

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591507

研究課題名(和文) iPS細胞からの軟骨分化システムを用いた先天性骨・関節疾患の網羅的解析法の開発

研究課題名(英文) Global analysis of congenital bone and joint diseases using a chondrogenic differentiation system from iPS cells

研究代表者

梅田 雄嗣 (UMEDA, KATSUTUSGU)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：80397538

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：神経堤細胞由来の軟骨前駆細胞分化誘導システムを患者由来iPS細胞に適用し、骨端軟骨板過形成を特徴とする先天性骨・関節疾患の一つであるCINCA症候群の病態再現を試みた。三次元軟骨分化アッセイでは、野生型iPS細胞と比較して変異型iPS細胞由来の軟骨前駆細胞は有意に巨大な軟骨ペレットを形成した。また、免疫不全マウスへの皮下移植によるin vivo軟骨形成アッセイでは変異型iPS細胞由来の未熟な軟骨前駆細胞からなる巨大な軟骨組織が得られ、本症候群の骨・軟骨形成異常を忠実に再現できることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We addressed whether the pathogenesis of CINCA syndrome, a congenital bone and joint disease characterized by epiphyseal overgrowth, could be recapitulated by using neural crest-derived chondroprogenitor differentiation from using patient-derived iPS cells. 3D chondrogenic assays showed mutant iPS cells produced significantly huge chondrogenous pellets than wild type iPS cells. Furthermore, in vivo chondrogenic assays by subcutaneous xenotransplantation into immunodeficient mice showed that huge chondrogenous tissues, consisting of immature chondroprogenitors, were obtained, which recapitulates the pathological condition of the syndrome.

研究分野：小児科学

キーワード：iPS細胞 骨・関節疾患 軟骨分化

## 1. 研究開始当初の背景

軟骨は胎生期に神経堤細胞、沿軸中胚葉、側板中胚葉に一時的に存在する軟骨前駆細胞から形成され、それぞれ顔面・頭蓋、体幹、四肢の骨格形成を司る。頭蓋・顔面、体幹、四肢の骨・軟骨の形成不全、形態異常、成熟障害を示す様々な先天性骨・関節疾患が存在し、その一部は胎生期または新生児期に致死的となり、その他の疾患も重度の骨格異常や機能障害のため患者のQOLは低い。その病態は前駆細胞の発生レベルの障害、前駆細胞から軟骨・骨への分化障害、軟骨・骨基質の質的・量的異常など多岐にわたると考えられている。

軟骨前駆細胞は生後にはほぼ消失しており、出生後に検体を得る事は困難である。そのため、ほとんどの先天性骨・関節疾患の病態機序・新規治療法の開発については十分な検討がなされていない。胚性幹細胞(ES細胞)は生体のあらゆる組織に分化し得る能力を保持しながら、ほぼ無尽蔵に増殖する性質を有する。また近年成体の皮膚・血液などの細胞に遺伝子導入する事によりES細胞とほぼ同等の自己複製能・多分化能を有する induced pluripotent stem (iPS)細胞が樹立され、疾患特異的 iPS 細胞の樹立により、再生医療・病態解明・創薬開発に対する貢献が期待されている。これら多能性幹細胞を用いた研究の最大の利点の一つとして、軟骨前駆細胞のような胎児期に一過性に出現する臓器の幹細胞・前駆細胞の解析が可能である事が挙げられる。

近年ヒトES細胞を用いた軟骨細胞の分化誘導の報告が散見されるが、その多くは起源が不明の間葉系細胞を用いており、個々の系統の軟骨前駆細胞の発生機構を解析するモデルとしては不適切な可能性が高い。また、形成された軟骨は十分成熟しておらず、疾患の病態解明や薬剤効果判定を評価するサンプルとしては不十分である。

