

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461384

研究課題名(和文) ヒトiPS細胞を用いた軟骨細胞誘導法の開発及び骨系統疾患の新規治療薬評価系の確立

研究課題名(英文) Development of cartilage cells induction method and the establishment of the system to evaluate the effect of novel therapeutic drugs on skeletal dysplasia by using iPS cells

研究代表者

三浦 晶子 (Miura, Masako)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：80437235

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ヒトiPS細胞を用いて、軟骨無形成症などの骨系統疾患に対する新規治療薬評価系の開発を行った。軟骨無形成症はFGFR3の恒常的活性化により軟骨細胞の増殖・分化・基質産生が抑制されていると考えられている。そこで、軟骨無形成症由来iPS細胞に対して軟骨細胞誘導法を行い、その過程でCNPを添加することにより、CNPの有効性評価を行った。CNP添加群と非添加群を比較すると、軟骨分化に関連した遺伝子の発現にある一定の有効性を認めた。引き続き、CNPの軟骨無形成症に対する効果について検討を行っていく。

研究成果の概要(英文)：In this study, we have tried to establish the system to evaluate the effect of novel therapeutic drugs on skeletal dysplasia, such as achondroplasia, by using iPS cells. Achondroplasia chondrocyte proliferation, differentiation and matrix production is suppressed by the constitutive activation of FGFR3. Then, we performed the cartilage cells induction method to achondroplasia-derived iPS cells. In the process, we did assessment of the effectiveness of CNP by adding CNP. Comparing the CNP added group and the non-addition group showed a certain efficacy in the expression of genes associated with cartilage differentiation. We will keep trying to investigate the effects of CNP on the iPS cells derived from achondroplasia patient.

研究分野：医歯薬学

キーワード：内分泌学 CNP 骨代謝 低身長 iPS細胞

1. 研究開始当初の背景

軟骨無形成症(achondroplasia)は骨・軟骨組織の障害により先天性の骨格異常を来たす骨系統疾患の中で最も頻度が高く、約2万出生に1人の割合で発生する。線維芽細胞増殖因子受容体 III 型 (FGFR3) の恒常活性型遺伝子異常が原因であり、内軟骨性骨化の過程が障害され、四肢短縮型の小人症となる。不均衡な低身長に加え、脊柱の彎曲による脊柱管狭窄症や内軟骨性骨化の異常に伴う種々の合併症(大後頭孔狭窄、中耳炎等)により患者の quality of life が著しく障害されているにもかかわらず、有効な薬物治療は未だ確立されていない。

これまで、C型ナトリウム利尿ペプチド(CNP)及びその特異的受容体 guanylyl cyclase-B (GC-B)が軟骨組織に存在し、内軟骨性骨化による骨の長軸方向への伸長を強く促進することを明らかにしてきた。さらに、軟骨無形成症モデルマウスへの CNP 投与により体長が野生型マウスとほぼ同等まで改善することを報告した。これらの研究成果より CNP は軟骨無形成症において、さらに将来的には他の原因による低身長症においても、新しい治療薬として臨床応用が期待されている。

臨床応用に先立ち、ヒト軟骨細胞における CNP の効果が確認出来るシステムを確立できれば、さらに大きな前進となる。

2. 研究の目的

本研究は軟骨無形成症由来 iPS 細胞を用いて CNP の有効性を評価するシステムを構築しようとするものである。このシステムを利用すれば、治療が困難であった他の骨系統疾患に CNP 反応性の疾患を発見出来る可能性がある。また他の薬剤にもこのシステムを応用し、骨系統疾患を特定の薬剤反応性あるいは抵抗性という新たな疾患カテゴリーによって分類することも可能性となる。

