

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 20 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670856

研究課題名(和文) 予防、治療を目指したヒト疾患特異的iPS細胞を用いた骨系統疾患解析に関する研究

研究課題名(英文) Bone disease analysis using human disease-specific iPS cells.

## 研究代表者

別所 和久 (Bessho, Kazuhisa)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：90229138

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)： 歯科口腔外科領域の代表的な骨系統疾患である鎖骨頭蓋異形成症、線維性異形成症のヒト疾患特異的iPSを用いた病態解析を行う。疾患を制御する薬剤候補物質を探索することで、予防・治療へのアプローチが確立され、罹患者に提供することを目指す。

線維性異形成症の患者から多数のクローンのiPS細胞の株を樹立した。研究に必要な変異のないコントロール用のiPS細胞は多数確保することはできたが、変異のある疾患特異的iPS細胞の樹立ができていない。

研究成果の概要(英文)： We will investigate pathological analysis using human FD (Fibrous Dysplasia; FD) cells which is the representative for preparation of bone disease.

We collected FD lesion from FD patients and we cultured human FD cells. Although we could get wild-type iPS cells, we couldn't establish human iPS cells from the FD cells mutation.

研究分野：医歯薬学

キーワード：疾患特異的iPS細胞 GNAS遺伝子変異 線維性異形成症

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 歯科口腔外科領域の代表的な骨系統疾患である鎖骨頭蓋異形成症 (Cleidocranial Dysplasia; CCD) 線維性異形成症 (Fibrous Dysplasia; FD) のヒト疾患特異的 iPS を用いた病態解析を行う。

(2) 罹患患者の体細胞より iPS 細胞を樹立し、in vitro において病態をモデル化した系を構築する。

(3) 病因の形成機序や病態の進行のメカニズム解明を図り、また、疾患を制御する薬剤候補物質を探索することで、予防・治療へのアプローチが確立され、罹患患者に提供することを目指す。

## 2. 研究の目的

(1) CCD は常染色体優性遺伝形式をとり、その原因遺伝子は、RUNX2 で、複数の遺伝子変異が同定報告されている。Runx2 は骨芽細胞の分化を調節する転写因子で、runx2 遺伝子欠損ヘテロマウスが、鎖骨の低形成、頭蓋縫合部の閉鎖遅延等 CCD と類似した表現型を示すことから遺伝子の発現量が減少したいわゆる haploinsufficiency のために骨分化が遅延したことにより発症すると推察されてきた。またその分子メカニズムとして、in vitro の実験系で、CCD の患者において同定された遺伝子変異は、BMP-SMAD シグナリングを dominant-negative に抑制することも示された。しかしいずれも従来の実験系では、ヒトの CCD の患者において実際に起こっていることかどうかは確認することは不可能であった。また、ヒトの CCD では最も高頻度に見られる臨床症状である埋伏過剰歯が CCD のモデルマウスである runx2 遺伝子欠損ヘテロマウスではみられず、マウスとヒトの種差による病態の差異とマウスを用いた研究の限界が指摘されてきた。そこで今回 CCD 特異的 iPS 細胞を用いることができれば、上記の実験系で示された仮説が実際のヒトの CCD の発症機構に関与するか否か検討することができる。更に従来示されていなかった全く新しい発症機構を解明する可能性も期待される。

(2) FD は、未熟な骨形成を伴った線維性結合組織が骨組織を置換して増生する良性病変で、顎骨の発症頻度も高く、GNAS 遺伝子の 201 番目の Arg のミスセンス変異に起因して起こる。GNAS 遺伝子変異は体細胞変異であり、変異細胞は患者の生体にモザイクで分布し、FD 病変部位においても変異のない健全な細胞とモザイク状態で病変が発症するとされている。培養あるいは共培養させながら骨誘導させて、基質を産生する骨幹細胞の存在を確認するとともに FD の発症機構を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) 病変の採取

附属病院において鎖骨頭蓋異形成症・線維性骨異型性症に罹患していることが確定したものを対象として、線維性骨異形成症の場合は口腔内病変部を採取し、鎖骨頭蓋異形成症では皮膚組織を採取する。

### (2) iPS 細胞の作成

標的細胞は採取後、組織からの細胞単離の常法を用いて標的となる細胞を単離・培養する。細胞を iPS センター搬送し、iPS センターにて細胞にレトロウイルスベクターを用いて 3 あるいは 4 遺伝子 (Oct3/4、Sox2 および Klf4、あるいはこれらに加えて c-Myc) を導入することにより iPS 細胞を作成する。

