

第4回 硬組織疾患ゲノムセンター・シンポジウム プログラム

開催日時：2011年1月31日 月曜日 午後1時～午後4時30分

場 所：1号館・管理棟 9階 講堂

開会挨拶（13:00－13:05）

副学長・研究担当理事 森田 育男 教授

硬組織疾患ゲノムセンターの概要（13:05－13:10） 硬組織疾患ゲノムセンター長 稲澤 譲治 教授

Session I 歯科口腔領域の腫瘍・遺伝性疾患のゲノム解析（13:10－14:30）

座長：小村 健 教授、三木 義男 教授

1. 頭蓋冠縫合部の発生における Hedgehog シグナルの役割（13:10－13:30）

未来医療展開部門 小林 起穂 特任助教

2. 顎顔面先天異常に対する矯正歯科的対応とその課題（13:30－14:10）

未来医療展開部門 森山 啓司 教授

3. 口腔がんにおける診断マーカー探索（14:10－14:30） 先端診断法開発部門 森田 圭一 特任講師

〈特別講演〉（14:30－15:10）

4. 次世代シーケンサーによるがんの全ゲノムシーケンス解析

理化学研究所 ゲノム医科学研究センター バイオマーカー探索・開発チーム

チームリーダー 中川 英刀 先生

Session II 骨軟骨領域の腫瘍・遺伝性疾患のゲノム解析（15:10－16:20）

座長：秋吉 一成 客員教授、津田 均 教授

5. 先天異常疾患の原因となるゲノム異常の網羅的探索（15:10－15:30）

硬組織疾患ゲノム構造解析部門 林 深 特任講師

6. 軟骨分化における転写因子 Runx の機能解析（15:30－15:50）

先端治療法開発部門 木村 文子 特任助教

7. 骨粗鬆症性椎体骨折の治療と課題（15:50－16:20）

先端治療法開発部門 大川 淳 准教授

閉会の辞（16:20－16:25）

硬組織疾患分子医科学研究部門 野田 政樹 教授

司会：森田 圭一 特任講師、林 深 特任講師

硬組織疾患ゲノムセンター活動の概要

稲澤 譲治^{1,2}

¹ 東京医科歯科大学 硬組織疾患ゲノムセンター 硬組織疾患ゲノム構造解析部門

² 東京医科歯科大学大学院 難治疾患研究所 分子細胞遺伝



東京医科歯科大学硬組織疾患ゲノムセンターでは、平成22年度より文部科学省の支援により「大学の特性を生かした多様な学術研究機能の充実」を目的とする教育研究事業の一環として「先端硬組織疾患ゲノム・ナノサイエンス統合プロジェクト」を推進しています。

本事業は、骨・骨軟部・歯科口腔領域などの硬組織疾患の病態を先端的なゲノム・エピゲノム解析によって得られた情報に基づき分子レベルで解明し、その成果をナノサイエンスと統合させて新しい画期的な診断・治療・予防法を開発するための基盤を構築し、トランスレーショナルリサーチへと発展させ、新時代の医療の実現を目指しています。この取り組みは、医療系総合大学院大学である東京医科歯科大学の特色を背景として、大学院医歯学総合研究科、医学部、歯学部、生体材料研究所、ならびに難治疾患研究所に在籍する先端ゲノム科学とナノサイエンスのエキスパートと臨床医の相互の連携を強化し、硬組織疾患の診断及び治療への包括的・統合的研究を推進するものです。

特に現在は、口腔領域ならびに骨・軟部組織に発症する悪性腫瘍や、顎顔面の変形（奇形）を伴う遺伝性疾患におけるゲノム異常の解析や原因遺伝子の同定、これに基づく診断や治療方針の決定の情報を確立すると共に、ナノサイエンスによる新たな硬組織の再構築の為の研究を推進しています。来年度（平成23年度）は、網羅的ゲノム・エピゲノム解析・クロマチン構造解析などを含むオミックス解析による新規の硬組織疾患・腫瘍疾患の原因遺伝子とその異常の発見を継続して推進してゆく予定です。また、これらの研究から得られる知見を硬組織の診断・治療の開発に直結させる臨床研究や、新規バイオマテリアルの先導的な開発と連携した新たな疾患治療開発研究の展開を期しています。私たちは、ゲノム医科学とナノサイエンス科学とを統合する新たな先端研究によって、未解決のままである多くの硬組織疾患の原因を究明するとともに早期の診断や効果的な治療および革新的な予防法を開発し、国民の健康と生活に安心をもたらすことを期待しています。

第4回 硬組織疾患ゲノムセンター・シンポジウム 抄録

1. 頭蓋冠縫合部の発生における Hedgehog シグナルの役割

小林 起穂¹、森山 啓司^{1,2}

¹ 東京医科歯科大学 硬組織疾患ゲノムセンター 未来医療展開部門

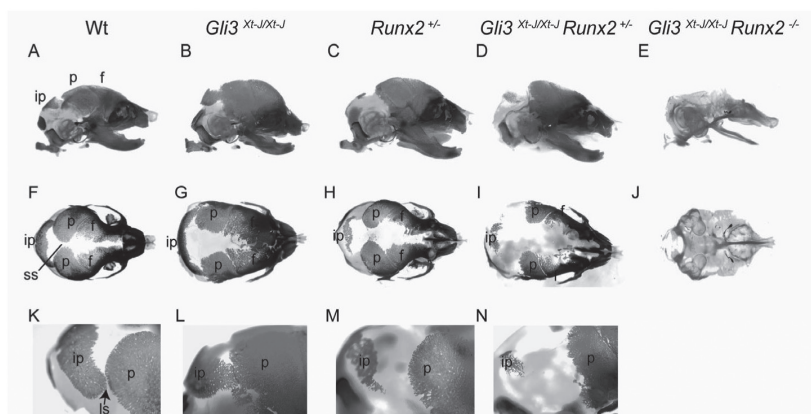
² 東京医科歯科大学大学院 歯学総合研究科 顎顔面矯正学分野



頭蓋冠縫合部は、隣接する頭蓋骨を結合する線維性の結合組織であり、脳容積の増大に伴う頭蓋冠の成長に重要な役割を果たす。特に、Osteogenic front (Of) とよばれる縫合部に接する頭蓋骨端においては、種々の遺伝子による緻密な骨芽細胞の増殖・分化制御がなされ、膜性骨の発生・成長に重要な役割を担っている。頭蓋冠縫合部早期癒合症 (Craniosynostosis) は、単一あるいは複数の縫合部が胎生期あるいは出生後早期に閉鎖する先天性の骨系統疾患であり、頭蓋顎顔面骨格に成長障害が惹起されるため、重篤な不正咬合を呈する事が多い。全 Craniosynostosis 患者の内、約30%は既知遺伝子 (FGFR1-3, MSX2, TWIST1, EFNB1, RAB23 等) の変異により発症するとされているが、詳細な病態成立機序の解明や、効果的な治療法の開発には至っていないのが現状である。

