

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：36102
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2020～2022
課題番号：20K07457
研究課題名(和文) エーラス・ダンロス症候群患者iPS細胞を適用した骨・軟骨組織の再生に関する研究

研究課題名(英文) Regenerative medicine research on osteo-related tissues using Ehlers–Danlos syndrome spondylodysplastic type 3 induced pluripotent stem cells

研究代表者
庄司 正樹 (Shoji, Masaki)

徳島文理大学・薬学部・講師

研究者番号：00636821
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)：本研究では、脊椎手掌異形成型エーラス・ダンロス症候群(EDSSPD3)患者由来から人工多能性幹細胞を誘導後、CRISPR/Cas9システムを適用して、患者が有するZIP13-G64D点変異を修復した。そして、骨芽・軟骨細胞が属する間葉系間質細胞(MSC)へと分化誘導させることに成功した。この細胞を用いた実験により、当該患者iPS細胞由来MSCは、健常者由来と比べ骨分化能が低下したが、ZIP13-G64D点変異を修復することで上昇した。この結果は、当該患者の「骨の脆弱性」という病態が、ZIP13-G64D点変異から起こるMSCの骨形成能低下に因ることを示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、当該患者iPS細胞のZIP13-G64D点変異修復株由来MSCを用いて、点変異を起因としたMSCの骨形成能低下を示唆する結果を得た。これらは、EDSSPD3患者における骨・軟骨細胞の分化と機能にかかわるシグナル経路を解析でき、治療薬の新しい標的を発見できる。さらに、患者iPS細胞由来MSCを用いて実施される薬剤スクリーニングは、患者由来の細胞を用いる点で、直接的な治療薬の発見に繋がる。そして、EDSSPD3患者のZIP13-G64D点変異修復iPS細胞株は、当該患者の正常な骨・軟骨細胞を作製でき、患者本人に拒絶反応なく移植できることから、再生医療への発展性も秘めている。

研究成果の概要(英文)：ZIP13 dysfunction caused by the homozygosity for a GGT to GAT transition changing codon 64 from Gly(G) to Asp(D) in its gene (ZIP13-G64D) is responsible for Ehlers-Danlos syndrome spondylodysplastic type 3 (EDSSPD3). However, the development research on therapeutic agents against EDSSPD3-patients have not been reported. In this study, we were generated from dermal fibroblasts of EDSSPD3-patients to induced pluripotent stem cells (iPSCs). We repaired a G64D point mutated ZIP13 gene in EDSSPD3-patients iPSCs using CRISPR/Cas9 system. Next, EDSSPD3-patients iPSCs were differentiated to mesenchymal stem cells (MSCs) via neural crest cells. Osteoblast differentiated from MSCs of EDSSPD3-iPSCs was low osteogenic potential as comparison with those of MSCs of healthy control and ZIP13-G64D repaired clones. These results suggested that ZIP13-G64D mutation in EDSSPD3-patient iPSCs was attenuated in a differentiation potency from MSCs to osteoblasts.

研究分野：医歯薬学・医学・ウイルス学関連および実験病理学関連

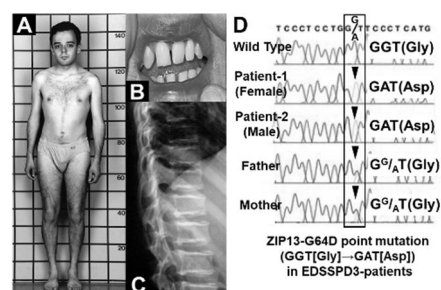
キーワード：脊椎手掌異形成型エーラス・ダンロス症候群 疾患特異的iPS細胞 CRISPR/Cas9 一塩基修復細胞 分化誘導 間葉系間質細胞 骨芽細胞

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

(1) 脊椎手掌異形成型エーラス・ダンロス症候群(EDSSPD3)

