

令和元年6月11日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19725

研究課題名（和文）骨オルガノイドの創成とその骨疾患研究への応用

研究課題名（英文）Development of bone-organoid and its application for the research in bone diseases

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） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：レチノイン酸シグナルを用いることでヒトiPS細胞から短期間で骨様結節を誘導する方法を樹立し、タイムラプスイメージングによりその過程を観察した。更にコラーゲンゲルを用いた培養系によって、骨芽細胞から骨細胞への分化過程を時空間的に可視化することに成功した。そして骨形成不全症由来iPS細胞を用いて、確立した誘導系及び観察システムが病態再現から創薬スクリーニングにおいて有用であることを実証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

学術的意義としては、骨代謝研究分野における新しいin vitroでの解析システムとして極めて有用なものである。社会的意義としては、難治性の骨疾患に対する病態解明から創薬へのプロセスに有用なものであり、有効な治療薬の無い疾患における患者の臨床病態の改善に貢献できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：We established a method to make bone-like nodules from human iPS cells within 10 days using retinoic acid signal, and observed this process by the time-lapse imaging. We also succeeded to visualize the differentiation process from osteoblasts to osteocytes using collagen gel culture system, and demonstrated that the induction method and experimental system are useful for disease-modeling and drug screening using patient-specific iPS cells of osteogenesis imperfecta.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：オルガノイド IPS細胞 骨改変 骨疾患

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

骨は複数の細胞の相互作用により常に改変を繰り返す動的組織であり、その過程は液性因子によるシグナル伝達から、細胞-細胞間の相互作用、そしてメカニカルストレス等、様々な分子機構により制御されている。そのため *in vitro*での単一細胞の解析から理解することは困難である。分化誘導技術の進歩により、iPS 細胞等から複数の細胞によって構成される3次元構造を有する疑似器官(オルガノド)の作製が可能となり、より *in vivo*に近い状況で分化過程や薬物に対する反応等を解析する試みが展開されている。申請者は疾患特異的 iPS 細胞を用いた骨軟骨研究を展開しており、最近、遺伝性骨疾患の病態を世界に先駆け解明したが(Hino et al. PNAS 2015)、その過程で iPS 細胞から短期間に効率よく骨芽細胞そして骨細胞を誘導する技術を開発した。更にこの誘導法に温度感受性培養皿を併用することで、骨組織に類似した構造をもつ3次元構造体(骨オルガノイドと称する)を作製することに成功した。本研究では、この骨オルガノイドに、同様に iPS 細胞から誘導した破骨細胞を加えることで、骨改変過程を *in vitro*で再現し、その過程の可視化を試みる。その観察に基づいて、骨再生促進薬の開発による再生医療への応用、更には骨代謝関連遺伝性疾患の患者から樹立した iPS 細胞を用いた「疾患特異的骨オルガノイド」を活用した病態解明から創薬への展開をも検討する。

2. 研究の目的

骨は複数の細胞の相互作用により常に改変を繰り返す動的組織であり、その過程には液性因子によるシグナル伝達から、細胞-細胞間の相互作用、そしてメカニカルストレス等、様々な分子機構により制御されている。従って *in vitro*での骨代謝研究には限界があり、遺伝子改変マウス等を用いた *in vivo*での研究が主体となって進められてきた。しかし *in vivo*での研究にも課題はある。例えば特定の疾患に対する創薬研究への応用を想定した場合、マウスモデルを使用して多数の薬剤をスクリーニングすることは困難である。すなわち単一細胞を用いた *in vitro*での研究と個体を用いた *in vivo*での研究の間を橋渡しする研究が必要である。近年、様々な分野で複数の細胞によって構成される3次元構造を有する疑似器官(オルガノド)を活用したアプローチが展開されている。本研究は同一ゲノム情報を有する、異なる種類の細胞を得ることが出来るという多能性幹細胞の利点を活用して、申請者が独自に開発した骨分化誘導法を用いて、骨芽細胞及び骨細胞を誘導し骨基質を形成させ、更に前破骨細胞及び破骨細胞を同一の iPS 細胞から誘導し、これらを共培養することで、3次元構造を有する骨オルガノイドを創成する。そして様々な因子を添加することで *in vitro*で骨リモデリング過程を再現することを目指す。更に遺伝性骨疾患患者より樹立した iPS 細胞を用いて、疾患骨オルガノイドを作製し、病態解明、そして創薬に応用することを目指す。

