



Title	GNAS遺伝子変異マウスを用いた線維性異形成症の病態解明
Author(s)	兵頭, 美穂
Citation	大阪大学, 2024, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/95986
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏 名 (兵 頭 美 穂)

論文題名

GNAS遺伝子変異マウスを用いた線維性異形成症の病態解明

【緒言】

線維性異形成症 (fibrous dysplasia: FD) は、幼弱な線維骨の形成を伴う線維性組織により骨髄が置換される難治性骨疾患である。全身の骨に発症するが顎顔面骨に好発し、顎顔面変形や咬合異常、神経圧迫などを引き起こし、多発重症例では患者のQOLを著しく低下させる。現在の治療法は外科的減量術が主流であるが、多発症例や頭蓋発症例では手術適応外となるため、内科的治療の開発が切望され、様々な研究が行われている。FDは、GNAS (*guanine nucleotide-binding protein, α -stimulating activity polypeptide*) 遺伝子の体細胞変異が起これ、細胞内cAMPが増加した結果、その下流の蛋白質キナーゼ (PKA) 活性化を介したシグナル伝達異常が引き起こす骨格系幹細胞の分化異常により発症すると考えられている。これまでに変異GNAS遺伝子 (GNAS^{R201C/H}) を、骨格系幹細胞や骨芽細胞系譜細胞に発現させた遺伝子改変マウスが報告されているが、FDを再現したモデルマウスの作製には至っていない。

近年、骨髄間質細胞であるレプチン受容体陽性 (LepR⁺) 細胞の中で、Runx2低発現 (Runx2^{low}) 細胞は幹細胞性が高く、LepR⁺/Runx2^{low}細胞は骨髄間質細胞の分化階層の頂点に位置する骨格系幹細胞であることが報告された。FDの病変細胞はRunx2高発現 (Runx2^{high}) の未熟な骨芽細胞系譜細胞の性質を有していることから、LepR⁺/Runx2^{low}の骨髄間質細胞からRunx2^{high}の骨芽細胞系譜細胞への分化過程におけるRunx2発現細胞がFD発症に関与している可能性があると考えられる。そこで、本研究ではRunx2発現細胞に着目し、骨髄間質細胞の中のRunx2発現細胞に変異GNAS遺伝子を発現させ、FDモデルマウスの作製を試みた。

【材料と方法】

1. **FDモデルマウスとZsGreen1レポーターマウス**: Runx2遺伝子のプロモーターの下流でCre酵素を発現するRunx2-Creマウスと、Cre依存性にGNAS遺伝子変異とGFP (GNAS^{R201H}-IRES-eGFP) を発現するGNAS^{R201H}Floxマウスを交配して、Runx2-Cre;GNAS^{R201H}マウスを作製し、各種解析に用いた。また、Cre依存性にZsGreen1 (緑色蛍光) を発現するマウスと交配し、Runx2-Cre;ZsGreen1マウスを作製し、Runx2発現細胞の細胞系譜解析に用いた。
2. **組織学的解析**: 各週齢の大腿骨と顎骨は、4%PFAにて固定後にEDTA脱灰し、パラフィン包埋・薄切後に、HE染色や免疫組織化学的染色、鍍銀染色を用いて解析した。
3. **免疫組織化学的染色**: 一次抗体として、抗LepR抗体、抗GFP抗体、抗Endomucin抗体、抗Phospho-PKA Substrate抗体、抗TRAP抗体を用いた。各一次抗体の免疫反応部位は、LSAB法を用いて検出し、DAB発色部位を観察した。蛍光染色には、蛍光標識2次抗体を用いて蛍光発色部位を観察した。
4. **X線画像解析**: 各週齢の全身骨格はX線撮影装置を用いて解析し、大腿骨と顎骨は70%エタノールにて固定後に μ CT撮影装置 (R_mCT2) を用いて詳細な解析を行った。
5. **cAMP測定**: 生後2週齢の大腿骨骨髄をフラッシュしてプレートに播種し、2週間後に骨髄間質細胞を採取した。生後1週齢の頭蓋冠から酵素処理により骨芽細胞を採取した。各種初代培養細胞を用いて、cAMP Direct Biotrak EIA kitにより細胞内cAMP量を測定した。
6. **シングルセル遺伝子発現解析**: 生後4週齢の大腿骨骨幹部 (骨髄と皮質骨を含む) の細胞を酵素的に単離し、抗CD45抗体と抗Ter119抗体を用いて血球細胞を除去したのちに、NovaSeq 6000 (イルミナ社) にて解析を行った。

【結果と考察】

1. Runx2-Creマウスを用いたZsGreen1レポーター発現細胞の検討

Runx2-Cre;ZsGreen1マウスでは、骨芽細胞や骨細胞に加えて、骨髄内の類洞周囲にZsGreen1陽性細胞を認めた。このZsGreen1陽性細胞は、骨髄間質細胞のマーカーとなるLepR陽性 (抗LepR抗体の免疫組織化学的染色により発現

を確認)であることから、Runx2-Creマウスを用いることにより、骨髄間質細胞に目的遺伝子を発現させることができると考えられた。

2. Runx2-Cre;GNAS^{R201H}マウスにおけるcAMP/PKAシグナル経路の検討

eGFP発現を指標としてGNAS^{R201H}発現細胞を検討したところ、Runx2-Cre;GNAS^{R201H}マウスでは、骨芽細胞/骨細胞および類洞周囲の紡錘形細胞にeGFP発現が認められたため、これらの細胞がGNAS^{R201H}を発現していると考えられた。また、Runx2-Cre;GNAS^{R201H}マウスの初代培養骨髄間質細胞や骨芽細胞における細胞内cAMP量は、野生型 (WT) マウスと比較して有意に増加した (各 $P < 0.01$ 、 $P < 0.01$)。

