

令和 6 年 9 月 22 日現在

機関番号：32650

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H03146

研究課題名(和文)機能ゲノミクス解析とハイスループット解析を用いた線維性異形成症新規治療法開発

研究課題名(英文)Development of a new treatment for fibrodysplasia using active genomics and high-throughput analysis

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) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：MacCuneAlbright症候群特異的iPS(MA)のR201H変異を人工的に導入したiPS細胞を作成した。まずR201部分に隣接するかつPAM配列をもつガイドRNAとして特異性の高い部位を選定する。EGFP配列とpuromycin耐性配列をつなげたドナーDNAを作成し201番アミノ酸に相当するエクソンの近傍のイントロンにCas9切断部位を決定し、その部位のPAM配列をもつガイドRNAを作成し、全てをelectroporationによりiPS細胞(Nips)に導入し、puromycinで選別し、その後生存した細胞をFACSにてEGF陽性細胞のみを選別し、MAiPS細胞を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

GNAS変異を原因とする多様な腫瘍性病変の病態機序解明の重要なツールとなる。本研究で利用した遺伝子編集技術は今後、同様の手法を応用した疾患特異的iPS細胞作製のあらたな展開を可能にする。GNASはGタンパク系受容体のシグナル伝達において主要なメカニズムを制御する重要な機構であり、多様な腫瘍発生原因であることが知られ、良性腫瘍、膵悪性腫瘍への進展が指摘される。膵嚢胞病変であるIPMNなどはGNAS変異の存在が示唆されており、病態不明良性腫瘍発生病態の解明の端緒となりうる。本論文はさまざまな病態解明にiPS細胞の利用が非常に有用であり汎用性を著しく向上させた点で医学発展に非常に貢献した。

研究成果の概要(英文)：We generated iPS cells artificially transfected with the R201H mutation of MacCuneAlbright syndrome-specific iPS (MA). First, a highly specific site was selected as a guide RNA adjacent to the R201 portion and containing a PAM sequence. The guide RNAs were all introduced into iPS cells (Nips) by electroporation, sorted by puromycin, and then MAiPS cells were established by sorting only EGF-positive cells by FACS.

研究分野：細胞生物学

キーワード：iPS細胞 GNAS Gタンパク質 悪性腫瘍

1. 研究開始当初の背景

GNAS 遺伝子は、Gs サブユニットをコードしており、この遺伝子の R201H/C 変異は、Gs の活性を調節する GTPase 活性を失わせます。その結果、Gs が持続的に活性化され、アデニル酸シクラーゼを介した cAMP の過剰産生が引き起こされる。cAMP シグナル伝達の異常な増強は、細胞の増殖や生存を促進し、腫瘍の発生や進行に寄与する。そのため GNAS の R201H および R201C 変異は腫瘍発生、進行に重要な役割を担うと想定され、ドライバー遺伝子とみなされている。これらの変異は、特に以下のような腫瘍に存在しそれら腫瘍の発生や進行に寄与するドライバー遺伝子とみなされている

- **McCune-Albright 症候群**: GNAS のモザイク変異として、R201H/C 変異が見られることが多い。GNAS 変異に関連する希少遺伝性疾患の中でも最もよく特徴付けられた疾患の一つであり、当初は骨の多骨性線維性異形成 (FD)、ゴナドトロピン非依存性の思春期早発症、およびカフェ・オ・レ色の皮膚色素沈着を三徴とする疾患として特徴づけられた。しかし、MAS 患者では親の対立遺伝子の偏りはないようである。
- **下垂体腺腫**: 特に成長ホルモン分泌腺腫で頻繁に見られる。
- **甲状腺腫瘍**: 甲状腺の機能亢進を伴う腫瘍で見られることがある。
- **胆管腫瘍 (胆道癌)**: R201H/C 変異が見られることがある。
- **低悪性度良性腫瘍**

IPMN、幽門腺腺腫、オキシシンチン腺腫、胃ヘテロトピア、胃ムチン細胞異形成
これらのことから、GNAS R201H/C 変異はドライバー遺伝子であり、腫瘍の形成や進行に直接関与している。非常に広範な組織に種々の異常を発生させる点や、特に良性腫瘍でありながら悪性腫瘍の発生母地となるような IPMN などの例は腫瘍発生機序の解明や新たな診断法あるいは治療法の開発にとり重要な糸口となると想定される。

