

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15733

研究課題名(和文) 線維性骨異形成症特異的iPS細胞による病態解明と創薬への応用

研究課題名(英文) Elucidation of fibrous dysplasia pathogenesis using disease-specific iPS cells and application to drug discovery

研究代表者

星 和人 (HOSHI, Kazuto)

東京大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：30344451

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)：線維性骨異形成症は正常な骨が幼若な骨や結合組織に置き換わる疾患で、骨の変形や病的な骨折を主症状とする。発症原因のひとつとしてGNAS1遺伝子の変異が知られている。治療方法は骨減量術のみであり、根本的な治療薬はない。そのため有効な治療薬の開発が望まれている。線維性骨異形成症の病態機序の解明、治療薬の創薬には同疾患の病変細胞が大量に必要となる。そこで我々はゲノム編集技術によりiPS細胞にGNAS1遺伝子変異を組み込むことで、病変細胞を大量に作出するツールとなるGNAS1変異iPS細胞を作出した。さらに本疾患の治療に有効な化合物を検索するための化合物スクリーニング系を構築した。

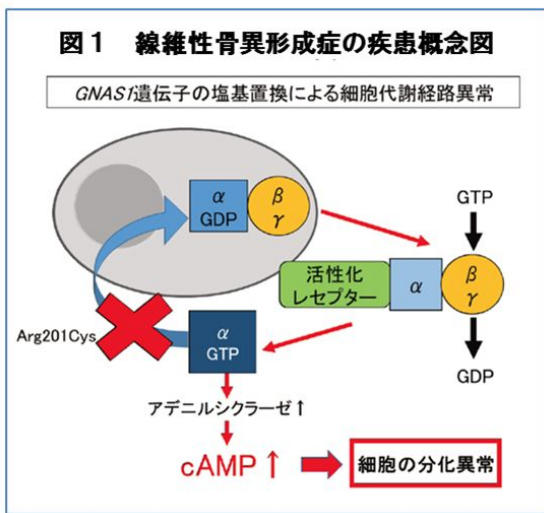
研究成果の概要(英文)：Fibrotic dysplasia is a disease in which normal bones replace with young bones and connective tissues, resulting in bone deformity and pathological fractures as the main symptoms. Mutation of the GNAS1 gene is known as one of the causes of onset. Currently, the only treatment method for the disease is bone loss surgery, and no fundamental therapeutic agent has been developed yet. To elucidate the pathophysiology of fibrotic dysplasia and discover therapeutic drugs, a large amount of lesion cells of the disease are required. Therefore, we incorporated GNAS1 mutant genes into iPS cells by genome editing technology to obtain GNAS1 mutant iPS cells, which could be a tool for producing large amounts of diseased cells. In addition, we constructed a screening system to investigate compounds effective for the treatment of this disease.

研究分野：再生医療、口腔外科学

キーワード：線維性骨異形成症 疾患特異的iPS細胞 ゲノム編集 創薬

1. 研究開始当初の背景

線維性骨異形成症は正常な骨が幼弱な骨・線維組織によって置換される疾患で、骨の膨隆・変形や病的骨折を主症状とする。全身の骨に発症する可能性があるが、顎骨や顔面骨、頭蓋骨に比較的高い頻度で発症する。このような顎・顔面の骨に線維性骨異形成症を発症すると、幼少から思春期の多感な時期に顔貌の重大な変形を引き起こす他、歯の萌出異常や傾斜による咬合不全、鼻閉、視神経障害などといった機能的な障害をも生じるため、線維性骨異形成症は口腔外科学が注力しなければならない重要な疾患のひとつとなっている。本疾患の原因としては、線維性骨異形成症を一徴候とする McCune-Albright 症候群における遺伝子解析から、GNAS1 遺伝子における 201 番アルギニンのシステインへの点変異 (Arg201Cys) が知られている [Sargin 2006 Endocr J]。非症候性の線維性骨異形成症も、Arg201Cys による体細胞突然変異が原因であるとされている [Toyosawa 2007 Modern Pathology]。この変異は、Gs タンパクの恒常的な活性化を惹起し、過剰な cAMP 産生を引き起こす。このような分子病理学的な病態機序が知られているにも関わらず、線維性骨異形成症の治療法としては外科的切除による骨減量術のみであり、ビスホスホネートや副甲状腺ホルモンアナログなどの薬剤投与の検討もなされているが [Nicole 2013 Arch Pathol LabMed]、未だ有効な治療薬は開発されていないのが現状である (図 1)。