Gli3 は、zinc-finger transcription factor であり、主に Hedgehog (Hh) シグナルに対し抑制的に働く転写因子である。ヒトにおける Gli3 変異は、頭蓋の変形や多指症を主症状とする Greig Cephalopolysyndactyly Syndrome の原因となることが知られている。今回我々は Gli3 遺伝子欠損マウス (Gli3^{Xt-J/Xt-J}) がラムダ状縫合に早期石灰化を呈することに着目し、その縫合部における骨芽細胞の増殖・分化について検討したうえで、Craniosynostosis に対する非外科的な治療法の開発に向けての基礎的な研究を行ったので報告したい。

Gli3^{Xt-J/Xt-J} (E18) は全個体 (5/5) でラムダ状縫合における早期癒合症を呈した。野生型 (Wt) 頭蓋冠 (E15.5) を用いた Whole mount in situ hybridization 法により、頭蓋冠における Gli3 mRNA の発現部位は、ラムダ状縫合および前頭縫合に接する Of で限局的に認められた。E15.5 におけるラムダ状縫合部における種々の Hh シグナル関連分子および骨分化関連因子 mRNA 発現を In situ hybridization 法により検索したところ、Gli3^{Xt-J/Xt-J} では Patched1, Runx2-II, 及び Dlx5 等の明らかな発現上昇、および Twist1 の発現低下が観察され、縫合部における骨芽細胞分化の亢進が確認された。また、BrdU 取り込み実験によって細胞増殖能を検索したところ、Gli3^{Xt-J/Xt-J} では Of のみならず、縫合部中央部の間葉系細胞で有意な細胞増殖亢進が認められた。頭蓋冠器官培養系において、FGF2 除放ビーズを Gli3^{Xt-J/Xt-J} ラムダ状縫合に適応したところ、ビーズ周囲に Twist1 発現が誘導され、同部位における早期癒合を阻止した。最後に、Gli3/Runx2 複合変異マウスを作成したところ、Gli3^{Xt-J/Xt-J} Runx2^{+/-} マウスではラムダ状縫合の開存が全例 (5/5) で認められた。以上のことから、頭蓋冠縫合部の適切な発生には、Gli3 が重要な働きをすることが示唆され、Runx2 の機能を抑制することで、縫合部における早期石灰化が阻止されることが示された。以上の結果は、将来 RNAi 等を利用した craniosynostosis に対する非外科的治療法開発へのヒントとなることが期待される。



図;野生型および各変異マウスの頭部骨格標本 (アリザリンレッドアルシアンブル-二重染色)

Gli3^{Xt-J/Xt-J} マウス (E18.5) ラムダ状縫合 (ls) は早期石灰化により閉鎖する (L) が、Gli3^{Xt-J/Xt-J} Runx2^{+/-} では開存が認められた (N)。略記: f: frontal bone, ip: interparietal bone, ls: lambdoid suture, p: parietal bone.

2. 顎顔面先天異常に対する矯正歯科的対応とその課題

森山 啓司^{1,2}

¹ 東京医科歯科大学 硬組織疾患ゲノムセンター 未来医療展開部門

² 東京医科歯科大学大学院 歯医学総合研究科 顎顔面矯正学分野



一般に先天異常を有する患者の約7割に、何らかの顎顔面奇形を伴うといわれている。これらの中には、よほど注意しなければ気付かないごく軽微な小奇形から、一般の人でも容易に認識しうる重篤なものまで、きわめて大きなバリエーションが存在する。口腔顎顔面領域に生じる奇形は、咀嚼、嚥下、呼吸といった生命を維持する上で大切な生理機能に影響を及ぼすだけでなく、快適な社会生活を営む上で欠かせないコミュニケーションにも障害を引き起こすことから、患者・家族の心理社会的負担は大きなものとなる可能性が高い。

我が国の先天異常患者に対する歯科医療保険制度の歴史を振り返ってみると、昭和57年（1982年）に唇顎口蓋裂の歯科矯正治療に健康保険が適用されたのを皮切りに、平成14年（2002年）に第一・第二鰓弓症候群、鎖骨頭蓋異骨症、Crouzon 症候群、Treacher Collins 症候群、Pierre Robin 症候群、Downs 症候群の6種類の先天異常、平成16年（2004年）にはRussell-Silver 症候群、Turner 症候群、Beckwith-Wiedemann 症候群、Apert 症候群の4種類の先天異常に対して保険適

応が可能となった。さらに平成20年（2008年）および平成22年（2010年）の改正を経て、現在では33種類の疾患に対して保険適応が拡大されている。これら一連の改正は、個々の患者の障害克服を物心両面で支えてきただけでなく、矯正歯科が国民の健康を守る医療の重要な一分野であることを強く社会に訴える1つの象徴的な事象にもなっている。

顎顔面先天異常患者に対する治療においては、歯科がチーム医療の一員として重要な役割を担う。特に成長過程で顎口腔領域に表出する種々の形態異常や機能障害への対応において、矯正歯科が果たすべき役割は大きい。また、近年のヒトゲノムプロジェクトや分子遺伝学的研究の進歩によってその発症原因が遺伝子レベルで解明されてきており、これらの最新情報は医療従事者にとっても必要不可欠なものであるだけでなく、将来新たな治療体系を構築する上でも極めて重要と考えられる。本講演では、当科を受診した症例をもとに、各々の先天異常の原因や臨床的所見について概説するとともに、それらの治療例について供覧し今後の課題について考察してみたい。

