

令和 2 年 6 月 23 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04357

研究課題名(和文) iPS細胞の分化パターンによる頭蓋縫合早期癒合症の分類と病態メカニズム解明

研究課題名(英文) Classification and pathological elucidation of Craniosynostosis by the differentiation's pattern of iPS cells

研究代表者

井関 祥子 (Iseki, Sachiko)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：80251544

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：症候群性の癒合症患者由来骨芽細胞間および正常骨芽細胞での骨芽細胞分化マーカーの発現パターンの比較を行った結果、群間での骨芽細胞分化マーカーの発現量に優位に差を認めた。また、非疾患群においては年齢による発現量の変化も示唆された。iPS細胞に関しては、骨芽細胞由来のiPS細胞を樹立し、骨芽細胞に再分化する系を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現状では、遺伝的要因は、頭蓋縫合早期癒合症全体の20%程度の症例を説明するにすぎず、また、環境要因が関与する割合も明らかでない。

患者頭蓋縫合由来骨芽細胞からiPS細胞を樹立し、骨芽細胞へ再分化させる系を用いて分化亢進のパターン解析を行うことで、頭蓋縫合早期癒合症の分類ができるのではないかと考えた。

疾患の分類により病態推移の予測が可能になることにより、本研究が将来的に、治療方針が立案や、新規治療の開発の一助になることを期待した。

研究成果の概要(英文)：We detect predominant difference of osteogenic gene expression between craniosynostosis and non-craniosynostosis. In non-craniosynostosis, results also suggest age may affect osteogenic gene expression.

We established osteoblast derived iPS cells and iPS cells differentiated into osteoblast again.

研究分野：分子発生学

キーワード：頭蓋縫合早期癒合症 iPS細胞 骨芽細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

頭蓋縫合早期癒合症は、頭蓋骨を連結する関節の一種である線維性結合組織の縫合が胎生期や出生後に早期に骨性の癒合を示す疾患で、2500~3000人に1人の割合で認められる。

病因には遺伝学的要因に加え、羊水減少による子宮内圧迫などの環境要因を含む多因子性疾患である。

現状では、症候群性と非症候群性を併せて約60の遺伝子に原因となる変異が報告されているが、頭蓋縫合早期癒合症全体の20%程度の症例を説明するにすぎず、また、環境要因が関与する割合も未だ不明である。

本疾患では、癒合によって頭蓋の発育が制限されるため、頭蓋の変形をきたす。また、脳の成長に対応した頭蓋の成長が得られず、十分な頭蓋内腔の容積が確保されずに頭蓋内圧の亢進が認められる。特に複数の癒合が認められる場合には症状は強く認められる傾向がある。頭蓋内圧の亢進に加えて顔面骨の劣成長が起きると、眼球突出や上気道狭窄が生じ、脳発達障害となる場合もある。

治療法は、外科処置による閉鎖部位の開放であるが、本疾患では骨芽細胞が活性化していること、および外科処置を行うのが幼少期であることが多いことより、再癒合が起きる頻度が高く、複数回にわたる外科処置が必要となる場合が多い。観血的処置を幼少期に複数回行う必要がある点において、感染のリスクを含め、患者および家族の負担の大きい疾患である。病態推移の予測が可能になると、治療方針が立案しやすいだけでなく、新規治療の開発も行いやすくなる。

2. 研究の目的

(1) 病態としては、骨芽細胞の分化亢進と考えられ、症候群ごと、すなわち遺伝的要因が明らかになっている頭蓋縫合早期癒合症で特徴的な表現型があることから、この分化亢進には一定のパターンがあると考えられる。すなわち、遺伝的要因が不明な頭蓋縫合早期癒合症にもパターン化された遺伝子発現が認められる可能性がある。現在、遺伝的要因のみで患者を分類することが不可能であることから、骨芽細胞分化マーカーの発現パターンによって頭蓋縫合早期癒合症の分類ができるのではないかと考えるにいたった。

