

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：32650

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K17027

研究課題名（和文）iPS細胞を用いた遺伝性骨疾患患者に対する骨損傷治療法の探索

研究課題名（英文）Exploring therapies for bone damage in patients with inherited bone diseases using iPSC cells

研究代表者

青木 栄人 (Aoki, Hideto)

東京歯科大学・歯学部・非常勤講師

研究者番号：90801481

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：樹立方法を確立したRunx2^{+/-}、^{-/-}マウス由来iPSCを用いて、遺伝性骨疾患患者の骨損傷に対する治療法としてのiPSC応用の可能性について検討した。骨芽細胞分化の初期段階で、wild-type マウスiPSC由来骨芽細胞と比較して、Runx2^{-/-}細胞ではRank1の発現が上昇し、Vdrの発現が低下した。さらにRunx2^{-/-}細胞では1,25(OH)2D3に対する反応が減少することがわかった。これらより、Runx2によるRank1とVdrの制御が骨量に大きく影響することが示唆された。Runx2^{+/-}が原因の遺伝性骨疾患である鎖骨頭蓋異形成症患者の骨粗鬆症治療戦略に重要なデータを得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

iPS細胞は高い増殖能と多分化能を有することで、細胞移植におけるソースとして期待されている。特に、疾患特異的iPS細胞への期待は大きく、病態解明が困難とされてきた多くの疾患において、その利用価値が高まっている。本研究では、樹立したRunx2ヘテロ、ホモ欠損マウス由来iPS細胞を用いて、遺伝性骨疾患患者の骨損傷に対する治療法としてのiPS細胞応用の可能性について検討した。その結果、Runx2によるRank1とVdrの複合制御が骨量に大きく影響することが示唆された。本研究内容はRunx2ヘテロ欠損が原因の遺伝性骨疾患である鎖骨頭蓋異形成症患者の骨粗鬆症治療に対する重要なデータである。

研究成果の概要（英文）：Using iPSCs derived from established Runx2^{+/-} and ^{-/-} mice, we investigated the potential of iPSC application as a treatment for bone damage in patients with inherited bone diseases. During the early stages of osteoblast differentiation, Rank1 expression was upregulated and Vdr expression was downregulated in Runx2^{-/-} cells compared to wild-type mouse iPSC-derived osteoblasts. Furthermore, the response to 1,25(OH)2D3 was decreased in Runx2^{-/-} cells. These findings suggest that the regulation of Rank1 and Vdr by Runx2 has a significant impact on bone mass, providing important data for osteoporosis treatment strategies for patients with clavicular craniocranial dysplasia, a genetic bone disease caused by Runx2^{+/-}.

研究分野：再生医療

キーワード：iPS細胞 骨分化 Runx2 再生療法

1. 研究開始当初の背景

骨芽細胞分化には、様々なシグナル分子が関与しており、それらのシグナルのクロストークにより厳密に制御されている。この過程で、骨芽細胞は分化段階により種々の表現系を発現する。ノックアウトマウスを使用した解析から、骨芽細胞に特異的な転写因子である *Runx2* (Komori T, et al. Cell 1997) と *Osterix (Sp7)* (Nakashima K, et al. Cell 2002) が重要な役割を担っていることが明らかにされている。

鎖骨頭蓋異形成症は、*RUNX2* を原因遺伝子とする常染色体性優性遺伝疾患であり、鎖骨低形成、頭蓋骨縫合閉鎖不全などの症状を示し、骨形成不全および骨粗鬆症に罹患しやすいことが知られている (Mundlos S, et al. J Med Genet 1999)。近年では疾患特異的 iPS 細胞を用いた、病態解明や治療法についての研究が進められているが、いまだ不明な点が多い。さらには、こうした骨疾患を有する患者における骨損傷に対する患者由来組織の自家移植は極めて困難なのが現状である。

iPS 細胞は高い増殖能と多分化能を有することで、細胞移植における一つのソースとして期待されている。特に、疾患特異的 iPS 細胞への期待は大きく、これまで病態解明が困難とされてきた多くの疾患において、その利用価値が高まっている。遺伝子疾患を有する患者に対する再生療法への応用には、実際の疾患モデルを使用して検討する必要がある。近年では、iPS 細胞を用いた *in vivo* 研究も行われているが、特異疾患モデルから作成された iPS 細胞を用いて自家移植を行い、評価している研究は極めて少ない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、遺伝性骨疾患患者に対する骨損傷の治療方法として、iPS 細胞の応用が可能であるかを検討することである。本研究では鎖骨頭蓋異形成症のモデルマウスによる疾患特異的 iPS 細胞を作成し、遺伝子編集技術を応用して、その細胞の遺伝子変異の正常化を行う。さらに疾患特異的モデルマウスに同細胞を自家移植することで移植細胞の動態を解析し、iPS 細胞を用いた細胞移植の可能性を検討する。

