, Kayamori K, Yamaguchi A, Ikeda T, Sakamoto K: Genetic basis of calcifying cystic odontogenic tumors. *PLoS One* 28;12:e0180224, 2017. doi: 10.1371/journal.pone.0180224
11. Onodera S, Saito A, Hasegawa D, Morita N, Watanabe K, Nomura T, Shibahara T, Ohba S, Yamaguchi A, Azuma T: Multi-layered mutation in hedgehog-related genes in Gorlin syndrome may affect the phenotype. *PLoS One* 12:e0184702, 2017. doi: 10.1371/journal.pone.0184702
12. Hasegawa D, Shino H, Onodera S, Nakamura T, Saito A, Onda T, Watanabe K, Nishimura K, Ohtaka M, Nakanishi M, Kosaki K, Yamaguchi A, Shibahara T, Azuma T: Gorlin syndrome-derived induced pluripotent stem cells are hypersensitive to Hedgehog-mediated osteogenic induction. *PLoS One* 12:e0186879, 2017. doi: 10.1371/journal.pone.0186879.
13. Lee JW, Hoshino A, Inoue K, Saito T, Uehara S, Kobayashi K, Ueha U, Matsushima M, Yamaguchi A, Imai Y, Iimura T: The HIV co-receptor CCR5 regulates osteoclast function. *Nat Commun* 8:2226,2017. doi: 10.1038/s41467-017-02368-5
14. Ooki A, Nakamura T, Onodera S, Hayashi K, Hasegawa D, Kato H, Onda T, Watanabe A, Kosaki K, Nishimura K, Ohtaka M, Nakanishi M, Sakamoto T, Yamaguchi A, Sueishi K, Azuma T: Targeted reversion of induced pluripotent stem cells from patients with human cleidocranial dysplasia showed corrected osteoblastic differentiation both in vitro and in vivo. *Stem Cell Res Ther* 2018 9:12,2018. doi:10.1186/s13287-017-0754-4
15. Ohata Y, Tsuchiya M, Hirai H, Yamaguchi S, Akashi T, Sakamoto K, Yamaguchi A, Ikeda T, Kayamori K: Leukemia inhibitory factor produced by fibroblasts within tumor stroma participates in invasion of oral squamous cell carcinoma. *PLoS One* 13:e0191865,2018. doi: 10.1371/journal.pone.0191865.
- 〔学会発表〕(計 12 件)
1. 山口 朗: 歯科医学の多様性を基盤とした新たな歯学研究の展開(教育研修会)、第 70 回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会 2016 年 4 月 16 日、福岡国際会議場
  2. 山口 朗: オステオネットワークの構築・維持・破綻: 顎顔面骨疾患の病態解析の基盤構築(宿題報告)、第 70 回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会 2016 年 4 月 17 日、福岡国際会議場
  3. 山口 朗: 病理学、骨代謝学、そして人々の出会い、第 27 回日本臨床口腔病理学会若手の集い、2016 年 8 月 10 日、広島大学広仁会館
  4. 山口 朗: 歯学研究における基礎と臨床のシグナル伝達、第 58 回歯科基礎医学会学術大会日本学術会議シンポジウム、2016 年 8 月 26 日、札幌コンベンションセンター
  5. 山口 朗: 我が国の今後の口腔科学研究の潮流、シンポジウム: 学内外の動向から探る今後の口腔科学研究の潮流、第 302 回東京歯科大学学会 2016 年 10 月 15 日、東京歯科大学水道橋校舎新館 第 2 講義室
  6. 山口 朗: 教育研修に関する計画の立案とチームアプローチについて: 科研新制度と大型科研費取得のストラテジー、平成 28 年度第 6 回鹿児島大学歯学部 FD 講演会、2016 年 11 月 30 日、鹿児島大学
  7. 東 俊文、小野寺 晶、齋藤 暁子、中村 貴、大庭 伸介、小崎健次郎、山口 朗、柴原 孝彦、iPS 細胞を用いた顎骨疾患病

態解明へのアプローチ、第 59 回歯科基礎医学会総会学術大会アップデートシンポジウム、2017 年 9 月 16 日、松本歯科大学

8. 山口 朗：PTH の骨形成促進作用における基礎研究の展開、第 7 回骨・軟骨フロンティア、2017 年 11 月 11 日、ベルサール八重洲（東京駅八重洲口）
9. 森田純晴、松永智、森石武史、阿部伸一、山口朗：アフリカツメガエル長管骨の造血は骨芽細胞性ニッチ優位に維持されている、第 37 回日本骨形態計測学会、2017 年 6 月 23 日、大阪国際会議場
10. 松永智、是澤和人、小高研人、吉成正雄、飯村忠浩、山口朗、中野貴由、阿部伸一：ヒト歯科インプラント周囲顎骨における構造特性、第 37 回日本骨形態計測学会、2017 年 6 月 24 日、大阪国際会議場
11. 李智媛、上原俊介、小林泰浩、山口朗、今井祐記、飯村忠浩：HIV 治療標的分子 CCR5 の破骨細胞機能分化における必須の機能-CCR5 を標的とした HIV 治療は骨吸収性疾患に対してもメリットをもたらす可能性がある、第 35 回日本骨代謝学会学術集会、2017 年 7 月 28 日、ホテル日航福岡
12. 東 俊文、小野寺晶、齋藤 暁子、中村 貴、大庭 伸介、小崎健次郎、山口 朗、柴原 孝彦、iPS 細胞を用いた顎骨疾患病態解明へのアプローチ、第 59 回歯科基礎医学会総会学術大会アップデートシンポジウム、2017 年 9 月 16 日、松本歯科大学

〔図書〕(計 3 件)

1. 山口 朗：骨細胞生物学からみたインプラント治療における科学的背景、**日本口腔インプラント学会誌** 28:463-468,2016

2. 山口 朗：水性と陸生の脊椎動物の骨格の形態と機能から学ぶ骨代謝、*Olive: Osteo Lipid Vascular & Endocrinology*, 6:4-5,2016

3. 山口 朗：口腔科学研究の現状と将来：顎骨疾患の集学的研究拠点形成の重要性、**歯科学報** 116:251-267,2016

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

山口 朗 (YAMAGUCHI Akira)

東京歯科大学・歯学部・客員教授

研究者番号：00142430

### (2)研究分担者

小野寺晶子 (ONODERA Shouko)

東京歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：90637662

齋藤暁子 (SAITO Akiko)

東京歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：90722835