

令和 3 年 5 月 27 日現在

機関番号：32650

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H03007

研究課題名(和文)疾患iPS細胞を用いたGNAS-cAMP経路の骨芽細胞分化石灰化メカニズム解明

研究課題名(英文)Elucidation of osteoblast mineralization mechanism using McCuneAlbright syndrome iPS cells

研究代表者

東 俊文 (AZUMA, TOSHIFUMI)

東京歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：00222612

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：先天性骨格系疾患の病態は多彩であり、疾患病態メカニズムの解明には疾患特異的iPS細胞応用が重要であることが明らかになっていった。GNAS過剰iPS細胞(線維性骨異形成症およびMcCuneAlbright症候群)iPS細胞を作製し、Gorlin症候群iPS細胞と比較検討し、Hedgehog経路とGNAS経路の関係と病態を解明することを目的とした。GNAS過剰iPS細胞を樹立し腫瘍性病変を再現したところ疾患細胞の未分化性が亢進するがわかった。したがって、線維性骨異形成症骨芽細胞分化阻害は実にHedgehog阻害を適切に薬剤投与により補正することが治療へ直結する可能性を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

GNAS過剰変異はSporadicに発生するMcCuneAlbright syndromeやFibrous dysplasiaなどにみられる遺伝子変異であるが、その解明においては上記疾患細胞の獲得が非常に困難であることが大きな障害となっていた。本研究にてiPS細胞を作製したことにより、この疾患に関連した多くの疾患(線維性骨異形成症、消化管良性腫瘍、臍癌)の研究など広範に利用可能である。

研究成果の概要(英文)：The pathophysiology of congenital skeletal diseases is diverse, and it has been clarified that disease-specific iPS cell application is important for elucidating the pathophysiological mechanism of the disease. GNAS-rich iPS cells (fibrous dysplasia and McCune-Albright syndrome) iPS cells were generated and compared with Gorlin syndrome iPS cells, with the aim of elucidating the relationship and pathophysiology of the Hedgehog pathway and the GNAS pathway. When GNAS-rich iPS cells were established and neoplastic lesions were reproduced, it was found that the undifferentiated state of diseased cells was enhanced. Therefore, it was clarified that the inhibition of osteoblast differentiation in fibrous dysplasia may be directly linked to the treatment by appropriately correcting the inhibition of Hedgehog by drug administration.

研究分野：再生医学

キーワード：GNAS ヘッジホッグ iPS細胞 骨芽細胞 骨 線維性骨異形成症 McCune Albright 症候群 消化管腫瘍

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、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

先天性骨格系疾患の病態は多彩であり 疾患病態メカニズムの解明には疾患特異的 iPS 細胞応用が重要であることが明らかになっていった。申請者らは Hedgehog 経路情報過剰となる Gorlin 症候群の研究から Hedgehog は骨芽細胞分化過程において過剰となると GNAS 経路を抑制することを見出した。さらに 近年の報告によれば GNAS 経路活性化が Hedgehog 抑制に作用する可能性も想定された。

GNAS 恒常活性化と線維性骨異形成症 (Fibrous dysplasia)

線維性骨異形成症 (Fibrous dysplasia) は 骨組織における幼弱な骨形成と線維性組織の異常増殖により骨皮質が委縮し 結果として骨髄が線維性組織で埋まってしまう慢性骨増殖性疾患で 一般的には腫瘍類似疾患と分類される。多くが単骨性に発生し、10~20 歳代に多く、好発部位は大腿骨近位部、頭蓋骨、顎骨および肋骨である。顎骨では下顎骨より上顎骨に多く、前歯部より臼歯部に好発する。孤発性の単骨型と 全身の骨組織に嚢胞性病変を呈する多骨型がある。頻度は全骨腫瘍の 2.4%、良性腫瘍の 7.0%とされる。周囲組織との境界は不明瞭のまま緩慢に進行し初期には嚢胞状組織を呈し、進行するとすりガラス状の異常陰影を呈する。しかし 骨成長が停止するとともに病変進行も停止するとされたが近年、50 台で発症した例も報告されている。原因は不明とされていたが 類縁する全身性疾患 McCuneAlbright 症候群原因遺伝子 GNAS 遺伝子変異が 病変組織骨芽細胞に確認され、骨芽細胞あるいは骨芽細胞前駆細胞の GNAS 遺伝子変異 (GNAS(R201H、R201C)) 変異) のため生じる G タンパク経路の異常活性化が原因の 1 つであることが確認された (2)。一方同じ GNAS 遺伝子 (GNAS(R201H) 変異) のモザイク変異が起因となる全身性疾患として McCune Albright 症候群がある。本疾患は片側複数骨の線維性骨異形成症、皮膚色素沈着 (しばしば 片側に生じる Café-au-lait 斑) および内分泌機能異常 (甲状腺機能亢進症、末端肥大症、クッシング症候群、思春期早発症) を呈する。線維性骨異形成症全体の 5% 未満にみられるとされる。

2. 研究の目的

そこで GNAS 過剰 iPS 細胞 (線維性骨異形成症および McCuneAlbright 症候群) iPS 細胞を作製し Gorlin 症候群 ipS 細胞と比較検討し、Hedgehog 経路と GNAS 経路の関係と病態を解明する。