3. 研究の方法

(1) 蛍光標識ヒト iPS 細胞の作成

各分化系譜及び分化段階の細胞を識別するために、それぞれの細胞に特異的と考えられている遺伝子の3'側に蛍光色素遺伝子を CRISPR/Cas9 システムを用いて挿入したレポーター iPS 細胞を作製した。

(2) ヒト iPS 細胞からの破骨細胞の誘導と機能解析

丹羽らが開発した方法(Yamaguchi et al. PLoS One, 2013)を用いて、ヒト iPS 細胞から破骨前駆細胞を分化誘導し、更に RANKL 及び M-CSF により破骨細胞を誘導した。その機能を酒石酸抵抗性酸ホスファターゼの活性、デンチンスライスを用いた吸収窩形成等で評価した。

(3) ヒト iPS 細胞からの骨オルガノイド作製

温度感受性培養皿上で10日間培養後、培養温度を下げることで、細胞群と基質を重層化した組織として回収し、組織学的解析(光顕及び電顕)で骨基質を確認し、各細胞の形態を観察した。分化誘導時に増殖因子等を添加し、骨オルガノイド形成に至適な条件を決定する。更に作製した骨オルガノイドを免疫不全マウスに正所性あるいは異所性に移植し、*in vivo*での骨組織形成能を確認した。

(4) 骨オルガノイドにおける骨改変過程の解析

蛍光標識を用いて骨芽細胞、骨細胞及び破骨細胞の局在と相互関係を解析する。同一細胞に骨芽細胞と骨細胞のマーカー遺伝子を標識した多能性細胞を用いて作製した骨オルガノイドを用いて、骨芽細胞から骨細胞への分化過程を経時的に観察した。更にライブイメージで観察することを試みた。

(5) 骨オルガノイドの骨代謝及び骨再生研究への応用

骨オルガノイドを、既知の骨代謝関連因子で一定期間処理し、形成された骨基質を定性及び定量評価し、既知の作用が再現されているかを検証した。

(6) 疾患特異的骨オルガノイドを用いた病態解析と創薬

骨代謝関連遺伝子の変異が原因の遺伝性疾患の代表的疾患である骨形成不全症を対象として、骨オルガノイドの有用性を検討した。

4. 研究成果

(1) 蛍光標識ヒト iPS 細胞の作成

骨芽細胞と骨細胞を標識するために、GFP 遺伝子で標識された iPS 細胞において DMP1 及び SOST 遺伝子の 3' 側に、CRISPR/Cas9 システムを用いて蛍光色素遺伝子を挿入した。挿入が確認された iPS 細胞を骨分化誘導し内因性遺伝子の発現と蛍光色素の発現を比較したが一致したクローンは得られなかった。

(2) ヒト iPS 細胞からの破骨細胞の誘導と機能解析

既報(Yamaguchi et al. PLoS One, 2013)に準じた方法を用いて、ヒト iPS 細胞から TRAP 陽性細胞を誘導することに成功した。引き続き破骨細胞である実証を得るために、機能評価実験を実施している。

(3) ヒト iPS 細胞からの骨オルガノイド作製

iPS 細胞の段階から 10 日間培養後、細胞と基質を重層化した組織として回収し、遺伝子発現解析、組織学的解析(顕微鏡及び電顕)、免疫組織化学染色で骨基質を確認し、骨芽細胞と骨細胞が混在していることを確認した。更に誘導後 7 日目の、骨芽細胞が主として骨芽細胞によって形成されている細胞群を、免疫不全マウスに作成した骨欠損部に移植し、ヒト由来の新生骨が形成されることを確認した。骨様結節を更に GFP 標識 iPS 細胞とタイムラプス解析を用いて、骨様結節の形成過程を可視化することに成功し、結節表面を覆う骨芽細胞のシートから、骨細胞が結節内に移動する過程が観察された。