歯科矯正に関する療養の給付の対象とする適応症

1982	2008	2010
1 唇顎口蓋裂	12 ロンベルグ症候群	24 筋ジストロフィ
	13 先天性ミオパチー	25 大理石骨病
2002	14 顔面半側肥大症	26 色素失調症
2 ゴールデンハー症候群（鰓弓症候群を含む）	15 エリス・ヴァン・クレペルト症候群	27 口—顔—指症候群
3 鎖骨・頭蓋骨異形成症	16 軟骨形成不全症	28 メービウス症候群
4 クルーゾン症候群	17 外胚葉異形成症	29 Kabuki syndrome
5 トリーチャー コリンズ症候群	18 神経線維腫症	30 クリッペル・トレノーネイ・ウェーバー症候群
6 ビエール ロバン症候群	19 基底細胞母斑症候群	31 ウィリアムス症候群
7 ダウン症候群	20 ヌーナン症候群	32 ビンダー症候群
2004	21 マルフアン症候群	33 スティックラー症候群
8 ラッセル・シルバー症候群	22 ブラダーウィリー症候群	
9 ターナー症候群	23 顔面裂	
10 ベックウィズ・ヴィードマン症候群		
11 尖頭合指症（Apert症候群）		

3. 口腔がんにおける診断マーカー探索

森田 圭一^{1,2}、小村 健^{1,2}

¹ 東京医科歯科大学 硬組織疾患ゲノムセンター 先端診断法開発部門

² 東京医科歯科大学大学院 歯学総合研究科 顎口腔外科学分野



口腔がんに対する治療は、摂食、嚥下、発音、審美といった患者のQOLに多大なる影響を及ぼすという特徴があり、根治性を追求した拡大手術ばかりを施行するのではなく、経過や予後の予測をも含む正確な診断に基づいたminimal invasive surgeryや機能温存治療を実践する必要がある。そこで今回我々は、この正確な診断法開発のための分子基盤解析について報告する。

口腔がんのマイクロアレイ解析により得られた分子プロファイルから、アポトーシスに関与するアダプター分子であるFADDがmRNAレベルで正常組織に比して高発現していることを見出した。このFADDは11q13.3に座位し、同部位は他のがんにおいてもゲノムの増幅がしばしば認められる領域であることから、口腔がん切除標本を用いて検討したところ、30症例中13症例（44.3%）でFADDの染色体上の増幅を確認した。また、この増幅は病理組織学的分化度との関連が認め

られた。そこで次に免疫組織染色法によるタンパクの発現を検討したところ、正常組織に比してがん病変部でFADDの高発現が認められた。また、FADDの高発現はリンパ節転移や疾患特異的累積5年生存率との関連も認められた。口腔がん培養細胞を用いた検討でも、いくつかの細胞種で、ゲノム増幅、mRNA高発現、タンパク高発現が認められた。以上より、FADDのゲノム増幅により引き起こされるタンパク高発現が病理組織学的分化度、すなわち癌の性質に影響を与え、その結果、リンパ節転移や予後に影響を与えることが明らかとなった。このことにより、リンパ節転移や予後を予測する分子マーカーの候補として有用である可能性が示唆された。しかし、FADDは細胞死を誘導する分子であり、これががんで高発現している意義については不明なことが多く、また受容体結合分子であるところのFADDが核内で高発現している点も解析がすすんでいないため、今後の検討課題である。

〈特別講演〉

4. 次世代シーケンサーによるがんの全ゲノムシーケンス解析

中川 英刀¹

¹ 理化学研究所 ゲノム医科学研究センター バイオマーカー探索・開発チーム チームリーダー



がんは、正常細胞のゲノムに様々な異常（突然変異、染色体異常など）が蓄積し、正常な分子経路が破綻した結果、無秩序な細胞増殖や転移をきたすことによって起こる“ゲノムの疾患”である事が解っています。近年、このゲノムの異常を標的として、分子標的薬などの新規の治療法や診断法が開発されてきており、がんゲノムの解読やゲノムの観点からのがんの理解は、がんの臨床に直結するものであります。しかし一方で、例えば同じ肺がんでもそれぞれのがんは異なるゲノム異常を持つこと、あるいは薬剤抵抗性を獲得するために新たな遺伝子変異を獲得することなど、がんゲノムは極めて多様で柔軟性に富んでいることも明らかになってきました。この“ゲノムの疾患”であるがんの全容を解明し新たな治療法や診断法の開発を促進するため、現在、次世代シーケンサーを用いたがんのゲノムシーケンス解析が世界中で行われています。国際連携研究であるICGC（国際がんゲノムコンソーシアム）のプロジェクトとして、我々は日本人やアジア人に多いウイルス性肝がんを対象にして全ゲノムシーケンス解析を行い、網羅的にがんの体細胞変異の検出を行って、がんゲノムのデータベースの構築を図っています。

次世代シーケンサーといった塩基配列の解読技術は、半導体のムーアの法則をはるかに超えるスピードで爆発的な進歩を遂げており、それに伴ってコストも急激に低下しています。2010年末の時点で、約3Gb（30億塩基対）のヒト全ゲノムシーケンス（Whole Genome Sequencing: WGS）のコストは100万円を切っており、近い将来は1000ドル以下になるものと予測されています。がんゲノムのWGSを行うにあたって、がんは合計120 Gb以上（1200億塩基対）、正常は合計90Gb以上（900億塩基対）のシーケンスを行い、偽陽性5%以下を目標に解析アルゴリズムの構築を行っています。まずBWAアルゴリズムを用いてヒトレファレンス配列に対してマッピングを行い、フィルタリングの後、read 数を基にして、SNVやshort indelの

判定をがんと正常のゲノムでそれぞれ行います。また、CNVおよびrearrangementの検出も行います。がんゲノムのvariantsと正常ゲノムのvariantsとを比較することにより、がんでの体細胞変異の推定を全ゲノムレベルで行います。SNVおよびrearrangementに関して、PCRとSanger法によるシーケンスを行い、一例のC型肝炎関連の肝がん、計36個の遺伝子にアミノ酸置換やframeshiftを伴う突然変異と13個のrearrangementが確認されました。また、B型肝炎関連の肝がんにおいては、B型肝炎ウイルスゲノムの挿入点を確認されました。

これらシーケンサーから産出されるWGSのデータは膨大であり、この超大量のデータを解析するための情報解析技術の革新および次世代スパコンなどの計算資源の大幅な拡充が必須になってきます。我々は、現在、東大医科研ヒトゲノム解析センターの6000コアを有するスーパーコンピュータを駆使して、WGSの効率的な解析を行っております。そして極めて複雑な分子制御機構が働いている癌においては、ゲノムのみならず、RNA発現解析やエピゲノム解析など様々な領域の網羅的分子データを統合的に解析し理解しているというシステム生物学的な見地も重要であり、これら膨大なデータの生物学的な解釈が今後重要な課題になってくるものと考えられます。

