

平成 31 年 4 月 2 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K17323

研究課題名(和文) iPS細胞を用いた頭蓋顔面形成異常を伴う先天疾患の発生機構解明方法の樹立

研究課題名(英文) Functional analysis of RPL5 using induced pluripotent stem cells from the patient with Diamond-Blackfan Anemia

研究代表者

早野 暁 (Hayano, Satoru)

岡山大学・岡山大学病院・講師

研究者番号：20633712

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)：本研究では頭蓋顔面の形態異常を伴う先天性希少疾患であるダイヤモンドブラックファン貧血に着目し、患者由来の細胞から樹立したiPS細胞を用いてその頭蓋顔面形態異常の発生機構について解析を行った。その結果、特に軟骨細胞においてリボソームタンパクがMDM2を介したp53細胞死経路を活性化し、軟骨細胞死を引き起こしていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

クルーゾン症候群や外胚葉異形成症など、発生率が比較的高い疾患においては、モデルマウスなどを用いた研究によりその発症機構が明らかになりつつあるが、大部分の頭蓋顔面の形態異常を伴う先天性疾患については、未だその発生機構が解明されていない。今回我々は患者由来の細胞から樹立したiPS細胞を用い、頭蓋顔面形態異常を伴う、ダイヤモンドブラックファン貧血における骨格的フェノタイプの発症機構を解明した。本方法を用いることにより、未だに解明されていない多くの先天性疾患の分子メカニズムを解明することが期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we focused on Diamond-Blackfan anemia (DBA), which is characterized by red blood cell aplasia and craniofacial defects. iPS cells derived from DBA patient was used in this study. Our current study indicates that craniofacial defect is caused by activation of p53-mediated cell death pathway which is induced by interaction between ribosomal proteins and MDM2.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：ダイヤモンド・ブラックファン貧血 RPL5

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

頭蓋顔面の形態異常を伴う先天性疾患は数多く存在するが、その多くについてはその骨格的なフェノタイプの発生機構が明らかになっていない。先天性遺伝子疾患の発生機序を解明するためには、遺伝子改変動物を用いることが一般的に行われているが、これには多大な労力と費用が必要となる。このため我々は、頭蓋顔面形態異常の発生機構解明に対してヒト iPS 細胞を応用するという方法を用いることとした。

## 2. 研究の目的

近年の分子生物学や遺伝子改変技術の進歩により、様々な頭蓋顔面の形態異常を伴う先天性疾患についての研究が行われてきた。実際、クルーゾン症候群やアペール症候群など、一部の疾患では原因遺伝子とその分子メカニズムが明らかになってきている。しかし、大部分の頭蓋顔面の形態異常を伴う先天性疾患については、未だその発生機構が解明されていない。本研究の目的は、患者の細胞から樹立した人工多能性幹細胞(induced pluripotent stem cells: iPS 細胞)を用い、未だに解明されていない多くの先天性疾患の分子メカニズムを解明する方法を確立することである。今回の研究で我々は、頭蓋顔面の形態異常を伴う先天性疾患の一つとしてダイヤモンド・ブラックファン貧血(Diamond-Blackfan anemia: DBA)に着目した。本疾患は発症率がおよそ15~20万人に1人の稀少疾患であり、リボソームタンパクの成熟に関わるRPS19, RPS24, RPL5, RPL11, RPL35a 遺伝子変異が原因である。網赤血球の減少による大球性正色素性貧血が主症状であるが、大頭・小頭・口唇口蓋裂といった頭蓋顔面の先天異常が高頻度で認められる疾患である。頭蓋顔面以外にも低身長・拇指奇形など様々な骨格系の異常が認められるため、発生の過程における骨や軟骨の発生に何らかの異常が生じていることが推測されるが、本疾患における頭蓋顔面形態異常の発生機構についてはまだ明らかにされていなかった。このため、患者由来の血球細胞から樹立した iPS 細胞を用いて、DBA における頭蓋顔面の形態異常の発生機序を解明することをもう一つの目的とした。

## 3. 研究の方法

当院に通院するRPL5ハプロ不全のDBA患者およびその健常血縁者の血球細胞からiPS細胞を樹立し、iPS細胞の分化能・iPS細胞から分化させた骨芽細胞および軟骨細胞の基質形成能を評価することとした。さらに、これらの細胞における細胞死および細胞増殖能を評価し、RPL5遺伝子異常に対する細胞死阻害薬の効果を検討することとした。骨芽細胞および軟骨細胞の分化能の評価方法としてリアルタイムPCR法を用いて、特異的mRNA発現量をDBA群と対照群とで比較した。軟骨基質形成能については、Alucian blue染色法を、骨基質形成能に関してはAlizarin red染色法を用いて比較した。細胞死経路の評価についてはTUNEL assayおよびp53細胞死経路特異的な遺伝子発現をリアルタイムPCR法を用いて解析し、さらに免疫沈降Western blotting法を用いてMDM2とリボソームタンパクとの結合を比較した。