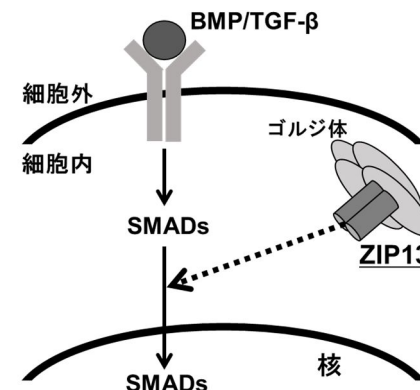
脊椎手掌異形成型エーラス・ダンロス症候群(EDSSPD3、OMIM 612350)は、細胞内亜鉛トランスポーターである ZIP13 の遺伝的 point 変異により発症したヒト疾患である(Fukada, *PLoS ONE* 2008、図 1)。当該疾患は、遅延(図 1A)や部分性無歯症(図 1B)、脊柱異形成(図 1C)など、骨・軟骨などの全身的な結合組織の脆弱性を呈する希少難病である。さらに、当該患者の ZIP13 は、64 番目のアミノ酸である Gly(G, コドン:GGT)が Asp(D, コドン:GAT)へと点変異(ZIP13-G64D)していた(図 1D)。



【図1】脊椎手掌異形成型エーラス・ダンロス症候群(EDSSPD3)の症例(Fukada, *PLoS ONE* 2008から改変)

(2) ZIP13 の G64D 点変異による骨・軟骨分化への影響

ZIP13 は、ゴルジ体から細胞質側への亜鉛輸送を担う。ZIP13 遺伝子欠損(KO)マウスは、EDSSPD3 と同様の病態を示すことが見出されている。さらに、当該マウス由来細胞の解析から、ZIP13 が骨・軟骨分化に重要な BMP/TGF- β シグナルの下流にある SMADs の核移行に関与する(Fukada, *PLoS ONE* 2008、図 2)。これは、ZIP13 がマウスの骨・軟骨分化と機能に重要であることを明示している。一方、G64D 点変異型 ZIP13 タンパク質は、細胞内で容易に分解され機能喪失することが示されている(Bin, *EMBO MM* 2014)。



【図2】ZIP13は、SMADsの核移行に関わる。

したがって、G64D 点変異型 ZIP13 を有する EDSSPD3 患者では、ZIP13 の機能喪失により骨・軟骨分化シグナルが破綻し、骨芽・軟骨細胞の分化と機能に異常が起こると考えられる。しかし、EDSSPD3 患者の骨芽・軟骨細胞を用いて、ZIP13 の G64D 点変異に因る病態研究や治療薬を含めた治療法に関連する創薬研究は、現時点で報告されていない。

2. 研究の目的

従来の遺伝子変異に因る希少難病の創薬研究では、その病態を呈した遺伝子改変動物を用いる。しかし、この手法では、種差の問題から、完全にヒトの病態や生理機能を踏まえた創薬研究が困難である。一方、患者の体細胞から誘導される人工多能性幹細胞(iPS 細胞)は、患者の病態を呈した各種細胞に分化できることから、希少難病の病態・創薬研究に有用である。そこで、申請者は、EDSSPD3 患者由来 iPS 細胞から骨芽・軟骨細胞への誘導過程において、その分化と機能にかかわるシグナル経路を解析することにより、ZIP13 の G64D 点変異が患者病態に与える影響を解明できると考えた。そして、当該患者由来細胞を用いて、解析したシグナル経路を標的とする薬剤が発見できれば、EDSSPD3 患者の骨関連組織を再生させる治療戦略を構築できると着想した。

本研究の目的は、EDSSPD3 患者由来 iPS 細胞から骨芽・軟骨細胞への誘導過程において、その分化と機能にかかわるシグナル経路を解析する。これにより、ZIP13 の G64D 点変異が患者病態に与える影響を解明するものである。さらに、当該患者 iPS 細胞由来の間葉系間質細胞(MSC)を用いて、解析したシグナル経路を標的とする薬剤の探索研究を実施する。そして、見出された薬剤を中心に、EDSSPD3 患者の骨関連組織を再生させる治療戦略の構築を目指す。

3. 研究の方法

(1) EDSSPD3 患者の皮膚繊維芽細胞から iPS 細胞の誘導

EDSSPD3 患者由来 iPS 細胞の誘導は、健常者および EDSSPD3 患者 2 名(女性および男性)の皮膚線維芽細胞にヒト iPS 細胞誘導用エピソーマルベクター(ヒト OCT3/4 および shp53、ヒト L-MYC および LIN28、ヒト SOX2 および KLF4、それぞれの遺伝子の発現カセットが導入されたプラスミド)をエレクトロポレーション用機器により導入することで行った。ベクター導入された各線維芽細胞は、マイトマイシン C 処理された SNL フィーダー細胞上に播種することで、iPS 細胞コロニーを発生させた。各々の iPS 細胞コロニーは、ピックアップ後フィーダーフリー条件で拡大培養し、未分化維持した。

