

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：32650

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09753

研究課題名(和文) Gorlin症候群由来iPS細胞を用いた歯原性角化嚢胞モデルの樹立とその応用

研究課題名(英文) Odontogenic keratocyst model using iPSCs derived from patient with Gorlin syndrome

研究代表者

小野寺 晶子 (Onodera, Shoko)

東京歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：90637662

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、樹立したGorlin症候群iPS細胞を用いて、歯原性角化嚢胞モデルを構築しその発症メカニズムを検討した。GorliniPS細胞より分化した基底細胞では、コントロール細胞に比べ、HhシグナルのターゲットであるGLI1, HHIPの上昇がみとめられた。UVC照射実験により、Gorlin症候群iPS細胞ではコントロール細胞に比べアポトーシス抵抗性を有することが確認された。ヘッジホッグシグナルの活性化異常とアポトーシス抵抗性が歯原性角化嚢胞の発生に関与していることが考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Gorlin症候群(基底細胞母斑症候群)は日本人においては24万人に1人の確立で発症する希少疾患であり、腫瘍性、嚢胞性病変の多発および骨形成異常を生じる。腫瘍性、嚢胞性病変は再発することも多いため、度重なる手術は患者のQOLを下げる原因となる。現在、根治的な治療はなく、外科的切除が第一選択となる。患者から樹立した疾患iPS細胞は、患者に生じる病態を実験上模倣することができる可能性を有する細胞である。この細胞を用いて病態形成モデルを確立し、発症するメカニズムを検討することで、病気に対する薬剤などを探ることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：We found that keratinocytes derived from G-OFiPSCs (GKCs) have increased expression of Hh target molecules. GKCs were irradiated and those cells showed high resistance to UV induced apoptosis. BCL2, known as anti-apoptotic molecule as well as Hh target, significantly increased in GKCs. Several molecules involved in DNA repair, cell cycle control, senescence, and genotoxic stress such as TP53, BRCA1 and GADD45A increased only in GKCs. GKCs are indicated to be resistant to UV irradiation by upregulating molecules which control DNA repair and genotoxic even under DNA damage caused by UV. The anti-apoptotic properties of GKCs may contribute BCC.

研究分野：遺伝子変異性疾患

キーワード：Gorlin症候群 疾患iPS細胞 遺伝子変異 歯原性角化嚢胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

歯原性角化嚢胞 (OKC) は 20 ~ 30 歳代で下顎の大臼歯部に好発し、顎骨を侵襲性に破壊し増大する傾向を示す嚢胞である。この裏装上皮は、数層からなる錯角化重層扁平上皮を示し、上皮下組織に娘嚢胞を生じることがある。Gorlin 症候群では OKC が多発することが知られており、山口らの検討で、OKC では Hedgehog (Hh) 経路の SMO 以下の情報経路の活性化がその発生に関与していることが示唆され (PLoS One. 2013 8(8):e70995)、孤発性の OKC においても Hh 経路の転写因子である GLI1 の活性化が認められる。Hh シグナルは生体内の恒常性の維持、骨形成の他、癌の発生においても多く報告があり (Zheng X et al. Oncology Reports 2013) 基底細胞癌や乳がんでは GLI1 の上昇が明らかにされている。この経路は受容体である PTCH1 の他、相同型受容体である PTCH2、共受容体である BOC、CDON など複数の受容体に制御を受けている (Alfaro A et al. Development 2014: 141 (17))。申請者は Gorlin 症候群患者においても責任遺伝子である PTCH1 の変異の他に PTCH2 や BOC にも変異があることを報告し (図 1-a)、多重変異がヘッジホッグシグナル活性を変化させ、表現型の多様性へ影響する可能性を示した (図 1-b,c) (Onodera S et al. PLoS One 2017 12(9):e0184702.)。また PTCH1 以外の PTCH2 や SMO が原因となり Gorlin 症候群が生じるといふ報告もある (Fan Z et al. J Med Genet. 2008;45(5):303-8.)。以上より遺伝的背景の違いは Hh シグナルの発現制御に影響を及ぼし、それにより生じる Hh シグナルの活性化が嚢胞形成に関与していることが考えられる。

嚢胞形成メカニズムは腎臓で生じる多発性嚢胞腎でいくらかわかっているもののその発症メカニズムの大部分は未解明である。メカニズム検討には in vitro における病態モデルの形成が必要だが、発生母地である基底細胞を採取が困難であり OKC 病態モデルは現在のところ確立されていない。