2. 研究の目的

線維性骨異形成症は顎・顔面の著しい変形を来すため、口腔外科が注力して取り組まなければならない疾患のひとつである。現在、同疾患の治療は骨減量術のみであり、根本的な治療薬はない。一方、疾患特異的 iPS 細胞

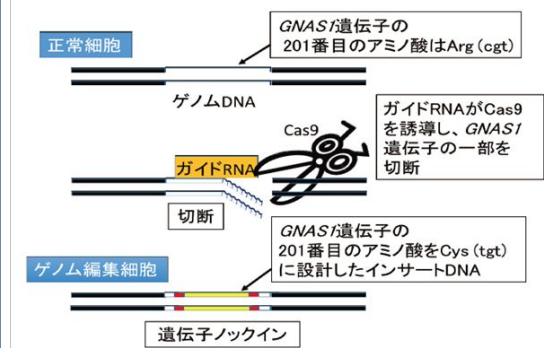
は、創薬に必要な病変細胞を大量に提供できるため、強力なツールとなる。本研究では線維性骨異形成症特異的 iPS 細胞を作出し、病態機序を解析するとともに、大規模な化合物スクリーニングを行ない、治療薬の創薬実現の一助とする。

3. 研究の方法

(1) ヒト iPS 細胞のゲノム編集による線維性骨異形成症の原因遺伝子変異を有する iPS 細胞の作製

ヒト iPS 細胞 (253G1、理化学研究所) に CRISPR/Cas システムを用いたゲノム編集を施し、線維性骨異形成症の原因変異である GNAS1 遺伝子の 201 番目アルギニンのシステインへの置換 (Arg201Cys) [Sargin 2006 Endocr J] を組み込んだ線維性骨異形成症と同様の遺伝子変異を有する iPS 細胞 (GNAS1 遺伝子変異 iPS 細胞) を樹立した (図 2)。これらの細胞の遺伝子配列については、ダイレクトシーケンスにより確認した。

図2 DNAの配列特異的切断によるゲノム編集の方法



(2) GNAS1 遺伝子変異 iPS 細胞の骨芽細胞への分化誘導

ゲノム編集にて作製した GNAS1 遺伝子変異 iPS 細胞と正常ヒト iPS 細胞を、われわれのグループの先行研究 [Kanke, Takato 2014 Stem Cell Reports] に準じて骨芽細胞に分化誘導した。iPS 細胞は最初オンフィーダーにて播種し、増殖させた後、100,000 cells/cm² の濃度で Matrigel コートディッシュ上で継代した。フィーダーフリー環境下で 5 日培養した。培地は mTeSR1 に ROCK inhibitor (Y-27632) を添加したものをを用いた。細胞をゼラチンコート 6well ディッシュ上に 100,000 cells/cm² の濃度で再度、継代した。ゼラチンディッシュ上に播種した細胞は、2i 培地に、1000 units/ml LIF、1 μM PD0325901、3 μM CHIR99021 を添加して、24 時間培養した。その後、中胚葉系細胞へ