(4) 骨オルガノイドにおける骨改変過程の解析

I 型コラーゲンをコートした培養皿を用いて、樹立したレチノイン酸シグナルを応用した分化誘導法により、iPS 細胞から骨芽細胞及び骨細胞を分化誘導し、オステオカルシン(OCN)及び PHEX の二重染色を行い、共焦点顕微鏡により解析した。細胞表面の細胞は OCN 陽性で、一部 PHEX 陽性、ゲル内に移動していった細胞は PHEX 陽性で、表層近くは立方型で深部になると多数の細胞突起を有する星状を呈する細胞となり、骨芽細胞から骨細胞への分化過程を再現していると考えられた。

(5) 骨オルガノイドの骨代謝及び骨再生研究への応用

確立した培養系に対して、TGF 等の成長因子を添加し、遺伝子発現及び骨様結節形成能に対する影響を評価し、in vitro での骨代謝解析系としての意義を検証した。

(6) 疾患特異的骨オルガノイドを用いた病態解析と創薬

COL1A1 遺伝子に変異を有する骨形成不全症(OI)患者由来の iPS 細胞を用いて、病態再現への応用を検討した。ゲノム編集技術を用いて変異を修復した OI 由来 iPS 細胞と比較することで、OI 由来 iPS 細胞ではコラーゲン分子の細胞外分布が異常であり、かつ細胞内に蓄積していること、そしてその結果 ER ストレスが亢進していることが確認され、OI の病態再現に成功した。更に既報でオートファジー亢進による in vitro での治療作用が報告されているラパマイシンを添加した実験を行い治療作用の再現に成功し、樹立した誘導法及び観察システムが化合物による創薬に向けたスクリーニングのアクセシビリティ系として有用であることを実証した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 3 件)

Kawai S, Yoshitomi H, Sunaga J, Alev C, Nagata S, Nishio M, Hada M, Koyama Y, Uemura M, Sekiguchi K, Maekawa H, Ikeya M, Tamaki S, Jin Y, Harada Y, Fukiage K5, Adachi T, Matsuda S, Toguchida J. In vitro bone-like nodules generated from patient-derived iPSCs recapitulate pathological bone phenotypes. Nat Biomed Eng, 2019. 査読有 DOI:10.1038/s41551-019-0140-7.

Nakajima T, Shibata M, Nishio M, Nagata S, Alev C, Sakurai H, Toguchida J, Ikeya M. Modeling human somite development and fibrodysplasia ossificans progressiva with induced pluripotent stem cells. *Development*. 2018;145(16). 査読有 pii: dev165431. doi: 10.1242/dev.165431.

Hino K, Zhao C, Horigome K, Nishio M, Okanishi Y, Nagata S, Komura S, Yamada Y, Toguchida J, Ohta A, Ikeya M. An mTOR Signaling Modulator Suppressed Heterotopic Ossification of Fibrodysplasia Ossificans Progressiva. *Stem Cell Reports*. 2018;11(5):1106-1119. 査読有 doi:10.1016/j.stemcr.2018.10.007.

〔学会発表〕(計 21 件)

川井俊介、吉富啓之、須長純子、アレブジャンタッシュ、永田早苗、西尾恵、羽田匡孝、吹上謙一、安達泰治、松田秀一、戸口田淳也 創薬応用を目指したヒト iPS 細胞による in vitro 骨形成過程再現系の構築 第 33 回日本整形外科学会基礎学術集会、奈良、2018 年 10 月 11-12 日

Kawai S, Yoshitomi H, Sunaga J, Alev C, Nagata S, Nishio M, Hada M, Fukiage K, Adachi T, Matsuda S, Toguchida J. Engineering bone-like nodules from human iPS cells as a research platform for bone biology. 5th TERMIS World Congress 2018, Kyoto, September 4-7, 2018

川井俊介、吉富啓之、松田秀一、戸口田淳也 創薬応用を目指したヒト iPS 細胞による in vitro 骨形成過程再現系の構築 第 36 回日本骨代謝学会学術集会、長崎、2018 年 7 月 26-28 日

川井俊介、吉富啓之、須長純子、アレブジャンタッシュ、永田早苗、西尾恵、羽田匡孝、吹上謙一、安達泰治、松田秀一、戸口田淳也 創薬応用を目指したヒト iPS 細胞による in vitro 骨形成過程再現系の構築 第 17 回日本再生医療学会総会、横浜、2018 年 3 月 21 -23 日

