

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15549

研究課題名(和文) 成長板軟骨の分化増殖機構における変異NLRP3の機能解析

研究課題名(英文) Functional analyses of mutant NLRP3 on the growth and differentiation of growth plate chondrocytes

研究代表者

戸口田 淳也 (Toguchida, Junya)

京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・教授

研究者番号：40273502

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：CINCA症候群はインフラマゾームの構成因子であるNLRP3遺伝子のヘテロ変異を原因とし、慢性炎症症状に加えて関節変形を伴うことを特徴とする自己炎症疾患である。関節変形の原因である成長軟骨板の増殖分化異常の分子機構を明らかにするために、モザイク患者から樹立した変異陽性と陰性のiPS細胞のそれぞれを蛍光色素遺伝子で標識した。そしてそれぞれを軟骨細胞に分化誘導した後に、培地を共有できる培養装置を用いて共培養実験を行った。その結果、モザイク患者においては、変異陽性細胞が分泌因子を介して変異陰性細胞に作用していることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：CINCA syndrome is one of auto-inflammatory diseases with a heterozygous mutation of NLRP3 gene and characterized as showing joint deformities along with symptoms related to chronic inflammation. To investigate the molecular mechanisms causing the abnormal growth plate, iPS cells with and without mutant NLRP3 gene were established and labeled with different markers, which can distinguish them. Chondrocytes were induced from each type of iPS cells and were cultured under the condition in which they shared culture supernatants. The results indicated that chondrocytes with mutant NLRP3 affected the phenotype of chondrocytes without the mutant gene by producing soluble factors.

研究分野：整形外科学、分子腫瘍学、幹細胞生物学

キーワード：CINCA症候群 NLRP3 成長軟骨 iPS細胞

1. 研究開始当初の背景

クライオピリン関連周期熱症候群 (Cryopyrin Associated Periodic Syndrome, CAPS) は、インフラマゾームの主たる構成因子の一つである NLRP3 遺伝子のヘテロ変異が原因となり、慢性炎症症状を呈する自己炎症疾患群であり、最も重症なものが関節症状を伴う CINCA 症候群 (Chronic Infantile Neurologic Cutaneous and Articular Syndrome) である。関節症状は CINCA 症候群における他の症状とは異なり炎症所見に乏しく、成長板軟骨の異常増殖像を呈する。我々は体細胞性モザイクの CINCA 症候群患者より、変異陰性と変異陽性の iPS 細胞を樹立し、変異陽性細胞が陰性細胞に比して、軟骨関連遺伝子の発現が早期から誘導され、かつ基質形成能も著しく亢進していることを見出した。更に NLRP3 から IL1 β までインフラマゾームの各ステップの因子に関する阻害剤を用いても、観察された軟骨分化能の亢進はキャンセルされなかったことより、軟骨病態はインフラマゾーム非依存性の現象であることが判明した。そして SOX9 遺伝子の発現を指標とした解析により、変異陽性細胞では cAMP~PKC~CREB のシグナルが亢進していることを見出した。

これらの結果から、NLRP3 変異細胞ではインフラマゾーム非依存性に何らかの因子が産生され、cAMP を増加させるシグナルを伝達しているという仮説が想定される。一方、変異細胞が 10% 程度のモザイク患者でも経配偶子性変異患者 (即ち全て変異陽性細胞) と、同等の成長板軟骨の異常増殖像を呈するという臨床所見も報告されている。これらの事実より、モザイク患者においては変異陰性細胞も変異陽性細胞より、何らかのシグナルを受取り、異常な増殖分化を遂げているのではないかという仮説が想定できる。

2. 研究の目的

以上の背景から、本課題では成長板軟骨細胞の異常増殖における変異陽性細胞と陰性細胞の相互作用に着目し、その分子機構を解明することを目的と、新規の培養器具を用いた共培養系等により、変異 NLRP3 により活性化される細胞間相互作用因子を同定することを目指した。その結果は CINCA 症候群における軟骨病変に対する新規治療法の開発とともに、成長板軟骨の増殖分化機構の理解にも寄与するものとなることが期待される。