しかし 良性腫瘍から細胞株はなかなか確立が困難である点、悪性腫瘍からのがん細胞株が確立されていない点は本疾患群研究を著しく困難にしている。したがって 本遺伝子変異をもつ iPS 細胞を開発することにより 広範な疾患研究への応用が可能であり GNAS 変異原性疾患群の解明に大きな利点を提供すると想定される。

GNAS はまた、親の特定の対立遺伝子に由来するコード領域と非コード領域の転写産物も産生する。GNAS の転写およびスプライシングプロファイルは非常に複雑である。転写開始と RNA プロセシングの過程で、NESP55、XL_s、A/B はそれぞれ独自のプロモーターを用いて自身のエクソン 1 から転写を開始し、転写物はさらにエクソン 2-13 にスプライシングされる。Gs (G タンパク質 サブユニット) は、多くの組織で二倍体として発現しています。Gs は遺伝子 GNAS によってコードされ、G タンパク質共役受容体 (GPCR) を介したシグナル伝達に関与しています。特に、Gs は細胞内でアデニル酸シクラーゼを活性化し、cAMP の産生を促進する重要な役割を担います。ただし、Gs の発現に関してはインプリンティング (ゲノム刷り込み) という現象が一部の組織で見られます。Gs が特定の組織で親特異的に発現する場合があります。通常は母系のアリルから発現することが一般的です。例として、脳のいくつかの領域や腎臓などの組織では、インプリンティングによる遺伝子発現が確認されています。したがって Gs はほとんどの組織で二倍体として発現しますが、一部の組織ではインプリンティングによって発現が母系または父系のアリルに偏ることがあります。すなわち GNAS 遺伝子座には複数の異なるメチル化領域 (DMR) が存在し、異なるプロモーターを含んでいる。メチル化された対立遺伝子では GNAS プロモーターがサイレンシングされるため、XL_s、A/B、GNAS-AS1 転写産物は父系でのみ発現するが、NESP55 転写産物は母系でのみ発現する。しかし、このエピジェネティックな事象が、GNAS 突然変異の親-起源特異的な表現型の変化に大きく寄与していることは明らかである。

2. 研究の目的

本研究の目的は、GNAS R201H 関連疾患のモデルを得るために、GNAS R201H 変異 (GNAS R201H/+) iPS 細胞を樹立することである。この目的のために、我々は Cas9n を用いて GNAS R201H/+ iPSC を作製した。 Guanine nucleotide binding protein 1 (GNAS) 遺伝子のミスセンス変異 (典型的には Arg201Cys または Arg201His (R201H/R201C)) は、いくつかの疾患の原因となる Gs -サイクリック AMP (cAMP) シグナル伝達経路の構成的活性化につながる。しかし、GNAS の生殖細胞系列変異は、致死性のためか、これまで同定され

ておらず、強固なヒト細胞モデルも作製されていない。そこで本研究の目的は、これらの疾患のモデルとして、GNAS 変異を持つ疾患特異的な人工多能性幹細胞を作製することである。

3. 研究の方法

従来の CRISPR/Cas9 法よりもオフターゲット効果の低い CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) ニッカーゼ法を用いて GNAS に変異を導入し、疾患特異的な人工多能性幹細胞を作製した。GNAS の R201H 変異を含むターゲットベクターを設計し、これをエレクトロポレーション法によりヒト対照人工多能性幹細胞 (Nips-B2) にトランスフェクトした。