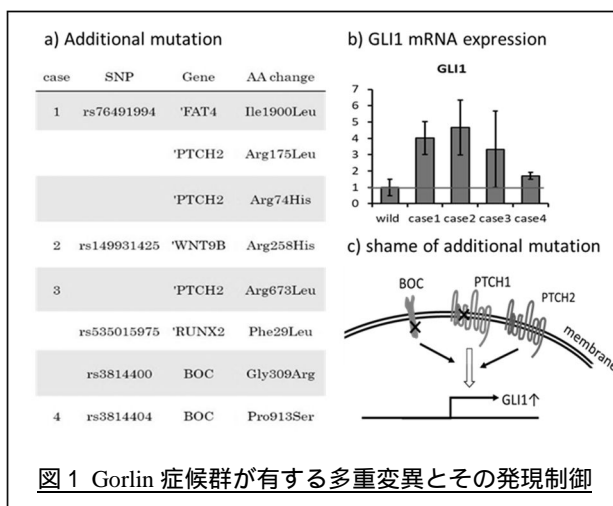


図 1 Gorlin 症候群が有する多重変異とその発現制御

2. 研究の目的

本研究では疾患 iPS 細胞を OKC の発生母地である基底細胞へ分化させ、OKC3 次元モデル形成を目指し、ヘッジホッグシグナルの活性化が引き起こす嚢胞発症メカニズムの解明を目的とした。

3. 研究の方法

1. 変異正常化 iPS 細胞:

gRNA 及び変異正常化及び遺伝子欠失用の Cas9 ベクターで遺伝子編集を行い、変異正常化 iPS 細胞 (rev iPS) を作製し、患者由来 iPS 細胞のコントロール細胞として用いる。同ベクターには loxP サイトが組み込んであり、樹立した rev iPS 細胞より変異挿入 iPS 細胞 (KO iPS) の作成が可能であり、メカニズムの検討に用いる。エレクトロポレーション法を用いて gRNA とターゲット領域を含むベクターを hiPS 細胞へと導入し、変異正常化 iPS 細胞 (rev iPS) を作製し、コントロール細胞とする。作成後 Hh シグナルのターゲット遺伝子である GLI1 と HHIP の発現を 201B7 細胞 (異なる遺伝子背景を持つ iPS) 比較し、遺伝子背景による Hh 経路の発現制御の違いを明らかにする。

2. 発生母地である基底細胞への分化誘導:

発生母地である基底細胞への分化誘導を行い、Gorlin-iPS 細胞とコントロール細胞群との分化の違いを明らかにする: 基底細胞への分化には梶原らによって樹立された方法を改変して用いる (Stem Cell Reports. 2017;8(6):1701-1713.:図 2)。

Day -1	0	4	1st passage	30
StemFit AK02N	DKSFM	DKSFM	DKSFM	
	RA+BMP4	EGF	EGF+Y-27632	
	Matrigel		VTN + collagen type I + iMatrix	

図 2

iPS 細胞を Vitronectin/collagen コートディッシュで播種、keratinocyte-SFM (Gibco) にレチノイン酸、BMP4、を加え 4 日間培養後、同一培地に EGF を添加し 30 日培養し上皮細胞を得る。分化の確認には基底細胞分化マーカーである *Keratin14*, *Integrin4* の mRNA およびタンパクの発現を用いて確認する。

### 3. Gorlin 症候群の OKC 発症メカニズム探索のための 2nd ヒットの検索:

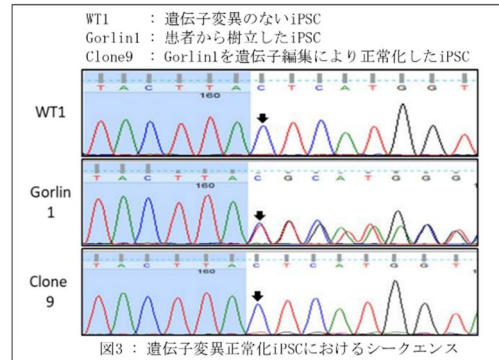
Gorlin 症候群の OKC 発症メカニズム探索のための 2nd ヒットの検索: Gorlin 症候群における OKC の有無を追跡している。東京歯科大学市川総合病院、慶応大学と共同で Gorlin 症候群患者の OKC の経過診察を行う。発症した患部組織のゲノム DNA と関与する可能性の高い PTCH1, PTCH2, SUFU, SMO, 4 遺伝子に対するカスタムパネルを用いてアンプリコン PCR を行い illumina miSeq にてシーケンスを実施する。得られたデータは CLC Genomics WorkBench を用いてマッピングおよび変異解析を行う。正常部 (iPS を作製した線維芽細胞ゲノム DNA 塩基配列 (既に決定済み)) との比較検討と 2nd ヒットと思われる変異部を特定する。