3. 研究の方法

- (1) 変異陽性及び変異陰性細胞のラベリング: 変異陰性及び変異陽性 CINCA 細胞にそれぞれ、GFP 及び mCherry 遺伝子を発現するベクターを導入し、それぞれを識別できる系を確立する。
- (2) 混合培養による相互作用の解析: それぞれの iPS 細胞を、これまでに確立した

培養法により軟骨前駆細胞へ分化誘導する。そして同量を混合した細胞集団を用いて、2D 及び 3D の軟骨分化誘導実験を行う。誘導された軟骨組織における蛍光状態を観察した後、それぞれの分化能を定量的に評価し、変異陰性あるいは陽性細胞を単独で分化誘導した場合の結果と比較検討する。2D の分化誘導後、酵素処理により単一細胞とし FACS を用いて、陰性細胞と陽性細胞に分離し、それぞれの集団に関して、トランスクリプトーム及びプロテオーム解析を行い、特に変異陰性細胞が混合培養によってどのような変化を遂げたのかを詳細に解析する。

- (3) 培地共有培養による相互作用の解析: 相互作用が細胞接触を必要とするものであるのか、分泌される因子によるものかを、連携研究者 (島崎) が開発した培地共有培養装置を用いて解析する。標識した変異陽性および陰性 iPS 細胞を、軟骨前駆細胞へ分化誘導した後、フィルターで隔別された well に細胞を播種して、2D の軟骨分化誘導実験を行う。最終的に形成された軟骨塊の定量的評価、サイズ及び基質としての GAG の定量的評価を行い、細胞塊を形成している細胞の遺伝子発現等を評価する。

4. 研究成果

- (1) 変異陽性及び変異陰性細胞のラベリング: 変異陰性及び変異陽性 CINCA-iPS 細胞にそれぞれ、GFP 及び mCherry 遺伝子を発現するベクターを、AAVS 遺伝子座に導入し、それぞれを識別できる系を確立した。導入遺伝子は、軟骨分化誘導後も蛍光を発色し、細胞識別マーカーとして適切であることを確認した。
- (2) 混合培養による相互作用の解析: 標識した変異陰性及び変異陽性 CINCA-iPS 細胞を、これまでに確立した神経堤を経る培養法により軟骨前駆細胞へ分化誘導し、その後両者をいくつかの比率で混合した細胞集団を作製し、3D の軟骨分化誘導実験を行った。その結果、変異細胞を少数混合した場合でも、変異細胞のみのもとの細胞塊のサイズは同等となることが判明し、やはり細胞間相互作用が存在している可能性が示唆された。
- (3) 培地共有培養による相互作用の解析: 次に上記と同様に、変異陰性及び変異陽性 CINCA-iPS 細胞を軟骨前駆細胞へ分化誘導した後、両者を細胞が接触することなく、かつ培地を共有できる培養器具を用いて 2D の軟骨分化誘導実験を行った。その結果、変異陰性細胞同士で培養上清を共有したものと比較して、変異陽性細胞と共有した場合、変異陰性細胞による軟骨組織のサイズが増大することが判明した。この結果は、変異陽性細胞が変異陰性細胞に対して分泌因子を介して作用している可能性を示唆する。

(4) 遺伝子改変細胞の作製：H27年度の研究において、モザイク患者における変異陰性 iPS 細胞と変異陽性 iPS 細胞の機能を複数のクローン間で比較検討したところ、同じタイプ（陽性あるいは陰性）の iPS 細胞でもクローン間で軟骨分化能に無視できない相違があることが判明した。この結果は、変異の有無による影響を正確に評価することが困難であることを示唆する。そこでモザイク患者由来の変異陰性 iPS 細胞に NLRP3 遺伝子の変異を、ゲノム編集技術を用いて導入した人工的変異 iPS 細胞を作製して、もとの iPS 細胞と比較する方針に変更し、その細胞の作製を行った。

(5) in vivo での分化能評価：(3) で作製した変異細胞が、CINCA 症候群のモデル細胞として適切であるのかについて、in vitro で作製した軟骨塊を免疫不全マウスの移植し、患者の成長軟骨板に発生する病変に類似した病変が形成されるのかについて解析した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計4件)