(2) CRISPR/Cas9 システムを適用した EDSSPD3 患者 iPS 細胞の ZIP13-G64D 点変異修復 iPS 細胞株の樹立

EDSSPD3 患者の ZIP13-exon2 遺伝子における一塩基変異(GAT)から近い部位の NGG 配列を切断部位とし、guide RNA(gRNA)を設計した(図 3)。さらに、一塩基変異部位を含む全長約 100bp

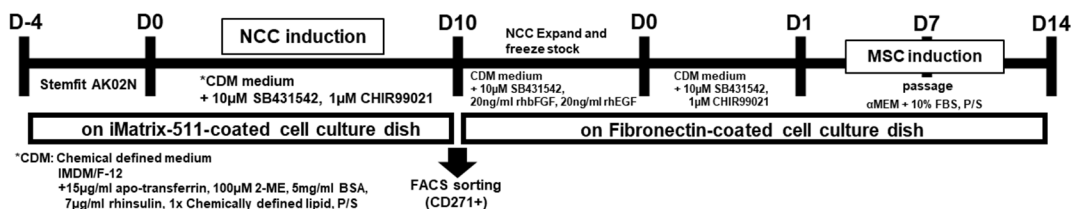
の配列を基に、遺伝子修復用一本鎖 DNA(ssODN)(GGT[Gly])を合成した(図 3)。設計の際、ssODN は、再び gRNA/Cas9 複合体に認識されないように、変異コドン以降の 2 つのコドン配列を、アミノ酸を変えないもの(TCA[Ser]および CTA[Leu])にした(図 3)。そして、組換え Cas9 タンパク質および gRNA、ssODN を共に、EDSSPD3 患者由来 iPS 細胞(女性および男性)にエレクトロポレーション法で導入した。これにより、gRNA/Cas9 複合体は、一塩基変異付近の二本鎖 DNA 切断を誘導し、遺伝子修復用 ssODN の相同配列を認識すると、修復用 ssODN を取り込む形で一塩基変異が修復される。導入された患者由来 iPS 細胞は、限界希釈法によりクローン化された後、ゲノム DNA を鋳型とした PCR 法で ZIP13-exon2 遺伝子の一塩基変異部位を増幅した。ZIP13-exon2 遺伝子アンプリコンは、シーケンス解析され、一塩基変異修復を確認した。

Original TCCCTCCTGGATTCCCTCATGGTGGGG
 sgRNA CTCCTGGATTCCCTCATGGT
 ssODN TCCCTCCTGGATTCCCTCATGGTGGGG

【図3】CRISPR/Cas9システムによる ZIP13-G64D 遺伝子変異修復の設計

(3) EDSSPD3 患者由来 iPS 細胞から MSC への分化誘導

骨芽・軟骨細胞は、MSC から分化することが知られている。そこで、申請者は、ヒト iPS 細胞から神経堤細胞(NCC)を介した MSC への分化誘導法(Fukuta, *PLoS ONE* 2014)を適用した(図 4)。具体的には、健常者および EDSSPD3 患者由来 iPS 細胞を TGF-β 阻害剤である SB431542 と GSK-3β 阻害剤である CHIR99021 を含む分化誘導培地で 10 日間培養し、NCC へと分化誘導させた。NCC は、細胞表面に CD271(p75^{NTR})が高発現していることから、CD271 抗体で蛍光免疫染色後、セルソーターを用い CD271 高発現細胞を単離した(図 4)。次に、CD271 高発現 NCC は、牛血清(FBS)を含む培養液で 14 日間培養し、MSC へと分化誘導させた(図 4)。