の5日間の分化誘導を開始した。中胚葉細胞への分化培地は2i培地に30 μMCHIRと5 μM cyclopamineを添加したものをを用いた。5日後、骨芽細胞への14日間の分化誘導を開始した。骨芽細胞への分化には2i培地に50 μg アスコルビン酸リン酸、10 mM -グリセロリン酸、0.1 μM デキサメタゾン、1 μM smoothed agonist、1 μM helioxanthinを添加した培地を用いた。14日経過後、分化した骨芽細胞を成熟させるため、4日間培養した。骨芽細胞成熟培地としては、2i培地に50 μg アスコルビン酸リン酸、10 mM -グリセロリン酸、0.1 μM デキサメタゾンを添加したものを使用した。評価する細胞の分化段階は、未分化、中胚葉系、間葉系、骨芽細胞、成熟骨芽細胞とした。GNAS1 遺伝子変異 iPS 細胞および正常 iPS 細胞について、それぞれの分化段階(培養開始後3日、1週、2週、4週)で細胞を一旦回収し、細胞播種密度を同一にして培養を再開した。再培養後3、7、10日目で細胞を回収して細胞数を計測し、増殖に対する評価をおこなった。さらに、各分化段階の細胞を、Isogenを用いてmRNAを抽出し、遺伝子発現をリアルタイム RT-PCRで評価した。多能性幹細胞や中胚葉系、間葉系および骨芽細胞のマーカー遺伝子、すなわち、GAPDH、NANOG、RUNX2、ALP、OPN、COL1、ON、BSP-2、CX43、DMPL、E11/GP38、PHEX、SOST、MEPEについて評価した。骨芽細胞分化については、アルカリフォスファターゼ染色やVon Kossa染色もおこない、酵素活性や石灰化についても評価した。これらの所見を元に、GNAS1 遺伝子変異がもたらす細胞変化の作用点を検討した。

(3)GNAS1 遺伝子変異 iPS 細胞を用いた化合物スクリーニング

(2)項で検索した細胞変異作用点に適合する分化段階のGNAS1 遺伝子変異 iPS 細胞ならびに正常 iPS 細胞を調製し、化合物を作用させる。作用させる化合物には、東京大学創薬オープンイノベーションセンターの化合物ライブラリー(21万種類)を活用し、GNAS1 遺伝子変異 iPS 細胞と正常 iPS 細胞とで差異が生じた4日前から、化合物終濃度が1 μMとなるように培地に投与した。GNAS1 遺伝子変異 iPS 細胞の表現型を正常 iPS 細胞の表現型の差異を検出する評価系を確立し、これを指標に候補化合物を選定した。

4. 研究成果

(1)ヒト iPS 細胞のゲノム編集による線維性骨異形成症の原因遺伝子変異を有する iPS 細胞の作製

CRISPR/Cas9 を応用したゲノム編集により、ヒト iPS 細胞のGNAS1 遺伝子にArg201Cysの

変異を組み込むため、2種類のsgRNA プラスミドDNAとOligo DNAを設計した。そしてヒト iPS 細胞にsgRNA プラスミドDNA、およびCas9 タンパク質発現プラスミドDNAをエレクトロポレーションで共導入した。遺伝子導入した細胞をカルチャーディッシュ上で培養し、94クロンの細胞を得ることができた。ゲノムDNAに目的の変異が正確に導入されているかダイレクトシーケンスにより遺伝子解析すると12株のヘテロ変異を有すクロンが確認できたが、ホモ変異を有するものは確認できなかった。そこで使用した2種類のsgRNAのうち変異導入効率の高いものを選択し、導入量を増加した条件でゲノム編集を実施し新たに100クロンを樹立した。しかし本条件においてもホモ変異を有するクロンは得られなかった。そこでヘテロクロンを以降の検討に使用した。

(2)GNAS1 遺伝子変異 iPS 細胞の骨芽細胞への分化誘導

(1)項で得られたGNAS1 遺伝子変異 iPS 細胞を3.(1)項に記載した方法で骨芽細胞に分化誘導した。ゲノム編集操作が細胞に与える影響を除外するためにゲノム編集操作をおこなったが変異が組み込まれなかった細胞を同条件で骨芽細胞分化誘導したものをコントロールとした。各分化誘導段階における培養細胞のmRNAなど解析用サンプルの回収、およびアルカリフォスファターゼなどの染色をおこなった。

(3)GNAS1 遺伝子変異 iPS 細胞を用いた化合物スクリーニング

(2)項の検討によって本培養・評価系が線維性軟骨異形成症の化合物スクリーニングに有用であることが確認できた。現在この系を利用した化合物スクリーニングを実施している。

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6件)

Kawase-Koga Y, Mori Y, Hoshi K, Takato T, Short Lingual Osteotomy Using a Piezosurgery Ultrasonic Bone-Cutting Device During Sagittal Split Ramus Osteotomy., J Craniofac Surg. 査読有、2015 Oct;26(7):e567-8. doi: 10.1097/SCS.0000000000001590.
Hoshi K, Bone Cell Biology Assessed by Microscopic Approach. Regenerative medicine of cartilage. Clin Calcium. 査読有、2015 Oct;25(10):1499-504. doi: CliCa151014991504.