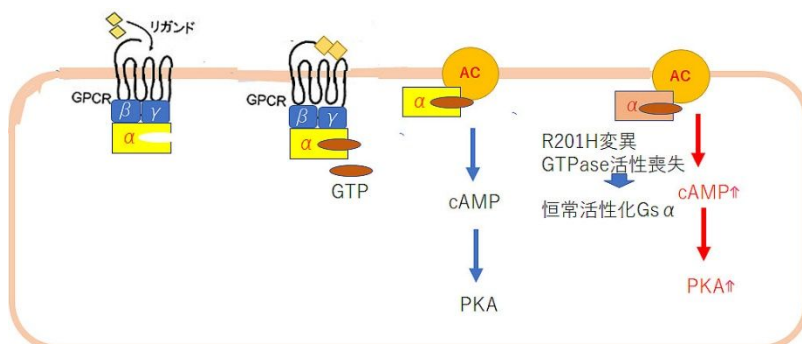
3. 研究の方法

GNAS(R201C) 変異 iPS 細胞を遺伝子編集法により作製した。GNASiPS 細胞と GorliniPS 細胞を骨芽細胞分化誘導し、遺伝子発現を網羅的に解析した。さらに Hedgehog 経路の活性化状態をこれら細胞ごとに検討した。

4. 研究成果

GNAS(R201H) 変異と情報伝達

G タンパク質は GTPase に属するタンパク質で、7 回膜貫通型受容体関連ヘテロ三量体 (、、subunit) を形成する。subunit (Gs) は GTP 結合領域を有し標的タンパク質を活性化しかつ GTPase 活性を持ち自身の活性レベルを調節する。この Gs をコードする遺伝子 GNAS の GTPase 活性化領域に変異が存在する (GNAS R201H、R201C など) と GTPase 活性化を喪失するため 活性化 GNAS は GTP を結合したままの状態となり Gs は恒常活性化する (図)。Gs の機能、情報経路はある程度解明されて McCuneAlbright 症候群 (MAS) や線維性骨異形成症は主に骨芽細胞、骨細胞の GNAS 遺伝子変異により G タンパク質 (Gs α) が恒常的に活性化することが原因とされる。我々は MAS/線維性骨異形成症特異的 iPS 細胞を用いた病態メカニズム研究から、病態の中心的な症状である石灰化抑制が、G タンパク質 (Gs α) が恒常的に伴って発生する Hedgehog 経路の抑制により起こることを発見した。Hedgehog 経路は様々な組織分化過程に重要な役割を果たすが、骨芽細胞分化過程においては、初期分化段階に必須であることを報告した。このため Gs が恒常的に活性化すると 結果として Hedgehog 経路が抑制され Wnt 経路が活性化することが報告さ



れた。この結果は我々も R201H を持つ iPS 細胞 (McCune Albright (MAS) iPS) を用いた研究から同様の結果を確認し MASiPS 細胞は Gs 恒常的活性化/cAMP 上昇が認められ Hedgehog 経路が極端に抑制され骨分化成熟抑制・骨石灰化抑制が生じる。他方、Hedgehog が恒常的に活性化している Gorlin 症候群では骨分化・石灰化過剰が生ずることを報告した。

我々は MASiPS 細胞を樹立し腫瘍性病変を再現したところ疾患細胞の未分化性が亢進するがわかった(5)。したがって、線維性骨異形成症骨芽細胞分化阻害は実に Hedgehog 阻害が Key point で、これを適切に薬剤投与により補正することが 治療へ直結する可能性を明らかにした
 治療候補薬剤の作用・効果検討し病態解明治療法開発へ繋げる可能性ある薬剤候補として SAG (Smoothened agonist) が有効である可能性を示した

	cAMP	Hedgehog	Wnt	石灰化
 MAS-iPS	高	著明低下	高	著明阻害
 MAS-iPS	高	正常化	高	正常化
Hedgehog活性化剤 SAG 投与				
 Gorlin-iPS	低	著明高	低	過剰

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Nakamura T, Nakamura-Takahashi A, Kasahara M, Yamaguchi A, Azuma T.	4. 巻 524(3)
2. 論文標題 Tissue-nonspecific alkaline phosphatase promotes the osteogenic differentiation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BERC	6. 最初と最後の頁 702-709.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.01.136.	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 Zujur D, Kanke K, Onodera S, Tani S, Lai J, Azuma T, Xin X, Lichtler AC, Rowe	4. 巻 14
2. 論文標題 Stepwise strategy for generating osteoblasts from human pluripotent stem cells under fully defined xeno-free conditions with small-molecule inducers.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Regen Ther	6. 最初と最後の頁 19-31
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.reth.2019.12.010. eCollection	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 Odashima A, Onodera S, Saito A, Ogihara Y, Ichinohe T, Azuma T.	4. 巻 53(1)
2. 論文標題 Stage-dependent differential gene expression profiles of cranial neural	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Med Mol Morphology	6. 最初と最後の頁 28-41
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00795-019-00229-2.	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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	中村 貴 (NAKAMURA TAKASHI) (80431948)	東京歯科大学・歯学部・講師 (32650)	

6. 研究組織（つづき）

	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	柴原 孝彦 (SHIBAHARA TAKAHIKO) (50178919)	東京歯科大学・歯学部・教授 (32650)	
研究分担者	齋藤 淳 (SAITO ATSUSHI) (60266559)	東京歯科大学・歯学部・教授 (32650)	
研究分担者	小野寺 晶子 (ONODERA SHOKO) (90637662)	東京歯科大学・歯学部・講師 (32650)	
研究分担者	齋藤 暁子 (SAITO AKIKO) (90722835)	東京歯科大学・歯学部・助教 (32650)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関