### (3) 病態解明・治療法開発に向けた解析

作成された疾患特異的 iPS 細胞を用いて、病態解明・治療法開発に向けた解析を行う。外部研究機関と共同研究をして、創薬とその毒性評価等に取り組み、iPS 細胞バンク事業へも寄託し、より社会への貢献を目指す。

## 4. 研究成果

(1) 医の倫理委員会の承認を受け、京大病院ですでに研究がスタートしている「ヒト疾患特異的 iPS 細胞の樹立とそれに用いた疾患解析に関する研究」のプロジェクトの一つとして取り組んだ。研究参加の同意の得られた FD 患者 5 人の病変部の手術検体より細胞を採取した。FD 病変部位において、GNAS 遺伝子変異のある変異細胞とない健全な細胞とがモザイク状態で分布していると報告されているため 1 人目の患者さんにおいて、手術検体の病理組織切片の病変部から抽出した genomic DNA において 201 番目の Arg の遺伝子変異の有無を確認した。ダイレクトシーケンスにて 201 番目の Arg の遺伝子変異の確認することができた。そこで CiRA (京都大学 iPS 細胞研究所) においてレトロウイルスベクターを用いて 4 遺伝子 (Oct 3/4、Sox2、Klf4、c-Myc) を導入することにより iPS 細胞の樹立を試みた。12 クローンの iPS 細胞を樹立し、病変採取部位から樹立した iPS 細胞より genomic DNA を抽出し、ダイレクトシーケンスにて 201 番目の Arg の遺伝子変異の有無を確認した。12 クローンすべてが正常型で、変異型の iPS 細胞は認めなかった。

(2) 2 人目の患者さんからは樹立する iPS 細胞クローンの数を増やすこととし、61 クローンの iPS 細胞を樹立した。同様に変異の有無を確認したが、201 番目の Arg の遺伝子変異を有する iPS 細胞株を得ることはできなかった。

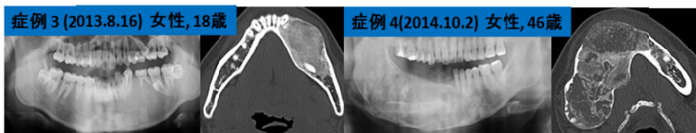
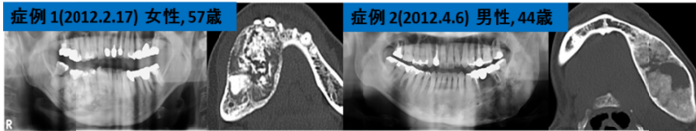
(3) 3 人目の患者さんにおいては、手術検体及び手術検体より得られた iPS 細胞樹立するための培養細胞から抽出した genomic DNA において 201 番目の Arg の遺伝子変異の有無を確認したが、確認できなかったため iPS 化をし

なかった。

(4)4、5 人目の患者さんにおいて、3 人目の患者さんと同様に手術検体及び手術検体より得られた iPS 細胞を樹立するための培養細胞から抽出した genomic DNA において 201 番目の Arg の遺伝子変異の有無を確認し、確認できたため、より iPS 化されやすいエピソードベクターを用いて 6 遺伝子 (Oct 3/4、Sox2、klf4、L-Myc、LIN28、p53-shRNA) を用いて iPS 細胞の樹立を試み検討を行っているところだ。

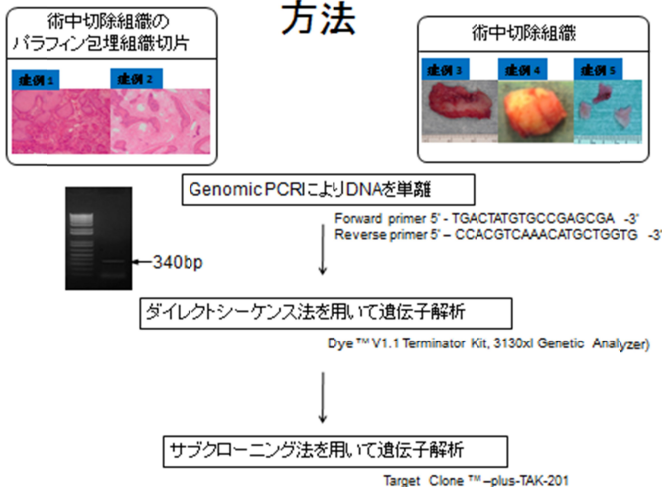
(5) 骨減量術を施行した FD 患者の切除組織を試料とした。さらに 2 症例では標本を部位ごとに分けて検討した。DNA の抽出方法として直接 DNA を抽出した方法と細胞培養後に DNA を抽出した方法の 2 通りで行った。また、最初にダイレクトシーケンスにて遺伝子解析を行い、さらにサブクローニング後にシーケンスを行い、変異率を算出した。ダイレクトシーケンスで GNAS1 遺伝子コドン 201 において Arg から His へのミスセンス変異を 2 症例で検出し、1 例は検出できなかった。また、サブクローニング後による変異率は症例ごとに異なり、FD の症例ごとに変異率が異なることがわかった。

