

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K19278

研究課題名（和文）原発性萌出不全特異的iPS細胞を用いた疾患発症機序の解明

研究課題名（英文）Study on the mechanism of the pathogenesis of primary failure of eruption

研究代表者

泉田 恵理 (Eri, Izumida)

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：70783497

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,000,000円

研究成果の概要（和文）：副甲状腺ホルモン(PTH)-1受容体(PTH1R)遺伝子の変異が原発性萌出不全(PFE)で認められるが、PFEの発症機序は不明だった。そこで、PFE患者と非患者の末梢血単核球からiPS細胞(PFE-iPSCとC-iPSC)を樹立し、PFE発症機序を解析した。それぞれのiPSCから骨芽細胞様細胞を誘導した。両骨芽細胞用細胞の石灰化能、骨芽細胞マーカー遺伝子の発現に差は認められなかった。活性型ビタミンDによるRANKLの発現誘導にも差は認められなかった。しかし、PTH刺激によるRANKL発現誘導は、C-iPSC由来骨芽細胞様細胞に比べ、PFE-iPSC由来骨芽細胞様細胞で著しく低下していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PFE患者のPTH1R遺伝子に変異が報告されていたが、その変異のPFE発症への関与を説明する研究はなかった。今回、PFE患者iPSCを用いることで、PFE患者のPTH1R遺伝子変異がPFE発症に関与するメカニズムのひとつを明らかにした。すなわち、PFE患者由来iPSCと健常人iPSCから誘導した骨芽細胞様細胞で石灰化や分化マーカーの発現に差はなかったが、PTH応答は前者で低下していた。歯の萌出には破骨細胞分化を誘導するRANKLの発現が必要だが、PTH誘導性のRANKL発現が前者で低下していた。PFE患者では、PTH依存性破骨細胞誘導能が低下し、歯の萌出が阻害されている可能性を示唆する。

研究成果の概要（英文）：While several mutations in the (PTH)-1 receptor (PTH1R) gene are associated with primary failure of eruption (PFE), the mechanism of PFE pathogenesis remained unclear. We established iPSC cells from the peripheral blood mononuclear cells of a PFE patient and a non-patient (PFE-iPSC and C-iPSC). Osteoblasts-like cells (OB) were derived from PFE-iPSC and C-iPSC. There was no remarkable difference in OB derived from PFE-iPSC and C-iPSC in the calcification, the expression of marker genes, or the active vitamin D-induced expression of RANKL. However, the RANKL expression induced by the PTH in PFE-iPSC-derived OB was significantly lower than that in C-iPSC-derived OB.

研究分野：矯正歯科学

キーワード：原発性萌出不全 iPSC細胞 副甲状腺ホルモン受容体 変異

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

原発性萌出不全(PFE)は側方歯開咬を特徴とする発症原因不明の成長障害である。山口らは、4名のPFE患者のPTH/PTHrP受容体-1(PTH1R)遺伝子中に、それぞれ、356C>T(P119L)、395C>T(P132L)、439C>T(R147C)、1148G>A(R383Q)のミスセンス変異を同定した[J Bone Miner Res 26:1655-1661, 2011]。我々は、これらの変異とPFE発症の関係を明らかにしたいと考えた。そこで、PTH1Rを発現していないことが知られているHeLa細胞に、レンチウイルスベクターを用いて野生型または356C>T(P119L)、395C>T(P132L)、439C>T(R147C)、1148G>A(R383Q)の変異を持つPTH1R遺伝子を導入し、各PTH1Rを強制発現させた。野生型および変異PTH1Rタンパク質の発現をWestern blotにて確認した結果、野生型の分子量は8.7万、P119LおよびP132L変異体のそれは6.9万、R147CおよびR383Q変異体は8.7万と6.9万の分子が混在することが分かった。PTH1Rのペプチド部分のみの分子量は6.3万で、PTH結合領域中の4箇所のAsn残基がN-グリコシル化を受けることが知られている。そこで、それぞれの細胞のタンパク質抽出液をN-グリコシダーゼで処理したところ、すべてが分子量6.2万になった。従って、PFE患者におけるPTH1Rのアミノ酸置換は、N-グリコシル化を強く抑制すると考えられた。また、PTH1R変異体の蛍光ラベルPTHに対する親和性は野生型PTH1Rに比べ低下していた。さらに、PTHで刺激した変異PTH1R発現細胞におけるcAMPの上昇が抑制されていた。

上の結果は、PTH1Rにおけるアミノ酸置換がPTH1Rの構造変化と糖鎖修飾に変化を与え、PTH親和性が低下することがPFEの発症に関係することを示唆している。しかし、PFE患者のPTH1Rはヘテロ変異であることから、PFE発症メカニズムの解析を行うには、PFE患者特異的iPS細胞から誘導した骨芽細胞におけるPTH応答を解析する必要があると考えた。