＜略歴＞

中川 英刀（なかがわ ひでわき）

昭和41年（1966） 大阪生まれ。

昭和60年（1985） 兵庫県甲陽学院高等学校卒業

平成3年（1991） 大阪大学医学部医学科卒業

平成3年（1991） 大阪大学医学部第2外科 臨床研修医

平成4年（1992） 大阪大学付属病院ICU レジデント

平成5年（1993） 国立大阪病院外科 レジデント

平成8年（1996） 大阪大学医学部大学院博士課程入学

（2000年博士号取得）

家族性大腸癌およびその原因遺伝子の研究に従事

平成11年（1999） 米国オハイオ州立大学
 Human Cancer Genetics ポスドク
 家族性大腸癌や大腸癌のepigenetics研究に従事

平成15年（2003） 東京大学医科学研究所
 ヒトゲノム解析センター
 ゲノムシーケンス解析分野 助手

平成19年（2007） 同 准教授
 膵臓癌と前立腺癌のゲノム解析による
 分子標的の同定とその機能解析

平成20年（2008） 理化学研究所 ゲノム医科学研究センター
 バイオマーカー探索・開発チーム
 チームリーダー
 次世代シーケンサーによる癌ゲノム研究
 前立腺癌の遺伝子多型研究
 プロテオミクスにより疾患関連の血清
 バイオマーカーの探索

<学会員>

日本癌学会 評議員
 日本外科学会 認定医
 日本消化器外科学会 認定医
 日本癌治療学会会員 がん治療認定医
 日本膵臓学会会員
 American Association for Cancer Research（AACR）,
 active member

<賞与・助成金>

平成13年－平成14年 日本学術振興会特別研究員（PD）
 平成14年 The Scholar-in-Training Award for the 2002 AACR
 平成18年 第65回日本癌学会学術総会 日本癌学会奨励賞

<代表論文>

1. Fujimoto A, Nakagawa H, Hosono N, Nakano K, Abe T, Boroevick KA, Nagasaki M, Yamaguchi R, Shibuya T, Kubo M, Miyano S, Nakamura Y, and Tsunoda T. Whole genome sequencing and comprehensive variant analysis of a Japanese individual using massive parallel sequencing. *Nat Genet* 42, 931-936 (2010)
2. Akamatsu S, Takata R, Ashikawa K, Hosono N, Kamatani N, Fujioka T, Ogawa O, Kubo M, Nakamura Y, and Nakagawa H. A functional variant in NKX3.1 associated with prostate cancer susceptibility down-regulates NKX3.1 expression. *Hum Mol Genet* 19, 4265-4272 (2010)
3. Takata R, Akamatsu S, Kubo M, Takahashi A, Hosono N, Kawaguchi T, Tsunoda T, Inazawa J, Kamatani N, Ogawa O, Fujioka T, Nakamura Y, and Nakagawa H. Genome-wide association study identifies five new prostate cancer susceptibility loci in the Japanese population. *Nat Genet* 42, 751-754 (2010)

4. The International Cancer Genome Consortium. International network of cancer genome projects. *Nature* 464:993-998 (2010)
5. Tamura K, Furihata M, Tsunoda T, Ashida A, Nasu Y, Kumon H, Konaka H, Namiki M, Tozawa K, Kohri K, Tanji N, Miki T, Fujioka T, Shuin T, Nakamura Y, and Nakagawa H. Molecular features of hormone-refractory prostate cancer cells by genome-wide gene-expression profiles. *Cancer Res* 67: 5117-5125 (2007)
6. Hosokawa M, Takehara A, Matsuda K, Eguchi H, Ohigashi H, Ishikawa O, Shinomura Y, Imai K, Nakamura Y, and Nakagawa H. Oncogenic role of KIAA0101 interacting with PCNA in pancreatic cancer. *Cancer Res* 67:2568-2576 (2007)
7. Hampel H, Frankel WL, Martin E, Arnold M, Khanduja K, Kuebler P, Nakagawa H, Sotamaa K, Prior T, Westman J, Panescu J, Fix D, Lockman J, Comeras I, and de la Chapelle A. Population-wide screening for Lynch syndrome (hereditary non-polyposis colorectal cancer) . *N Engl J Med* 352:1851-1860 (2005)
8. Nakagawa H, Lockman JC, Frankel WL, Hampel H, Steenblock K, Burgart LJ, Thibodeau SN, and de la Chapelle A. Mismatch repair gene PMS2: Disease-causing germline mutations occur in patients whose tumors stain negative for PMS2 at immunohistochemistry but paralogous genes obscure mutation detection. *Cancer Res* 64: 4721-4727 (2004)
9. Nakagawa H, Yan H, Lockman J, Hampel H, Kinzler KW, Vogelstein B, and de la Chapelle A. Allele separation facilitates interpretation of potential splicing alterations and detection of genomic rearrangements. *Cancer Res* 62: 4579-4582 (2002)
10. Nakagawa H, Chadwick RB, Peltomäki P, Plass C, Nakamura Y, and de la Chapelle A. Loss of imprinting of IGF2 occurs by biallelic methylation in a core region of H19 associated CTCF-binding sites in colorectal cancer. *PNAS* 98: 591-596 (2001)

5. 先天異常疾患の原因となるゲノム異常の網羅的探索

林 深^{1,2}、稲澤 譲治^{1,2}

¹ 東京医科歯科大学 硬組織疾患ゲノムセンター 硬組織疾患ゲノム構造解析部門

² 東京医科歯科大学大学院 難治疾患研究所 分子細胞遺伝



精神遅滞 (mental retardation; MR) はIQ70以下で定義され、全人口の1~3%に存在するとされているが、その病態は多様である。MRは表現型 (phenotype) と遺伝形質 (genotype) の両面から診断されてきたが、臨床的に診断がつくのは全体の約2割と報告されている [Hunter. Am J Med Genet. 2000]。特に、顔面・骨・皮膚・内臓などの形態異常や機能異常を一定のパターンで共有する疾患群は先天異常症候群として確立され、診断の一助となっているが、それ以外の臨床的に非定型的な症例に対する検索は取り得る技法が限られてきたのが実情であった。