- (1) Hayashi Y, Hsiao EC, Samia S, Lanceroa M, Schlieve CR, Nguyena T, Yano K, Nagahashie A, Ikeya M, Matsumoto Y, Nishimura K, Fukuda A, Hisatake K, Tomoda K, Asaka I, Toguchida J, Conklin BR, Shinya Yamanaka. BMP-SMAD-ID promotes reprogramming to pluripotency by inhibiting p16/INK4A dependent senescence. Proc Natl Acad Sci U S A. 2016;113(46):13057-13062. 査読有. DOI: 10.1073/pnas.1603668113
- (2) Hino K, Ikeya M, Horigome K, Matsumoto Y, Ebise H, Nishio M, Sekiguchi K, Shibata M, Nagata S, Matsuda S, Toguchida J. Neofunction of ACVR1 in Fibrodysplasia Ossificans Progressiva. Proc Natl Acad Sci U S A. 2015;112(50):15438-43. 査読有. DOI: 10.1073/pnas.1510540112.
- (3) Jin Y, Elalaf H, Watanabe M, Tamaki S, Hineno S, Matsunaga K, Woltjen K, Kobayashi Y, Nagata S, Ikeya M, Kato T Jr, Okamoto T, Matsuda S, Toguchida J. Mutant IDH1 Dysregulates the Differentiation of Mesenchymal Stem Cells in Association with Gene-Specific Histone Modifications to Cartilage- and Bone-Related Genes. PLoS One. 2015;10(7):e0131998. 査読有. DOI: 10.1371/journal.pone.0131998.
- (4) Matsumoto Y, Ikeya M, Hino K,

Horigome K, Fukuta M, Watanabe M, Nagata S, Yamamoto T, Otsuka T, Toguchida J. New Protocol to Optimize iPS Cells for Genome Analysis of Fibrodysplasia Ossificans Progressiva. Stem Cells. 2015;33(6):1730-42. 査読有. DOI: 10.1002/stem.1981.

〔学会発表〕(計15件)

- (1) 関口和也、日野恭介、池谷真、戸口田淳也：iPS 細胞を活用した進行性骨化性線維異形成症の病態解析 第27回小児整形外科学会学術集会. 2016.12.1-2. 仙台国際センター（宮城県仙台市）
- (2) 戸口田淳也、日野恭介、池谷真、関口和也、金永輝、岡本健、吉富啓之、松田秀一：疾患特異的 iPS 細胞を活用した骨格疾患の病態解明・創薬 第31回日本整形外科学会基礎学術集会. 2016.10.14. 福岡国際会議場（福岡県福岡市）
- (3) 川井俊介、羽田匡孝、小山優子、池谷真、Cantas Alev、堀田秋津、池川志郎、中村雅也、松本守雄、吉富啓之、松田秀一、戸口田淳也：家族性 OPLL 患者由来の iPS 細胞を用いた、OPLL 遺伝的要素の検討 第31回日本整形外科学会基礎学術集会. 2016.10.13-14. 福岡国際会議場（福岡県福岡市）
- (4) Kawai S, Hada M, Koyama Y, Ikeya M, Alev C, Hotta A, Ikegawa S, Nakamura M, Yoshitomi H, Matsuda S, Toguchida J. Evaluation of genetic factors of OPLL using patient-specific iPSCs. ISSCR 2016 Annual Meeting. 2016.6.22-25. San Francisco (USA)
- (5) Tamaki S, Watanabe M, Yamamoto R, Yoshitomi H, Nishikomori R, Toguchida J. Investigation of molecular mechanism underlying enhanced chondrogenesis in neonatal-onset multisystem inflammatory disease using patient-derived induced pluripotent stem cells. ISSCR 2016 Annual Meeting. 2016.6.22-25. San Francisco (USA)
- (6) Watanabe M, Yamamoto R, Tamaki S, Ikeya M, Yoshitomi H, Sato T, Toguchida J. Metabolomic analysis-based identification of predictive markers for differentiation of human iPS cells into cartilage cells ISSCR 2016 Annual Meeting. 2016.6.22-25. San Francisco (USA)
- (7) Toguchida J, Hino K, Ikeya M, Horigome K, Matsumoto Y, Ebise H, Nishio M, Sekiguchi K, Shibata M, Nagata S, Matsuda S. Neofunction of ACVR1 in Fibrodysplasia Ossificans Progressiva ISSCR 2016 Annual Meeting. 2016.6.22-25. San Francisco (USA)
- (8) 玉置さくら、渡辺真、梅田雄嗣、西小森