Misawa M, Nitta N, Shirasaki Y, Hayashi K, Kosaka R, Hyodo K, Numano T, Homma K, Kuribayashi S, Fujihara Y, Hoshi K. Characteristic X-ray absorptiometry applied to the assessment of tissue-engineered cartilage development. J Xray Sci Technol. 査読有、2015;23(4):489-502. doi: 10.3233/XST-150504.

Horie N, Hikita A, Nishizawa S, Uto S, Takato T, Hoshi K, Impairment of the transition from proliferative stage to prehypertrophic stage in chondrogenic differentiation of human induced pluripotent stem cells harboring the causative mutation of achondroplasia in fibroblast growth factor receptor 3. Regenerative Therapy 査読有、2017 June;Volume 6:15-20

doi.org/10.1016/j.reth.2016.11.002
Fujihara Y, Nitta N, Misawa M, Hyodo K, Shirasaki Y, Hayashi K, Kosaka R, Homma K, Numano T, Kuribayashi S, Watanabe Y, Sato J, Ohtomo K, Takato T, Hoshi K. T2 and Apparent Diffusion Coefficient of MRI Reflect Maturation of Tissue-Engineered Auricular Cartilage Subcutaneously Transplanted in Rats. Tissue Eng Part C Methods. 査読有、2016 May;22(5):429-38.

doi: 10.1089/ten.TEC.2015.0291.
Hoshi K, Fujihara Y, Mori Y, Asawa Y, Kanazawa S, Nishizawa S, Misawa M, Numano T, Inoue H, Sakamoto T, Watanabe M, Komura M, Takato T. Production of three-dimensional tissue-engineered cartilage through mutual fusion of chondrocyte pellets. Int J Oral Maxillofac Surg. 査読有、2016 Sep;45(9):1177-85. doi: 10.1016/j.ijom.2016.03.002.

〔学会発表〕(計4件)

星和人、骨軟骨再生医療現状と展望 第7回日本創傷外科学会総会・学術集会(招待講演) 2015年7月24日 東京ドームホテル(東京都文京区)

Hoshi K, Recent trends of cartilage regenerative medicine and its application on the oral and maxillofacial surgery. 日露修好160年記念 日露医学歯学フォーラム(招待講演)(国際学会) 2015年9月1日 Sechenov First MSMU Simulation Center (Moscow, Russia)

堀江尚弘、疋田温彦、西澤悟、宇都さくら、高戸毅、星和人 ゲノム編集による軟骨無形成症特異的ヒトiPS細胞の樹立

及び、病態研究 第16回日本再生医療学会総会 2017年3月7日~2017年3月9日 仙台国際会議場(宮城県、仙台市)

Kanazawa S, Hikita A, Takato T, Hoshi K Analysis of Signals Involved in Stem Cell Property of MSC by Hematopoietic Mesenchymal Interaction. 13th ICRS World Congress (国際学会) 2016年9月24日~2016年9月27日 Hilton Sorrento convention center (Sorrento, Italy)

〔図書〕(計1件)

高戸毅、星和人、藤原夕子、金澤三四郎 株式会社メディカルトリビューン 再生医療用語ハンドブック(整形・形成) 2015 336(90-96)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

星和人 (HOSHI, Kazuto)

東京大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号: 30344451

(2) 研究分担者

高戸毅 (TAKATO, Tsuyoshi)

東京大学・医学部附属病院・教授
研究者番号: 90171454

西澤悟 (NISHIZAWA, Satoru)

東京大学・医学部附属病院・特任助教
研究者番号: 00646200

(3) 連携研究者

大津真 (OTSU, Makoto)

東京大学・医科学研究所・准教授
研究者番号: 30361330