当教室では、高感度・高精度にゲノムコピー数異常 (copy number variants; CNV) を検出するツールであるアレイCGHを用いて過去5年間にわたり原因不明の多発奇形を伴う精神発達遅滞 (MCA/MR) 症例536例の解析を行い、102例に疾患原因となるCNVを見出して genotype と phenotype との連関を明らかにした [Hayashi

et al. J Hum Genet. 2010]。また、X連鎖性発達遅滞 (XLMR) が疑われる144家系を対象とした解析を行い、10家系 (6.9%) にXLMRへの関連が予想されるX染色体構造異常を指摘した [Honda et al. J Hum Genet. 2010]。これらのゲノム異常と表現型の連関 (genotype-phenotype correlation) を蓄積から、疾患に関連する遺伝子の報告を行っている。一例として、小頭症・小脳脳幹部低形成を伴うMRの原因遺伝子であるCASKの指摘を行うなど、MRにおける新たな疾患概念確立の契機となる報告が挙げられる [Hayashi et al. Am J Med Genet. 2008]。現在では、ゼブラフィッシュなどのモデル動物を用いた実験や、SNPアレイや次世代シーケンサーなど新しいゲノム解析技法を導入し、従前の検索ではなお原因不明である先天異常疾患の原因探索に取り組んでいる。

これまでの当教室における取り組みを述べるとともに、先天異常疾患の背景に存在する多彩なゲノム異常についてご報告する。

6. 軟骨分化における転写因子Runxの機能解析

木村 文子^{1,2}、阿江 啓介^{1,2}、大川 淳^{1,2}、四宮 謙一^{1,2}、竹田 秀^{2,3}

¹ 東京医科歯科大学 硬組織疾患ゲノムセンター 先端治療法開発部門

² 東京医科歯科大学大学院 医歯学総合研究科 整形外科科学分野

³ 慶応義塾大学 腎臓内分泌代謝内科



骨格を形成する大部分の骨は、軟骨原器が形成され分化した後に骨に置換される内軟骨性骨化によってつくられる。軟骨細胞分化では、未分化間葉系細胞から分化した軟骨細胞が増殖・肥大化によって成熟する。この分化過程を調節する転写因子としてSoxやRunxが知られており、その中で機能が不明であったRunx1について機能解析を行った。Runx1ノックアウトマウスは胎生致死となるため、間葉系細胞特異的Runx1欠損マウス (Prx1 Cre/Runx1 flox/flox) および軟骨特異的Runx1欠損マウス (a1 (II) Cre/Runx1 flox/flox) を作成し、さらにこれらのマウスにRunx2欠損マウスと交配させることで、Runx1の軟骨分化におけ

る作用、およびRunx1とRunx2との機能的関連について検討した。

間葉系細胞特異的Runx1欠損マウスでは出生時に胸骨の石灰化の遅延が認められ、また間葉系細胞特異的Runx1/Runx2二重欠損マウスでは胸骨が完全に欠損していた。一方で、軟骨特異的Runx1欠損マウス、また軟骨特異的Runx1欠損/Runx2二重欠損マウスの骨格系には明らかな異常が認められなかった。この結果は、Runx1は間葉形細胞の軟骨細胞への分化を調節し軟骨細胞分化開始後には重要ではないことを示している。組織学的解析により、間葉系細胞特異的Runx1/Runx2二重欠損マウスの胸骨では間葉系細胞の凝集が

正常に認められたが、その後の軟骨細胞への分化が著しく障害されていることが分かった。またin situ hybridizationによる遺伝子発現解析を行ったところ、間葉系細胞特異的Runx1/Runx2二重欠損マウスの胸骨で分化調節転写因子であるSox5、Sox6の発現がほぼ消失していた。さらにin vitroの検討により、Sox6

が、Runx1とRunx2の軟骨細胞分化制御における標的遺伝子であることを示した。

これら一連の結果から、Runx1は、Sox5、Sox6の発現を介しRunx2と協調して間葉系細胞凝集後の軟骨細胞への分化を調節することを明らかにした

7. 骨粗鬆症性椎体骨折の治療と課題

大川 淳^{1,2}

¹ 東京医科歯科大学 硬組織疾患ゲノムセンター 先端治療開発学部門

² 東京医科歯科大学大学院 歯医学総合研究科 整形外科学分野



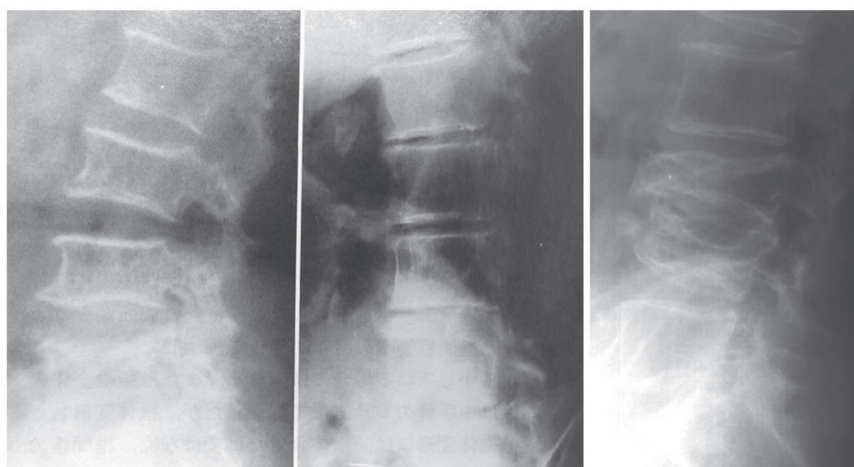
骨粗鬆症の有病者数は、我が国で1000万人を超えており、その中の5割は脊椎椎体骨折を経験する。適切な保存的治療で8-9割の患者が受傷前のQOL・ADLを獲得するものの、要介護状態の原因としては最も頻度が高い。その理由は、椎体骨折が治癒したとしても、円背・後弯変形による姿勢変化により腰背部痛、歩行障害などを引き起こすことが多く、さらに10%の症例で骨癒合が得られない偽関節状態に移行するからである。偽関節状態では、姿勢が変わるごとに椎体の形状が変化し、不安定な脊椎のために慢性的に強い痛みが生じて、寝たきりのきっかけとなることが多い。

一方、骨粗鬆症に対する治療法としては、骨吸収・形成のメカニズムの解明とともにビタミンD、ビスフォスフォネート、選択的エストロゲン受容体モジュレーター、副甲状腺ホルモンなどさまざまな薬剤が製品化されている。それらのprimary targetは骨折発生予防にあるが、いったん発生した骨折に対しては整形外科的治療が主体となる。