【図4】ヒトiPS細胞から間葉系間質細胞への分化誘導プロトコル

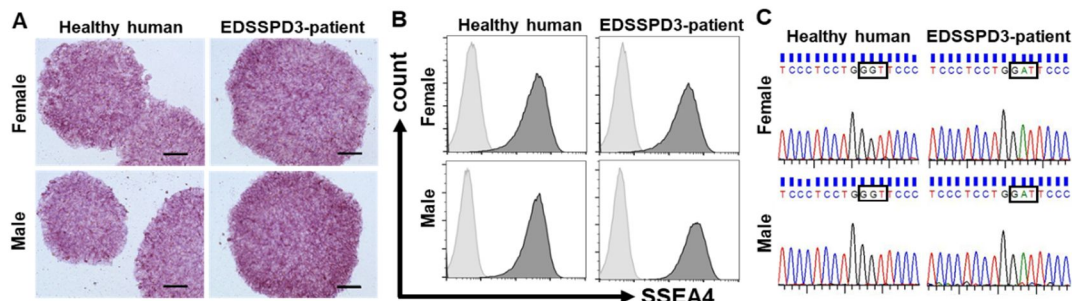
(4) EDSSPD3 患者 iPS 細胞由来の MSC から骨芽細胞への分化能

健常者および EDSSPD3 患者 iPS 由来 MSC(それぞれ女性)は、骨分化培地(デキサメタゾン、β-グリセロフォスフェート、アスコルビン酸含有)で 28 日間培養することにより、骨芽細胞へと分化誘導させた。MSC から骨芽細胞への分化誘導における陽性コントロールは健常者 MSC を用いた。MSC から骨芽細胞への分化誘導を確認するため、分化誘導 28 日目に、骨形成マーカーであるアルカリホスファターゼ(ALP)活性を ALP 染色で、また骨石灰化をアリザリンレッド O 染色で評価した。

4. 研究成果

(1) EDSSPD3 患者の皮膚繊維芽細胞から iPS 細胞の誘導

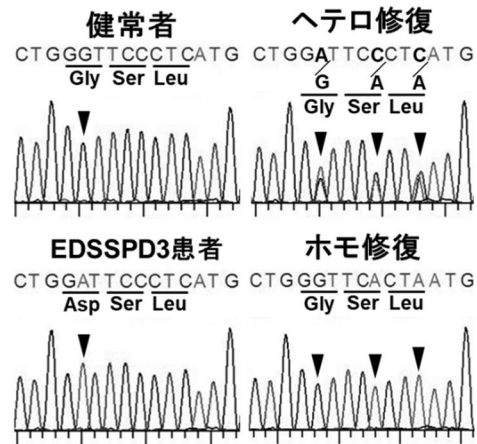
各種ヒト iPS 細胞の未分化性の確認は、ALP 活性の細胞染色と未分化幹細胞表面マーカーである stage-specific embryonic antigen 4 (SSEA4)発現をフローサイトメトリー解析でそれぞれ行った。誘導された EDSSPD3 患者由来 iPS 細胞は、健常者由来 iPS 細胞と同様に、ALP 活性の細胞染色が陽性であり(図 5A)、フローサイトメトリー解析でも SSEA4 が高発現していた(図 5B)。これらの結果は、健常者および EDSSPD3 患者由来の iPS 細胞が未分化性を維持した iPS 細胞であることを示している。さらに、EDSSPD3 患者が有する ZIP13 遺伝子の G64D 変異を確認するため、iPS 細胞の ZIP13-exon2 遺伝子の mRNA を逆転写後 PCR で解析したところ、EDSSPD3 患者由来の iPS 細胞は、健常者由来と比較して、ZIP13-G64D 遺伝子点変異していた(図 5C、黒枠)。以上より、申請者は、ZIP13G64D 変異を有する EDSSPD3 患者 2 名から iPS 細胞を誘導できた。



【図5】EDSSPD3患者由来iPS細胞の未分化性解析

(2) CRISPR/Cas9 システムを適用した EDSSPD3 患者 iPS 細胞の ZIP13-G64D 点変異修復 iPS 細胞株の樹立

遺伝子修復した EDSSPD3 患者由来 iPS 細胞の ZIP13 遺伝子配列を確認したところ、当該患者 iPS 細胞の ZIP13 遺伝子をホモ変異型(GAT, Asp:D)からヘテロ修復型(G^A/G^T, Gly:G)或いはホモ修復型(GGT, Gly:G)に修復されていた(図 6)。EDSSPD3 患者の ZIP13-G64D ヘテロ修復型は、EDSSPD3 を発症していない患者両親と同型である(図 1D)。したがって、申請者は、EDSSPD3 患者 iPS 細胞の ZIP13-G64D 点変異におけるヘテロ修復型およびホモ修復型の細胞株を樹立できた。これらの ZIP13 遺伝子修復 iPS 細胞株は、EDSSPD3 を発症せず、正常な骨芽・軟骨細胞へと分化誘導できると考えられる。以上のことから、CRISPR/Cas9 システムによる一塩基変異修復法の適用により、2 名の EDSSPD3 患者(女性および男性)由来 iPS 細胞の ZIP13-G64D 遺伝子点変異修復株を樹立できた。



