

Title	26 : CRISPR/Cas 9 を用いたMcCune-Albright 症候群モデルiPS 細胞の樹立
Author(s)	渡邊, 豪士; 奥平, 貴人; 中村, 貴; 小野寺, 晶子; 齋藤, 暁子; 山口, 朗; 東, 俊文; 柴原, 孝彦
Journal	歯科学報, 118(3): 250-250
URL	http://hdl.handle.net/10130/4599
Right	
Description	

No.25：鎖骨頭蓋骨異形成症由来 iPSC 細胞を用いた骨芽細胞分化誘導時の RUNX 2 機能不全と核形態異常との関連

齋藤暁子¹⁾, 大木章生²⁾, 澤田 隆³⁾, 中村 貴¹⁾, 小野寺晶子¹⁾, 長谷川大悟⁴⁾, 末石研二²⁾,
東 俊文¹⁾ (東歯大・生化)¹⁾ (東歯大・矯正)²⁾ (東歯大・組織発生)³⁾
(東歯大・口腔顎顔面外科)⁴⁾

目的：鎖骨頭蓋骨異形成症 (CCD) は RUNX 2 遺伝子のヘテロ変異を有する疾患で、特に膜性骨化異常をきたす。RUNX 2 は骨芽細胞分化のマスター転写因子であるが、その骨芽細胞分化機構については未だ不明な点が多い。本研究では樹立した CCD 由来 iPSC 細胞 (CCD-iPSCs) を用いて RUNX 2 による骨芽細胞分化機構の解明を目指す。

方法：本研究は本学倫理審査委員会および動物実験委員会で承認済みである (承認番号533, 290401)。我々が樹立した CCD-iPSCs から CRISPR-Cas 法により変異塩基を正常化した Revertant-iPSCs と、ホモ欠損変異をもつ KO-iPSCs を作製した。骨芽細胞誘導培地で培養後、ALP 活性化染色、qPCR で評価した。ヌードラット頭蓋冠に作製した欠損部へ、iPSCs から骨芽細胞分化誘導後の細胞 (OBs) を、足場素材とともに移植し 4 週間後の検体を μ CT および組織学的方法で評価した。それぞれの OBs について、核染色および透過型電子顕微鏡を用いた解

析にて核形態を観察し、核構造維持に重要な遺伝子群の発現を qPCR にて確認した。

結果および考察：骨分化誘導解析では、Revertant-iPSCs でのみ ALP, OSX, OC, DLX 5 などの骨芽細胞分化マーカーの発現上昇を認めた。ヌードラット頭蓋骨欠損部移植実験では、Revertant 細胞移植群において、欠損部が新生骨でほぼ修復されたのに対し、CCD 移植群では骨閉鎖遅延を認め、骨体積、骨塩量ともに低下していた。以上の結果から、樹立した CCD-iPSCs は骨芽細胞分化異常に伴う骨石灰化障害を呈することが確認できた。次に核形態を観察したところ、Rev-OBs は正常な核形態を示したのに対し、CCD-および KO-OBs では核溝や核膜の異常陥入による分葉状の核を認めた。さらに核形態維持に必須の Lamin A/C 遺伝子発現が KO-OBs で顕著に発現低下していた。以上のことから CCD 病態における RUNX 2 発現・機能減弱と核形態維持に関わる遺伝子発現に関連がある可能性が考えられた。

No.26：CRISPR/Cas 9 を用いた McCune-Albright 症候群モデル iPSC 細胞の樹立

渡邊豪士¹⁾, 奥平貴人¹⁾, 中村 貴²⁾, 小野寺晶子²⁾, 齋藤暁子²⁾, 山口 朗³⁾, 東 俊文²⁾,
柴原孝彦¹⁾ (東歯大・口腔顎顔面外科)¹⁾ (東歯大・生化)²⁾ (東歯大・口科研)³⁾

目的：McCune-Albright 症候群 (MAS) は、線維性異形成、カフェオレ斑、思春期早熟症を主症状とする疾患であり、GNAS 1 exon 8 上の codon 201 の点変異によってアルギニンがヒスチジンまたはシステインに変化し Gs α が恒常的活性化することで発症する。MAS の病変部は正常細胞および変異細胞との体細胞モザイクであることが知られており、変異細胞のみを得ることは非常に困難である。そこで本研究では、MAS のメカニズムを解明するために CRISPR/Cas 9 遺伝子編集技術を用いて GNAS 1 突然変異を有する iPSC 細胞を作製することとした。

方法：遺伝子編集を以下の手順で行った。(1) 2 か所の guide RNA (gRNA) 配列を CRISPR design (<http://crispr.mit.edu/>) を用いて選択した。(2) (1) で選択した gRNA を pSpCas 9 n (BB) (PX460) ベクターに組み込んだ。(3) ターゲティングベクターは薬剤耐性遺伝子を挟む形で 5' 側に exon 7 の相同領域を、3' 側には codon 201 アルギニンをヒス

チジンに置換した exon 8-10 を含む相同領域を設計した。(4) (2) および (3) で作製したベクターをエレクトロポレーション (950V/2ms/2 pulses) により正常ヒト iPSC 細胞 (NiPS) に導入し、薬剤選択培地で培養後、コロニーを単離した。

結果および考察：得られたクローン 24 個中 2 個のクローンで、ゲノム DNA の PCR および Sanger sequence によって目的とする GNAS 1 遺伝子変異を有することを確認した。得られた iPSC 細胞の未分化マーカー (REX 1, NANOG, OCT 3/4, SOX 2) および三胚葉分化マーカー (AFP, SOX17, MSX 1, BRACHYURY, MAP 2, PAX 6) の発現を RT-PCR を用いて確認した。これらの結果より MAS 表現型を有する可能性を持つ GNAS 1 変異 iPSC 細胞の樹立に成功した。この細胞は MAS の病態生理学的メカニズムを理解するのに有用であると考えられる。今後、骨芽細胞およびメラニン産生細胞へ分化誘導および解析を行う予定である。