

令和元年5月28日現在

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06530

研究課題名(和文)ゲノム編集を応用したFGFRシグナル制御によるヒトiPS細胞の歯胚分化誘導

研究課題名(英文) Human iPS cell tooth germ differentiation technologies under the control of FGFR signal by genome editing

研究代表者

堀江 尚弘 (Horie, Naohiro)

東北大学・大学病院・医員

研究者番号：30802318

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：近年、再生医療の観点から欠損歯の補綴歯科治療の実現を目指した多くの研究が行われてきたが、臨床応用に向けた革新的な技術は未だ得られていない。本研究は歯の発生において重要な分子であるFGFRシグナルに注目し、研究代表者らが過去に樹立したFGFR3ゲノム編集iPS細胞を用いて分化誘導実験を行い、歯胚分化誘導技術の基盤に繋げることを目的とした。実験を通じて、FGFR3ゲノム編集iPS細胞はスタチンの骨芽細胞分化促進作用に対して抵抗性を持つことが想定された。同結果は骨形成のメカニズムに新たな知見を加え得ると共に、象牙質の形成促進作用をもつ化合物の探索など、歯胚分化誘導技術の発展に寄与する可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究を通じて、FGFR3ゲノム編集iPS細胞はスタチンの骨芽細胞分化促進作用に対して抵抗性を持つことが想定された。同研究成果は、骨形成機構や歯胚分化誘導技術に新たな知見をもたらす。更に、難病の一つである軟骨無形成症の病態解明の一助となるものであり、延いては治療薬の開発に貢献し得る。また、FGFR3を原因とする他の骨系統疾患の病態研究にも応用できる可能性があり、学術的・社会的に大きな意義があると言える。

研究成果の概要(英文)：Recently, many studies have been conducted for realize the regenerative prosthodontic treatment for missing teeth, however, innovative technique for clinical application has not been developed. On this research, we focused on FGFR signaling which was essential molecule for tooth development, and intended to develop the tooth germ differentiation technologies by conducting the differentiation experiment of FGFR3 genome edited iPS cells which had been established by our group at the previous study.

According the results, it was suggested that FGFR3 genome edited iPS cells had the resistance against to osteodifferentiation ability of statin. This consequence might supply the new insight for the mechanisms of bone forming and contribute the development of tooth germ differentiation technologies, e.g. screening the molecules which have the promoting potency in dentin forming.

研究分野：再生医療

キーワード：歯胚 iPS細胞 ゲノム編集 FGFR 軟骨細胞 軟骨無形成症 骨芽細胞 スタチン

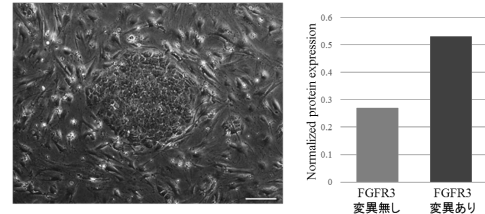
1. 研究開始当初の背景

(1)近年、再生医療の観点から欠損歯の補綴歯科治療の実現を目指した多くの研究が行われてきたが、臨床応用に向けた革新的な技術は未だ得られていない。人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) は、三胚葉系の組織・細胞への分化能を有する再生医療ツールとして期待されており、歯学分野ではマウス iPS 細胞から歯の発生に要するエナメル芽細胞・象牙芽細胞を樹立する分化誘導系が報告された (Arakaki ら, J Biol Chem. 2012, Otsu ら, Stem Cells Dev. 2012.)。しかしながら、歯の発生の分子制御機構には未だ不明な点が多く残っており、発生機構を模倣した歯の再生技術、特にヒト iPS 細胞を用いた場合には困難を伴うのが現状である。

iPS 細胞を用いた歯胚誘導が困難な理由として、iPS 細胞に成長因子やシグナル調節化合物を添加する従来のアプローチでは、同時に複数の遺伝子発現が引き起こされてしまうため、歯の発生における緻密な遺伝子制御を模倣するには限界があることが挙げられる。また、標的遺伝子をウイルスベクター等で導入して強制的に過剰発現させる実験系では、生理的な発生過程の模倣は困難である。これらの問題を解決するために、本研究ではゲノム上の任意の位置における遺伝子改変を可能とする“ゲノム編集”に着目した。

