

論文内容要旨

基底細胞母斑症候群 (NBCCS) の遺伝子解析及びインテグレーションフリー・フィーダー細胞フリー・無血清培養系での NBCCS 特異的 induced pluripotent stem cells (iPSCs) の樹立研究

指導教員：岡本 哲治 教授
(医系科学研究科 分子口腔医学・顎顔面外科学)

中瀬 洋司

【目的】

基底細胞母斑症候群 (NBCCS) は 1960 年に Gorlin と Goltz らによって報告された発生過程の奇形と腫瘍性疾患を併せ持つ常染色体優性遺伝疾患であり、手掌・足底皮膚の pit や嚢胞形成、多発性顎骨嚢胞、二分肋骨、癒合肋骨、椎骨異常、大脳鎌の石灰化、基底細胞癌、髄芽腫、卵巣腫瘍など、種々の臓器に多彩な症状を示す疾患である。1996 年、Johnson らにより NBCCS の病原変異遺伝子は *patched-1* 遺伝子 (*PTCH1*) であることが報告された。*PTCH1* はヒト 9 番染色体上に locus を有し、24 個の exon から構成され、1,447 個のアミノ酸からなる 12 回膜貫通型細胞膜蛋白 Patched-1 をコードし、sonic hedgehog (SHH) の受容体として機能している。SHH-patched-1 pathway は、胚での細胞増殖、左右決定などの細胞運命決定を制御するネットワークとして機能し、多くの固形腫瘍の発症にも関与している。SHH が patched-1 に結合していない状態では smoothed (SMO) を patched-1 は制御しており、下流シグナルは抑制されるが、結合することで、SMO を制御出来なくなり、下流シグナルが活性化される。したがって、*PTCH1* に病原性変異が存在すると恒常的に下流シグナルが活性化され、本症が発症すると考えられている。一方、近年このような遺伝性疾患の発症機構を解明するため、疾患特異的 iPSC を用いた研究の有用性が注目されている。

本研究では、NBCCS 発症機序を明らかにするため、まず散発性 NBCCS 症例及び 4 代にわたる NBCCS 家系内の疾患患者及び健常人の *PTCH1* の変異を解析した。続いて、散発性患者及び同一家系内患者及び健常人由来細胞より iPSC 細胞を樹立した。

【方法】

散発性 NBCCS 4 症例 (S1-S4) および 4 世代に渡る NBCCS 家系内の疾患患者 7 名 (F1-F7) および健常人 4 名 (wild type (WT)1-WT4) の *PTCH1* の遺伝子解析を以下の方法で行った。各個体より Ficoll-Hypaque 比重遠心法で分離した単球 (PBMC) 由来 DNA を用いて、polymerase chain reaction-single strand conformational polymorphism (PCR-SSCP) および direct sequence 法で解析を行った。次に、各 PBMC を RD6F 培地に IL-2 を添加した無血清培地で 6 日間培養し活性化リンパ球を得た。次に本リンパ球を laminin-E8 処理 6well-dish に 1×10^5 /well の細胞密度で播種し、初期化 4 遺伝子 (*Klf4*, *Oct3/4*, *Sox2*, *c-Myc*) をリニアに搭載したセンダイウイルスベクター (MOI=6) で 2 時間感染させた。続いて、hESF9 無血清培地に培地交換し 2 週間培養後に alkaline phosphatase 陽性コロニーを pick up し、NBCCS-iPSCs 及び WT-iPSCs を得た。家族性 NBCCS-iPSC (F3-5) 由来 DNA を用いて next generation sequence (NGS) 法で *patched-1* シグナル関連遺伝子群を含めた先天性疾患に関わる 4,813 遺伝子を網羅的に解析した。

iPSCs の未分化性は、Revers Transcription-PCR (RT-PCR) 法による *Oct3/4*, *Sox-2*, *Rex1* 発現および蛍光免疫染色法による *Oct3/4*, *Nanog*, *SSEA-3*, *SSEA-4*, *Tra-1-60*, *Tra-1-81* 発現で明らかにした。分化多能性は embryo body (EB) 形成法および免疫不全マウス (SCID) 背部皮下での teratoma 形成能で評価した。EB での *patched-1* シグナル関連遺伝子 (*SHH*, *PTCH1*, *GLI3*, *Nanog*, *TP63*, *KRT5*, *MAP2*, *IGF2*) 発現を RT-qPCR で検討した。さらに、iPSCs から keratinocyte への分化誘導後の *KRT5*, *KRT14*, *TP63* 発現および *KRT5*, *TP63*, *Nestin* の発現および各細胞の増殖能を検討した。本研究は広島大学ヒトゲノム・遺伝子解析研究承認研究 (第ヒ 58, 72 号) に基づいて行った。

【結果】

PTCH1 変異解析の結果、NBCCS-S1 では cording DNA の 2733 番目と 2734 番目の塩

基間に TG の 2 塩基挿入変異 (c.2733_2734insTG) を認めた。同変異は 924 番目のコドンの stop コドンへの置換(p.T924X)を示唆した。S2 では 1539 番目の塩基 T の G への変異 (c.1539T>G) を認め、同変異は 513 番目の aspartic acid の glutamic acid への置換を示唆した(p.D513E)。S3 および S4 では 1704 番目の塩基 C の欠失(c.1704delC) を認め、同変異は 579 番目のコドンの stop codon への置換を示唆した (p.V579X)。家系内 NBCCS (F1-7) では 3298 番目と 3299 番目の塩基間に AAG の 3 塩基挿入を認め (c.3298_3299insAAG)、同変異は 1099 番目の Histidine と 1100 番目の Valine 間に Glutamic acid の挿入を示唆した (p.H1099_V1100insE)。NGS 解析の結果、F3-5 では *PTCH1* の c.3298_3299insAAG 変異は確認されたが、その他の発症に関与する *SHH*, *SMO*, *SUFU*, *Gli1* および他の先天性疾患に関わる遺伝子群には病原性変異を認めなかった。また NBCCS-iPSC 由来 DNA においても NBCCS -PBMC と同質の *PTCH1* 変異を認めた。

NBCCS-, WT-iPSC は、未分化マーカー遺伝子・蛋白および EB では三胚葉マーカー遺伝子・蛋白の発現を認め、SCID 背部皮下で teratoma を形成し三胚葉分化を示したことから未分化性と分化多能性を維持していた。WT-iPSC では EB 誘導後に *PTCH1* 発現の低下を認めたが、NBCCS-iPSC では上昇した。iPSCs 由来 keratinocyte は、WT-iPSC と比較して上皮マーカー *KRT5*, *KRT14*, *TP63* の発現上昇および高い増殖能を示した。

【考察】

散发性 NBCCS 3 症例および家族性 NBCCS における *PTCH1* 変異を解析し、今までに報告のない新規病原変異を同定した。また、無血清培養下、散发性及び家族性 NBCCS 由来 PBMC から疾患特異的 iPSC の樹立および長期培養に成功した。同一家系内の健常人および疾患特異的 iPSC は遺伝的背景が均一であることから、本 iPSC を用いることで、本疾患のさらなる病態解明や治療法の開発研究に寄与すると考えられた。