3. 研究の方法

樹立方法を確立した *Runx2* ヘテロ欠損マウス iPS 細胞 (*Runx2*^{+/-} miPSCs) (Aoki H, et al. manuscript in preparation) を用いて骨芽細胞へと分化誘導し、リアルタイム PCR による骨芽細胞分化関連遺伝子の解析と ALP 染色、von Kossa 染色による骨芽細胞分化の評価を行う。さらに、作成した Revertant-miPSCs と *Runx2*^{+/-} miPSCs を 12 週齢となったマウスに自家移植し、移植細胞の動態及び骨欠損の治癒状態を形態学的 (μCT 画像解析、走査型電子顕微鏡による観察)、組織学的 (HE 染色、von Kossa 染色) に解析する。また、

移植細胞にはレンチウイルスを用いて蛍光タンパク質を遺伝子導入することにより、移植後の細胞動態の観察を行う。

4. 研究成果

骨芽細胞分化 14 日目の *Runx2*^{-/-} miPSCs では、wild-type miPSC 由来細胞と比較して、*Rankl* と *Opg* の mRNA 発現が有意に高いことが確認されました。*Runx2*^{+/-} および *Runx2*^{-/-} miPSC では、wild-type miPSCs と比較して、骨芽細胞分化処理後に *Rankl*/*Opg* 比が有意に減少した。また、*Runx2*^{-/-} 細胞では、wild-type および *Runx2*^{+/-} miPSC 由来の骨芽細胞と比較して、*Vdr* mRNA の発現が有意に低いことも確認された (図 1)。

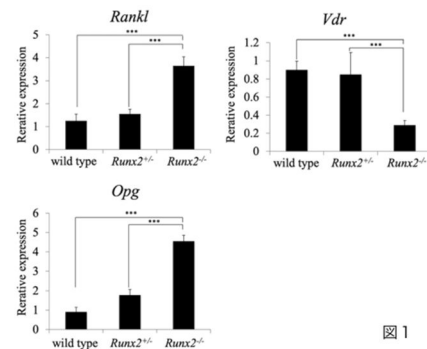
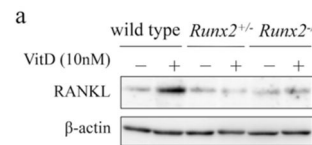


図 1

次に、VDR の標的として RANKL のタンパク質レ

ベルと *Cyp24a1* mRNA の発現を確認した。miPSC 由来細胞を $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ で処理すると、wild-type でのみ RANKL タンパク質レベルが有意に増加した。*Runx2*^{+/-} および

Runx2^{-/-} miPSC 由来細胞は両方とも、 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ に反応して、RANKL タンパク質レベルに変化を示さ



なかった。同様に、骨芽細胞分化の 14 日目に miPSC 由来細胞を $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ で処理すると、野生型細胞でのみ *Cyp24a1* mRNA が有意に増加した (図 2)。

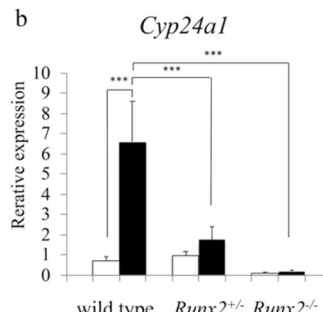


図 2

今回の研究で、*Runx2* が miPSC の骨芽細胞分化の初期段階で *Vdr* の発現に影響を与えたことが示された。これは、*Runx2*^{+/-} が原因で生じる遺伝子骨疾患である鎖骨頭蓋異形成症患者に関連する骨形成障害が *Vdr* の発現レベルの低下により発生する可能性があることを示唆している。野生型 miPSC 由来細胞と比較して、*Runx2*^{+/-} および

Runx2^{-/-} miPSC 由来細胞の両方で $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 処理による *Cyp24a1* mRNA の発現が増加しなかったことより、VDR が機能していないことを示している可能性がある。鎖骨頭蓋異形成症患者によく見られる脆弱性骨折や骨粗鬆症を引き起こす骨の微細構造に RUNX2 がどのように影響するかを明らかにするには、さらなる研究が必要です。

今回の得られたデータは鎖骨頭蓋異形成症患者の骨粗鬆症治療戦略に対する重要なデータとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Aoki Hideto, Suzuki Eiichi, Nakamura Takashi, Onodera Shoko, Saito Akiko, Ohtaka Manami, Nakanishi Mahito, Nishimura Ken, Saito Atsushi, Azuma Toshifumi	4. 巻 55
2. 論文標題 Induced pluripotent stem cells from homozygous Runx2-deficient mice show poor response to vitamin D during osteoblastic differentiation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Medical Molecular Morphology	6. 最初と最後の頁 174 ~ 186
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00795-022-00317-w	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
---------	---------