### 2. 研究の目的

PFE患者特異的iPS細胞(PFE-iPSC)と健常者のiPS細胞(C-iPSC)を作製した。まず、PFE-iPSC C-iPSCから分化させた骨芽細胞様細胞を分化させた。両者の骨芽細胞分化能に違いがあるかを解析した。さらに、PFE-iPSCとC-iPSCから得られた骨芽細胞用細胞様細胞のPTH応答、特にPTHによるRANKL発現誘導を比較した。PTH1Rの変異がPFE発症に関わるか否かを明らかにするために、これらの解析を行った。

### 3. 研究の方法

PTH1Rに395C>T(P132L)のヘテロ変異を持つPFE患者および健常人の末梢血CD34陽性細胞から定法に従ってiPS細胞(PFE-iPSCおよびC-iPSC)を誘導した。SSEA-4およびTra-1-60タンパク質の発現、SOX2、OCT、NANOG遺伝子のmRNA発現からiPS細胞であることを確認するとともに、PFE-iPSCについては、PTH1R遺伝子のヘテロ395C>T変異を確認した。PFE-iPSCおよびC-iPSCをBMP-2、-グリセロリン酸、アスコルビン酸、デキサメタゾンを含む骨芽細胞分化誘導培地で3週間培養した。石灰化結節の染色・定量、RUNX2、SP7およびBGLAP mRNAの発現により骨芽細胞分化を評価した。さらに、活性化型ビタミンD刺激によりRANKL mRNAの発現上昇が認められた株を実験に用いた。PTHを培養系に添加し、PTHのセカンド・メッセンジャーであるcAMPの上昇、RANKL mRNA発現を定量的PCRで、RANKLタンパク質の発現をwestern blot法で評価した。

### 4. 研究成果

PFE-iPSCおよびC-iPSCから誘導した骨芽細胞様細胞の石灰化能に大きな違いは認められなかった。骨芽細胞分化に必須の転写因子RUNX2およびSP7の発現もPFE-iPSC由来の骨芽細胞様細胞とC-iPSC由来の骨芽細胞様細胞で顕著な差は見られなかった。骨芽細胞のマーカー遺伝子であるBGLAP mRNAの発現も同様に3週間の培養で上昇した。さらにPTH1R mRNAの発現も両者をiPSCから骨芽細胞様細胞への分化に伴い、同様に上昇した。

骨芽細胞様細胞に分化した細胞のPTHに対する応答を比較した。C-iPSCから誘導した骨芽細胞様細胞は、活性化型ビタミンDあるいはPTH刺激によりRANKL mRNAおよびRANKLタンパク質の発現が上昇した。一方、PFE-iPSCから誘導した骨芽細胞様細胞は活性化型ビタミンDによりRANKL mRNAおよびRANKLタンパク質は上昇したが、PTHによるRANKL mRNAおよびRANKLタンパク質の発現は有意な上昇が認められなかった。PFE-iPSCから誘導した骨芽細胞様細胞をPTHで刺激した後の細胞内cAMPの上昇は、C-iPSCから誘導した骨芽細胞様細胞をPTHで刺激した後の細胞内cAMPの上昇に比べ、有意に低値を示した。

以上の結果から、PTH1RにP132Lのアミノ酸置換があるPFE患者の骨芽細胞は、PTHに対する応答が健常者の骨芽細胞に比べて弱く、PTHによるRANKL発現も健常者の骨芽細胞に比べて弱いと考えられた。PFE患者では、PTHによる破骨細胞分化誘導因子であるRANKLの発現誘導が弱い

ために、歯の萌出に必要な破骨細胞の分化が十分でないために、歯の萌出が起こらない可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 泉田恵理、山口徹太郎、芳賀秀郷、横宏太郎	4. 巻 79
2. 論文標題 上顎両側第一小臼歯および下顎両側第二小臼歯先天欠如を伴う骨格性I級の矯正治療例.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 昭和学会雑誌	6. 最初と最後の頁 529-535
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14930/jshowaunivsoc.79.529	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 Izumida E, Suzawa T, Miyamoto Y, Yamada A, Otsu M, Saito T, Yamaguchi T, Nishimura K, Ohtaka M, Nakanishi M, Yoshimura K, Sasa K, Takimoto R, Uyama R, Shirota T, Maki K, Kamijo R	4. 巻 99
2. 論文標題 Functional analysis of PTH1R variants found in primary failure of eruption.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Dent Res	6. 最初と最後の頁 429-436
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/0022034520901731	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 泉田恵理、須澤徹夫、山口徹太郎、宮本洋一、上條竜太郎、横宏太郎
2. 発表標題 原発性萌出不全特異的iPS細胞を用いた同疾患発症機序の解明
3. 学会等名 第29回 日本顎変形症学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

昭和大学歯学部 口腔生化学講座  
<http://www10.showa-u.ac.jp/~oralbio/>  
昭和大学歯科病院 矯正歯科  
<http://www.ortho-showa.com>

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------