

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月30日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659877

研究課題名（和文）

GNAS1 遺伝子変異細胞株の同所性移植による線維性骨異形成症モデルの作製

研究課題名（英文）

Trial research of fibrous dysplasia model transplanted with GNAS1 mutant cells

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

研究成果の概要（和文）：ヒトの正常 GNAS1 遺伝子の翻訳産物 Gs $\alpha$  のコドン 201 番の Arg が His に置換する変異を導入し、線維性骨異形成症 (FD) の原因となる変異 GNAS1 遺伝子 (R201H) を作製した。次に、この変異 GNAS1 遺伝子 (R201H) を培養細胞に過剰発現させるため、R201H を挿入したレンチウイルスベクターを作製し、C57BL/6 マウスの骨髄間質細胞に R201H を過剰発現させた細胞を作製した。現在、R201H 過剰発現細胞の増殖・分化を検討中で、将来、骨髄への同所性移植によるマウスモデルを作製予定である。また、FD の内科的治療に向けて、他の類似骨病変と鑑別できる高精度遺伝子診断法を検討した。その結果、従来より、PNA プローブを用いたリアルタイム PCR 法や pyrosequencing 法が有効であることが分かった。

研究成果の概要（英文）：To replacement Arg201 with His in the Gsa, we produced mutated GNAS1 gene (R201H) replacing with A instead of G of the human GNAS1 gene, which causes human fibrous dysplasia of bone (FD). To stably transfer the R201H into cultured cells, we constructed a lentiviral vector expressing R201H, and used it to transduce C57BL/6 mice-derived marrow stromal cells. We are now elucidating the cell proliferation and differentiation of the R201H-expressing cells and are going to make a mouse model by the orthotopic transplant of the transduced cells. In addition, we studied the method of highly precise genetic tests that we could distinguish it from other similar bone lesions. As a result, the real-time PCR using PNA probe and pyrosequencing method were more effective, compared to conventional PCR-restriction fragment length polymorphism.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：病態科学系歯学・歯科放射線学

キーワード：線維性骨異形成症、GNAS1 遺伝子、骨髄間質細胞、遺伝子診断

### 1. 研究開始当初の背景

線維性骨異形成症 (FD) は、全身骨格の中で顎骨に高い頻度で発症する腫瘍様骨病変であり、骨変形や病的骨折を引き起こす。

FD の原因は GNAS1 遺伝子の体細胞変異であり、その翻訳産物である促進性 G 蛋白質  $\alpha$  サブユニット (Gs $\alpha$ ) の恒常的活性化により細胞内 cAMP が過剰となり、下流のシグナル伝達を誘導して、FD の病態効果が現れ

る。この発症機序を基にして世界中で研究が行われており、我々も病理組織学的に鑑別できない類似顎骨病変から FD を鑑別する遺伝子診断法を報告した。しかし、FD 病態には不明な点も多く、骨格成長後の病変増殖は静止傾向にある事や、低リン血症の併発、悪性化は治療に影響する病態現象である。また、FD 治療には、外科的切除が実施されているが、国外ではビスフォスフォネート (BP) 投薬も試みられている。

## 2. 研究の目的

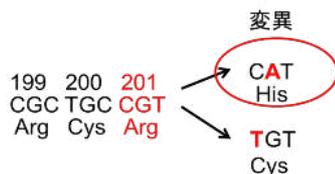
変異 GNAS1 遺伝子を用いて、ヒト FD 細胞と同じシグナル伝達を恒常的に誘導した人工的 FD 細胞を作製して、マウスの顎骨骨髄に移植してマウス FD モデルを作製する。同時に、ヒト FD を他の骨疾患と鑑別できる高精度遺伝子診断方法を確立する。これらの両研究により、ヒト FD の内科的治療法開発の可能性を検討する。