3. 研究の方法

ヒト iPS 細胞から軟骨細胞への誘導法の開発

ヒト iPS 細胞を用いた CNP の有効性評価システムの構築のため、ヒト iPS 細胞から軟骨細胞への分化誘導法の開発を行ってきており、未分化 iPS 細胞からの胚葉体(EB)形成(1st step)、培養皿上に接着した EB からの発芽状細胞増殖(2nd step)、一旦細胞を回収し EB を除いた後、間葉系細胞の培養条件下での単層培養(3rd step)、ペレットカルチャー(4th step)の4段階を経ることで、軟骨細胞様に分化可能な誘導法を開発出来た。しかし一部の軟骨分化マーカーの発現が認められず、軟骨細胞としての成熟度は不十分であると考えられた。疾患 iPS 細胞のより正確な特性や薬物の有効性の評価を行うためには、より生理的な軟骨細胞の誘導が望まれる。そこで本研究では、より生理的な軟骨細胞を誘導

するための誘導法の開発を行う。上記誘導法の 3rd step、4th step に改良の可能性があると考えている。

軟骨無形成症患者由来 iPS 細胞における軟骨細胞分化の評価

軟骨無形成症患者の低身長症に対して CNP の臨床応用を目指しており、既に軟骨無形成症患者組織から iPS 細胞の樹立にも成功している。現在はこれまで確立した誘導法を用いて、疾患 iPS 細胞の解析を行っているが、より生理的な軟骨細胞が誘導出来るようになれば、新しい誘導法により疾患 iPS 細胞の軟骨分化過程についてさらに検討を行う。分化系の改良により、より実際の疾患患者の軟骨細胞に近い情報が得られることが期待される。これを健常者由来 iPS 細胞と比較することにより、未分化 iPS 細胞から軟骨細胞への分化過程において軟骨無形成症患者の病態がどのように再現されるのかを把握し、疾患細胞の特徴を明らかにする。

CNP の有効性について評価するシステムの構築

申請者らは患者に治療薬として CNP あるいは他の薬剤を投与した際に得られる効果を事前に患者 iPS 細胞を用いて予測し得るようなシステムの構築を最終的な目的としている。疾患細胞の特徴を把握し、未分化 iPS 細胞から軟骨細胞への分化過程において、CNP の効果を評価するのに最適な方法を探索する。

4. 研究成果

ヒト iPS 細胞の軟骨誘導法の改善を行った。まず、低酸素環境下でのペレットカルチャーについて試みた。これまでは 20%の酸素濃度下でペレットカルチャーを行っていたが、関節軟骨は生体内で 1~7%の酸素濃度下で存在すると言われていたため、5%の酸素濃度下で行った。しかし、3週間後のペレットの組織像で却って組織の壊死増を多く認めため、この培養系において低酸素濃度環境は細胞へのダメージとなる事が考えられた。

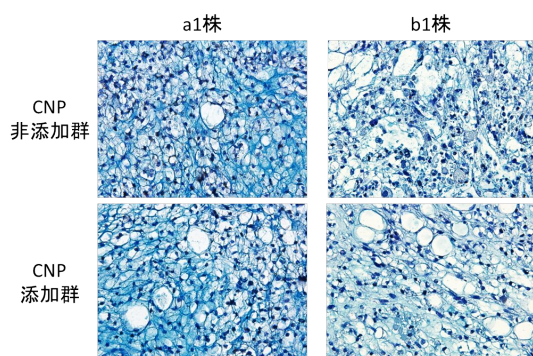
次に、従来の誘導培地にいづつかの成長因子やホルモンを組み合わせ誘導法の改善を試みた。しかし、ペレットカルチャー後に測定した軟骨分化マーカーの発現量やグルコサミノグリカンの産生量に予想した程の効果をもたらさなかった。その為、従来の誘導法を用いて軟骨無形成症由来 iPS 細胞の解析や CNP の有効性評価を行う事とした。



従来の誘導法を用いて軟骨無形成症の疾患特異的疾患 iPS 細胞(Ach-iPS 細胞)の軟骨分化誘導を行い、ペレットカルチャー後の組織像で検討したところ、Ach-iPS 細胞も健常

