

令和 4 年 5 月 20 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02780

研究課題名(和文) 内軟骨性骨化モデルを用いた骨形成不全症の病態解析と薬効評価

研究課題名(英文) Analysis of mechanism of bone fragility and effects of drugs in osteogenesis imperfecta using a graft model for enchondral bone formation

研究代表者

大園 恵一 (Ozono, Keiichi)

大阪大学・医学系研究科・教授

研究者番号：20270770

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：骨形成不全症(OI)患者の線維芽細胞、iPS細胞から分化誘導した骨芽細胞が産生するコラーゲンの性質を検討し、OI由来では、糖鎖の過修飾を認めた。ブフェニールの投与により、コラーゲンの異常は改善することを示し、論文発表を行った。TGF- β シグナルに若干の差を認めた。OI患者19例において血中スクレロスチンと身長、体重と関連性があり、骨塩量ともその傾向を認めた。遺伝子パネルにより、OI患者47名の解析を行い、36名の患者で遺伝子変異を同定した。表現型との相関性を検討し、論文発表を行った。治療薬の開発：COL1A1変異(p.G810S)を組み込んだノックインマウスを作成し、その骨脆弱性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

まだ、有効な治療法のない重症骨形成不全症の治療薬として、ブフェニールを見出した。独自の骨形成不全症モデルマウスを作成し、ブフェニールの効果を判定できる段階となっている。ブフェニールは、他の疾患に適応が取れており、いわゆるdrug repositioningにより、薬剤開発の面でも有利であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We obtained fibroblasts and iPS cells from patients with osteogenesis imperfecta (OI). Collagen type 1 from fibroblasts and osteoblasts differentiated from iPS cells were analyzed by SDS-PAGE and LC/MS. The glycosylation-overmodification of collagen type 1 was found. 4-phenyl butyric acid improved overmodification and accumulation of collagen in ER. TGF- β signaling was slightly different between osteoblasts induced from normal and OI patients derived iPS cells. The concentration of sclerostin was related to height and weight in 19 OI patients. Variants responsible for OI was found in 36 out of 47 OI patients. The significant genotype-phenotype correlation was reported. The model mice having p.G810S were generated by the knock-in method and proved to show fragile bone phenotypes.

研究分野：骨代謝学

キーワード：骨形成不全症 骨脆弱性 疾患特異的iPS細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

令和4年2月までに、骨形成不全モデルマウスの繁殖を行い、令和4年3月にマウスの解析実験を行う予定であったが、マウス飼育舎のオープンが遅れたので、令和4年度に研究を延期することになり、研究助成金も繰り越しをおこなった。

2. 研究の目的

骨形成不全症(OI)患者における unmet needs である、既存薬のビスホスホネート以上の骨折予防効果を持つ薬剤の開発と、OI 患者の低身長メカニズムの解明を目的とし、本研究を行う。具体的には、患者由来皮膚線維芽細胞、iPS 細胞を用いて、生化学的、細胞生物学的に、OI に共通する病理学的機序を明らかにする。また、OI 患者で見出した COL1A1 変異を組み込んだ OI モデルマウスも用いる。成長軟骨帯軟骨細胞の遺伝子およびタンパク質の発現を検討し、その特徴づけを行う。候補薬 4-phenylbutyric acid(4-PBA)を見出しているため、OI モデルマウス、内軟骨性骨化モデルを用いてその効果を検証するとともに、作用機序をさらに検討する。内軟骨性骨化モデル実験系を用いて、OI における四肢短縮型低身長の発症機序を明らかにする。

3. 研究の方法

当科で経験した骨形成不全症患者で証明された I 型コラーゲンの A1 鎖をコードする COL1A1 変異(c.2461G>A, p.G810S)を組み込んだノックインマウスを作成した。

OI モデルマウスの作成方法を記す。

(1) 対象遺伝子に対する sgRNA (crRNA, tracrRNA) をデザインする。

我々が使用しているグリシン置換変異を有する OI 患者の変異は COL1A1 遺伝子の c.2461G>A, p.G821S の変異であり、らせん構造の開始から 643 番目のグリシンがセリンに置換される変異である。

マウスにおいてこの変異と同等と考えられる、らせん構造の開始から 643 番目のグリシンがセリンに置換される変異は Col1a1 遺伝子の c.2428G>A, p.G810S であるため、同変異を起こすような sgRNA をデザインする。

(2) エレクトロポレーション法によって Cas9ヌクレアーゼ、sgRNA をマウス受精卵に導入する。

(3) Cas9ヌクレアーゼ、sgRNA を導入した受精卵を仮親マウスに移植し、遺伝子改変マウスを得る。

ノックインマウスの作出には、CRISPR-Cas9 System を用いた。マイクロ CT、3 点曲げ試験などで、骨形成不全症のモデルであるかどうか検討を行う。その上で、骨細胞を回収し、遺伝子発現などを検討し、骨細胞機能の検討を行う。

並行して、骨形成不全症モデルマウスとして広く使われている oim マウスを購入して輸入した。このマウスの検討も行う。

4. 研究成果

当科で経験した骨形成不全症患者で証明された I 型コラーゲンの A1 鎖をコードする COL1A1 変異(c.2461G>A, p.G810S)を組み込んだノックインマウスを作成し