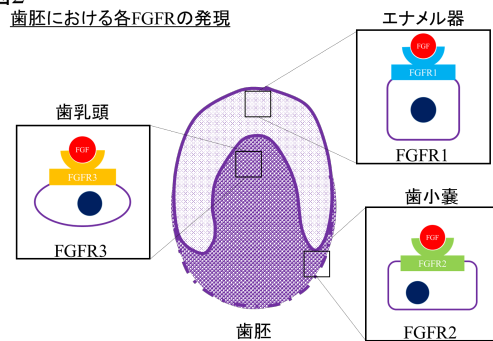
研究代表者はこれまでに、Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeat (CRISPR) /Cas システムによるゲノム編集にて、FGFR3 の機能亢進症である軟骨無形成症 (Achondroplasia; ACH) の原因遺伝子変異をヒト iPS 細胞に導入し、FGFR3 タンパク質の発現を増加させた病態モデル iPS 細胞を作製した (Horie ら, Regen Ther. 2017.; 図1左)。この病態モデル iPS 細胞には、ACH 患者に高頻度に認められる FGFR3 遺伝子の一塩基置換が組み込まれており、軟骨細胞へと分化誘導させると FGFR3 タンパク質の発現が上昇する (図1右)。

図1 軟骨無形成症病態モデルヒトiPS細胞 軟骨分化誘導14日目 FGFR3タンパク質発現



歯の発生初期において、FGFR は重要な分子の一つであり、同受容体のリガンドである FGF は、歯の発生の開始点にあたる口腔外胚葉・間葉の時期から、歯冠・歯根形成の段階に渡り器官形成に關与する (Tummers ら, J Exp Zool B Mol Dev Evol. 2009.)。FGF ファミリーのうち、FGF3 および FGF10 は歯原性上皮細胞の増殖における重要な制御因子としての役割をもち (Kettunen ら, Dev Dyn. 2000.)、FGF4 は間葉系細胞のアポトーシスを抑制して咬頭の形成に寄与する (Vahtokari ら, Development. 1996.)。また、歯胚における上皮および間葉系の細胞には、FGFR1、FGFR2、FGFR3 が高発現している (Kettunen ら, Dev Genet. 1998.; 図2)。

図2 歯胚における各FGFRの発現



一方、FGFR 遺伝子の変異に起因する、ACH、Pfeiffer 症候群 I 型、Apert 症候群では、FGFR シグナルが活性化する結果、上顎骨の劣成長を伴う下顎前突を引き起こす (Reitsma ら, Eur J Oral Sci. 2013, Purushothaman ら, Birth Defects Res A Clin Mol Teratol. 2011.)。興味深いことに、これら症候群では、歯の発生において重要な役割を示す FGFR 遺伝子が高発現しているにも関わらず、歯の構造における著明な障害は報告されていない。従って、ゲノム編集によって FGFR の機能獲得型変異をもつ病態モデル iPS 細胞は、通常の iPS 細胞同様に歯原性細胞への分化誘導が可能である上に、FGFR を介するシグナル伝達が歯の発生に及ぼす影響を探索するモデルとして好適である可能性が高い。

(2)加えて、ACH とは軟骨内骨化の障害による四肢短縮型の低身長を呈する先天疾患であり、FGFR3 遺伝子の機能獲得型変異が原因であることが判明している [Horton ら, Lancet. 2007.]。2014 年、京都大学の山下らは、患者由来 iPS 細胞の軟骨分化誘導実験および疾患モデルマウスを用いた解析を通じて、高コレステロール血症の治療薬であるスタチンが、ACH の骨形成の障害を改善することを報告した [Yamashita ら, Nature. 2014.]。但し、スタチンの作用機序については未だ不明な点が多い。2017 年の Fafilek らの報告ではスタチンが軟骨細胞の FGFR3 シグナルには直接的な影響が無い事が示されており、別のシグナル経路の関与が示唆されている [Fafilek ら, Osteoarthritis Cartilage. 2017.]。また歯学領域では、スタチンはヒト歯髓細胞の象牙芽細胞への分化誘導を促進することが示唆されている [Ishio ら, 口歯保存誌. 2006.]。