ヒトFD細胞内では、cAMP増量によりPKAが活性化し、PKAの基質のリン酸化が亢進する。このリン酸化状態をリン酸化PKA基質に対する特異抗体を用いて免疫組織化学的に検出すると、WTマウスと比較して、Runx2-Cre;GNAS^{R201H}マウスでは、骨芽細胞や骨細胞、類洞周囲の紡錘形細胞に強陽性の免疫反応を示し、PKA活性化の亢進が示された。以上より、Runx2-Cre;GNAS^{R201H}マウスでは、WTマウスと比較して、骨髄間質細胞や骨芽細胞系細胞におけるcAMP/PKAシグナル経路が活性化していることが示された。

3. Runx2-Cre;GNAS^{R201H}マウス骨格のX線画像解析

生後48週齢までの経時的観察では、WTマウスと比較して、Runx2-Cre;GNAS^{R201H}マウスには顕著な体重変化や全身骨格の変化はみられないが、12週齢で大腿骨長が軽度短縮し、32週齢以降で尾骨の変形が認められた。μCT解析では、WTマウスと比較して、Runx2-Cre;GNAS^{R201H}マウス的大腿骨では皮質骨幅が増加し、WTマウスでは存在しない骨幹部骨髄内に骨形成が認められ、その骨量は経時的に増加した。また、Runx2-Cre;GNAS^{R201H}マウスの血清PおよびCa濃度に異常はなかった。

4. Runx2-Cre;GNAS^{R201H}マウス骨格の組織学的解析

Runx2-Cre;GNAS^{R201H}マウス的大腿骨では、皮質骨幅の増生と骨幹部部の海綿骨の増生、さらに骨幹部骨髄内にも骨形成が認められた。生後2, 4週齢では、骨幹部骨髄内の骨表層には大型の骨芽細胞が分布し、鍍銀好染性の細網線維が認められたが、その後、これらは加齢に伴い消失傾向がみられた。また、生後2, 4週齢のRunx2-Cre;GNAS^{R201H}マウスでは、WTマウスと比較して、破骨細胞数の有意な増加を認めた ($P < 0.01$)。顎骨でも、骨髄内の骨増生やその表層に分布する大型骨芽細胞と細網線維を含む線維成分が認められた。ヒトFDほどの骨髄内が線維性組織で置換されて増生する像は観察されなかったが、骨が分布しない骨幹部骨髄内に骨が形成されて細網線維を含む線維性組織を伴うことや、破骨細胞数が増加するというFD病変の特徴の一部が認められた。

5. シングルセル遺伝子発現解析

骨幹部 (骨髄と皮質骨を含む) の細胞のシングルセル遺伝子発現解析の結果から、Runx2-Cre;GNASマウスでは、WTマウスと比較して、骨髄間質細胞から骨芽細胞系譜細胞への分化が亢進していることが分かった。

【結語】

Runx2-Cre;GNAS^{R201H}マウスの解析により、骨髄内のLepR⁺/Runx2^{low}の骨髄間質細胞は、GNAS^{R201H}を発現させることにより、骨髄間質細胞から骨芽細胞系細胞への分化が亢進することが分かった。また、このマウスの長管骨および顎骨の骨髄内では線維成分を伴う骨の増生や破骨細胞の増加などFD病変の特徴の一部が再現できた。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (兵頭 美穂)			
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	教 授	豊澤 悟
	副 査	教 授	大庭 伸介
	副 査	准教授	松永 和秀
	副 査	講 師	村上 智彦
論文審査の結果の要旨 線維性異形成症（FD）は、未熟骨の形成を伴う線維性結合組織により骨髄が置換される骨疾患で、全身骨に発生するが特に顎顔面骨に好発する。その治療は外科的摘出が主流であるが、多発重症例では手術適応外となるため、内科的治療薬の開発が望まれる。FD は <i>GNAS</i> 遺伝子の体細胞変異が骨格系前駆細胞に起こって発症すると考えられており、同遺伝子変異を用いた幾つかの FD モデルマウスが作製されているが、FD を再現するには至っていない。 本研究では、FD は骨髄に発生し、病変細胞は <i>Runx2</i> を発現する事から、骨髄間質（幹）細胞の中で幹細胞性の高い <i>Runx2</i> 低発現細胞に変異 <i>GNAS</i> 遺伝子を発現させると FD モデルになると想定して、<i>Runx2-cre;GNAS</i> マウスを作製した。<i>Runx2-cre;GNAS</i> マウスでは、本来、骨形成の起こらない大腿骨の骨幹部骨髄に未熟骨が形成され、顎骨でも骨増生が認められた。形態およびシングルセル解析から、<i>Runx2-cre;GNAS</i> マウスの骨幹部骨髄内の未熟骨は大型骨芽細胞に取り囲まれ、その周囲に 3 型コラーゲンとペリオスチンを発現する紡錘形細胞とその産物が分布することが分かり、FD でも未熟骨間の線維性結合組織に 3 型コラーゲンとペリオスチンの分布が確認された。また、FD では破骨細胞性骨吸収が亢進していることが知られているが、<i>Runx2-cre;GNAS</i> マウスの骨組織でも破骨細胞数の増加が認められた。このように、<i>Runx2-cre;GNAS</i> マウスは FD を完全に再現するには至らないが、FD の重要な特徴を再現することができた。 以上の結果は、上記のマウスは、FD の病態を理解して創薬開発を進める上で有用であると思われる、博士（歯学）の学位を授与するに値するものと認める。			