骨脆弱性骨折として数多く発生する手関節、股関節に対しては骨折型により保存治療、手術治療の選択が比較的容易で、最近では90歳を超える超高齢者に対しても必要であれば手術を行うことが普通になった。ところが、骨粗鬆性椎体骨折に関しては日本整形外科学会において、最近になっても「保存療法の指針策定のための探索的臨床研究」をプロジェクト研究として行っているように、現時点においてもなお保存的治療ならび

に早期手術適応が確定しているとは言い難い。保存治療は医療機関ごとに、安静臥床から始まって、体幹ギブス固定や軟性コルセットなどさまざまな治療が行われている。手術治療に関しても、経皮的な椎体内骨セメント注入から早期人工骨置換+脊椎固定術などさまざまなオプションがある。多種の治療法が乱立する背景には脊椎手術に対する心理的な抵抗感とともに、必ずしも十分ではない長期治療成績も影響しているかもしれない。さらに、脊椎を固定する手術では、隣接する椎体の術後新規骨折や椎間板組織の強度との相互関係(図)が、金属内固定材料の使用やその範囲に影響しうる。椎体・椎間板の相互関係には骨質や遺伝的背景が関与している印象があり、今後解析が望まれる。

本講演では、こうした高齢者における骨粗鬆症性椎体骨折に対する整形外科治療における現状の課題について解説する。



a. 椎間板・椎体とも保持

b. 椎間板狭小化、
椎体は保持

c. 椎間板保持、椎体は
骨折

図 手術治療に影響する高齢者腰椎における椎体・椎間板の相互関係

硬組織疾患ゲノムセンター 各部門の紹介

硬組織疾患分子医科学研究部門

教授 野田 政樹

併任、難治疾患研究所 分子薬理学 教授



准教授 江面 陽一

併任、難治疾患研究所 分子薬理学 准教授



(A) 悪性腫瘍骨転移に関わる分子機構の解明.

悪性腫瘍の骨転移に関わる分子機構解明のため、メラノーマ細胞株 (B16) を用いて検討しており、腫瘍細胞の遊走を促す走化性因子としてオステオポンチンの役割を示してきた。すなわち、インビトロ培養系に加えた外因性オステオポンチンは、腫瘍細胞の遊走を促進し、また腫瘍細胞に内因性に発現を誘導した場合においても、腫瘍遊走能は亢進し、オステオポンチン遺伝子欠損マウスに移植された B16 細胞は、野生型マウスに移植した場合に比べて遠隔転移が抑制された。同様に、転移の分子機構への関与の推定される Ciz (Cas-interacting zinc finger protein) についても、遺伝子欠損マウスを用いて検討を行っており、オステオポンチンと Ciz の相互関係についても検討をすすめている。

(B) 廃用性骨萎縮に関わる分子機構のゲノムワイドな探索.

廃用性骨萎縮を伴う重篤な骨粗鬆症に対する治療法開発には、その分子機構の解明が必須である。廃用性骨萎縮のモデル実験系としてマウス尾部懸垂モデルを利用して、上下肢長管骨の骨幹部、骨端部、骨髓および末梢血における網羅的な遺伝子発現の変化について探索をおこない、特にオステオポンチンの変化に注目して関連機構の解明を目指している。

(C) 軟骨細胞の分化過程におけるプロモーター領域 DNA メチル化調節の解析.

ヒト間葉系細胞の軟骨細胞への分化制御機構の解明のため、運動器外科学との共同研究により得られたヒト間葉系細胞を用いて遺伝子上流領域の DNA メチル化について解析している。骨系細胞分化におけるマスター遺伝子に加えて、網羅的な発現解析から選ばれた遺伝子上流領域について、軟骨細胞への分化誘導前後の比較解析をおこなった結果、代表的なメチル化変動遺伝子として SDF1 遺伝子を同定した。この遺伝子のメチル化制御と細胞分化制御との関連について解析し、またこのような変化を網羅的に同定するため、クロマチン沈降法を用いた検討を進めている。関節軟骨疾患に対する間葉系細胞移植による治療法の改良を目標として、異なる組織由来の間葉系幹細胞について、エピジェネティックな制御の関与について比較解析をおこなっている。

硬組織疾患ゲノム構造解析部門

教授 稲澤 譲治

併任、難治疾患研究所 分子細胞遺伝 教授



特任講師 林 深



ゲノム情報を基盤として、疾患の新しい診断・治療・予防方法の開発、ならびに基礎研究で得られた成果を臨床医学に展開する「トランスレーショナルリサーチ」に期待が寄せられています。当部門では、独自に開発したBACクローンによるMCG (Molecular Cytogeneticsの略) ゲノムアレイを用いて、口腔がん、骨軟部腫瘍をはじめとする種々のがん腫を対象としたゲノム一次構造異常やエピゲノム遺伝子制御機構、体系的遺伝子発現解析など統合的ゲノム解析を推進しています。各種がん

の原因遺伝子の同定し病態を明らかにすることによって、新たな診断法、治療法、予防法を開発し、難治がんの個別化医療の実現を目指しています。

顎顔面領域の形成異常は先天異常症 / 精神発達遅滞においてしばしば認められる合併症です。しかし、その90%以上は原因不明とされています。このような原因不明の先天異常疾患を対象に、私たちの研究室で開発したBACアレイというゲノム解析技術を用いて、病気の原因となる潜在的ゲノムコピー数異常 (Copy number variant, CNV) の解析を進めています。既に、700例以上で解析を終了し、20%以上の症例で疾患原因と判断できる病因性CNVを検出しました。現在、これらの成果に基づき原因不明とされてきた先天異常症の病態解明に取り組むとともに、日本人ゲノムのCNVデータベースの構築に取り組んでいます。私たちの研究室で開発した先天異常症診断用ゲノムアレイ (Genome Disorder Array; 通称GDアレイ) は2009年9月に実用化され、日常の遺伝外来においても利用されるようになってきており、既に医療貢献しています。

硬組織疾患ゲノム機能解析部門

教授 三木 義男

併任、難治疾患研究所 分子遺伝 教授



口腔癌および骨軟部腫瘍を対象にゲノム科学を応用することによって発癌機構の解明をめざす。特にトランスクリプトーム情報を基盤に生命現象としての癌の解明と同時に、その過程で得られる情報を癌治療に応用し、オーダーメイド医療の実現を目指した研究を展開する。

(1) トランスクリプトーム解析による口腔扁平上皮癌の浸潤転移、治療感受性の解析

近年の分子生物学的手法の進歩により、トランスクリプトーム情報を利用して癌の生物学的個性を評価することが可能となった。本プロジェクトでは、口腔癌において、「放射線感受性」「抗癌剤感受性」「浸潤転移能」「リンパ節転移」予測におけるトランスクリプトームの有用性について検討を進めている。具体的成果として、口腔扁平上皮癌組織53症例を対象にLaser microbeam microdissection法により癌組織を選択的採取、Affymetrix社GeneChipにより網羅的遺伝子発現解析を行い、頸部リンパ節転移診断モデルを構築、次いで

構築したモデルを検証し正答率は92.3%であった。このように臨床的にも病理学的にも困難なリンパ節転移に対し、遺伝子発現情報を指標にした有用性の高い予測診断システムを開発した。(Nguyen ST, et al., Cancer Sci. 2007; 98: 740-6.)