以上の背景から研究代表者は、スタチンが軟骨細胞に影響しないのであれば、骨の細胞には何らかの作用を及ぼしていると仮説を立てた。故に、軟骨内骨化へのスタチンの影響をより詳細に分析するため、本研究は FGFR3 ゲノム編集 iPS 細胞の骨への分化誘導実験を行った。更に、同解析にて期待される結果は、骨形成のメカニズムに新たな知見をもたらし得るものであり、延いては象牙質への分化誘導を促進させることを目標とする、所謂、歯胚分化誘導研究へと応用できる可能性を秘めている。

2. 研究の目的

(1)ゲノム編集技術を用いて FGFR の機能獲得型変異を示すヒト iPS 細胞モデルを作製し、これを用いて FGFR シグナルを中心とした歯の発生機構を解析し、歯胚への分化誘導技術の基盤に繋げること。

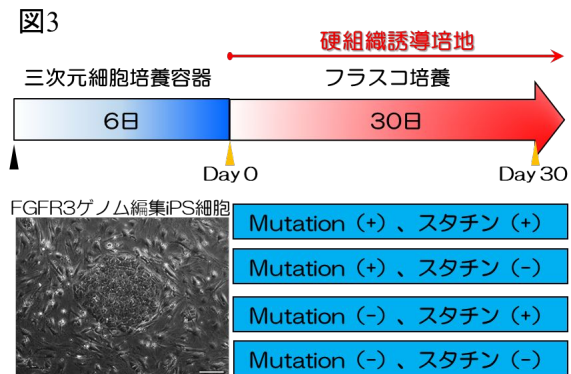
(2)ACH にみられる骨形成阻害に対するスタチンの作用機序を明らかにすること。

3. 研究の方法

以降は、研究期間内にデータが得られた内容について記載する。

FGFR3 ゲノム編集 iPS 細胞を用いた骨芽細胞分化誘導実験

代表研究者らのグループは、マウス iPS 細胞を分化誘導して骨芽細胞様の三次元構造体を創出する技術をこれまでに確立している[Okawa ら, Stem Cells Int. 2016.]. 同手法を応用し、FGFR3 ゲノム編集 iPS 細胞において変異が挿入された群[Mutation(+)]と、変異が挿入されなかった群[Mutation(-)]とを骨へと分化誘導した。更に、分化誘導中にシンバスタチンを添加した群[スタチン(+)]・非添加群[スタチン(-)]を組み合わせで計 4 群を設定し、骨芽細胞分化誘導 Day30 で遺伝子発現を解析するためリアルタイム PCR を、組織学的検討のため、パラフィン切片を作製し、H.E. 染色、Von Kossa 染色を行った(図 3)。



4. 研究成果

本研究で用いたヒト iPS 細胞の分化誘導法は、最初に三次元細胞培養容器の上で培養した後、フラスコ内の硬組織誘導培地上で振盪培養する手法であり、球状の構造体が形成される(図 4 上)。また、同構造体の骨マーカー遺伝子発現(RUNX2)が分化誘導前と比較して上昇していることが、正常なヒト由来の iPS 細胞を用いた検討にて確認された(図 4 下)。

次に、同分化誘導系を用いる対象として FGFR3 ゲノム編集 iPS 細胞を、前項で記載した通り Mutation(+/-)、スタチン(+/-)を組み合わせた 4 群に分け、遺伝子発現、組織学的所見を比較した。

本解析の結果、変異が挿入されなかった細胞群に関して、シンバスタチンを添加すると骨マーカー遺伝子である RUNX2, Sp7 遺伝子の発現が上昇したのに対し、変異導入群ではシンバスタチン添加による同遺伝子の発現上昇は認められなかった(図 5)。また組織学的所見としては、変異が挿入されなかった群にシンバスタチンを添加すると iPS 細胞由来三次元構造体に含まれる、石灰化組織の量が増加傾向にある一方で、変異導入群にシンバスタチンを添加しても、石灰化組織量に明らかな差は見受けられなかった(図 6; 次頁参照)。