者由来 iPS 細胞とほぼ同等の分化能を示した。これより、少なくとも分化の初期から中期段階の分化能は軟骨無形成症患者の細胞においても維持されていることが示唆された。

次に、ペレットカルチャー時に CNP を添加し、添加群と非添加群を比較した。その結果、組織学的所見で継代数や株ごとに軟骨分化の成功率にばらつきを認め、3 週間後の添加群では非添加群と比較すると多くが軟骨様に分化していた。



また、添加後 1、2、3 週間ペレットカルチャー後のペレットより抽出したグルコサミノグリカンや RNA を用いて比較を行った。その結果、グルコサミノグリカンの産生量に増加傾向を認め、軟骨分化マーカーの発現量にも増大を認めるものを多く確認できた。

今回、われわれは軟骨無形成症における、CNP の効果について、ある一定の評価を得ることが出来た。本研究をさらに進めることにより、今後低身長をきたす他の骨系統疾患への応用も期待でき、非常に意義は大きいと考える。

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 9 件)

1. Yamashita, Y., Yamada-Goto, N., Katsuura, G., Ochi, Y., Kanai, Y., Miyazaki, Y., Kuwahara, K., Kanamoto, N., Miura, M., Yasoda, A., Ohinata, K., Inagaki, N., Nakao, K. Brain-specific natriuretic peptide receptor-B deletion attenuates high-fat diet-induced visceral and hepatic lipid deposition in mice *Peptides* December 15, 2015 Article in press 査読あり。 DOI: 10.1016/j.peptides.2016.03.014
2. Yoshioka, S., Miura, Y., Iwasa, M., Fujishiro, A., Yao, H., Miura, M., Fukuoka, M., Nakagawa, Y., Yokota, A., Hirai, H., Ichinohe, T., Takaori-Kondo, A., Maekawa, T. Isolation of mesenchymal

stromal/stem cells from small-volume umbilical cord blood units that do not qualify for the banking system. *Int J Hematol.* 2015 Aug;102(2):218-29. 査読あり。

DOI: 10.1007/s12185-015-1828-7.

3. Kondo, E., Yasoda, A., Fujii, T., Nakao, K., Yamashita, Y., Ueda-Sakane, Y., Kanamoto, N., Miura, M., Arai, H., Mukoyama, M., Inagaki, N., Nakao, K.

Increased bone turnover and possible accelerated fracture healing in a murine model with an increased circulating C-type natriuretic peptide (Article) *Endocrinology* Volume 156, Issue 7, 1 July 2015, Pages 2518-2529 査読あり。

DOI: 10.1210/en.2014-1801

4. Nakao, K., Osawa, K., Yasoda, A., Yamanaka, S., Fujii, T., Kondo, E., Koyama, N., Kanamoto, N., Miura, M., Kuwahara, K., Akiyama, H., Bessho, K., Nakao, K.

The local CNP/GC-B system in growth plate is responsible for physiological endochondral bone growth (Article) *Scientific Reports* Volume 5, 27 May 2015, Article number 10554 Open Access 査読あり。

DOI: 10.1038/srep10554

5. Hirota, K., Yasoda, A., Fujii, T., Inagaki, N.

Voriconazole-induced periostitis in a patient with overlap syndromes (Article) *BMJ Case Reports* 5 March 2014 査読あり。

DOI: 10.1136/bcr-2013-203485

6. Matsushita, M., Hasegawa, S., Kitoh, H., Mori, K., Ohkawara, B., Yasoda, A., Masuda, A., Ishiguro, N., Ohno, K.

Meclozine promotes longitudinal skeletal growth in transgenic mice with achondroplasia carrying a gain-of-function mutation in the fgfr3 gene (Article) *Endocrinology* Volume 156, Issue 2, 1 February 2015, Pages 548-554 査読あり。

