

令和 3 年 6 月 22 日現在

機関番号：32202  
研究種目：若手研究  
研究期間：2019～2020  
課題番号：19K18930  
研究課題名（和文）疾患特異的iPS細胞を用いた症候群性頭蓋縫合早期癒合症に対する新規治療法の開発  
  
研究課題名（英文）Development of a novel treatment for syndromic craniosynostosis using disease-specific induced pluripotent stem cells  
  
研究代表者  
池 大官（Chi, Daekwan）  
  
自治医科大学・医学部・非常勤講師  
  
研究者番号：50784344  
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：アペール症候群の患者2名、ファイファー症候群の患者2名より採取した肉芽組織から初代培養した線維芽細胞を用いて、疾患特異的iPS細胞株を樹立した。これらのiPS細胞を用いて、報告されている複数の方法にて骨・軟骨分化誘導実験を施行したが、意図した誘導を確実に得ることができず、疾患特異的iPS細胞と正常iPS細胞の骨・軟骨分化におけるPhenotypeの相違を同定することはできなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義  
未だに根本的な治療法がない症候群性頭蓋骨縫合早期癒合症に対して新しいアプローチで解決を試みた。疾患特異的iPS細胞の骨・軟骨分化の過程における異常について分子生物学的解析を行うことにより、新規治療法開発の糸口が見つかると考えたが、期間内の研究では形質の違いを同定することはできなかった。骨・軟骨分化の方法に問題がある可能性があり、今後も継続していきたい。

研究成果の概要（英文）：We established disease-specific induced pluripotent stem cell lines from the patients of syndromic craniosynostosis and conducted experiments to induce bone and cartilage differentiation. However, we were not able to identify the phenotypes in bone and cartilage differentiation of disease-specific iPS cells within the study period.

研究分野：形成外科学

キーワード：頭蓋骨縫合早期癒合症

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

症候群性頭蓋縫合早期癒合症 (Crouzon症候群・Apert症候群・Pfeiffer症候群など) は、頭蓋縫合の早期癒合だけでなく、中顔面低形成や指趾奇形など種々の症状を呈する疾患である。線維芽細胞増殖因子受容体 (FGFR) の変異が原因として同定されているが、研究対象となる材料 (患者由来の骨芽・軟骨細胞) の獲得が倫理的に困難であるため、発症機序の詳細は不明であり、治療法は対症療法としての手術治療しかない。

人工多能性幹細胞 (iPS細胞) は、皮膚線維芽細胞や末梢血単核細胞より樹立される多能性幹細胞であり、主に再生医療のソースとして注目されてきた。しかし、近年では タナトフォリック骨異形成症の疾患特異的 iPS細胞を用いた薬剤スクリーニングにより、高脂血症治療薬であるスタチンが疾患特異的 iPS細胞の軟骨分化能を著明に改善することが示された報告や、Smith-Lemli-Opitz症候群の疾患特異的 iPS細胞を用いた解析により、7DHCの細胞内蓄積による Wnt/ $\beta$ -catenin 経路阻害がその真の病態であることが示された報告などが相次いでおり、研究材料が有限もしくは入手不可能な遺伝疾患の研究材料におけるソースとしても、iPS細胞は非常に有用であると考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、症候群性頭蓋縫合早期癒合症の詳細な発症機構を分子生物学的に明らかにすることにより、新規治療法開発への道を開くことである。具体的には、まず症候群性頭蓋縫合早期癒合症の患者から初代培養した皮膚線維芽細胞を用いて人工多能性幹細胞 (iPS細胞) を樹立する。そして、樹立した疾患特異的 iPS細胞が軟骨・骨系統に分化する過程を分子生物学的に解析して症候群性頭蓋縫合早期癒合症の病態生理を解明する。さらに、解明された発症機序をもとに候補薬剤をピックアップしたうえで、薬剤スクリーニングによるドラッグリポジショニングといった新規治療法の開発することを最終目標とする。

### 3. 研究の方法

ファイファー症候群の患者2名とアペール症候群の患者より採取した真皮組織より皮膚線維芽細胞を分離・培養した。この皮膚線維芽細胞に対して、Oct3/4, Sox2, Klf4, L-Myc 遺伝子をセンダイウイルスを用いてよって導入することにより iPS細胞を樹立した。樹立した iPS細胞に対して、骨・軟骨分化誘導実験を施行した。