## 3. 研究の方法

### ① 変異 GNAS1 遺伝子の作製

FD では、GNAS1 遺伝子の翻訳産物 Gs $\alpha$  のコドン 201 に変異が起こり、下図のように、Arg が His や Cys へアミノ酸変異を起こす。そこで、GNAS1 変異遺伝子を用いて人工的な FD 細胞株を作製するため、ベクターに挿入したヒトの正常 GNAS1 遺伝子を、その翻訳産物 Gs $\alpha$  のコドン 201 番の Arg が His に置換する変異を導入し、変異 GNAS1 遺伝子を作製する。

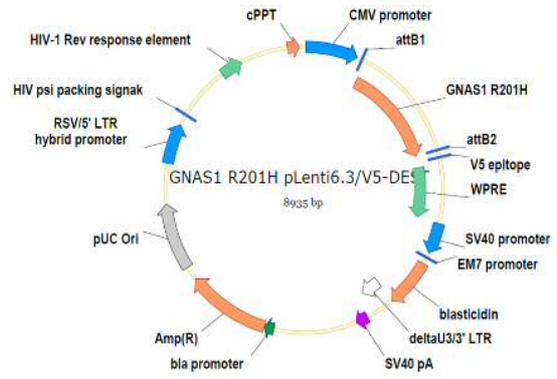
<GNAS1 遺伝子のコドン 201 番の変異>



### ② 変異 GNAS1 遺伝子過剰発現ベクター作製

上記の His 置換の変異 GNAS1 遺伝子を細胞に過剰発現させるために遺伝子組換えして、変異 GNAS1 遺伝子を過剰発現するレンチウイルスベクターを作製する。

<変異 GNAS1 遺伝子過剰発現ベクター>



### ③ 変異 GNAS1 遺伝子過剰発現細胞の検討

#### i) MC3T3-E1 細胞株への感染

GNAS1 の R201H 変異体を含むレンチウイルスのタイターは、 $1.30 \times 10^4$ , GFP を含むレンチウイルスのタイターは、 $9.18 \times 10^4$ 。これらのウイルス液を、MOI=5 となるように調整し、MC3T3-E1 細胞株へ感染させた。

#### ii) 変異 GNAS1 遺伝子を過剰発現した MC3T3-E1 細胞株の増殖・分化の検討

細胞密度  $1 \times 10^5$  で 24well plate に細胞を播種。増殖培地と石灰化培地で培養する。細胞増殖能は、培養 3, 5 日後に、Cell counting Kit-8 液 (同仁化学研究所) を  $10 \mu\text{L}$  ずつ添加し、マイクロプレートリーダーを用いて、細胞数の評価を行う。石灰化能は、1, 2, 3, 4 週間培養し、アリザリン染色を行って、対照群と比較検討する。

#### iii) C57BL/6 マウスの骨髄間質細胞への感染

GNAS1 の R201H 変異体を含むレンチウイルスのタイターは、 $1.30 \times 10^4$ , GFP を含むレンチウイルスのタイターは、 $9.18 \times 10^4$ 。これらのウイルス液を、MOI=5 となるように調整し、骨髄間質細胞へ感染させる。

#### iv) 変異 GNAS1 遺伝子を過剰発現した骨髄間質細胞の cAMP 測定方法

細胞密度  $1 \times 10^5$  で 24well plate に細胞を播種する。翌日、培地交換を行い実験開始。2 日後と 6 日後に培養上清と細胞抽出液を回収する。Enzo Life Sciences 社の cAMP Complete ELISA kit (ADI-900-163) を使用

して cAMP の値を測定し、対照群と比較する。

v) 変異 GNAS1 遺伝子を過剰発現した骨髄間質細胞の増殖・分化の検討

細胞密度  $1 \times 10^5$  で 24well plate に細胞を播種。増殖培地と石灰化培地で培養した。細胞増殖能は、培養 3, 5 日後に、Cell counting Kit-8 液 (同仁化学研究所) を  $10 \mu\text{L}$  ずつ添加し、マイクロプレートリーダーを用いて、細胞数の評価を行う。石灰化能は、1, 2, 3, 4 週間培養し、アリザリン染色を行って、対照群と比較検討する。

