

平成 2 6 年 6 月 1 1 日現在

機関番号： 1 4 3 0 1

研究種目： 若手研究(B)

研究期間： 2012 ～ 2013

課題番号： 2 4 7 9 1 5 4 1

研究課題名（和文）軟骨疾患由来誘導軟骨細胞を用いたⅡ型コラーゲン代謝の解析

研究課題名（英文）Modeling type II collagenopathy

研究代表者

岡田 稔（Okada, Minoru）

京都大学・iPS細胞研究所・研究員

研究者番号： 3 0 6 2 5 8 3 5

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000 円、（間接経費） 960,000 円

研究成果の概要（和文）：研究の全体構想は骨系統疾患の1つであるⅡ型コラーゲン病の病態を解明し治療薬を開発することである。この目標を達成するために、本研究では細胞リプログラミング技術を用いて培養下で疾患モデルを構築した。具体的には、Ⅱ型コラーゲン病患者の皮膚細胞に外部から遺伝子を強制的に発現させることによって軟骨細胞およびiPS細胞を作製した。軟骨分化培養条件を適用することによってiPS細胞から軟骨細胞を誘導した。これらの軟骨細胞では、異常なⅡ型コラーゲンが細胞内に蓄積するとともに小胞体ストレスシグナルが検出され、細胞死が誘発されていた。今後、本研究で作製した軟骨細胞を用いて治療薬を探索することが可能になった。

研究成果の概要（英文）：The purpose is to clarify mechanisms of type II collagenopathy and to find drugs for medical application. In this study, we established disease models of type II collagenopathy using cell reprogramming technologies. To generate disease-specific chondrocytes, we introduced retrovirus or plasmid vectors encoding specific genes to patients fibroblasts. Disease-specific chondrocytes derived from patients fibroblasts or iPS cells showed intracellular accumulation of mutated type II collagen and endoplasmic reticulum stress, resulting apoptosis. These disease models reflect phenotypes of type II collagenopathy and can be useful for drug screening in further investigations.

研究分野： 医歯薬学

科研費の分科・細目： 外科系臨床医学・整形外科学

キーワード： 整形外科学 細胞生物学 分子生物学

1. 研究開始当初の背景

骨系統疾患は、骨、軟骨の分化や成長の異常によって骨格の変形を呈する疾患の総称である。脊椎の骨格変形は脊髄圧迫の原因になり、麻痺を起こす。気管軟骨や肋軟骨の変形や脆弱性は呼吸困難を引き起こし、重症の場合には生後早期の死因になる。骨系統疾患のほとんどは単一遺伝子病であり、最近の研究によって原因遺伝子が明らかにされてきた。例えば、軟骨細胞外マトリックスの構成因子である II 型コラーゲンをコードする遺伝子や、軟骨細胞分化に重要な役割をもつ線維芽細胞増殖因子(FGF)受容体をコードする遺伝子に変異が発見された。個々の疾患の罹患率は高くないが、骨系統疾患全体では数千人に一人以上の患者がいると考えられている。しかし、骨系統疾患の大部分は、発症の過程や、症状が進行していく分子機構が不明であり、有効な治療法が存在しない。

2. 研究の目的

研究の全体構想は、骨系統疾患の軟骨病変の病態を解明し、臨床応用へ向けた創薬を行うことである。本研究では、骨系統疾患の一つである II 型コラーゲン病の病態解明および治療薬の探索を目的とし、それらを可能にする疾患モデルを構築した。

3. 研究の方法

(1) iPS 細胞の作製

II 型コラーゲン病患者の皮膚線維芽細胞に 4 つのリプログラミング因子(Oct3/4, Klf4, Sox2, c-Myc)を導入し iPS 細胞を作製した。

(2) iPS 細胞から軟骨細胞への分化

作製した iPS 細胞に Wnt, Activin などを適宜添加し、発生過程を模倣するように、中胚葉、間葉系細胞、軟骨系譜へと分化させた。さらに、軟骨様の結節を含む軟骨細胞を 3 次元で培養し分化・成長させた。