ヒトES細胞から側板中胚葉由来と考えられる軟骨分化誘導方法が唯一報告されているが、前駆細胞の同定は出来ておらず、また形成された軟骨の成熟度も十分検討されていない (Oldershaw RA, Nat Biotech 2010, 28; 1187)。マウスES細胞では沿軸中胚葉と側板中胚葉由来の軟骨分化誘導 (Nakayama N, J Cell Sci 2003, 116; 2015)、分化した軟骨片のマウスへの皮下移植により、骨への分化誘導が報告されている (Jukes JM, Proc Natl Acad Sci USA 2008, 105, 6840)。申請者は WNT/ $\beta$ -catenin 活性を亢進させ、BMP 活性を抑制する事でヒトES/iPS細胞から沿軸中胚葉由来の軟骨前駆細胞分化誘導に成功した (Nakayama N. Embryonic Stem Cells (in press); Umeda K. 投稿中)。また Nodal/Activin 活性の抑制により得られたヒトES/iPS細胞由来神経堤細胞を培養し、軟骨前駆細胞を選択的に増殖する培養システムを開発した (Umeda et al. 投稿準備中)。両系統の軟骨前駆細胞は、PDGF-BB、TGF $\beta$ 3、BMP4を加えた三次元培養にて生体に存在する軟骨とほぼ同等の生物学的活性を有する成熟した軟骨組織を形成した。

## 2. 研究の目的

申請者はヒト多能性幹細胞 (ES/iPS細胞) から2系統(神経堤細胞、沿軸中胚葉由来)の軟骨前駆細胞から軟骨を作成する培養システムを開発した。本研究の目的は3系統全ての軟骨・骨分化誘導システムを完成し、患者iPS細胞を用いた先天性骨・関節疾患の病態および新規治療法を網羅的に解析する基盤技術を開発することである。

## 3. 研究の方法

(平成24年度)

### (1)ヒトES/iPS細胞からの側板中胚葉由来の成熟軟骨分化誘導システムの確立

a) ES/iPS細胞から胚様体を形成し、Wnt3a、Activin、bFGF、BMP4等の成長因子を様々

な組み合わせで投与し、6-8 日間浮遊培養する。分化した細胞における細胞表面抗原 (PDGFR $\alpha$ 、VEGFR2、CD34、CD73 など) の発現をフローサイトメトリーにて解析する。発現を認められたマーカーについては陽性分画と陰性分画に選別し、側板中胚葉マーカー (PRRX1、FOXF1) の発現をリアルタイム PCR で調べ、陽性分画で高発現を認める軟骨前駆細胞のマーカー候補を探す。

b) 候補の軟骨前駆細胞マーカーを用いて陽性分画と陰性分画に選別し、軟骨分化活性を調べる。分化方法としては比較的短期間(約 2 週間)に分化能が判定できる二次元培養法を用いる。陽性・陰性分画細胞を PDGF-BB、TGF $\beta$ 3、BMP4 などの成長因子存在下にフィブロネクチンをコートしたウェル上で培養し、アルシャンブルー染色で判定する。

## (2)免疫不全マウスへの移植によるヒト ES/iPS 細胞から骨への分化システムの確立

a) 3 系統の分化誘導システムを用いて軟骨前駆細胞を誘導する。沿軸中胚葉への分化には GSK-3 阻害剤 (BIO) BMP アンタゴニスト (Noggin) Nodal/Activin インヒビター (SB431542) を用い、PDGFR $\alpha$ <sup>+</sup>VEGFR2<sup>-</sup>細胞を誘導する。神経堤細胞への分化には SB431542 を単独で使用し、CD271<sup>+</sup> PDGFR $\alpha$ <sup>+</sup>細胞を分化誘導する。側板中胚葉への分化には(1)で開発した培養方法を誘導する。純化

した軟骨前駆細胞は PDGF-BB、TGF $\beta$ 3、BMP4 存在下で三次元培養を行い、軟骨片を得る。

b)軟骨片を免疫不全マウスへ移植し、in vivo で骨分化を誘導する。三次元培養にて形成された軟骨片を、免疫不全マウス (NOD/SCID/ $\gamma$ c<sup>null</sup> マウス) の皮下へ移植する。4-6 週後に移植片を取り出し、軟骨から骨への移行はアルシャンブルー染色とア