(2) 骨軟部腫瘍患者における網羅的発現解析の臨床的有用性に関する検討

整形外科領域の腫瘍で、病理学的診断において、良悪性の診断に難渋する症例に時に遭遇する。また、病理学的診断が必ずしも術後の生物学的悪性度と関連していない場合がある (liposarcoma mixed type, chondrosarcomaなど)。これら腫瘍のトランスクリプトーム解析による生物学的悪性度の診断指標を検討する。これまでに、脂肪肉腫29例、脂肪腫30例についてAffymetrix expression arrayを用いた解析を行った。また、脂肪肉腫37例、脂肪腫35例について行いAffymetrix 500K mapping arrayを用いたcopy number解析が進行中である。発現解析については、両者の鑑別に有用な候補遺伝子の選定を行うと同時に、さまざまなDNA増幅パターンを組み合わせ、脂肪性腫瘍の段階的悪性化マーカーの開発を目指している。

口腔領域疾患・病理情報解析部門

研究教授 津田 均

併任、国立がんセンター中央病院臨床検査部病理検査室



形態学的なアプローチにより口腔領域疾患、硬組織腫瘍の研究を進めている。ヘマトキシリン・エオジン（HE）染色組織標本の検鏡や免疫組織化学法による分子変化の同定を行い、定量 RT-PCR 法やウエスタンブロット法による mRNA やたんぱく質のデータと比較している。また FISH 法や PCR-LOH 法により腫瘍におけるゲノムレベルの異常を同定し、頭

頸部悪性腫瘍のほか、乳癌、膵癌、肝癌、卵巣癌、消化器癌などの診断マーカーや治療標的分子を見出した。腫瘍の骨転移巣や口腔癌でも同様のアプローチによる検討を行っている。近年では、頭頸部扁平上皮癌における Connective tissue growth factor (CTGF) の発現の免疫組織化学的検討、転移性脊椎腫瘍における Receptor activator of nuclear factor κ B ligand (RANKL) や osteoprotegerin (OPG) の発現の免疫組織化学的検討などを行った。他部門とも共同研究を行い、特に免疫組織化学による腫瘍組織における発現スクリーニング、マイクロダイセクションの際の癌細胞の同定などを担当してきた。

先端診断法開発部門

教授 小村 健

併任、医歯学総合研究科
顎口腔外科学分野 教授



特任講師 森田 圭一



口腔癌に対する治療において根治性を確保するために、現在まで一定の安全域を設けた切除、転移の可能性のある頸部リンパ節の郭清を中心とし、これに放射線・化学療法を組み合わせた治療が行われてきた。しかし、これまでの診断技術を駆使しても、微小リンパ節転移や生命予後を完全に予測することは難しく、低侵襲治療やオーダーメイド治療実現のために、より正確な予測を可能にする診断技術が必要になってきている。

そこで当部門は、口腔癌および口腔前癌病変を対象とし、トップレベルの治療成績と豊富な臨床データをもとに、基礎と臨床のトランスレーショナルリサーチを推進し、エビデンスに基づいた先端診断法の開発を目標とする。現在、臨床における病変組織のサンプリングおよびデータベース化をすすめ、当センター内他部門や他施設との共同研究を中心に、同組織サンプルや培養細胞株を用いた遺伝子およびタンパク解析を行っている。その中には、マイクロアレイを用いた新たな口腔前癌病変診断法の検討、網羅的解析により抽出した遺伝子の機能解析、プロテオミクスによるバイオマーカー開発の試みやリンパ節転移予測分子の検討が含まれる。当部門としては、これらバイオマーカーを用いて、口腔癌・前癌病変の早期発見・検診システムの構築、正確な診断に基づいた手術療法における minimal invasive surgery の実践を目指している。

先端治療法開発部門

准教授 大川 淳

併任、先端医療開発学系
先端外科治療学 整形外科学分野 准教授



助教 阿江 啓介

併任、先端医療開発学系、先端外科治療学
整形外科学 助教



特任助教 木村 文子



先端治療開発部門は整形外科からのスタッフおよび硬組織疾患ゲノムセンター特任助教で構成され、骨軟部腫瘍と骨再生をテーマとした研究を目指している。

骨軟部腫瘍の発生頻度は他の癌腫と比べると非常に少ないものの、病理分類は多岐にわたっている。外科治療に関しては手術標本による切除縁の解析により、全体では90%以上の症例で再発を防げる切除範囲が明らかになっている。その結果、近年治療の目標は低い再発率の維持と患肢機能の温存あるいは再建に移行しつつある。そこで、われわれは骨軟部腫瘍ごとの生物学的態度や治療に対する応答多様性に対応するために、多施設共同のバイオリソースバンクを設立して腫瘍の新鮮凍結標本と臨床情報の集

積を行ってきた。今後、これを活用して分化の方向性、増殖、浸潤、転移、化学療法応答性など診断、予後判定、治療に関わるバイオマーカーを抽出してオーダーメイド治療を行うことを目指している。