(3) 線維芽細胞からの軟骨細胞の直接誘導

II 型コラーゲン病患者の皮膚線維芽細胞に 2 つのリプログラミング因子(Klf4, c-Myc)と 1 つの軟骨分化因子(Sox9)を導入し軟骨様細胞を作製した。

(4) 軟骨細胞の評価

DNA シークエンスによって II 型コラーゲン遺伝子変異を評価した。患者の皮膚線維芽細胞から誘導した軟骨細胞と正常線維芽細胞から誘導した軟骨細胞を比較した。RNA を抽出し軟骨マーカー遺伝子である Sox5, Sox9, Col2a1, Agcn, Comp 遺伝子の発現を real time PCR により評価した。電子顕微鏡をもちいて細胞内小器官を観察した。小胞体ストレスマーカーである Bip, Chop, Gpr94, Pdi, p58ipk, Erdj4 の発現を定量した。TUNEL 試験によりアポトーシスの割合を定量した。3 次元培養した軟骨組織をアルシア

ンブルー、トルイジンブルー、サフラニン O 染色によって評価した。

4. 研究成果

(1) iPS 細胞の作製

患者の皮膚線維芽細胞から DNA を抽出しシークエンスによって II 型コラーゲン遺伝子に変異があることを確認した。iPS 細胞の作製効率は正常皮膚線維芽細胞由来 iPS 細胞のものと同様であった。多能性のレベルも問題は見られなかった。

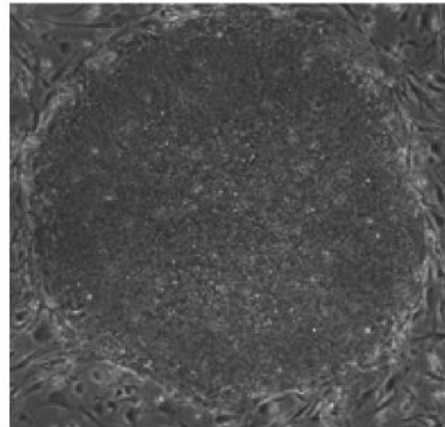


図1. II型コラーゲン病患者の皮膚線維芽細胞から作製したiPS細胞。

(2) iPS 細胞から軟骨細胞への分化

作製した iPS 細胞を培養下で軟骨細胞へと分化させ、病態の再現を試みた。分化誘導の約 10 日後から、原因遺伝子の発現によるドミナント・ネガティブ効果に誘発され、細胞小器官の異常、軟骨特異的遺伝子の低発現、形態的な異常が認められた。約三週間からは高頻度の細胞死が継続的に観察され、陽性対照との細胞レベルにおける差異が顕著に増大した。誘導後期では軟骨マーカーの染色が大部分で陰性となり、明らかな軟骨低形成が示され、病態の一部を再現することに成功した。