Kawai S, Yoshitomi H, Junko S, Alev C, Nagata S, Nishio M, Hada M, Adachi T, Fukiage K, Matsuda S, Toguchida J. Visualization of bone-like nodule formation using human induced pluripotent stem cells. Orthopaedic Research Society 2018, New Orleans, March 10-13, 2018

吉富啓之、川井俊介、戸口田淳也 運動器疾患に対する iPS 細胞研究の進歩 iPS 細胞を用いた新規骨分化誘導法による難治性骨疾患の病態解明と創薬 第 33 回日本整形外科学会基礎学術集会、奈良、2018 年 10 月 12 日

Toguchida J Application of iPS cells for disease modeling and drug discovery 第 13 回 International Symposium of the Institute Network for Biomedical Sciences、福岡、2018 年 10 月 19 日

戸口田淳也 整形外科基礎領域への iPS 細胞の応用 第 33 回日本整形外科学会基礎学術集会、奈良、2018 年 10 月 11 日

戸口田淳也 疾患特異的 iPS 細胞を活用した病態解析から創薬 第 91 回日本生化学会大会、京都、2018 年 9 月 21 日

Toguchida J Application of iPS cell technology for bone diseases. 第 15 回 Bone Biology Forum、千葉、2018 年 8 月 17 日

戸口田淳也 疾患特異的 iPS 細胞を活用した病態解析から創薬 第 36 回日本骨代謝学会学術集会、長崎、2018 年 7 月 26 日

Toguchida J iPSC-based disease modeling and drug discovery for skeletal diseases. 12th Catholic International Stem Cell Symposium、Seoul, 29 June, 2018

戸口田淳也 iPS 細胞を活用した難治性疾患に対する創薬 第 4 回日本骨免疫学会、2018 年 6 月 25 日

戸口田淳也 iPS 細胞を活用した病態再現から創薬 第 106 回日本泌尿器科学会総会、京都、2018 年 4 月 20 日

戸口田淳也 iPS 細胞を用いた in vitro 骨様組織の作製と応用 医工学フォーラム、京都、2018 年 2 月 28 日

Kawai S, Yoshitomi H, Alev C, Hada M, Koyam, Y, Nagata S, Nishio M, Sekiguchi K, Fukiage, K, Matsuda S, Toguchida J. Recapitulation of disease-phenotype using patient-specific iPSCs of osteogenesis imperfect. International Society for Stem

Cell Research 2017, Boston, June 14-17, 2016

戸口田淳也 iPS細胞を活用した難治性骨格系疾患の病態解析 第32回日本整形外科学会基礎学術集会、那覇、2017年10月26日

Toguchida J. Application of disease-specific iPS cells for systemic skeletal diseases. 2nd Catholic iPSC International Symposium. Seoul, November 9, 2017

戸口田淳也 骨軟骨領域におけるiPS細胞研究の現況と展望 第35回日本骨代謝学会学術集会、福岡、2017年7月28日

戸口田淳也、日野恭介、川井俊介、吹上謙一、池谷真、吉富啓之 疾患iPS細胞を活用した難治性骨軟骨疾患に対する創薬 第38回日本炎症・再生医学会、大阪、2017年7月18日

- ② 戸口田淳也、日野恭介、池谷真、川井俊介、吹上謙一、吉富啓之 疾患特異的iPS細胞を用いた骨軟骨系統疾患治療研究 第120回日本小児科学会学術集会、東京、2017年4月14日

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：吉富 啓之

ローマ字氏名：YOSHITOMI, Hiroyuki

所属研究機関名：京都大学

部局名：ウイルス・再生医科学研究所

職名：准教授

研究者番号(8桁)：50402920

(2)研究協力者

研究協力者氏名：安達 泰治

ローマ字氏名：ADACHI, Taiji

研究協力者氏名：アレブ ジャンタッシュ

ローマ字氏名：ALEV, Cantas

研究協力者氏名：川井 俊介

ローマ字氏名：KAWAI, Shunsuke

研究協力者氏名：丹羽 明

ローマ字氏名：NIWA, Akira

研究協力者氏名：松田 秀一

ローマ字氏名：MATSUDA, Shuichi

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。