## 症例

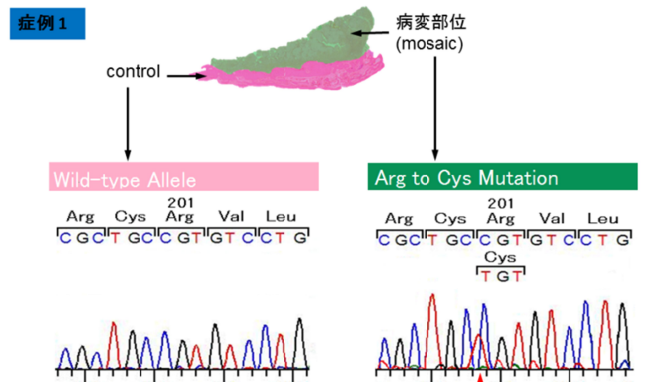


症例	性別	年齢	手術部位	病理診断名
1	女	57歳	下顎骨	セメント質骨形成線維腫
2	男	44歳	下顎骨	FD
3	女	18歳	下顎骨	FD
4	女	46歳	下顎骨	FD
5	女	29歳	下顎骨	FD

## 方法



## 結果



症例1~3で行い、症例1のみ病変部位のGNAS1コドン201において、野生型の配列とArgからCysへのミスセンス変異(R201C)が認められた。

## 症例4

GT値 (HU)	切除骨組織		培養細胞	
	ダイレクトシーケンス	クローニング後の変異率	ダイレクトシーケンス	クローニング後の変異率
A 190	R201H CGCTGC CGT GT	45% (27/59)	R201H CGCTGC CGT GT	-
B 338	R201H CGCTGC CGT GT	2% (1/46)	R201H CGCTGC CGT GT	52% (12/23)
C 368	野生型 CGCTGC CGT GT	0% (0/49)	野生型 CGCTGC CGT GT	-

## 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 21 件)

Kiso H, Takahashi K, Kang Y, Saito K, Togo Y, Sakata-Goto T, Huang B, Tsukamoto H, Nakashima Y, Bessho K. Application of anti-BMP Antibodies to Immunohistochemical Examination of Fibrous Dysplasia. Journal of Oral and Maxillofacial Surgery Medicine and Pathology, 27(1), 106-111, 2015, 査読有 DOI: 10.1016/j.ajoms.2013.12.009

E Sakanashi, Sonobe J, Chin M, Bessho K. Schwannoma Located in the Upper Gingival Mucosa. Case Report and Literature Review. Journal of Maxillofacial and Oral Surgery, 14(1), 222-225, 2015, 査読有 DOI: 10.1007/s12663-012-0445-8

Mshima S, Nakao K, Ikeno M, Bessho K. Hemostasis management of tooth extraction in a patient with Bernard–Soulier syndrome and a severe bleeding tendency: A case report. *Journal of Maxillofacial Oral Surgery Med Path*, 2014 in press. 査読有  
DOI: 10.1016/j.ajoms.2014.09.010

Hussain A, Takahashi K, Sonobe J, Tabata Y, Bessho K. Bone Regeneration of Rat Calvarial Defect by Magnesium Calcium Phosphate Gelatin Scaffolds with or without Bone Morphogenetic Protein-2. *Journal of Maxillofacial Oral Surgery*, 13, 29-35, 2014, 査読有  
DOI: 10.1007/s12663-013-0478-7