(2) ヒトでは年齢とともに頭蓋冠の骨欠損の修復効率が悪くなるが、これが骨芽細胞分化能力の低下によるものか否かは明らかになっていない。上記のように骨芽細胞の分化パターンを遺伝子発現パターンとして捉える場合、年齢による骨芽細胞の分化状態の考慮が必要となることも考えられる。この年齢差を排除する方法として、骨芽細胞を一旦未分化状態にすることが考えられる。iPS細胞は、由来する細胞に特徴的なエピジェネティック状態を維持し、元の細胞へと分化しやすい特性(メモリー機能)を有することから、患者由来骨芽細胞をiPS細胞へと誘導し、さらに再分化させて骨芽細胞分化過程の均一化を図ることが望まれる。

(3) 遺伝子変異などによらない骨芽細胞分化の抑制方法を検討し、頭蓋縫合早期癒合患者の再癒合を防止し、再外科手術の減少を図る。

3. 研究の方法

(1) 患者頭蓋骨からの骨芽細胞の単離と石灰化誘導

連携医療機関にて手術時に採取した頭蓋縫合早期癒合症患者及び、非頭蓋縫合早期癒合症患者由来の頭蓋骨切削片および骨片より骨芽細胞の単離方法について確認を行った。

頭蓋縫合早期癒合症患者および別疾患患者の骨芽細胞を、同じ条件下で培養し、石灰化誘導を行った。*RUNX2*, *SP7*, *BGLAP*等の骨芽細胞マーカー、および頭蓋縫合早期癒合症を引き起こす変異が発見された原因遺伝子の発現量を測定し、特徴的な発現パターンを検討した。また、石灰化を誘導し、アリザリンレッド染色にて石灰化を定量的に評価した。

(2) 患者由来骨芽細胞からのiPS細胞樹立および骨芽細胞への再分化

iPS細胞の、由来する体細胞組織に特徴的なエピジェネティック状態を維持し、由来する元の組織の細胞へと分化しやすい特性(メモリー機能)を利用し、患者頭蓋冠由来骨芽細胞からiPS細胞を樹立し、骨芽細胞へと再分化した。再分化過程における骨芽細胞分化マーカーの発現パターンを比較、評価した。

(3) ポリロタキサン上での骨芽細胞の分化、増殖の評価

ポリロタキサン(PRX)と呼ばれる超分子(図1)は分子可動性を示し、間葉系幹細胞に対して高分子可動性PRXは脂肪細胞へ、低分子可動性PRXは骨芽細胞への易分化性を誘導することが報告されている。これを骨芽細胞へと応用し、分子可動性の骨芽細胞分化過程への影響について検討した。さらには、症候群性頭蓋縫合早期癒合症のひとつであるSaethre-Chotzen症候群のモデルマウスである*Twist1^{+/-}*マウスの頭蓋冠由来骨芽細胞の培養の形態、増殖速度、石灰化、遺伝子発現レベルへの影響を評価した。

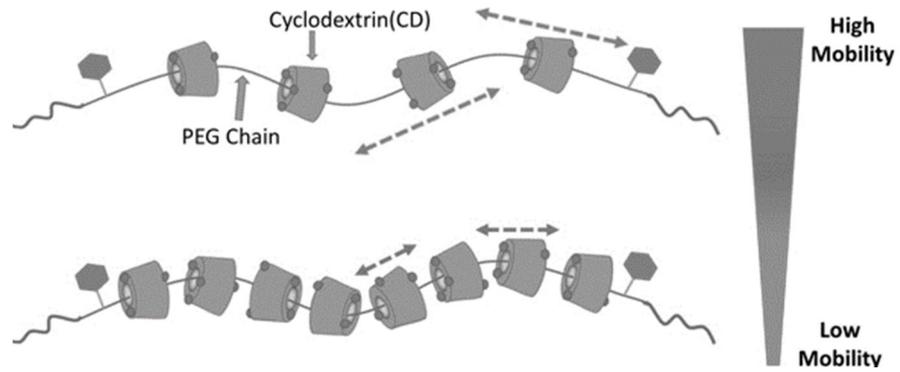


図 1

4. 研究成果

ヒト頭蓋骨切削片および骨片から、骨芽細胞を単離、継代する方法を確立した。

まず、頭蓋骨由来の骨芽細胞の分化マーカーの発現を原因遺伝子の同定されている症候群性の頭蓋縫合早期癒合症患者由来骨芽細胞と非疾患群骨芽細胞を用いて評価した。非疾患群骨芽細胞は複数の検体があったため、年齢による発現量の変化も評価した。