また、腫瘍切除後の大きな骨欠損に対して、早期に骨組織の再生、再建が可能となる治療法を開発することがもう一つの臨床的課題である。骨欠損の修復には再生医工学の手法が用いられるが、足場材料、骨形成細胞、骨芽細胞分化を促進する薬剤の三者が重要である。足場材料に関しては、多孔質ハイドロキシアパタイト・コラーゲン複合体を新規開発し、特許取得後、本年度に臨床治験が終了、現在承認申請準備中である。また、骨形成に関しては、骨髄由来間葉系細胞（MSCs）の分化能について検討を行い、分化抑制因子の発現をサルノ異所性骨化モデルで確認した。さらに、マイクロアレイ解析やsiRNAなどの手法を用いて候補因子は絞り込んでいる。また、骨芽細胞の分化に重要な増殖因子のひとつとしてBMPsがあるが、ヒトなどの高等動物では高濃度が必須とされており、コストの問題でその普及を妨げている要因となっている。そこで、MSCs分化能の増強因子を探り、デキサメサゾン（DEX）が候補になりうることを確認した。さらにBMPsとDEXを浸透させた人工骨によりBMP-2単独に比較して2.5~3倍の骨形成量が得られた。こうした現象のメカニズムを検討することで、より効率的に骨芽細胞分化を促進する手法を見出していく予定である。

教授 森山 啓司

併任、医歯学総合研究科
顎顔面矯正学分野 教授

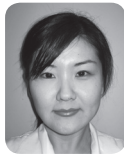


助教 小川 卓也

併任、医歯学総合研究科
顎顔面矯正学分野 助教



特任助教 小林 起穂



顎顔面矯正学分野では、種々の先天的あるいは後天的原因によって引き起こされる不正咬合に対し、多角的な観点から研究が行われている。各疾患の病態成立機構の解明、診断法の改良・開発、新規治療法の確立等を目的として構成された各研究グループによって研究活動が行われている。その内容は基礎的研究から臨床的研究まで多岐にわたり、基礎的研究成果を効果的な治療・診断・予防法へと還元することを目的としている。硬組織疾患にかかわる研究として当分野で行われている内容として、

1 頭蓋冠縫合部早期癒合症の病態成立機構の解明と新規治療法開発への基礎的研究；頭蓋冠縫合部早期癒合症を呈する Apert 症候群のモデルマウスを用いて、本疾患の病態成立機構について解析を行い、非侵襲的な治療法の開発を行っている。また、これら先天性硬組織疾患に対する効果的なドラッグデ

リバリーシステムの構築を目指し、ナノバイオテクノロジーを応用した基礎的研究を行っている。また、Saethre-Chotzen 症候群の責任遺伝子 TWIST1 について、その発現調節機構および上皮間葉移行における役割について研究を行っている。

2 家族性多数歯欠損症に見られる欠損部位・歯数の genotype-phenotype correlation; 家族性多数歯欠損症を有する家系からゲノム DNA を抽出し、原因遺伝子である PAX9 や MSX1 における変異解析を行い、各変異と欠損部位・歯数との相関性を明らかにすることを目的としている。

3 上顎骨および歯槽骨骨延長術の改良、および治療成績の向上に向けた研究；骨延長術装置、術式の改良を検討するとともに、延長部位の速やかな骨形成の促進作用が期待される高気圧酸素法の有効性の評価を行っている。また術後の骨形成状態について超音波画像診断を適応している。

4 口唇裂発症における Tbx22 の機能解析；転写因子 Tbx22 の口唇裂発症における役割を解明し、顎顔面領域の発生における本因子の機能解析を行っている。

5 エナメル芽細胞および象牙芽細胞由来細胞外基質の硬組織における機能解析；歯の発生段階において分泌される細胞外基質タンパクによる細胞外からのシグナル伝達に着目し、歯・骨組織における未知の役割について解析を行なっている。

教授 秋吉 一成

併任、生体材料工学研究所 客員教授



准教授 佐々木 善浩

併任、生体材料工学研究所
有機材料分野 准教授



ドラッグデリバリーシステム（DDS）の開発は、再生医療やナノ医療における重要な課題の一つである。我々は、新規ナノキャリアとしてナノゲルやリポソームの研究を展開している。世界に先駆けて開発したナノサイズのネットワークを有する両親媒性多糖ナノゲルは、タンパク質、遺伝子、siRNA, microRNA など、サイトカインやバイオ医薬分子を効率よく取り込み、安定化し、それらの徐放制御や細胞内取り込みを促進しえる DDS ナノキャリアとしての利用を図っている。

このナノゲルは、タンパク質を安定に取り込み凝集を抑制し、もとの活性を保持して徐放しえるいわゆるシャペロン機能を有するまた、このナノゲルを

集積、架橋したヒドロゲル材料を開発し、骨再生の足場材料としての利用を行っている。

多糖ナノゲルは抗原タンパク質を容易に内包しえ、50 nm 以下の安定な複合体ナノ微粒子を形成した。例えば、癌遺伝子産物としての erbB2 抗原タンパク質を内包した CHP ナノゲルを胆癌マウスの皮下に投与すると、抗体を産生するヘルパー T 細胞のみならず、抗腫瘍性のキラー T 細胞が効率よく誘導される。2004 年から臨床試験も行われその有効性が実証されている。特に食道がんに対する治療効果は顕著にみられ、現在 I 相試験が進んでいる。また、最近カチオン性多糖ナノゲルが経鼻ワクチンのキャリアとして極めて有用であることも明らかになった。

多糖ナノゲルで架橋されたポリエチレングリコールハイブリッドゲルは、骨形成促進に関与する PGE2 (プロスタグランジン E2)、インターロイキン 12 や BMP などのサイトカインの徐放制御により、効率よく骨を再生する足場材料として機能することを明らかにしている。

本センターで得られる疾患に関する種々の情報を盛り込んだドラッグデリバリーシステムを開発し新規ナノ医療システムを開発することを目的としている。

硬組織疾患ゲノムセンターの組織構成

- | | |
|--------------------|--|
| 1. 硬組織疾患分子医科学研究部門 | 教授 野田 政樹 (併任)、准教授 江面 陽一 (併任) |
| 2. 硬組織疾患ゲノム構造解析部門 | 教授 稲澤 譲治 (併任; センター長)、特任講師 林 深 |
| 3. 硬組織疾患ゲノム機能解析部門 | 教授 三木 義男 (併任) |
| 4. 口腔領域疾患・病病情報解析部門 | 研究教授 津田 均 (併任) |
| 5. 先端診断法開発部門 | 教授 小村 健 (併任)、特任講師 森田 圭一 |
| 6. 先端治療法開発部門 | 准教授 大川 淳 (併任)、助教 阿江 啓介 (併任)、
特任助教 木村 文子 |
| 7. 未来医療展開部門 | 教授 森山 啓司 (併任)、助教 小川 卓也 (併任)、特任助教 小林 起穂 |
| 8. ナノ医療展開部門 | 教授 秋吉 一成 (併任)、准教授 佐々木 善浩 (併任) |