### 4. 研究成果

ファイファー症候群の患者2名、アペール症候群の患者2名より採取した肉芽組織より線維芽細胞を初代培養した。(ファイファー症候群由来線維芽細胞:PfF1, PfF2、アペール症候群由来線維芽細胞:ApF1, ApF2)同様に患者より採取した皮膚片よりヒト由来正常線維芽細胞を初代培養した。(正常線維芽細胞:Nf1, Nf2)これら4株に対して、センダイウイルスを用いてOCT3/4, SOX2, KLF4, L-MYCの4遺伝子を導入した。ウイルス感染して1週間培養した後に、Lamini511-E8 fragment(i-Matrix 511)にてコーティングしたディッシュにリプレーティングした。iPS細胞専用培地(StemFit)を2日おきに交換し、約3週間後に形成されてきたiPS細胞様コロニー(図1)をピックアップした。

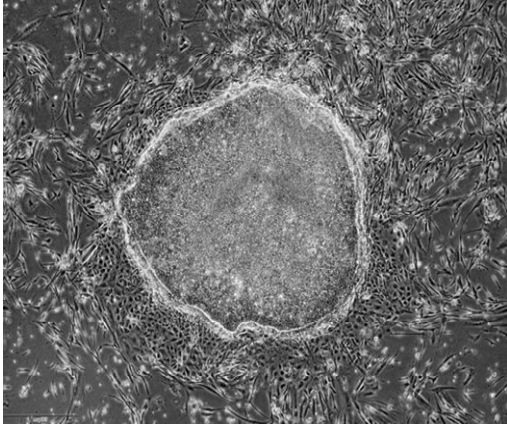


図 1

i-Matrix 511コーティングによるフィーダーフリー培養を継続し、継代の過程において線維芽細胞・分化細胞のコンタミネーションや分化傾向の明らかなコロニーを破棄していった結果、NF1, PfF1, PfF2, ApF1それぞれ6, 8, 8, 5株ずつiPS細胞状の敷石状コロニーを形成する細胞株を確立した。(NF2, ApF2からは確立できず)(図2)

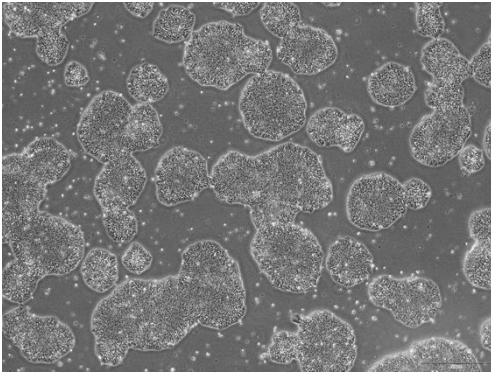


図 2

これらのiPS細胞株のコロニーは全てアルカリフォスファターゼ染色陽性かつOct4, SOX2, Nanog, SSEA-4抗体を用いた免疫蛍光染色陽性であり(図3)、未分化能を有していると考えられた。

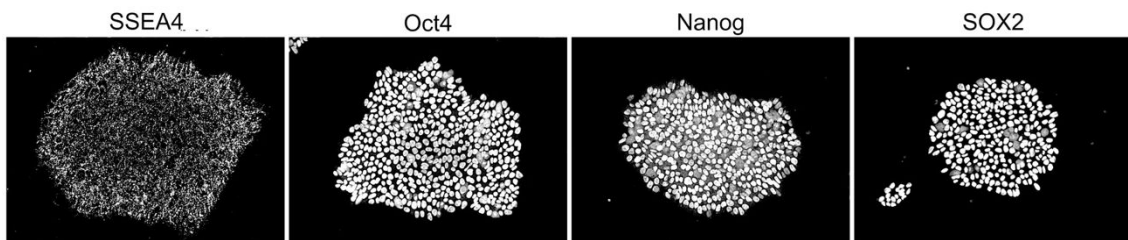


図 3

これらの細胞株に対して報告されている複数の方法にて骨・軟骨分化誘導実験を行った。しかし、期間内の研究では、意図した誘導を得ることができず、疾患特異的 iPS 細胞と正常 iPS 細胞の骨・軟骨分化における Phenotype の相違を同定することはできなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------