

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：32650

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861560

研究課題名(和文) リプログラム化白板症細胞における癌抑制因子Lefty遺伝子の発現調節機序の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the expression regulatory mechanism of tumor suppressor gene Lefty reprogrammed leukoplakia cells

研究代表者

齋藤 暁子 (Saito, Akiko)

東京歯科大学・歯学部・助手

研究者番号：90722835

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)：適当な白板症症例が得られなかったため、同じく前癌病変でかつ遺伝性疾患である基底細胞母斑症候群(Gorlin症候群)に着目し、まずGorlin患者4症例よりiPS細胞を作製した。これらのGorlin-iPS細胞では増殖能が亢進し、さらに血清飢餓状態での薬剤感受性が正常iPS細胞に比し有意に亢進していた。我々が以前報告した効率の良い骨芽細胞分化誘導法を用いて、Gorlin-iPS細胞および正常ヒトiPS細胞を分化誘導後、PCR arrayを用いてHh関連遺伝子の発現を比較検討した。その結果、Gorlin-iPS細胞においてHh関連遺伝子、Wnt関連遺伝子およびBMP、Runx2の発現上昇を認めた。

研究成果の概要(英文)：Because the appropriate leukoplakia cases could not be obtained, also focused on the basal cell nevus syndrome, a pre-cancerous lesion in and hereditary disease (Gorlin syndrome). We generated four cases of Gorlin patient's specific iPS cells. In these Gorlin-iPS cells enhanced the ability to proliferate, drug sensitivity in addition serum starvation state had been significantly increased compared to the normal iPS cells. Using our previous report and efficient osteoblast differentiation induction method, after induction of differentiation the Gorlin-iPS cells and normal human iPS cells, was examined the expression of the Hh-related genes using the PCR array. As a result, we found that Gorlin-iPS cells were enhanced the expression of Hh related-genes, Wnt related-genes, BMP and Runx2 compared to the normal iPS cells.

研究分野：生化学

キーワード：疾患iPS細胞 癌

1. 研究開始当初の背景

癌と幹細胞の類似性に着目しES、iPS細胞の増殖を抑制し分化誘導に働くタンパク質Leftyが癌細胞では癌抑制因子として働き、その発現がLefty遺伝子のメチル化などのエピジェネティック因子により調節されることを明らかにしている。本研究は、前癌病変である口腔内白板症細胞およびこの細胞をリプログラムした細胞におけるLeftyの発現とエピジェネティック因子の関連を明らかにすることが目的である。

前癌病変である白板症からのiPS細胞の作製は、口腔内白板症からの余剰組織の回収の難しさから困難を極めた。これを克服するため、日本では約25万人に一人の有病率で約3割が基底細胞癌を発症しているといわれる、基底細胞母斑症候群(Gorlin)の患者からのiPS細胞を作製することとした。

2. 研究の目的

基底細胞母斑症候群(Gorlin症候群)は、多発性顎嚢胞(角化嚢胞性歯原性腫瘍)や基底細胞癌、髄芽腫などの腫瘍病変を特徴とする難治性遺伝性疾患で、二分肋骨などの骨格異常、異所性石灰化が特に大脳鎌に生じやすいことも知られる。ヘッジホッグ(Hh)受容体PTCH1遺伝子の変異によりHhシグナルの恒常的亢進が認められる。Hhシグナル亢進は腫瘍形成において重要な役割を果たしており、癌治療の新たな標的として注目されている。Gorlin症候群患者由来iPS細胞は、Hhシグナル伝達経路の解明とともに、癌化のメカニズム、骨形成、石灰化の異常機構の解明に有用であると考えられる。本研究ではGorlin症候群患者特異的iPS細胞を作製し、GLI1を中心に検討した。

3. 研究の方法

(1)本研究は東京歯科大学倫理委員会にて承認済みである(承認番号527,575)。本校を受診したGorlin症候群患者より同意を得た後、口腔粘膜組織を採取し線維芽細胞(G-OF)の初代培養を行った。次世代シーケンスエクソーム解析によりPTCH1遺伝子変異を同定した。産総研より提供を受けたセンダイウイルスベクター-SeVdp(KOSM)302Lを用いて4因子(Oct3/4, Sox2, Klf-4, c-Myc)を線維芽細胞へ導入し、G-iPS細胞を作製し、RT-PCRにてESマーカー(Oct3/4, Sox2, c-Myc, Klf4, Nanog, REX1)および胚様体(EB)形成後の三胚葉マーカー(内胚葉:AFP, 中胚葉:MSX1, 外胚葉:MAP)の確認を行った。また、SCIDマウス精巣部へのiPS細胞の移植を行い、テラトーマ形成による三胚葉分化および癌化の有無を評価した。

(2)フィーダーフリー培養に馴化させた正常iPS細胞(KD-iPS細胞)およびG-iPS細胞を96穴プレートに 2×10^3 個播種接着後、24、48、72時間後にMTTアッセイを行い、増殖能を比較検討した。

(3)Gorlinの線維芽細胞およびiPS細胞に対し、Hhシグナルの活性化剤としてSAGを、抑制剤としてcyclopaminをそれぞれ血清飢餓状態(0.5%FBS)の培地に $1 \mu\text{M}$ 、 100 nM の濃度で添加し48時間培養した。その後RNAを回収しqRT-PCRにてHhシグナルの標的遺伝子であるGLI1の遺伝子発現を評価した。

