

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H03110

研究課題名(和文) 機能亢進型GNAS変異マウスを用いた線維性骨異形成症の病態解明と創薬展開

研究課題名(英文) Pathogenesis of fibrous dysplasia using hyperfunctional GNAS-mutant mice and drug discovery

研究代表者

豊澤 悟 (Toyosawa, Satoru)

大阪大学・大学院歯学研究科・教授

研究者番号：30243249

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：線維性骨異形成症(FD)はGNASの体細胞変異により細胞内シグナル伝達に異常が起こって、骨髄内に骨形成を伴った線維組織が増生する骨疾患である。骨髄に発生するFDは、この変異が骨髄間質幹細胞に起こると考えて、GNAS変異FloxマウスとLepR-、Runx2-Creマウスを交配し、骨髄間質幹細胞にGNAS変異を発現させて各マウスの骨髄変化を検討した。その結果、2種のいずれのGNAS変異マウスもFD病変を再現するには至らないが、GNAS変異により骨髄内に骨形成を誘導し、破骨細胞が増加し、その周囲には細網線維の豊富な線維組織が形成されて、FD病変の特徴の一部を再現できることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の意義は、ヒトの線維性骨異形成症(FD)と全く同じGNAS変異によるシグナル伝達異常を、骨髄間質幹細胞に引き起こして、本来、骨の存在しない骨幹部骨髄に骨形成を誘導できたことにある。さらに、この骨形成に伴って、FD病変に特徴的な細網線維を豊富に含む線維組織形成や破骨細胞の増加が認められた。結果として、FDのモデルマウスには至らなかったが、ヒトFDと同じシグナル伝達異常で起こった遺伝子改変マウスの骨髄変化は、FDの病態解明に有効な手掛かりとなると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Fibrous dysplasia (FD) is a bone disease, in which abnormal signaling transductions by GNAS somatic mutations result in the formation of fibrous tissue with new bone in the bone marrow. It was postulated that in bone marrow-derived FD, the mutation occurs in bone marrow stromal cell (BMSC). To test this hypothesis, GNAS-mutant Flox mice were crossed with LepR-, Runx2-Cre mice, and the effects of GNAS-mutant BMSCs on the bone marrow of two GNAS-mutant mice were studied. The results demonstrated that the two GNAS-mutant mice did not recapture FD lesions. Nevertheless, the GNAS mutation induced bone formation in the bone marrow, increased the number of osteoclasts, and formed fibrous tissue rich in reticular fibers (mainly composed of type 3 collagen) around them, which reproduced some of the characteristics of FD lesions.

研究分野：口腔病理学

キーワード：機能亢進型GNAS変異 線維性骨異形成症 骨髄間質幹細胞 シグナル伝達異常 細網線維

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

機能亢進型 GNAS 変異疾患では、GNAS 遺伝子の体細胞変異により細胞内のシグナル伝達に異常が起こって、様々な臓器に病変を発症する。骨髄に発症する線維性骨異形成症(FD)は、GNAS 遺伝子変異が間葉系幹細胞に起こる骨疾患である。その治療は主に外科切除であるが、その適応外となる難治症例も含まれるため、内科的治療薬の開発が望まれる。

FD は骨髄に発症するため、骨髄間質幹細胞(BMSC)に GNAS 変異が起こり、GNAS 変異細胞が増生・分化して、異常な骨形成と線維成分が骨髄を置換して拡がると考えられる。しかし、FD を多発する McCune-Albright 症候群では、内・中・外の 3 胚葉由来の臓器に GNAS 変異による病変が生じるため、GNAS 変異は 3 胚葉に分かれる前の発生初期の内部細胞塊で起こると考えられ、GNAS 変異がどの分化段階で起こって FD が発生するのか、詳細はよく分かっていない。

2. 研究の目的

本研究では、間葉系幹細胞系譜に GNAS 変異を発現させることができる GNAS 変異 Flox マウスを用いて、GNAS 変異が間葉系幹細胞系譜のどの分化段階で起これば FD 病態を再現できるのか検討した。すなわち、FD は骨髄内に発生するため、BMSC に特異的に Cre を発現する LepR-Cre (阪大・長澤先生から供与)および Runx2-Cre (ウルム大・Tuckermann 先生から供与)マウスと GNAS 変異 Flox マウスとを交配させて、BMSC に GNAS 変異が発現する 2 種の遺伝子改変マウスを解析して、FD モデルマウスの作製を試みた。