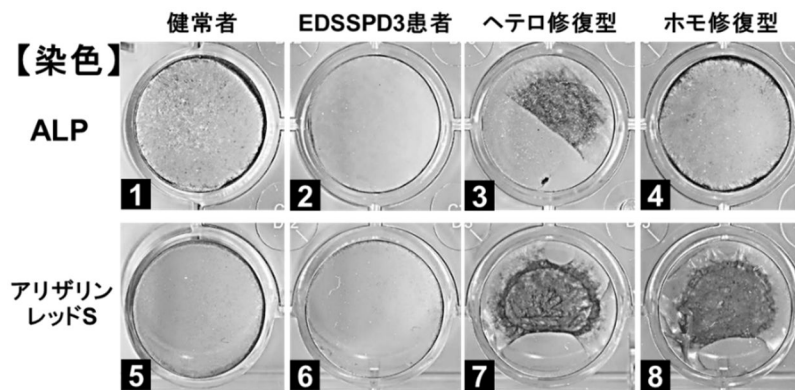
【図6】EDSSPD3患者iPS細胞のZIP13遺伝子修復株のZIP13-G64D遺伝子配列の解析

(3) EDSSPD3 患者由来 iPS 細胞から MSC への分化誘導

MSC への分化誘導 MSC の確認は、MSC 表面マーカーの陽性因子である CD73 および CD105、CD44 の発現と陰性因子である CD45 の発現をそれぞれの特異的抗体で蛍光免疫染色後、フローサイトメーターで解析した。その結果、EDSSPD3 患者 iPS 由来 MSC は、健康者由来 MSC と同様に、CD73 および CD105、CD44 が高発現しており、一方 CD45 は発現していなかった。以上より、EDSSPD3 患者 iPS 細胞から MSC を誘導できた。

(4) EDSSPD3 患者 iPS 細胞由来の MSC から骨芽細胞への分化能

各種 MSC の骨分化能を検討した。分化誘導した iPS 細胞株由来の MSC を骨分化培地で 28 日間培養したところ、EDSSPD3 患者 iPS 細胞由来の MSC から分化した骨芽細胞は、健康者由来と比べ、骨分化マーカーである ALP の活性が低下した(図 7: 1,2)。しかし、ZIP13-G64D 遺伝子点変異修復 iPS 細胞由来の MSC から分化した骨芽細胞では上昇した(図 7: 2-4)。興味深いことに、カルシウムの沈着を染色することで骨形成能を検討できるアリザリンレッド S 染色でも同様の結果を得た(図 7: 5-8)。以上より、EDSSPD3 患者 iPS 細胞由来の MSC は、健康者や ZIP13-G64D 遺伝子点変異の修復株由来と比べ、骨芽細胞への分化能が低いことを見出した。この結果は、当該患者の有する「骨の脆弱性」という病態が、ZIP13-G64D 遺伝子点変異から起こる MSC の骨形成能低下に因ることを示唆している。



【図7】EDSSPD3患者iPS細胞のZIP13点変異修復株由来MSCにおける骨形成能の解析

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 庄司正樹, 大橋拓人, 長瀬早咲, 市橋健太, 原貴史, 吉開会美, 福中彩子, 藤谷与士夫, Heloisa G. dos Santos, 深田俊幸, 葛原隆.
2. 発表標題 骨格筋分化におけるZIP13の関与: 脊椎手掌異形成型エーラス・ダンロス症候群患者のiPS細胞を用いた検討.
3. 学会等名 第22回 日本再生医療学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Masaki Shoji
2. 発表標題 Characteristic analysis of skeletal muscle cells differentiated from Ehlers-Danlos syndrome, spondylodysplastic type 3 (EDSSPD3)-patient induced pluripotent stem cells.
3. 学会等名 International Meeting at IMCR Joint Usage/Research Program for Endocrine & Metabolism “Role of Zinc metabolism in Health and Disease” (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

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