以上のことから、ACH モデル細胞はスタチンの骨芽細胞分化促進作用に対して抵抗性を持つことが想定された。

また、今後の展望として、スタチン作用時のシグナル変化を検知し、同抵抗性の機序をより深く分析することが考えられる。

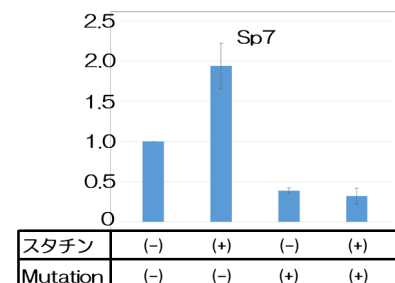
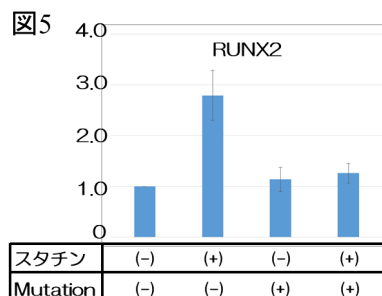
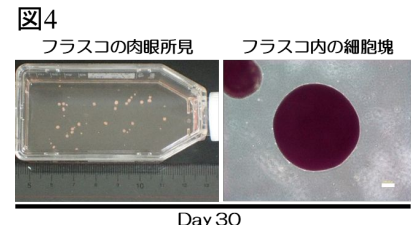
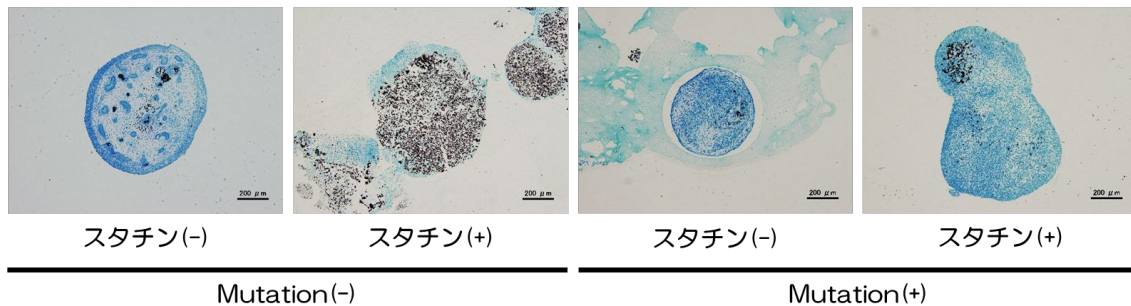


図6

Von Kossa染色



ここまでが本研究の主な結果である。同結果は骨形成のメカニズムに新たな知見を加え得ると共に、本分化誘導系を応用した、象牙質形成促進作用をもつ化合物の探索など、歯胚分化誘導技術の発展に寄与する可能性がある。更に、ACH の病態解明の一助となるものであり、延いては治療薬の開発に貢献し得る。また、FGFR3 を原因とする他の骨系統疾患の病態研究にも応用できる可能性があり、国内外で学術的・社会的に大きな意義があると言える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計2件)

(1)帆足 有理恵, 堀江 尚弘, 森本 悟, 歯科補綴学研究者による iPS 細胞研究が拓く病態解析と創薬の未来, 公益社団法人 日本補綴歯科学会第 128 回学術大会, 2019 年, イブニングセッション(シンポジウム)

(2)近藤 威, 大川 博子, 堀江 尚弘, 江草 宏, A Stepwise Protocol for Efficient Osteogenic Induction of Human Induced Pluripotent Stem Cells, The 5th Joint Scientific Meeting in Dentistry, 2018 年

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

該当なし。

6. 研究組織

(1)研究分担者

該当なし。

(2)研究協力者

該当なし。