

Title	24 : ヘッジホッグシグナル伝達異常により発症する 歯原性角化嚢胞が生じる遺伝子異常の網羅的解析
Author(s)	小野寺, 晶子; 森田, 那奈; 渡邊, 豪士; 斎藤, 暁子; 中村, 貴; 野村, 武史; 高橋, 慎一; 片倉, 朗; 柴原, 孝彦; 東, 俊文
Journal	歯科学報, 118(3): 249-249
URL	http://hdl.handle.net/10130/4588
Right	
Description	

示 説

No.23: 遺伝子改変マウスを使用した未分化間葉系幹細胞の骨細胞への分化機構の解明

鈴木瑛一¹⁾, 青木栄人¹⁾, 中村 貴²⁾, 久永幸乃¹⁾, 佐藤正敬¹⁾, 中村彩乃¹⁾, 東 俊文²⁾³⁾,
齋藤 淳¹⁾³⁾ (東歯大・歯周)¹⁾ (東歯大・生化)²⁾ (東歯大・口科研)³⁾

目的: 歯槽骨などの硬組織形成において、未分化細胞からの効果的な分化誘導法の確立のためには、詳細な分化機序を解明する必要がある。本研究では、遺伝子改変マウスを使用し、未分化間葉系幹細胞から骨細胞への分化過程における遺伝子発現の変動を解析することで、骨細胞への分化過程ならびに硬組織における遺伝子制御機構の一端を明らかにすることを目的とした。

方法: 骨細胞特異的マーカーである Dentin matrix protein 1 (Dmp 1) 存在下で enhanced green fluorescent protein (EGFP) を発現するトランスジェニックマウスを作成、bone marrow stem cells (BMSCs) の採取を行った。BMSCs は 2 週間の骨分化誘導を行ったのち、FACS にて EGFP 陰性および陽性細胞の単離を行った。EGFP 陰性・陽性細胞よりそれぞれ RNA を抽出し、DNA マイクロアレイ法にて骨細胞への分化前後における発現変動遺伝子の解析を行った。また、リアルタイム PCR 法により mRNA 発現の確認を行った。

結果および考察: BMSCs を骨分化誘導培地で培養

したところ、EGFP 発現細胞の経時的な増加を認めた。EGFP 陰性細胞と比較して、EGFP 陽性細胞では Osteocalcin をはじめとする骨分化マーカー mRNA 発現量の有意な亢進が認められた ($p < 0.05$)。DNA マイクロアレイより *Bmp 8 b*, *Pdgfc*, *Cryab* 等の遺伝子群において、EGFP 陰性・陽性細胞間で有意な発現変動が認められた ($p < 0.001$, $FDR < 0.05$)。さらに発現変動遺伝子についてリアルタイム PCR 法による解析を行ったところ、EGFP 陰性細胞と比較し、EGFP 陽性細胞において *Cryab* mRNA 発現量の有意な亢進を認めた ($p < 0.001$)。BMSCs の骨分化誘導時における経時的な mRNA 発現量を解析すると、*Cryab* は *Dmp 1* と同様の発現パターンを示し、*Cryab* が骨細胞への分化ならびに硬組織形成に関与していることが示唆された。遺伝子改変マウスの使用により、未分化間葉系幹細胞から骨細胞への分化に関与する主要遺伝子群の候補が示された。本研究の結果は、歯槽骨をはじめとする硬組織への分化制御機構の解明につながるものと考えられる。

No.24: ヘッジホッグシグナル伝達異常により発症する歯原性角化嚢胞が生じる遺伝子異常の網羅的解析

小野寺晶子¹⁾, 森田那奈²⁾, 渡邊豪士³⁾, 齋藤暁子¹⁾, 中村 貴¹⁾, 野村武史²⁾, 高橋慎一⁴⁾,
片倉 朗⁵⁾, 柴原孝彦³⁾, 東 俊文¹⁾ (東歯大・生化)¹⁾ (東歯大・オーラルメディシン口外)²⁾
(東歯大・口腔顎顔面外科)³⁾ (東歯大・市病・皮膚科)⁴⁾ (東歯大・口腔病態外科)⁵⁾

目的: ヘッジホッグ (Hh) 伝達経路は胚発生、骨形態形成および癌形成に寄与していることが知られており、Hh 受容体である Ptch 1 コンディショナルノックアウトマウスでは、髄芽種、基底細胞癌の発現増加が報告されている。OKC (歯原性角化嚢胞) では Hedgehog (Hh) 経路の SMO 以下、情報経路の活性化が報告されており、Hh シグナルの活性化が嚢胞形成に関与していることが示唆されているものの、その発症メカニズムの大部分は未解明である。現在、次世代シーケンズ解析 (NGS) を用いることで遺伝性疾患解析をより迅速かつ網羅的に進める為、新たな病態発見、治療法の開発が可能となった。本研究では Gorlin 症候群において頻発し再発性の歯原性角化嚢胞 (OKC) の NGS 解析し未知の病態開発を目指す。

方法: 本研究は東京歯科大学倫理委員会にて承認済された (承認番号 527, 575)。東京歯科大学口腔顎顔面外科を受診した Gorlin 症候群患者 2 名より正常部組織、病変部位からゲノム DNA を抽出した。ゲノム DNA は HiSeq2500 にてシーケンズを解析した。得られたシーケンズはアライメント後、

SNPEff にて変異解析を行った。得られた変異塩基の内、coverage 30 以上であるもののみを遺伝子変異解析プログラム PROVEAN と SIFT を用いてタンパク機能異常を持つ可能性のあるものを同定した。**結果および考察:** OKC と診断された病変部の DNA からはゲノム変異と同一の PTCH 1 変異のみが検出され、他の Hh 経路受容体である PTCH 2, SMO, BOC, CDO においても追加の変異は認められなかった。検出された変異の 137 個のうち、54 個がタンパク質コード領域の変異であった。このコード領域に存在する変異について PROVEAN/SIFT を用いてさらなる解析を行ったところ、17 の遺伝子にタンパク機能異常を有する可能性があった。これらの遺伝子は BCC で報告されている癌関連遺伝子を含まなかった。以上より Gorlin 症候群患者由来 OKC ではもともと患者が有する Hh 関連遺伝子以外の変異を有することが示され、BCC などの癌発生とは異なるメカニズムで発生している可能性が示され Hh 経路以外の変異検出も加えて行うことが OKC のメカニズムを解明するうえで重要であると考えられた。