Sumi E, Yamazaki T, Tanaka S, Yamamoto K, Nakayama T, Bessho K, Yokode M. The increase in prescriptions of bisphosphonates and the incidence proportion of osteonecrosis of the jaw after risk communication activities in Japan: a hospital-based cohort study. *Pharmacoepidemiology and Drug Safety*, 23, 398-405, 2014, 査読有  
DOI: 10.1002/pds.3562

Yamazaki T, Takahashi K, Bessho K. Recent Clinical Evidence in Bisphosphonate-Related Osteomyelitis of the Jaw: Focus on Risk, Prevention and Treatment. *Review on Recent Clinical Trial*, 9, 37-52, 2014, 査読有  
DOI:  
10.2174/1574887109666140423120614

Huang B, Takahashi K, Jennings E, Puntang-on P, Kiso H, Togo Y, Saito K, Sugai M, Akira S, Shimizu A, Bessho K. Prospective signs of cleidocranial dysplasia in Cebp<sup>b</sup> deficiency. *Journal of Biomedical Science*, 21, 44, 2014, 査読有  
DOI: 10.1186/1423-0127-21-44

Tamura K, Togo Y, Kaihara S, Hussain A, Takahashi K, Bessho K. The effect of nicotine on osteoinduction by recombinant human bone morphogenetic protein 2. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 43(8), 1022-1029, 2014, 査読有  
DOI: 10.1016/j.ijom.2014.02.014

Huang B, Takahashi K, Goto T, Kiso H,

Sugai M, Shimizu A, Kosugi S, Bessho K. ANKH Polymorphisms and Clicking of the Temporomandibular Joint in Dental Residents. *Journal of Maxillofacial Oral Surgery*, 2014, 査読有  
DOI: 10.1007/s12663-014-0622-Z

Kiso H, Takahashi K, Saito K, Togo Y, Tsukamoto H, Huang B, Sugai M, Shimizu A, Tabata Y, Economides A N, Slavkin H C, Bessho K. Interactions between BMP-7 and USAG-1 (Uterine Sensitization-Associated Gene-1) Regulate Supernumerary Organ Formations. *PLoS ONE*, 9(5), 2014, 査読有  
DOI: 10.1371/journal.pone.009693

Idrees S R, Fujimura K, Bessho K. Dental Trauma related to General Anesthesia. Should the Anesthesiologist Perform a Preanesthetic Dental Evaluation? *Oral Health & Dental Management*, 2014, 13(2), 271-274. 査読有  
<http://oralhealth.ro/volumes/2014/volume-2/Paper576.pdf>

Asai K, Yamori M, Yamazaki T, Nakano-Araki I, Yamaguchi A, Takahashi K, Sekine A, Matsuda F, Kosugi S, Nakayama T, Bessho K. Tooth Loss and Atherosclerosis: The Nagahama Study. *Journal of Dental Research*, 94(3), 52S-58S, 2014, 査読有  
DOI: 10.1177/0022034514559127

Hussain A, Bessho K, Takahashi K, Tabata Y. “ Magnesium calcium phosphate /  $\beta$ -tricalcium phosphate incorporation into gelatin scaffold, in vitro comparative study”. *J Tissue Eng Regen*, 8(11), 919-924, 2014, 査読有  
DOI: 10.1002/term.1596

北本幸恵、高橋克、磯部悠、池野正幸、三島清香、別所和久：線維性異形成症部に生じた下顎骨骨折の治療を行った1例、*日本口腔外科学会雑誌*, 60(4)、2014、査読有

Huang B, Takahashi K, Sakata-Goto T, Kiso H, Togo Y, Saito K, Tsukamoto H, Sugai M, Akira S, Shimizu A, Bessho K. Phenotypes of CCAAT/enhancer-binding protein beta deficiency: hyperdontia and elongated coronoid process. *Oral Diseases* 19, 144-150, 2013, 査読有

DOI:  
10.1111/j.1601-0825.2012.01963.x.

Koyama N, Miura M, Nakao K, Kondo E, Fujii T, Taura D, Kanamoto N, Sone M, Yasoda A, Arai H, Bessho K, Nakao K. Human Induced Pluripotent Stem Cells Differentiated into Chondrogenic Lineage Via Generation of Mesenchymal Progenitor Cells. *Stem Cells and Development*, 22, 102-113, 2013, 査読有  
DOI: 10.1089/scd.2012.0127.