DOI: 10.1210/en.2014-1914

7. Hayakawa, N., Nakamoto, Y., Kurihara, K., Yasoda, A., Kanamoto, N., Miura, M., Inagaki, N., Togashi, K. A comparison between

¹¹C-methionine PET/CT and MIBI SPECT/CT for localization of parathyroid adenomas/hyperplasia *Nuclear Medicine Communications* 19 September 2014, Article in press 査読あり。

DOI:10.1097/MNM.000000000000021

8. Isojima, T., Doi, K., Mitsui, J., Oda, Y., Tokuhira, E., Yasoda, A., Yorifuji, T., Horikawa, R., Yoshimura, J., Ishiura, H., Morishita, S., Tsuji, S., Kitanaka, S.
A recurrent de novo FAM111A mutation causes Kenny-Caffey syndrome type 2 (Article) Journal of Bone and Mineral Research Volume 29, Issue 4, April 2014, Pages 992-998 査読あり。
DOI: 10.1002/jbmr.2091
9. Honda, K., Sone, M., Tamura, N., Sonoyama, T., Taura, D., Kojima, K., Fukuda, Y., Tanaka, S., Yasuno, S., Fujii, T., Kinoshita, H., Ariyasu, H., Kanamoto, N., Miura, M., Yasoda, A., Arai, H., Ueshima, K., Nakao, K.
Adrenal reserve function after unilateral adrenalectomy in patients with primary aldosteronism (Article) Journal of Hypertension Volume 31, Issue 10, October 2013, Pages 2010-2017 査読あり。
DOI: 10.1097/HJH.0b013e3283635789

〔学会発表〕(計 32 件)