症候群性の癒合症患者由来骨芽細胞間および正常骨芽細胞での骨芽細胞分化マーカーの発現パターンを比較を行った結果、群間での骨芽細胞分化マーカーの発現量に優位に差を認めた。頭蓋縫合早期癒合症患者由来骨芽細胞では骨芽細胞分化マーカーは増殖期から高い値を示す一方で、誘導後の発現量の増加量は対照群と比較して低かった（図 2）。この結果から、頭蓋縫合早期癒合症患者由来骨芽細胞では、外的環境に依存せず骨芽細胞分化マーカーの発現が恒常的に高いレベルであると考えられる。

また、年齢による発現量の変化も示唆された。

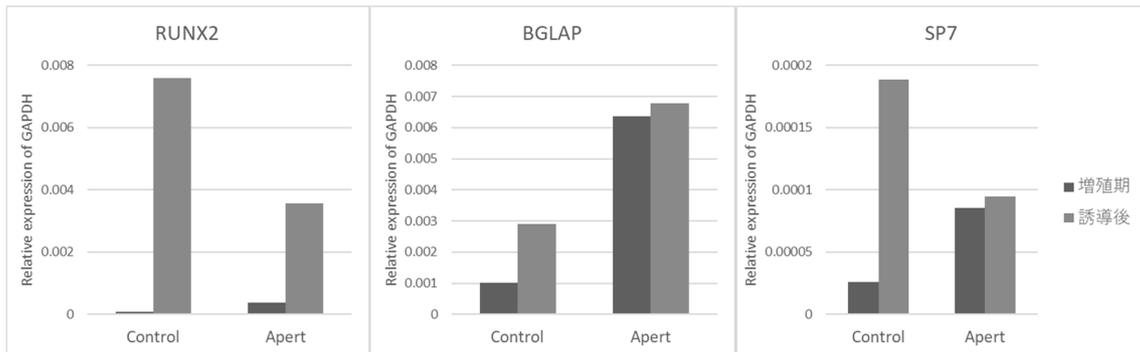


図 2

アリザリンレッド染色による石灰化定量の結果、頭蓋縫合早期癒合症患者由来の骨芽細胞では、より強い石灰化傾向を認めた（図 3）。

iPS 細胞に関しては、患者由来の骨芽細胞にプラスミドベクターとエレクトロポレーション法を用いて山中遺伝子を導入することで、骨芽細胞由来の iPS 細胞を樹立した。樹立した iPS 細胞を用いて 3D 培養を行い胚様体を形成し、骨芽細胞に再分化する系を確立した。

症候群性頭蓋縫合早期癒合症のひとつである Saethre-Chotzen 症候群モデルマウスである *Twist1*^{-/-} マウスの頭蓋骨から単離した骨芽細胞を可動性の異なるポリロタキサンで処理された表面上で培養し、形態、増殖速度、分化マーカーの発現量などを評価した。

異なる可動性のポリロタキサン上で細胞の免疫染色を行った。転写共役因子である YAP は、可動性の低いポリロタキサンやポリロタキサン処理を行わないプレート表面上では核内に限局して認められるが、可動性の高いポリロタキサン表面上では細胞質と核内に認められる。

このことより、ポリロタキサンの可動性が機械的シグナル伝達を制御することが示唆された。YAP の動態を観察するため、LAMIN A/C を用いて角膜を蛍光染色した。可動性の低いポリロタキサンやポリロタキサン処理を行わないプレート表面上では、YAP は円滑な角膜周囲に限局して認