下図にドナーベクター作成の概要を示す。

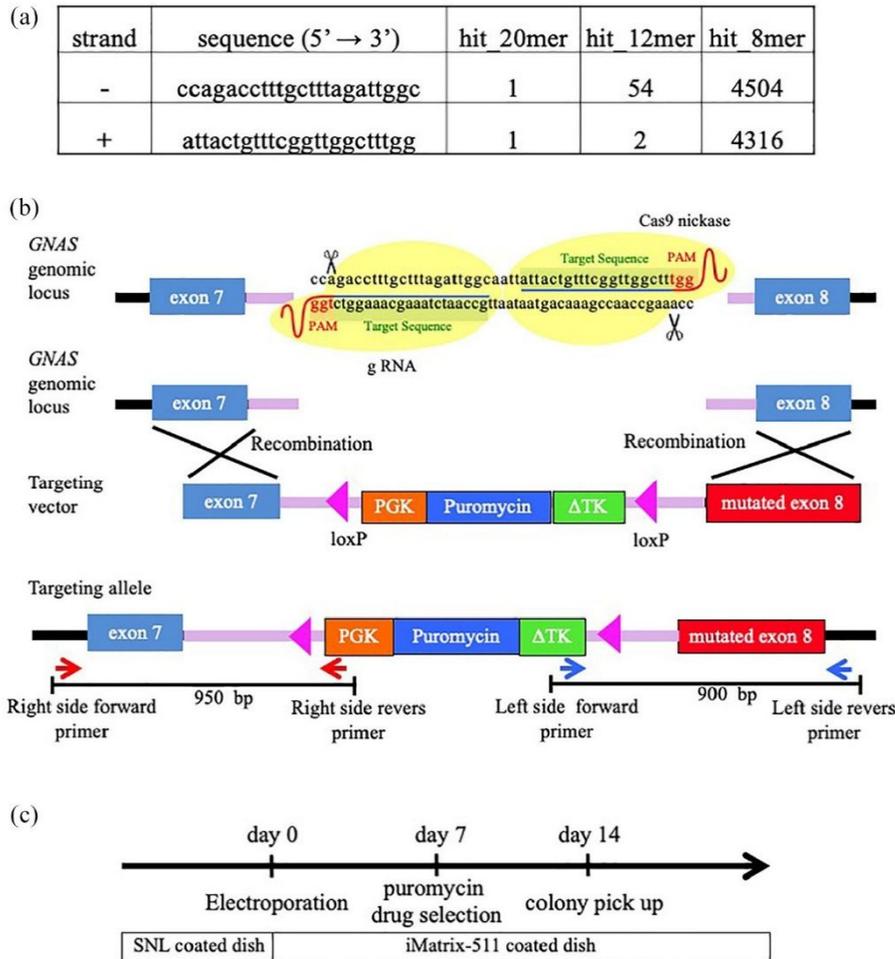


図 ドナーベクター作成概要

4. 研究成果

GNASR201H 変異 (GNASR201H/+) 誘導多能性幹細胞の樹立を確認した。変異が cAMP 産生に及ぼす影響を解析し、さらに管腔上皮構造の免疫組織化学的解析のために奇形腫を作製した。GNAS 変異を有する人工多能性幹細胞は、細胞内 cAMP レベルが有意に高く、副甲状腺ホルモンや副腎皮質刺激ホルモンによるホルモン刺激によっても、その上昇状態が長時間維持された。免疫組織化学的解析から、サイトケラチン 18 (CK18) 陽性上皮細胞では、MUC1、2、MUC5AC を含むいくつかのムチンが発現していることが明らかになった。しかし、変異した人工多能性幹細胞由来の奇形腫組織では、CK18 陽性細胞はほとんど見られず、変異した上皮細胞では MUCINs の発現が減少していた。CDX2 の発現に差はな

かったが、変異上皮細胞は CEA と CA19-9 の発現が陽性であった。GNASR201H 変異人工多能性幹細胞と GNASR201H 変異上皮細胞は、異なる表現型と分化特性を有する。我々は、cAMP 産生が増加した GNASR201H 変異ヒト人工多能性幹細胞の樹立に成功した。人工多能性幹細胞の分化能を考慮すると、これらの細胞は GNAS 変異疾患の病態メカニズム解明のモデルとして有用である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 6件）