Inuzuka K, Endo Y, Kato Y, Fujisawa A, Tanioka M, Kabashima K, Tsukamoto H, Sonobe J, Bessho K, Miyachi Y. Methotrexate-associated Lymphoproliferative Disorder Mimicking Pyocyanic Ecthyma Gangrenosum in a Patient with Rheumatoid Arthritis. *Eur J Dermatol*, 23, 418-419, 2013, 査読有  
DOI: 10.1684/ejd.2013.2044.

Yamazaki T, Yamori M, Asai K, Nakano-Araki I, Yamaguchi A, Takahashi K, Sekine A, Matsuda F, Kosugi S, Nakayama T, Inagaki N, Bessho K: Mastication and Risk for Diabetes in a Japanese Population: A Cross-Sectional Study. *PLOS ONE* 8, e64113, 2013, 査読有  
DOI: 10.1371/journal.pone.0064113.

Nakao K, Okubo Y, Yasoda A, Koyama N, Osawa K, Isobe Y, Kondo E, Fujii T, Miura M, Nakao K, Bessho K: The Effects of C-type Natriuretic Peptide on Craniofacial Skeletogenesis. *Journal of Dental Research*, 92, 58-64, 2013, 査読有  
DOI: 10.1177/0022034512466413.

Togo Y, Takahashi K, Saito K, Kiso H, Huang B, Tsukamoto H, Hyon S H, Bessho K. Aldehyded Dextran and  $\epsilon$ -Poly(L-lysine) Hydrogel as Nonviral Gene Carrier. *Stem Cells International*, Article ID 634379, 2013, 査読有  
DOI: 10.1155/2013/634379.

- ② Yamazaki T, Yamori M, Tanaka S, Yamamoto K, Sumi E, Nishimoto-Sano M, Asai K, Takahashi K, Nakayama T, Bessho K. Risk Factors and Indices of Osteomyelitis of the Jaw in Osteoporosis Patients: Results from a Hospital-Based Cohort Study in

Japan. *PLOS ONE* 8, e79376, 2013, 査読有  
DOI: 10.1371/journal.pone.0079376.

〔学会発表〕(計 21 件)

Nakao K, Yasoda A, Okubo Y, Yamanaka S, Isobe Y, Ikeno M, Koyama N, Miura M, Bessho K. The effects of C-type natriuretic peptide on craniofacial growth. 43<sup>rd</sup> Annual Meeting and Exhibition of the AADR Charlotte, USA, 2014.3.19-22

Asai K, Yamori M, Sano M, Yamazaki T, Yamaguchi A, Sonobe J, Takahashi K, Bessho K. Periapical periodontal Disease and Bisphosphonate-related Osteonecrosis of the Jaw, 43<sup>rd</sup> Annual Meeting & Exhibition of the AADR / 28<sup>th</sup> Annual Meeting of the CADR Charlotte, N.C., USA, 014.3.19-22

小山典昭、三浦晶子、中尾一祐、上田依利子、山下唯、近藤絵里、藤井寿人、磯部悠、池野正幸、山中茂樹、金本巨哲、曾根正勝、八十田明宏、荒井宏司、別所和久、稲垣暢也、中尾一和: ヒト iPS 細胞から軟骨細胞への分化誘導過程における CNP の作用に関する検討、第 13 回日本再生医療学会総会、京都市、2014.3.4-6

中尾一祐、八十田明宏、大澤賢次、山中茂樹、小山典昭、近藤絵里、藤井寿人、三浦晶子、稲垣暢也、別所和久、中尾一和: CNP/GC-B 系は局所因子として内軟骨骨化を促進する、第 32 回骨代謝学会学術集会、大阪市、2014.7.24-26

山中茂樹、中尾一祐、八十田明宏、小山典昭、磯部悠、池野正幸、藤井寿人、近藤絵里、三浦晶子、中尾一和、別所和久: 内軟骨骨化の顎顔面形態に対する影響～軟骨細胞特異的 CNP 遺伝子改変マウスを用いた研究～第 87 回日本内分泌学会総会、福岡市、2014.4.24-26

三浦晶子、小山典昭、中尾一祐、上田依利子、山下唯、近藤絵里、藤井寿人、金本巨哲、曾根正勝、八十田明宏、荒井宏司、別所和久、稲垣暢也、中尾一和: ヒト iPS 細胞からの軟骨細胞分化誘導における CNP の作用に関する検討第 87 回日本内分泌学会学術総会、福岡市、2014.4.24-26