④ 高精度 GNAS1 遺伝子変異検出方法

大阪大学歯学研究科倫理委員会承認 (H22-E20) の下に外科的切除組織から抽出した DNA サンプルを解析する。

i) リアルタイム PCR を用いた高精度 GNAS1 遺伝子変異検出法

$10\text{ng}/\mu\text{L}$  濃度で  $2 \mu\text{L}$  に調整した DNA サンプルを用いる。正常の GNAS1 遺伝子の増幅をブロックし、変異 GNAS1 遺伝子が増幅するよう PNA プローブを用いて、リアルタイム PCR にて変異 GNAS1 遺伝子を増幅する TaqMan® Mutation Detection Assays を行う。

ii) Pyrosequencing 法を用いた高精度 GNAS1 遺伝子変異検出法

$20\text{ng}/\mu\text{L}$  濃度で  $50 \mu\text{L}$  に調整した DNA サンプルを Pyrosequencing にて解析する。

4. 研究成果

① 変異 GNAS1 遺伝子過剰発現細胞の検討

i) 変異 GNAS1 遺伝子を過剰発現した MC3T3-E1 細胞の増殖・分化について

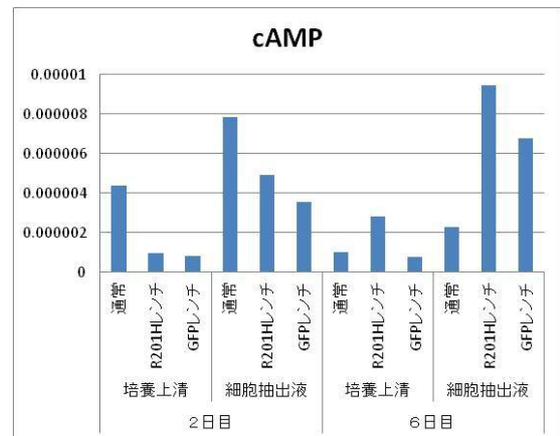
変異 GNAS1 遺伝子の MC3T3-E1 細胞への感染を GFP 発色で確認したが、細胞増殖や石灰化能等の変化は認められなかった。

ii) 変異 GNAS1 遺伝子を過剰発現した骨髄間質細胞における cAMP 測定

変異 GNAS1 遺伝子の骨髄間質細胞への感染を GFP 発色で確認し、変異 GNAS1 遺伝子を過剰発現した骨髄間質細胞を培養して 3 日

後に cAMP を測定すると、下図のように、レンチ非感染細胞より変異 GNAS1 遺伝子過剰発現細胞が cAMP 値の低下を示した。5 日後に cAMP を測定すると、レンチ非感染細胞より変異 GNAS1 遺伝子過剰発現細胞の cAMP 値が上昇したが、GFP 過剰発現細胞でも上昇が認められ、変異 GNAS1 遺伝子過剰発現による cAMP 値上昇であることの確証が得られなかった。今後、レンチウイルスのタイターの再検討を行い、再実験を行う。

変異 GNAS1 遺伝子を過剰発現した骨髄間質細胞の cAMP 値 (cAMP/細胞数)



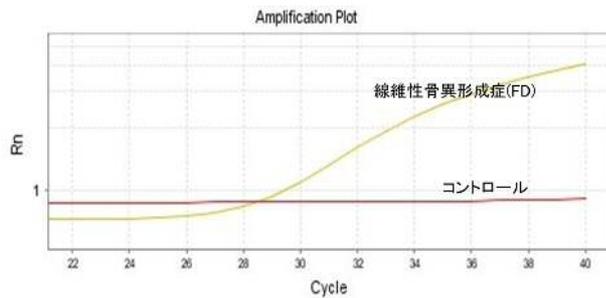
ii) 変異 GNAS1 遺伝子を過剰発現した骨髄間質細胞における増殖・分化の検討

同時に培養した変異 GNAS1 遺伝子を過剰発現した骨髄間質細胞では 1 週間後以降に培養細胞の剥離傾向が見られ、増殖・分化の検討はできなかったため、再実験を行う。