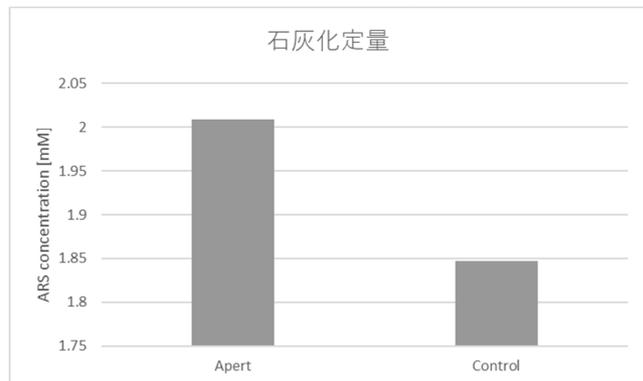


図 3

められた一方、可動性の高いポリロタキサン表面上では、角膜に皺が寄り LAMIN A/C のシグナルが拡散していた。これらの結果から可動性の高いポリロタキサンは機械的シグナル伝達を減少、阻害することが示唆された。

可動性の高いポリロタキサン表面上では、石灰化誘導後の骨芽細胞分化マーカーの発現量や石灰化量が低下した。*Twist1*^{-/-}マウス癒合縫合を離開させ、ポリロタキサン処理をした PLGA メンブレンを留置した群では、対照群と比べ縫合部の閉鎖遅延が認められた。これらの結果から、可動性の高いポリロタキサンを用いることで、頭蓋縫合早期癒合症患者において縫合の再癒合を細胞の分化や増殖の制御によって防止する可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Charoenlarp P, Rajendran AK, Fujihara R, Kojima T, Nakahama K, Sasaki Y, Akiyoshi K, Takechi M, Iseki S.	4. 巻 29
2. 論文標題 The improvement of calvarial bone healing by durable nanogel-crosslinked materialsJ Biomater Sci Polym Ed	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Biomater Sci Polym Ed	6. 最初と最後の頁 1876-1894
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/09205063.2018.1517403	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Rajendran AK, Arisaka Y, Iseki S, Yui N.	4. 巻 in press
2. 論文標題 Sulfonated Polyrotaxane Surfaces with Basic Fibroblast Growth Factor Alter the Osteogenic Potential of Human Mesenchymal Stem Cells in Short-Term Culture.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ACS Biomater. Sci. Eng.	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acsbiomaterials.8b01343	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Amin M.B., Miura M, Uddin M.K., Islam M.J., Yoshida N., Iseki S., Kume T, Trainor P.A., Saitou H, Kazushi Aoto.	4. 巻 57
2. 論文標題 Foxc2CreERT2 knock-in mice mark stage-specific Foxc2-expressing cells during mouse organogenesis.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Conget. Anom.	6. 最初と最後の頁 24-31
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cga.12198.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Charoenlarp P., Arun Kumar R., Iseki S.	4. 巻 37
2. 論文標題 Role of Fibroblast Growth Factors in bone regeneration.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Inflammation and Regeneration	6. 最初と最後の頁 10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） org/10.1186/s41232-017-0043-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Mya N, Furutera T, Okuhara S, Kume T, Takechi M, Iseki S.	4. 巻 -
2. 論文標題 Transcription factor Foxc1 is involved in anterior part of cranial base formation.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Conget. Anom.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cga.12268.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 A. Sivashanmugam, Pornkawe Charoenlarp, S. Deepthi, Arunkumar Rajendran, Shantikumar V. Nair, Sachiko Iseki, R. Jayakumar	4. 巻 2017 Dec
2. 論文標題 Injectable Shear-Thinning CaSO 4/FGF-18-Incorporated Chitin-PLGA Hydrogel Enhances Bone Regeneration in Mice Cranial Bone Defect Model	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 ACS Applied Materials & Interfaces	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsami.7b15845	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Lu Zhao, Yoshiro Matsumoto, Takashi Ono, Sachiko Iseki	4. 巻 101
2. 論文標題 Effects of Mechanical Force Application on the Developing Root Apex in Rat Maxillary Molars	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Arch Oral Biol .	6. 最初と最後の頁 64-76