た。*Col1a1*遺伝子に p.G810S をホモ接合性に有する個体は出生していないため、同変異をヘテロ接合性に有するマウス (*Col1a1* G810S ヘテロノックインマウス) について骨脆弱性を有するかどうかを 12 週齢で野生型マウスと比較して評価した。体重は *Col1a1* G810S ヘテロノックインマウスで有意に小さかった。マイクロ CT による第 5 腰椎海綿骨の評価では *Col1a1* G810S ヘテロノックインマウスは BV/TV (海綿骨体積/全計測領域体積)、BMC/BV (骨塩量/海綿骨体積)、骨梁幅、骨梁数がいずれも低値であり、骨梁間隙は高値であった。大腿骨遠位部海綿骨でも BV/TV は低値であった。つまり、*Col1a1* G810S ヘテロノックインマウスは骨量が少なく、粗な骨梁を有することがわかった。また、大腿骨中央部の皮質骨体積と骨髄体積は *Col1a1* G810S ノックインマウスで低値であった。3 点曲げ試験による大腿骨の評価では骨のしなやかさを表す破断変位と、骨折に至るまでの総仕事量である破断エネルギーが *Col1a1* G810S ヘテロノックインマウスで低値であった。以上の結果から、*Col1a1* G810S ノックインマウスは骨形成不全症の表現型を有すると考えられた。申請者らが見出した骨形成不全症治療の候補薬 (プフェニール) は、他の疾患に対して適応取得されており発売元のオーファンパシフィックの好意により、実験に投与できる量の供与を受けた。今後、作成したモデルマウスに対して、プフェニールの有効性、安全性を検討する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Takeyari S, Kubota T, Ohata Y, Fujiwara M, Kitaoka T, Taga Y, Mizuno K, Ozono K.	4. 巻 296
2. 論文標題 4-phenylbutyric acid enhances the mineralization of osteogenesis imperfecta iPSC-derived osteoblasts.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Biol Chem	6. 最初と最後の頁 100027
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA120.014709	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ohata Y., Takeyari S., Nakano Y., Kitaoka T., Nakayama H., Bizaoui V., Yamamoto K., Miyata K., Yamamoto K., Fujiwara M., Kubota T., Michigami T., Yamamoto K., Yamamoto T., Namba N., Ebina K., Yoshikawa H., Ozono K.	4. 巻 30
2. 論文標題 Comprehensive genetic analyses using targeted next-generation sequencing and genotype-phenotype correlations in 53 Japanese patients with osteogenesis imperfecta	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Osteoporosis International	6. 最初と最後の頁 2333 ~ 2342
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00198-019-05076-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 武鐘真司, 大幡泰久, 窪田拓生, 多賀祐喜, 水野一乗, 大園恵一
2. 発表標題 患者由来線維芽細胞、iPS細胞を用いた骨形成不全症の病態解析と4-フェニル酪酸の効果
3. 学会等名 第51回 日本結合組織学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shinji Takeyari, Yasuhisa Ohata, Takuo Kubota, Yuki Taga, Kazunori Mizuno, Keiichi Ozono
2. 発表標題 Analysis of osteogenesis imperfecta in pathology and the effects of 4-phenylbutyric acid using patient-derived fibroblasts and induced pluripotent stem c
3. 学会等名 ICCBH 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 武鑑真司, 大幡泰久, 窪田拓生, 多賀祐喜, 水野一乗, 大園恵一
2. 発表標題 患者由来線維芽細胞、iPS細胞を用いた骨形成不全症の病態解析と4-フェニル酪酸の効果 (Young Investigator Award)
3. 学会等名 第51回 日本結合組織学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takeyari S, Ohata Y, Kubota T, Taga Y, Mizuno K, Ozono K.
2. 発表標題 Analysis of osteogenesis imperfecta in pathology and the effects of 4-phenylbutyric acid using patient-derived fibroblasts and induced pluripotent stem cells (New Investigator Award)
3. 学会等名 9th International Conference on Children's Bone Health (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大幡泰久, 武鑑真司, 中野由佳子, 山本賢一, 中山尋文, 北岡太一, 窪田拓生, 道上敏美, 山本威久, 大園恵一
2. 発表標題 ターゲットエクソーム解析を用いた日本人骨形成不全患者47名の網羅的遺伝子解析と表現型解析
3. 学会等名 第36回 日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ohata Y, Takeyari S, Kitaoka T, Nakayama H, Varoona Bizaoui, Nakano N, Yamamoto K, Miyata K, Yamamoto K, Kubota T, Yamamoto K, Michigami T, Yamamoto T, Ozono K
2. 発表標題 Comprehensive Genetic Analysis by Targeted Next Generation Sequencing and Genotype-phenotype Correlation of 47 Japanese Patients with Osteogenesis Imperfecta
3. 学会等名 ASBMR2018 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 武鑑真司, 大幡泰久, 窪田拓生, 多賀祐喜, 水野一乘, 大園恵一
2. 発表標題 患者由来iPS細胞、線維芽細胞を用いた骨形成不全症新規治療薬の探索 (最優秀演題賞)
3. 学会等名 第52回 日本小児内分泌学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大幡泰久, 武鑑真司, 中野由佳子, 山本賢一, 宮田 京, 中山尋文 Varoona Bizaoui, 北岡太一, 窪田拓生, 山本勝輔, 道上敏美, 山本威久, 大園恵一
2. 発表標題 ターゲットエクソーム解析を用いた日本人骨形成不全患者52名の網羅的遺伝子解析と 表現型解析
3. 学会等名 第52回 日本小児内分泌学会学術集会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	道上 敏美 (Michigami Toshimi) (00301804)	地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪母子医療センター (研究所)・環境影響部門・部長 (84408)	
研究 分担者	妻木 範行 (Tsumaki Noriyuki) (50303938)	京都大学・iPS細胞研究所・教授 (14301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------