3. 研究の方法

(1) GNAS 変異マウスの作製

GNAS 変異 Flox マウスを、LepR-Cre マウス (阪大・長澤先生から供与)および Runx2-Cre マウス (ウルム大・Tuckermann 先生から供与)の 2 種の Cre マウスと交配させて、目的とする BMSC に GNAS 変異が発現する LepR-Cre;GNAS 変異マウスと Runx2-Cre;GNAS 変異マウスの 2 種を作製した。また、2 種のマウスと ZsGreen レポーターマウスを交配させて、骨髄内で GNAS 変異を発現する細胞の局在分布を検討した。

(2) cAMP 測定

GNAS 変異細胞では、GNAS 変異遺伝子の翻訳産物である Gs 変異体が構成的に活性化して、細胞内 cAMP が過剰産生される。GNAS 変異が発現する BMSC の cAMP 濃度を対照群と比較検討した。まず、初代培養 BMSC を得るためには、生後 2 週齢の LepR-Cre;GNAS 変異マウス(生後 1 週齢)と Runx2-cre;GNAS 変異マウス(生後 2 週齢)と対照マウスの大腿骨と脛骨の骨幹端部を切断し、骨幹部の骨髄細胞を採取した。採取した骨髄細胞は、無血清 -Minimum Essential Medium(-MEM)に浸漬後にピペッティングし、セルストレイナーを通して濾過してプレートに播種し、2 週間培養した。これらの初代培養 BMSC を用いて、cAMP Parameter Assay kit により細胞内 cAMP 濃度を測定した。

(3) コロニー形成能と骨誘導アッセイ

LepR-Cre;GNAS 変異マウスでは、前述と同様に初代培養 BMSC を採取して、10cm 培養ディッシュに播種し、十分な細胞数に増加するまで培養した。この際、各マウス由来の細胞は個別の 10cm ディッシュに播種した。BMSC をトリプシン-EDTA 溶液で回収し、 5×10^3 、 1×10^4 、 3×10^4 細胞を 6 ウェルプレートに播種し、約 2 週間培養を行った。メタノール固定後にクリスタルバイオレット溶液にて染色後、コロニーがよく分離しているウェルを選択し、コロニー数を計測した(各コロニー 50 個以上の細胞数を含むものをカウントした)。

継代 2 代目の BMSC を 24 ウェルプレートに 10×10^4 細胞播種し、コンフルエントになるまで培養を継続した。その後、培地を骨分化誘導培地に変更し、9 日間培養し、通法に従いアルカリフォスファターゼおよびアリザリンレッド染色を行った。

(4) 各 GNAS 変異マウスの長管骨解析

・骨格構造解析

μ CT 撮影装置(R_mCT2Rigaku)を用いて、各 GNAS 変異マウスの大腿骨の解析を行った。画像解析は画像解析ソフトウェア ImageJ を用いて行った。

・形態学的解析

2 種の GNAS 変異マウスを 4%パラホルムアルデヒドにて一晩浸漬固定し、10%EDTA 溶液にて低温脱灰後、通法に従いパラフィン包埋した試料をヘマトキシリン-エオジン(HE)染色、鍍銀染色、免疫染色に用いた。免疫染色では、目的抗原を認識する 1 次抗体に対するビオチン標識 2 次抗体を滴下し、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンにて免疫反応部位を検出し、DAB 発色にて可視化した。蛍光染色では各蛍光標識 2 次抗体を滴下して、蛍光発色にて免疫反応部位

を可視化した。

(5) 空間トランスクリプトーム解析

生後 10 週齢の LepR-Cre;GNAS 変異マウスと対照マウスに麻酔下で大腿骨遠位部の骨髄除去による骨再生実験を行い、術後 10 日後の同部を採取した。通法で固定・脱灰・パラフィン包埋して薄切切片を作製し、空間トランスクリプトーム解析(10xGenomics Visium)に用いた。パラフィン切片は、大阪大学微生物病研究所ゲノム解析室においてシーケンシング、Space Ranger によるアウトプット作成を行った。Seurat(バージョン 4.2.1)を用いて、Space Ranger 解析にて取得した filtered_feature_bc_matrix により、まず検出遺伝子が 3 つ以下のスポットは解析から除去した。ノーマライゼーションおよびスケールリングを行ったデータを用い、主成分分析を実施後、UMAP によるクラスタリング状態の可視化を行った。細胞種のアノテーションはソフトウェア SCSA(バージョン 1.0)を用いて行った。各クラスタのマーカー遺伝子について pvalue,0.01 に該当する遺伝子を選択し、発現量が 2 倍もしくは 2 分の 1 に該当するものを選択し、組織のタイプを推定した。