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Kimura M, Saito A, Onodera S, Nakamura T, Suematsu M, Shintani S, Azuma T. | 4. 巻 55(1) |
| 2. 論文標題 The concurrent stimulation of Wnt and FGF8 signaling induce differentiation of dental mesenchymal cells into odontoblast-like cells. | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Med Mol Morphol. | 6. 最初と最後の頁 8-19 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00795-021-00297-3. | 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 Kato H, Watanabe K, Saito A, Onodera S, Azuma T, Takano M. | 4. 巻 30 |
| 2. 論文標題 Bone regeneration of induced pluripotent stem cells derived from peripheral blood cells in collagen sponge scaffolds. | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 J Appl Oral Sci. | 6. 最初と最後の頁 e20210491 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1590/1678-7757-2021-0491. | 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 Aoki H, Suzuki E, Nakamura T, Onodera S, Saito A, Ohtaka M, Nakanishi M, Nishimura K, Saito A, Azuma T. | 4. 巻 55(3) |
| 2. 論文標題 Induced pluripotent stem cells from homozygous Runx2-deficient mice show poor response to vitamin D during osteoblastic differentiation. | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Med Mol Morphol. | 6. 最初と最後の頁 174-186 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00795-022-00317-w. | 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 Takada K, Odashima A, Onodera S, Saito A, Aida N, Furusawa M, Azuma T. | 4. 巻 55(3) |
| 2. 論文標題 The effect of BMP4, FGF8 and WNT3a on mouse iPS cells differentiating to odontoblast-like cells. | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Med Mol Morphol. | 6. 最初と最後の頁 199-209. |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00795-022-00318-9. | 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 Furukawa Y, Odashima A, Hoshino T, Onodera S, Saito A, Ichinohe T, Azuma T. | 4. 巻 63(2) |
| 2. 論文標題 Effects of KnockOut Serum Replacement on Differentiation of Mouse-Induced Pluripotent Stem Cells into Odontoblasts. | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Bull Tokyo Dent Coll. | 6. 最初と最後の頁 75-83 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2209/tdpublication.2021-0042. | 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 Aida N, Ohno T, Azuma T. | 4. 巻 23(19) |
| 2. 論文標題 Progress and Current Status in Hajdu-Cheney Syndrome with Focus on Novel Genetic Research. | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Int J Mol Sci. | 6. 最初と最後の頁 11374 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms231911374. | 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 ISLAM SHAJEDUL, KITAGAWA TAKAO, AZUMA TOSHIFUMI, KURAMITSU YASUHIRO | 4. 巻 41 |
| 2. 論文標題 The Expression Levels of Vinculin in Pancreatic Cancer Tissues Significantly Correlates With Patient Survival | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Anticancer Research | 6. 最初と最後の頁 4979 ~ 4984 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancerres.15311 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|-----------------|
| 1. 著者名 Matsunaga Mayumi, Kimura Maki, Ouchi Takehito, Nakamura Takashi, Ohyama Sadao, Ando Masayuki, Nomura Sachie, Azuma Toshifumi, Ichinohe Tatsuya, Shibukawa Yoshiyuki | 4. 巻 12 |
| 2. 論文標題 Mechanical Stimulation-Induced Calcium Signaling by Piezo1 Channel Activation in Human Odontoblast Reduces Dentin Mineralization | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Frontiers in Physiology | 6. 最初と最後の頁 0 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fphys.2021.704518 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|-----------------|
| 1. 著者名 Onodera Shoko, Morita Nana, Nakamura Yuriko, Takahashi Shinichi, Hashimoto Kazuhiko, Nomura Takeshi, Katakura Akira, Kosaki Kenjiro, Azuma Toshifumi | 4. 巻 16 |