## 4. 研究成果

### 1. 変異正常化 iPS 細胞の樹立:

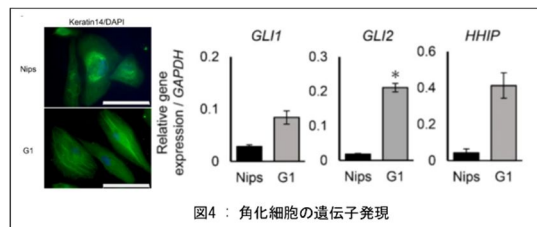
これまでに樹立した 1 症例の iPS 細胞からゲノム編集技術を用いて遺伝子変異を修復したコントロール iPS 細胞を作製した (図 3)。

遺伝子編集をしたコントロール iPS 細胞では遺伝子編集前と同様の未分化性および多能性を確認した。コントロール iPS 細胞では Gorlin 症候群 iPS と比べ変異を有するアレルの発現減少が認められ、Hh 経路のターゲット遺伝子である HHIP および GLI1 の発現減少が認められた。



### 2. 基底細胞でのヘッジホッグシグナルの発現:

分化誘導後, GiPS 群は KRT14, ITGB4 遺伝子の発現およびタンパク発現を認めた。コントロール iPS 群と比較し, GiPS 群は HHIP, GLI1 mRNA が発現上昇し Hh 経路の活性化を認めた。UV 照射後 GiPS 由来分化細胞群では Apoptosis 陽性細胞の有意な減少を認めた。GiPS は Hh 経路活性と Apoptosis 抵抗性を有しており, 変異のない細胞と比較し正常な細胞死が誘導されにくいことが示唆された。(図 4)



### 3. 4 遺伝子に対する遺伝子パネルの開発:

設計には Design Studio (Illumina 社) を使用し, PTCH1, PTCH2, SMO, SUFU, 4 遺伝子の全 Exon 領域の塩基配列を 99% 以上解読する遺伝子パネルを作製した。患者 12 名から歯肉・OKC・血液のいずれかからゲノム DNA を抽出後, MiSeq にて解析した。ヒトゲノム配列である Hg19 に対して FASTQ データを BWA にてマッピング後, GATK で変異解析を行った。5 つのソフトウェアを用いて病原性を予測し, 変異バリエーションごとの評価を行った。次に本パネルの正規性の検証のため患者 7 名の組織から得た WES 解析データとパネル解析データを比較し, 同一患者データでの変異の近似性を確認した。これらの組織サンプルの遺伝子パネルの解析精度は Quality score30 は 70% 以上を示し, On target ratio は 90% 以上を示した。現在はこのパネルを使用し, OKC に対する体細胞変異の検出を検討中である。

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 Morita Nana, Onodera Shoko, Nakamura Yuriko, Nakamura Takashi, Takahashi Shin-ichi, Nomura Takeshi, Azuma Toshifumi	4. 巻 54
2. 論文標題 Keratinocytes from Gorlin Syndrome-induced pluripotent stem cells are resistant against UV radiation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Medical Molecular Morphology	6. 最初と最後の頁 69 ~ 78
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00795-020-00264-4	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 Onodera Shoko, Saito Akiko, Hojo Hironori, Nakamura Takashi, Zujur Denise, Watanabe Katsuhito, Morita Nana, Hasegawa Daigo, Masaki Hideki, Nakauchi Hiromitsu, Nomura Takeshi, Shibahara Takahiko, Yamaguchi Akira, Chung Ung-il, Azuma Toshifumi, Ohba Shinsuke	4. 巻 15
2. 論文標題 Hedgehog Activation Regulates Human Osteoblastogenesis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Stem Cell Reports	6. 最初と最後の頁 125 ~ 139
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.stemcr.2020.05.008	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 Onodera Shoko, Nakamura Yuriko, Azuma Toshifumi	4. 巻 21
2. 論文標題 Gorlin Syndrome: Recent Advances in Genetic Testing and Molecular and Cellular Biological Research	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 7559 ~ 7559
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21207559	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4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Onodera S, Azuma T, Ohba S.
2. 発表標題 Enhancement of osteogenic potential in iPSCs derived from Gorlin syndrome
3. 学会等名 96th General Session & Exhibition of the International Association for Dental Research, (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Morita N, Onodera S, Hasegawa D, Nomura T, Azuma T.
2. 発表標題 Epidermal differentiation from Gorlin Syndrome- induced pluripotent stem cells
3. 学会等名 96th General Session & Exhibition of the International Association for Dental Research (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小野寺 晶子
2. 発表標題 Abnormalities of osteoblast differentiation capacity of iPS cells derived from Gorlin syndrome patient
3. 学会等名 第50回日本臨床分子形態学会
4. 発表年 2018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	中村 貴  (Nakamura Takashi)  (80431948)	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
---------	---------