(6) シングルセル解析

生後 2 週齢の Runx2-cre;GNAS 変異マウスの大腿骨と脛骨の骨幹部骨組織を 0.2% Collagenase と 0.2% Dispase 含有溶液で処理して、細胞を単離した。赤血球と白血球をセルソーターを用いて除去し、非血球系細胞のみを回収した。1 細胞に単離した細胞懸濁液は、10X Chromium システム (10x Genomics, Pleasanton, CA, USA) を用いて解析を行った。得られたシークエンスデータは、Cell Ranger 7.1.0 による一次解析と Seurat 4.2.1 による二次解析を行い、細胞クラスタリングと細胞クラスタ特異的発現変動遺伝子の抽出を行った。その後、主成分分析を実施後 PC20 にて次元削減を行い、UMAP による二次元プロットを行った。

4. 研究成果

(1) LepR-Cre;GNAS 変異マウス

大腿骨と脛骨から単離した初代培養 BMSC における細胞内 cAMP 濃度は野生型より有意に高値を示した。また、ZsGreen レポーターマウスとの交配により、骨髄内では endomucin 陽性の類洞周囲に局在する細胞に GNAS 変異が発現することを確認した。

生後 4, 12, 24 週齢の大腿骨骨幹部骨髄内に FD のような線維組織や新生骨形成はみられないが、骨髄内の骨周囲には大型の骨芽細胞が分布し、その周囲は好銀性を示す細網線維が取り囲んでいた。また、LepR 陽性細胞は、骨髄内の主な colony-forming unit fibroblast(CFU-F)の供給源であることから、LepR-Cre;GNAS 変異マウスの大腿骨から単離した BMSC を用いて CFU-F アッセイを行った。その結果、LepR-Cre;GNAS 変異マウスの大腿骨から単離した BMSC の colony forming 活性は、野生型と比較して 4 週齢で著しく高く、14 週齢でも有意に高い活性が示された。さらに、4, 14 週齢の BMSC の骨分化誘導培地による培養では、LepR-Cre;GNAS 変異マウスの BMSC は、野生型と比較して石灰化ノジュール形成能が高かった。

上記の BMSC の *in vitro* 実験結果を反映する事を期待して、*in vivo* で生後 10 週齢の大腿骨骨髄除去による骨再生実験を行ったところ、野生型と比較すると、LepR-Cre;GNAS 変異マウスでは、骨髄内の骨形成と線維組織形成が亢進した。また、新生骨周囲には野生型とは異なって骨表面には多数の破骨細胞が分布し、骨周囲の線維組織には細網線維(3型コラーゲン)が豊富に含まれており、*in situ* hybridization 解析にて骨芽細胞周囲の紡錘形細胞が細網線維となる 3 型コラーゲン mRNA を発現していることが分かった。骨再生部にみられる骨周囲の細網線維(reticular fiber)が豊富な線維組織や破骨細胞の増加は、FD 病変にみられる特徴である。空間トランスクリプトーム解析により、LepR-Cre;GNAS 変異マウスでは、骨芽細胞系譜クラスタ内に PTH1R 遺伝子を高発現する特徴的クラスタが骨髄内に分布することが分かった。

(2) Runx2-cre;GNAS 変異マウス

BMSC の中には、Runx2 を低発現し、幹細胞性が高く、骨芽細胞への分化に拘束されていない細胞がある。FD の病変細胞は Runx2 を高発現する事から、Runx2 を低発現する BMSC に GNAS 変異を発現させると FD 病変が発生するのではないかと仮定して作製した。

大腿骨と脛骨から単離した初代培養 BMSC と頭蓋骨から単離した骨芽細胞における細胞内 cAMP 濃度は野生型より有意に高値を示した。また、ZsGreen レポーターマウスとの交配により、骨髄内では endomucin 陽性の類洞周囲に局在する細胞に GNAS 変異が発現することを確認した。