Nakao K, Yasoda A, Osawa K, Koyama N, Kondo E, Fujii T, Miura M, Akiyama H, Bessho K, Nakao K: C-type natriuretic peptide(CNP)/guanylyl cyclase-B (GC-B) system in growth plate promotes

endochondral bone formation through autocrine / paracrinemechanism. 2<sup>nd</sup> Joint Meeting of the IBMS and the JSBMR. Kobe, 2013.5.28-6.1

Koyama N, Miura M, Nakao K, Kondo E, Fujii T, Kanamoto N, Yasoda A, Arai H, Bessho K, Nakao K: The development of culture method for chondrogenic Differentiation of human iPS cells. 2<sup>nd</sup> Joint Meeting of the IBMS and the JSBMR. Young Investigator Seminar. Kobe, 2013.5.28-6.1

Nakao K, Yasoda A, Osawa K, Fujii T, Kondo E, Koayama N, Kanamoto N, Miura M, Kuwahara K, Akiyama H, Bessho K, Nakao K: Impact of local CNP/GC-B system in growth plates on endochondral bone growth. 6<sup>th</sup> International Conference on cGMP. Erfurt, Germany, 2013.6.28-30

磯部悠、小山典昭、池野正幸、中尾一祐、高橋克、別所和久: ヒト iPS 細胞を用いて間葉系前駆細胞を介した骨芽細胞への分化誘導、第 58 回日本口腔外科学会総会、福岡市、2013.10.11-13

塚本容子、高橋克、後藤朋子、喜早ほのか、別所和久: Id2 遺伝子は上顎骨形成時に BMP シグナリングの下流で軟骨形成を制御する第 31 回日本骨代謝学会学術集会、神戸市 2013.5.28-6.1

中尾一祐、八十田明宏、小山典昭、近藤絵里、藤井寿人、三浦晶子、別所和久、中尾一和: C 型ナトリウム利尿ペプチド (CNP) の顎顔面形態における影響および顎変形症に対する臨床応用の可能性-遺伝子改変マウスを用いた解析、第 86 回日本内分泌学会学術総会、仙台市、2013.4.25-27

〔図書〕(計 4 件)

Takahashi K, Kiso H, Saito K, Togo Y, Tsukamoto H, Huang B, Bessho K: Feasibility of Molecularly targeted therapy for tooth regeneration. New Trends in Tissue Engineering and Regenerative Medicine-Official Book of the Japanese Society of Regenerative Medicine, InTech, Rijeka, Croatia, Chapter5, 55-65, 2014.

Fujimura K, Bessho K: Chapter27.Rigid Fixation of Intraoral Vertical-Sagittal Ramus Osteotomy for Mandibular Prognathism. In. Mohammad Hosein Kalantar Motamed. A Textbook

of Advanced Oral and Maxillofacial Surgery. ISBN978-953-51-1146-7, InTech, Croatia, 717-721, 2013,

Takahashi K, Kiso H, Saito K, Togo Y, Tsukamoto H, Huang B, Bessho K: Chapter30.Feasibility of Gene Therapy for Tooth Regeneration by Stimulation of a Third Dentition. In. Francisco Martin Molinaed. Gene Therapy-Tools and Potential Applications, ISBN: 978-953-51-1014-9, InTech, Croatia, 727-744, 2013,

Sakanashi E, Kikuchi K, Matsumura M, Miura H, Bessho K: Chapter7. Allergic Contact Dermatitis to Dental Alloys: Evaluation, Diagnosis and Treatment in Japan -Reflectance Confocal Laser Microscopy, an Emerging Method to Evaluate Allergic Contact Dermatitis .In. Neill Galalied. Biochemistry, Genetics and Molecular Biology "Confocal Laser Microscopy - Principle and Applications in Medicine, Biology, and the Food Sciences" ISBN978-953-51-1056-9 InTech, Croatia, 141-155, 2013,

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 0 件)  
なし

取得状況 (計 0 件)  
なし  
〔その他〕  
ホームページ等  
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

別所 和久 (BESSHO Kazuhisa)  
京都大学・医学研究科・教授  
研究者番号: 90229138

(2) 研究分担者

高橋 克 (TAKAHASHI Katsu)  
京都大学・医学研究科・准教授  
研究者番号: 30599931

中尾 一祐 (NAKAO Kazumasa)  
京都大学・医学研究科・助教  
研究者番号: 40599932

小山 典昭 (KOYAMA Noriaki)  
京都大学・医学研究科・客員研究員  
研究者番号: 30599931