- 隆太、戸口田淳也：疾患特異的 iPS 細胞を用いた成長軟骨病態解析. 第 27 回日本整形外科学会骨系統疾患研究会. 2015.12.5. 長良川国際会議場（岐阜県岐阜市）
- (9) 松本佳久、池谷真、福田誠、永田早苗、浅香勲、大塚隆信、戸口田淳也：疾患特異的 iPS 細胞を用いた創薬に向けた薬剤スクリーニング系の構築. 第 30 回日本整形外科学会基礎学術集会. 2015.10.23. 富山国際会議場（富山県富山市）
- (10) 松本佳久、池谷真、福田誠、日野恭介、大塚隆信、戸口田淳也：遺伝子改変を行った iPS 細胞を用いた進行性骨化性線維異形成症の病態解明及び創薬に向けた評価系の構築. 第 125 回中部日本整形外科学会災害外科学会. 2015.10.3. ウィンクあいち（愛知県名古屋市）
- (11) 戸口田淳也、横山宏司、玉置さくら、池谷真、田中孝之、斉藤潤、梅田雄嗣、中畑龍峻、平家俊男、西小森隆太：疾患特異的 iPS 細胞を用いた CINCA 症候群における成長軟骨病態の解析. 第 1 回骨免疫学会. 2015.7.1. ホテルブリーズベイマリーナ宮古島（沖縄県宮古島市）
- (12) Toguchida J, Yokoyama K, Umeda K, Saito KM, Ikeya M, Nakahata T, Heike T, Nishikomori R. Enhanced chondrogenesis of induced pluripotent stem cells from patients with neonatal-onset multisystem inflammatory disease occurs via the caspase 1-independent cAMP/PKA/CREB pathway. 第 13 回 ISSCR. 2015.6.27. Stockholm(Sweden)
- (13) Matsumoto Y, Ikeya M, Fukuta M, Nagata S, Otsuka T, Toguchida J. Establishment of new drug screening system using fibrodysplasia ossificans progressiva iPS cells. 第 13 回 ISSCR. 2015.6.26. Stockholm(Sweden)
- (14) 松本佳久、池谷真、福田誠、永田早苗、浅香勲、大塚隆信、戸口田淳也：疾患特異的 iPS 細胞を用いた進行性骨化性線維異形成症の創薬に向けた薬剤スクリーニング系の構築. 第 88 回日本整形外科学会学術総会. 2015.5.23. 神戸国際会議場（兵庫県神戸市）
- (15)戸口田淳也、松本佳久、横山宏司、松田秀一、西小森隆太、池谷真：疾患特異的 iPS 細胞を活用した難治性骨軟骨疾患の病態解明. 第 88 回日本整形外科学会学術総会. 2015.5.22. 神戸国際会議場（兵庫県神戸市）

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

なし

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

戸口田 淳也 (TOGUCHIDA, Junya)
京都大学・ウイルス・再生医科学研究所 .
教授
研究者番号：4 0 2 7 3 5 0 2

(2)研究分担者

池谷 真 (IKEYA, Makoto)
京都大学・iPS 細胞研究所・准教授
研究者番号：2 0 4 4 2 9 2 3

(3)研究分担者

金 永輝 (JIN, Younghui)
京都大学・医学研究科・特定助教
研究者番号：9 0 6 2 0 3 4 4

(4)連携研究者

島崎 猛夫 (SHIMAZAKI, Takeo)
金沢医科大学・総合医学研究所・准教授
研究者番号：5 0 3 7 7 4 2 0