生後 1, 4, 12, 24 週齢の大腿骨骨幹部骨髄内に骨形成がみられ、初期には未熟骨であるが、加齢に伴い成熟して層板骨になる。骨表面には大型の骨芽細胞が分布し、破骨細胞の増加が観察された。また、骨周囲には線維組織が形成され、好銀性を示す細網線維が豊富に分布していた。4 週齢の骨幹部(骨髄と皮質骨を含む)のシングルセル解析から、Runx2-Cre;GNAS 変異マウスの骨芽細胞系譜クラスタ内に骨膜に特徴的な遺伝子が高発現する特徴的クラスタが抽出された。骨髄内の骨周囲の細網線維が豊富な線維組織、破骨細胞の増加、骨膜に特徴的な遺伝子の高発現は、FD 病変にみられる特徴でもある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 豊澤悟、阿部真土、廣瀬勝俊、宇佐美悠、佐藤淳
2. 発表標題 線維性異形成症モデルの検討：骨髄間質幹細胞におけるGs 構成的活性化が骨形成に及ぼす影響
3. 学会等名 第111回日本病理学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hirose K, Naniwa K, Hyodo M, Usami Y, Abe M, Hata K, Inubushi T, Toyosawa S
2. 発表標題 Osteocytic constitutive activation of G s activity exerts an anabolic effect on the bone.
3. 学会等名 American Society for Bone and Mineral Research 2022 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 兵頭美穂、廣瀬勝俊、宇佐美悠、豊澤悟
2. 発表標題 GNAS遺伝子変異マウスを用いたFibrous dysplasia の病態解析
3. 学会等名 第33回日本臨床口腔病理学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 豊澤悟、阿部真土、廣瀬勝俊、兵頭美穂、宇佐美悠、佐藤淳
2. 発表標題 線維性異形成症モデルの検討：LepR + 骨髄間質細胞におけるGsa1pha構成的活性化が骨形成に及ぼす影響
3. 学会等名 第112回日本病理学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 兵頭美穂、廣瀬勝俊、宇佐美悠、豊澤悟
2. 発表標題 線維性異形成症モデルの検討：骨格系幹細胞におけるGs 構成的活性化が骨形成に及ぼす影響
3. 学会等名 第112回日本病理学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 兵頭美穂、廣瀬勝俊、宇佐美悠、豊澤悟
2. 発表標題 線維性骨異形成症の病態解明を目指したモデルマウスの作製
3. 学会等名 第77回日本口腔科学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 兵頭美穂、廣瀬勝俊、芝原巧、宇佐美悠、鶴澤成一、豊澤悟
2. 発表標題 線維性異形成症モデルマウス作製の試み
3. 学会等名 第34回日本臨床口腔病理学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 兵頭美穂、廣瀬勝俊、宇佐美悠、豊澤悟
2. 発表標題 線維性異形成症モデルマウスの検討：骨格系幹細胞におけるGs 構成的活性化が骨形成に及ぼす影響
3. 学会等名 第65回歯科基礎医学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 兵頭美穂, 廣瀬勝俊, 宇佐美悠, 芝原巧, 豊澤悟
2. 発表標題 線維性異形成症モデルの検討: 骨格系幹細胞におけるGs 構成的活性化が 骨形成に及ぼす影響
3. 学会等名 第113回日本病理学会総会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 廣瀬勝俊, 兵頭美穂, 宇佐美悠, 芝原巧, 豊澤悟
2. 発表標題 線維性異形成症モデルマウスの解析
3. 学会等名 第113回日本病理学会総会
4. 発表年 2024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	鶴澤 成一 (UZAWA NARIKAZU) (30345285)	大阪大学・大学院歯学研究所・教授 (14401)	
研究分担者	田熊 一敞 (TAKUMA KAZUHIRO) (90289025)	大阪大学・大学院歯学研究所・教授 (14401)	
研究分担者	松井 崇浩 (MATSUI TAKAHIRO) (50747037)	大阪大学・大学院医学系研究科・准教授 (14401)	

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	阿部 真土 (ABE MAKOTO) (40448105)	大阪大学・大学院歯学研究科・講師 (14401)	
研究分担者	廣瀬 由美子(堀由美子) (HIROSE UMIKO) (60528785)	独立行政法人国立病院機構大阪医療センター(臨床研究センター)・その他部局等・研究員 (84414)	
研究分担者	宇佐美 悠 (USAMI YU) (80444579)	大阪大学・大学院歯学研究科・講師 (14401)	
研究分担者	廣瀬 勝俊 (HIROSE KATSUTOSHI) (00824898)	大阪大学・大学院歯学研究科・助教 (14401)	

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		
	ドイツ	Ulm大学	Comparative Molecular Endocrinology研究所