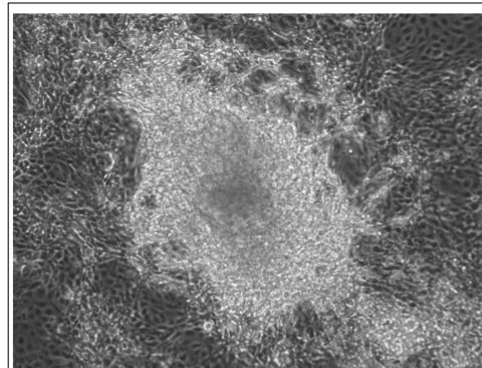


図1. II型コラーゲン病iPS細胞から分化した軟骨様の結節。単層の軟骨細胞上に形成される。

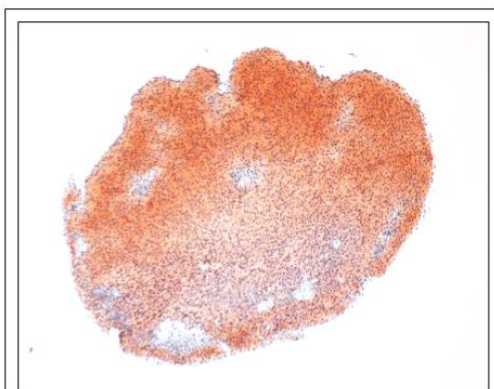


図2. 正常線維芽細胞から軟骨細胞を誘導し、3次元培養を用いた組織学的解析。サフラニンO陽性を示す。

(3) 線維芽細胞からの軟骨細胞の直接誘導
線維芽細胞から直接、軟骨細胞を誘導し、上記の疾患 iPS 由来軟骨と同様の結果が得られた。この方法を用いる場合、発生過程を模倣しない点において iPS 細胞研究に劣るが、均一な疾患軟骨細胞の獲得が容易であることや、病態を培養下で比較的早く再現できる利点があることがわかった。

今後、これらの結果・技術を活かし、病態の全容解明に向けて解析をさらに進める予定である。

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 1 件)

Outani H, Okada M, Yamashita A, Nakagawa K, Yoshikawa H, Tsumaki N: Direct induction of chondrogenic cells from human dermal fibroblast culture by defined factors. PLoS ONE 8 e77365 (2013)

〔学会発表〕(計 9 件)

岡田稔「ヒト iPS 細胞培養デモ及び実技訓練」 共同研究拠点 疾患特異的 iPS 細胞を活用した筋骨格系難病研究 平成 25 年度後期技術講習会 (2014)

岡田稔、妻木範行「ディレクトッドリプログラミング技術を用いた II 型コラーゲン病モデルの構築」 iPS 細胞研究の今 JST 戦略的創造研究推進事業「iPS 細胞」研究支援 3 制度合同シンポジウム (2014)

岡田稔、妻木範行「細胞リプログラミング技術を用いた II 型コラーゲン病疾患モデリング」 第 4 回 Orthopedic Research Club (2013)

Okada M and Tsumaki N: Directed conversion and iPS cell technologies allow for pathophysiological recapitulation of

type II collagenopathy. 10th Meeting of Bone Biology Forum (2013)

岡田稔「軟骨分化誘導の実際」 共同研究拠点 疾患特異的 iPS 細胞を活用した筋骨格系難病研究 平成 25 年度前期技術講習会 (2013)

岡田稔、池川志郎、今泉和則、澤井英明、室月淳、大橋博文、妻木範行 「細胞リプログラミング技術を用いた II 型コラーゲン病疾患モデルの解析」 第 26 回日本軟骨代謝学会 (2013)

岡田稔、妻木範行「細胞リプログラミング技術を用いた II 型コラーゲン病疾患モデルの解析」 第 9 回 Skeletal Research Meeting (2012)

岡田稔、妻木範行 Modeling of Type II collagenopathy using Cell Reprogramming Technologies. 第 13 回運動器科学研究会 (2012)

Okada M, Yamashita A, and Tsumaki N: Chondrogenic differentiation of human iPS cells. 10th Annual Meeting of ISSCR (2012)

〔図書〕(計 2 件)

7) 妻木範行、岡田稔、山下晃弘 「iPS 細胞を使うー軟骨の研究へ」 整形外科 64 1106-1109 南江堂 (2013)

8) 岡田稔、妻木範行 「多能性幹細胞 (ES 細胞、iPS 細胞) を使った軟骨再生」 再生医療叢書 第 6 巻 52-60 朝倉書店 (2012)

〔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:

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

岡田 稔 (OKADA, Minoru)

京都大学 iPS 細胞研究所・研究員

研究者番号：30625835

(2)連携研究者

妻木 範行 (TSUMAKI, Noriyuki)

京都大学 iPS 細胞研究所・教授

研究者番号：