(4)我々が以前報告したiPS細胞からの効率の良い骨芽細胞分化誘導法(文献1)を用いて、G-iPS細胞を6日間浮遊培養後に形成された胚様体を単離し接着後、FGF2, TGF- β 1, IGF1を添加したOBM培地にて10日間培養し、PCR arrayにてHh関連遺伝子の発現について検討した。

4. 研究成果

(1)4症例すべてで新規のPTCH1遺伝子の変異を同定した。また4症例すべてについてiPS細胞の樹立に成功し、これらのiPS細胞のES細胞マーカーの発現(図1)、EB形成後の三胚葉マーカーの発現をそれぞれ確認した(図2)。さらに形成されたテラトーマにおいて三胚葉由来組織の存在を確認した(図3)。また、これらのテラトーマの癌化は移植12週間では確認されなかった。

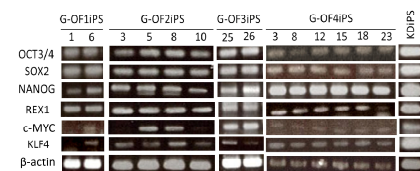


図1. ES細胞マーカーの発現

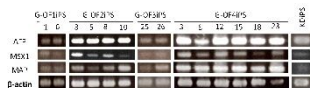


図2. EB形成後の三胚葉分化マーカーの発現

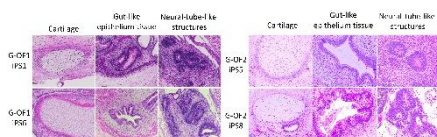


図3. テラトーマ形成

(2)MTTアッセイの結果、G-iPS細胞は正常iPS細胞に比べ、増殖能が亢進していた(図4)。

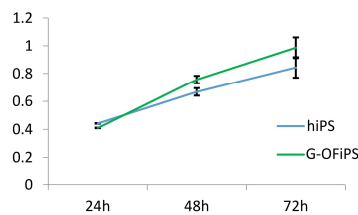


図4. MTTアッセイ

(3)線維芽細胞での比較では、Control (KD)に比べ、GorlinでSAG添加により有意にGLI1発現が亢進し、cyclopamin添加によりそれが有意に抑制された(図5)。iPS細胞においても同様の結果であった(図6)。

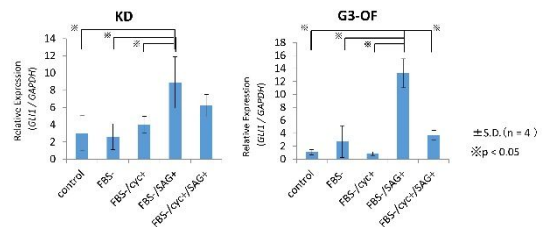


図5. Gorlin線維芽細胞におけるGli1の発現

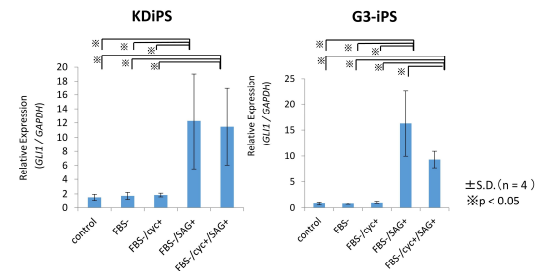


図6. Gorlin-iPS細胞におけるGli1の発現

(4) G-iPS細胞および正常ヒトiPS細胞を分化誘導後、PCR arrayを用いてHh関連遺伝子の発現を比較検討した結果、G-iPS細胞においてHh関連遺伝子、Wnt関連遺伝子およびBMP、Runx2の発現上昇が認められた。

<引用文献>

Ochiai-Shino et al., PLoS One 2014 9 (6):e99534 2014

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計6件)

小野寺晶子、基底細胞母斑症候群(Gorlin症候群)患者由来細胞を用いた疾患特異的ヒト人工多能性幹細胞(iPS細胞)の樹立、第14回日本再生医療学会総会、平成27年3月19~21日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

長谷川大悟、基底細胞癌発生機序解明を目指したGorlin症候群患者由来ヒト人工幹細胞(iPS細胞)の樹立、第24回日本有病者医療学会総会・学術大会、平成27年3月20~22日、旭川市大雪クリスタルホール(北海道・旭川市)

小野寺晶子、Gorlin症候群患者由来細胞を用いたヒト人工多能性幹細胞(iPS細胞)の樹立および骨芽細胞分化、第33回日本骨代謝学会学術集会、平成27年7月23～25日、京王プラザホテル(東京都・新宿区)

齋藤暁子、鎖骨頭蓋異形成症患者由来iPS細胞の樹立と機能解析、第15回日本再生医療学会総会、平成28年3月17～19日、大阪国際会議場(大阪府・大阪市)

篠宏美、Gorlin症候群患者由来細胞を用いたiPS細胞の樹立と骨芽細胞分化の検討、第15回日本再生医療学会総会、平成28年3月17～19日、大阪国際会議場(大阪府・大阪市)

小野寺晶子、Gorlin症候群患者由来細胞を用いたiPS細胞の樹立と骨芽細胞分化の検討、第15回日本再生医療学会総会、平成28年3月17～19日、大阪国際会議場(大阪府・大阪市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齋藤 暁子 (SAITO, Akiko)

東京歯科大学・歯学部・助手

研究者番号： 90722835