## 4. 研究成果

我々は、DBAの原因遺伝子として知られる、RPL5ハプロ不全の患者および、その健常血縁者の血球細胞から樹立したiPS細胞から間葉系幹細胞を分化することに成功した。さらに、間葉系幹細胞から骨細胞・軟骨細胞を分化誘導することにも成功した。分化させた骨細胞・軟骨細胞を用いて、RPL5の変異がどのように骨格形成の源となる骨芽細胞・軟骨細胞の増殖や基質形成に影響するかについて解析を行った。まず、第一の発見として、RPL5の変異は軟骨基質形成

に強く影響しており、骨基質形成への影響が少ないことが組織染色実験から分かった。これは、今回血球細胞を単離した DBA 患者の臨床症状と類似していた。この結果から、軟骨細胞への分化能を比較するため、SOX9, ACAN, COL10A1 の発現量を比較したが、分化マーカーの発現量に差はなかった。次に、DBA グループにおける軟骨基質形成能の低下の原因を調べるため TUNEL assay を行った結果、RPL5 変異軟骨細胞において p53 細胞死経路が更新していることが分かった。興味深いことに、軟骨細胞において p53 遺伝子自体の発現が更新してはいなかった。このことから、p53 細胞死経路の活性は p53 タンパクの翻訳後修飾が関与している可能性が示唆された。我々は、p53 タンパクの代謝において最も重要とされる MDM2 に着目した。ダイヤモンド・ブラックファン貧血の臨床症状の一つである大球性正色素性貧血における過去の報告では、リボソームを構成するタンパクが MDM2 に結合することにより、その機能を阻害した結果、p53 細胞死経路が活性することが示唆されている。このことから、我々は RPL5 ハプロ不全の軟骨細胞培養液に MDM2 亢進剤を添加した結果、RPL5 ハプロ不全の軟骨細胞における細胞死が減少し、平成 29 年度の研究実績として報告した、軟骨基質の形成不全も優位に改善した。反対に对照群の軟骨細胞培養液に MDM2 阻害剤を添加した結果、对照群軟骨細胞の細胞死が増加し、RPL5 ハプロ不全の軟骨細胞と同様に軟骨基質の形成不全が生じた。

このことから、ダイヤモンド・ブラックファン貧血患者において、リボソームタンパクによる MDM2 の阻害が顎顔面の形態異常の原因となっている可能性が示唆された。

## 5 . 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 4 件)

Hayano S, Fukui Y, Kawanabe N, Kono K, Nakamura M, Ishihara Y, Kamioka H. Role of the inferior alveolar nerve in rodent lower incisor stem cells. J Dent Res, 査読有, 97, 954-961, 2018. DOI: 10.1177/0022034518758244

Liu X, Hayano S, Pan H, Inagaki M, Ninomiya-Tsuji J, Sun H, Mishina Y. Compound mutations in Bmpr1a and Tak1 synergize facial deformities via increased cell death. Genesis, 査読有, 56, e23093, 2018. DOI: 10.1002/dvg.23093

Kramer K, Yang J, Swanson WB, Hayano S, Toda M, Pan H, Kim JK, Krebsbach PH, Mishina Y. Rapamycin rescues BMP mediated midline craniosynostosis phenotype through reduction of mTOR signaling in a mouse model. Genesis, 査読有, 56, e23220, 2018. DOI: 10.1002/dvg.23220

Odagaki N, Ishihara Y, Wang Z, Ei Hsu Hlaing E, Nakamura M, Hoshijima M, Hayano S, Kawanabe N, Kamioka H. Role of Osteocyte-PDL Crosstalk in Tooth Movement via SOST/Sclerostin. J Dent Res, 査読有, 97, 1374-1382, 2018. DOI: 10.1177/0022034518771331

### 〔学会発表〕(計 4 件)

Yuko Fukui, Satoru Hayano, Megumu Saito, Akira Shimada, Noriaki Kawanabe, Hiroshi Kamioka, Relation between chondrodysplasia and RPL5-associated cell death in Diamond-Blackfan Anemia, 第 32 回日本軟骨代謝学会, 2019 年

福井裕子、早野暁、齋藤潤、嶋田明、川邊紀章、上岡寛、ダイヤモンド・ブラックファン貧血における軟骨形成不全と RPL5 変異に起因する細胞死との関連、第 77 回日本矯正歯科

学会学術大会、2018年

小田垣直弥, 石原嘉人, 王紫儀, イイスライン, 中村政裕, 星島光博, 早野暁, 川邊紀章, 上岡寛. 歯根膜の圧迫負荷は骨細胞の SOST/Sclerostin を介した歯槽骨代謝制御をパラクリン機構によって調節する、第77回日本矯正歯科学会学術大会、2018年

Satoru Hayano, Noriaki Kawanabe, Yuko Fukui, Hiroshi Kamioka, Role of the inferior alveolar nerve in the mesenchymal stem/progenitor cells, 94th European Orthodontic Society Congress (国際学会), 2018年

〔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:

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:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名: 嶋田 明

ローマ字氏名: SHIMADA Akira

研究協力者氏名: 斎藤 潤

ローマ字氏名: SAITO Megumu

研究協力者氏名：上岡 寛

ローマ字氏名：KAMIOKA Hiroshi

研究協力者氏名：川邊 紀章

ローマ字氏名：KAWANABE Noriaki

研究協力者氏名：福井 裕子

ローマ字氏名：Fukui Yuko

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。