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.archoralbio.2019.03.010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takahiko Yamada, Masaki Takechi, Norisuke Yokoyama, Yuichi Hiraoka, Harumi Ishikubo, Takako Usami, Toshiko Furutera, Yuki Taga, Yoshikazu Hirate, Masami Kanai-Azuma, Tetsuya Yoda, Kiyoko Ogawa-Goto, Sachiko Iseki	4. 巻 Volume249, Issue5
2. 論文標題 Heterozygous Mutation of the Splicing Factor Sf3b4 Affects Development of the Axial Skeleton and Forebrain in Mouse	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Dev Dyn .	6. 最初と最後の頁 622-635
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/dvdy.148	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Joshua Sanchez Risa Miyake Andrew Cheng Ting Liu Sachiko Iseki Tsutomu Kume	4. 巻 -
2. 論文標題 Conditional inactivation of Foxc1 and Foxc2 in neural crest cells leads to cardiac abnormalities	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Genesis .	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/dvg.23364	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Arun Kumar Rajendran, Yoshinori Arisaka, Nobuhiko Yui, Sachiko Iseki
2. 発表標題 Regulation of osteogenic differentiation by utilizing molecular mobility of polyrotaxanes.
3. 学会等名 日本炎症再生学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Arun Kumar Rajendran, Yoshinori Arisaka, Nobuhiko Yui, Sachiko Iseki
2. 発表標題 Polyrotaxanes for the purpose of regulating osteogenic differentiation
3. 学会等名 日本バイオマテリアル学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Sachiko Iseki
2. 発表標題 Using Biomaterials for bone repair and regeneration
3. 学会等名 The 6th Tripartite Conference on Tooth and Bone in Development & Regeneration (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 柳澤 昇平、武智正樹、Rajendran Arun Kumar、上田晃一、塗隆志、要匡、柳 久美子、小林真司、原田敦子、原田浩之、井関祥子
2. 発表標題 Apert症候群患者頭蓋骨由来骨芽細胞における分化マーカーの発現検討
3. 学会等名 第15回Craniosynostosis研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井関祥子、武智正樹、Rajendran Arun Kumar、原田浩之、柳澤昇平、上田晃一
2. 発表標題 頭蓋縫合早期癒合症患者由来骨芽細胞および骨芽細胞由来iPS細胞の再分化過程における関連遺伝子発現パターンの検討
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tri Vu Hoang, Masaki Takechi, Miki Shimizu, Taro Kitazawa, Hiroki Higashiyama, Akiyasu Iwase, Hiroki Kurihara, Sachiko Iseki
2. 発表標題 Dlx5-augmentation in neural crest cells induces ectopic calvarial cartilages.
3. 学会等名 第59回日本先天異常学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Manami Takeoshita, Masaki Takechi, Kazushi Aoto, Tsutomu Kume, Michiyo Miyashin, Sachiko Iseki
2. 発表標題 Cell lineage- and expression-based inference of molecular function of fork head box transcription factor Foxc2 in craniofacial development
3. 学会等名 4th Meeting of the International Association for Dental Research Asia Pacific Region 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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	武智 正樹 (Takechi Masaki) (10455355)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・テニユアトラック助教 (12602)	
研究分担者	要 匡 (Kaname Tadashi) (40264288)	国立研究開発法人国立成育医療研究センター・ゲノム医療研究部・部長 (82612)	
研究分担者	塗 隆志 (Nuri Takashi) (40445995)	大阪医科大学・医学部・准教授 (34401)	
研究分担者	上田 晃一 (Ueda Koichi) (90257858)	大阪医科大学・医学部・教授 (34401)	
研究協力者	小林 眞司 (Kobayashi Shinji)	神奈川県立子ども医療センター・形成外科・部長	
研究協力者	原田 敦子 (Harada Atsuko)	高槻病院・小児脳神経外科・主任部長	
研究協力者	二宮 洋一郎 (Ninomiya Youichirou)	国立情報学研究所・医療ビッグデータ研究センター・特任研究員	