リザリンレッド染色の二重染色で確認する。

## (平成 25、26 年度)

### **(3)形成された軟骨・骨の表現型評価法の確立**

ヒト ES/iPS 細胞から分化誘導された成熟軟骨・骨の生物学的特性、分化・増殖に関する転写因子活性、シグナル伝達経路に対する以下の項目の評価法を確立する。

a)軟骨の評価法：免疫染色 (1・2・10 型コラーゲン、アグリカン) リアルタイム PCR (1・2・10 型コラーゲン、アグリカン、SOX9、NKX3.2、COMP)。

b)骨の評価法：特殊染色 (フォンコッサ染色、アルカリフォスファターゼ染色) 免疫染色 (オステオカルシン：OSC) リアルタイム PCR (RUNX2、OSC、BSP、MMP13) ウェスタンブロット法 (MAPK、STAT1、p53) アポトーシス検査 (Tunnel 法)。

### **(4)先天性骨・関節疾患 iPS 細胞の樹立、軟骨・骨への分化誘導とその表現型の評価**

a)神経堤細胞 (Treacher Collins 症候群) 沿軸中胚葉 (軟骨無形成症) 側板中胚葉 (CINCA 症候群)由来の軟骨・骨形成障害に異常がある疾患の iPS 細胞を樹立する。樹立された iPS 細胞は正常核型、未分化マーカー発現 (Oct3/4、Nanog、TRA-1-60 等) in vitro または in vivo での多分化能を確認する。責任遺伝子が明らかな疾患については、同一の異常が存在するかを確認する。

b)疾患 iPS 細胞を 3 系統の分化誘導システムを用いて分化させ、前駆細胞の発生過程をフローサイトメトリーで評価する。次に成熟軟骨・骨の分化過程を(3)の評価法を用いて解析する。

## 4 . 研究成果

神経堤細胞由来の軟骨前駆細胞を用いた軟骨・骨分化誘導システムを用いて、ヒト多能性幹細胞から形成される軟骨・骨の表現型評価法の確立を試みた。ES/iPS 細胞を無血清

培養条件下で TGF $\alpha$ /Nodal/Activin インヒビターや bFGF を添加すると CD271+CD73+間葉系細胞を大量に増幅した。この細胞を三次元培養すると均質な軟骨ペレットが形成され、免疫不全マウスに皮下移植すると巨大に成長した骨・軟骨ペレットが得られた。病理組織学的検討では軟骨組織と骨組織が混在する内軟骨性骨化が再現されていた。

CINCA 症候群は NLRP3 変異による自己炎症性疾患で、骨端軟骨板過形成が特徴所見の一つである。正常組織における NLRP3 の発現は血液細胞と軟骨のみであるが、本症候群における骨端軟骨板過形成の機序は不明である。そのため、発生初期の病態を充実に模倣しうる iPS 細胞を用いた研究を行うこととした。

NLRP3 体細胞モザイクを有する CINCA 症候群の患者から変異のある iPS 細胞と変異のない iPS 細胞を作製した。得られた iPS 細胞から分化誘導した軟骨前駆細胞を用いて三次元軟骨分化誘導を行った。野生型 iPS 細胞と比較して変異型 iPS 細胞由来の軟骨前駆細胞は有意に巨大な軟骨組織を形成した。

軟骨前駆細胞を免疫不全マウスに皮下移植すると、野生型 iPS 細胞と比較して、変異型 iPS 細胞由来軟骨前駆細胞を移植したマウスでは巨大な骨・軟骨組織を形成した。病理組織学的検討では、野生型 iPS 細胞由来軟骨前駆細胞を移植したマウスではほぼ均一な骨組織を認めたのに対して、変異型 iPS 細胞由来軟骨前駆細胞を移植したマウスでは幼弱な軟骨細胞の無秩序な増生を認めた。患者由来の iPS 細胞を用いることにより、本症候群の骨端軟骨板における過形成を特徴とする骨・軟骨形成異常を忠実に再現できることが明らかとなった。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

梅田雄嗣 医学系研究科 (助教)

研究者番号: 80397538

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：