② 高精度 GNAS1 遺伝子変異検出

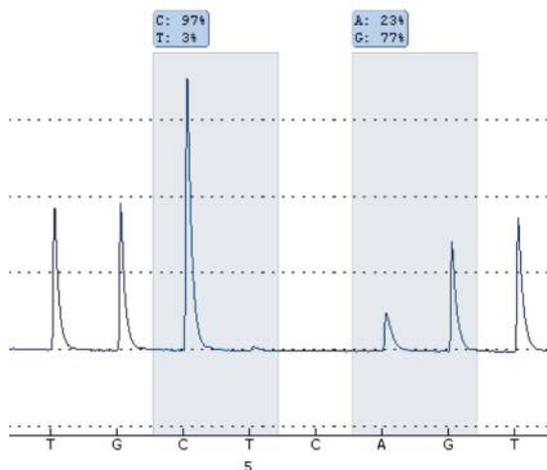
i) リアルタイム PCR を用いた高精度 GNAS1 遺伝子変異検出法

従来の nested-PCR を用いた PCR 制限酵素断片長多型解析法より感度は低いが、高い精度が得られ、実用化できると考えられた (次頁図)。



ii) Pyrosequencing 法を用いた高精度 GNAS1 遺伝子変異検出法

下図のように、GNAS1 遺伝子の翻訳産物 Gs $\alpha$  のコドン 201 の変異の A/G 割合が、変異遺伝子 A:23%、正常遺伝子:77%と測定でき、再現性も高かった。また、従来 of nested-PCR を用いた PCR 制限酵素断片長多型解析法より感度はかなり低く、DNA 量が多量に必要であるが、高い測定精度を有することが分かった。



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① 豊澤 悟、村上秀明、宇佐美 悠、顎骨の線維性骨性病変 - 歯原性腫瘍との鑑別点を含めて -、病理と臨床、査読無、31:527-534、2013.
- ② Cantley L, Saunders C, Guttenberg M, Candela ME, Ohta Y, Yasuhara R, Kondo N, Sgariglia F, Asai S, Zhang X, Qin L, Hecht JT, Chen D, Yamamoto M, Toyosawa S, Dormans JP, Esko JD, Yamaguchi Y, Iwamoto M, Pacifici M, Enomoto-Iwamoto M., Loss of  $\beta$ -catenin induces multifocal periosteal

chondroma-like masses in mice., Am J Pathol、査読有、182:917-27、2013.

[学会発表] (計 5 件)

- ① 豊澤 悟、病理学の観点からみた BRONJ の病態、第 22 回日本歯科医学会総会、11 月 9 日～11 日、2012.
- ② 豊澤 悟、病理学の観点からみた BRONJ の病態、日本歯科放射線学会 第 17 回臨床画像大会、11 月 9 日～11 日、2012.
- ③ 佐藤 淳、岸野万伸、宇佐美 悠、小川裕三、豊澤 悟、下顎骨腫瘍の一例、第 23 回日本臨床口腔病理学会総会、東京医科歯科大学 M&D タワー、8 月 29 日～31 日、2012.
- ④ 豊澤 悟、ビスフォスフォネート関連顎骨壊死の病態を考える、第 23 回日本臨床口腔病理学会総会、東京医科歯科大学 M&D タワー、8 月 29 日～31 日、2012.
- ⑤ 豊澤 悟、Fibrous dysplasia 再訪、第 12 回リウマチ病セミナー、大阪国際会議場、12 月 17 日、2011.

[図書] (計 1 件)

- ① 豊澤 悟、岸野万伸、佐藤 淳、他、永井書店、リウマチ病セミナー XX III : Fibrous dysplasia 再訪、49-56、2012.

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

佐伯 万騎男 (SAEKI MAKIO)  
大阪大学・大学院歯学研究科・講師  
研究者番号：30273692

佐藤 淳 (SATO JUN)  
大阪大学・大学院歯学研究科・講師  
研究者番号：70335660

宇佐美 悠 (USAMI YU)  
大阪大学・歯学部附属病院・助教  
研究者番号：804444579