| 2. 論文標題 Novel alterations in IFT172 and KIFAP3 may induce basal cell carcinoma | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Orphanet Journal of Rare Diseases | 6. 最初と最後の頁 0 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13023-021-02033-7 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|--------------------|
| 1. 著者名 Kimura Motoyoshi, Saito Akiko, Onodera Shoko, Nakamura Takashi, Suematsu Makoto, Shintani Seikou, Azuma Toshifumi | 4. 巻 55 |
| 2. 論文標題 The concurrent stimulation of Wnt and FGF8 signaling induce differentiation of dental mesenchymal cells into odontoblast-like cells | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Medical Molecular Morphology | 6. 最初と最後の頁 8~19 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00795-021-00297-3 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|-----------------|
| 1. 著者名 Nakamura Y., Onodera S., Takano M., Katakura A., Nomura T., Azuma T. | 4. 巻 0 |
| 2. 論文標題 Development of a targeted gene panel for the diagnosis of Gorlin syndrome | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery | 6. 最初と最後の頁 0 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ijom.2022.03.054 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|-----------------|
| 1. 著者名 Aoki Hideto, Suzuki Eiichi, Nakamura Takashi, Onodera Shoko, Saito Akiko, Ohtaka Manami, Nakanishi Mahito, Nishimura Ken, Saito Atsushi, Azuma Toshifumi | 4. 巻 0 |
| 2. 論文標題 Induced pluripotent stem cells from homozygous Runx2-deficient mice show poor response to vitamin D during osteoblastic differentiation | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Medical Molecular Morphology | 6. 最初と最後の頁 0 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00795-022-00317-w | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 東 俊文、齋藤暁子、中村貴 |
| 2. 発表標題 骨芽細胞Runx2 は核膜タンパク質発現制御を通じて核形態および骨芽細胞分化を制御する。 |
| 3. 学会等名 第94回日本生化学会大会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 東 俊文、齋藤暁子、中村貴 |
| 2. 発表標題 『核とミトコンドリア研究』から見えてきた疾患病態の先端分子生物学) Runx2 は LINCタンパク質発現調節により骨芽細胞分化を制御する。 |
| 3. 学会等名 第44回 日本分子生物学会年会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 奥平 貴人, 中村 貴 2, 齋藤 暁子 2, 山口 朗 1, 高野 正行 3, 柴原 孝彦 3, 東 俊文 1.2 |
| 2. 発表標題 骨細胞のLamin Aは骨リモデリングを制御する。 |
| 3. 学会等名 第53回 日本臨床分子形態学会総会・学術集会, |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 中村ゆり子, 小野寺晶子, 秀島 樹, 森田奈那, 高野正行, 片倉 朗, 東 俊文, 野村武史 |
| 2. 発表標題 Gorlin症候群診断遺伝子パネル開発とその信頼性の検証 |
| 3. 学会等名 第65回日本口腔外科学会総会・学術大会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 秀島 樹, 中村ゆり子, 小野寺晶子, 森田奈那, 加藤禎彬, 吉田秀児, 野村武史, 高野正行, 東俊文, 片倉 朗. |
| 2. 発表標題 Gorlin症候群診断遺伝子パネルを用いた歯原性角化嚢胞の解析 |
| 3. 学会等名 第66回日本口腔外科学会総会・学術大会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 森田奈那, 小野寺晶子, 中村ゆり子, 長谷川大悟, 渡邊豪士, 秀島樹, 高橋慎一, 野村武史, 松浦信幸, 東俊文 |
| 2. 発表標題 Gorlin症候群患者由来iPS細胞の上皮細胞分化誘導と紫外線照射時の反応 |
| 3. 学会等名 第66回日本口腔外科学会総会・学術大会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 森田奈那, 小野寺晶子, 中村ゆり子, 長谷川大悟, 渡邊豪士, 秀島樹, 高橋慎一, 野村武史, 松浦信幸, 東俊文. |
| 2. 発表標題 Gorlin症候群患者由来iPS細胞の上皮細胞分化誘導と紫外線照射時の反応 |
| 3. 学会等名 第53回日本臨床分子形態学会総会・学術集会 |
| 4. 発表年 2021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 | 間 奈津子 (AIDA NATUSKO) (90615379) | 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 | 齋藤 暁子 (SAITO AKIKO) (90722835) | 東京歯科大学・歯学部・助教 (32650) | |
| 研究分担者 | 長山 和亮 (NAGAYAMA KAZUAKI) (10359763) | 茨城大学・理工学研究科（工学野）・教授 (12101) | |
| 研究分担者 | 村川 泰裕 (MURAKAWA YASUHIRO) (50765469) | 国立研究開発法人理化学研究所・生命医科学研究センター・ チームリーダー (82401) | |
| 研究分担者 | 野村 武史 (NOMURA TAKESHI) (60328268) | 東京歯科大学・歯学部・教授 (32650) | |
| 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 | 溝口 利英 (MIZOGUCHI TOSHIHIDE) (90329475) | 東京歯科大学・歯学部・教授 (32650) | |
| 研究分担者 | 片倉 朗 (KATAKURA AKIRA) (10233743) | 東京歯科大学・歯学部・教授 (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 |
|---------|---------|
|---------|---------|