1. 三浦晶子, 金丸良徳, 早川尚雅, 松尾奈緒美, 小原章央, 木下智晴, 猪野正志, 土居健太郎: SPIDDM と診断 7 年後に stiff-person syndrome を発症し、抗 GAD 抗体が著しく上昇した 1 例、日本糖尿病学会、京都、2015/11/14
2. 三浦晶子, 小原章央, 堀井和子, 土居健太郎, 稲垣暢也: 閉経後骨粗鬆症症例におけるデノスマブ投与後の血清カルシウム値および骨密度の変動に関する検討、日本女性医学学会、愛知、2015/11/7
3. 松尾奈緒美, 三浦晶子, 金丸良徳, 奥雄介, 早川尚雅, 荒木倫利, 土居健太郎: 甲状腺全摘術後に重篤な低カルシウム血症をきたしたバセドウ病の 1 例、日本甲状腺学会、福島、2015/11/5
4. 山中茂樹, 中尾一祐, 八十田明宏, 小山典昭, 磯部悠, 藤井寿人, 近藤絵里, 三浦晶子, 稲垣暢也, 中尾一和, 別所和久: 軟骨無形成症モデルマウスに生じた顎顔面形態異常に対する、C 型ナトリウム利尿ペプチドの有効性について、日本内分泌学会、東京、2015/07/25
5. 谷川幸洋, 藤倉純二, 小倉雅仁, 丸川雄大, 勝部元紀, 齊藤晋, 長嶋一昭, 八十田明宏, 稲垣暢也: 不適切なインスリン自己注射手技により左上腕壊死性筋膜炎を発症した一例、日本糖尿病学会、山口、2015/04/25
6. 岩崎順博, 藤倉純二, 豊田健太郎, 岩永康裕, 大野洋一, 小倉雅仁, 八十田明宏, 長嶋一昭, 川口道也, 岡島英明, 上本伸二, 稲垣暢也: 藤島移植後 9 年の時点でのインスリン分泌反応が残存している、罹病歴 39 年の 1 型糖尿病の一例、日本糖尿病学会、山口、2015/04/25
7. 福田賢英, 曾根正勝, 田浦大輔, 小嶋勝利, 本田恭子, 藤井寿人, 金本巨哲, 三浦晶子, 八十田明宏, 稲垣暢也: 副腎静脈サンプリングにおける ACTH 負荷の意義についての検討、日本内分泌学会、東京、2015/04/01
8. 植田洋平, 八十田明宏, 山下唯, 金井有吾, 近藤絵里, 藤井寿人, 稲垣暢也: グルココルチコイドによる成長障害に対する CNP の骨伸長効果の検討、日本内分泌学会、東京、2015/04/01
9. 金井有吾, 八十田明宏, 山下唯, 植田洋平, 近藤絵里, 藤井寿人, 稲垣暢也: Osteocrin が筋骨格系に及ぼす作用 マウス筋芽細胞株 C2C12 を用いた検討、日本内分泌学会、東京、2015/04/01
10. 山中茂樹, 中尾一祐, 八十田明宏, 小山典昭, 藤井寿人, 近藤絵里, 三浦晶子, 稲垣暢也, 中尾一和, 別所和久: C 型ナトリウム利尿ペプチドによる軟骨無形成症の顎顔面形態異常に対する新規治療法の開発。日本内分泌学会、東京、2015/04/01
11. 園山拓洋, 曾根正勝, 田村尚久, 本田恭子, 田浦大輔, 小嶋勝利, 福田賢英, 金本巨哲, 三浦晶子, 八十田明宏, 荒井宏司, 伊藤裕, 中尾一和: 原発性アルドステロン症患者の血漿アルドステロン濃度への内因性 ACTH の影響、日本内分泌学会、東京、2015/04/01
12. 曾根正勝, 福田賢英, 田浦大輔, 本田恭子, 小嶋勝利, 松尾浩司, 藤井寿人, 八十田明宏, 稲垣暢也: 原発性アルドステロン症(PA)の副腎静脈サンプリング(AVS)における ACTH 負荷の意義: 日本内科学会、京都、2015/4/10
13. 和田啓子, 御石絢子, 古御門恵子, 中村聡宏, 森栄作, 八十田明宏, 幣憲一郎, 稲垣暢也: 糖尿病 1a 型に対する低血糖予防について症例報告(第二報)、日本病態栄養学会、京都、2015/1/10
14. 金井有吾, 曾根正勝, 三宅啓史, 山崎寛章, 小林正行, 上田依利子, 藤井寿人, 田浦大輔, 金本巨哲, 三浦晶子, 八十田明宏, 荒井宏司, 高折晃史, 稲垣暢也: 下垂体腫瘍により汎下垂体機能低下症を呈した HIV 感染症の一例、臨床内分泌代謝 Update、埼玉、2014/11/28
15. 大野洋一, 八十田明宏, 藤井寿人, 幡地佑有子, 松尾浩司, 金井有吾, 田浦大輔, 小倉雅仁, 曾根正勝, 稲垣暢也: IgG4 関連下垂体炎が疑われた一例、内分泌代謝 Update、埼玉、2014/11/28
16. 三浦晶子, 道上敏美, 立川加奈子, 金本巨哲, 曾根正勝, 八十田明宏, 荒井宏司,

- 稲垣暢也：Osteopathia Striata with Cranial Sclerosis の男性軽症例、内分泌代謝 Update、埼玉、2014/11/28
17. 松尾浩司, 曾根正勝, 大同恵, 井上真由美, 福田賢英, 本田恭子, 小嶋勝利, 藤井寿人, 田浦大輔, 八十田明宏, 稲垣暢也: パセドウ眼症に ITP が合併しステロイドパルスが著効した 1 例、内分泌代謝 Update、埼玉、2014/11/2
 18. 金本巨哲, 須川秀夫, 曾根正勝, 三浦晶子, 八十田明宏, 荒井宏司, 稲垣暢也: 甲状腺嚢胞性病変内への感染が疑われた一例、日本神経内分泌学会、東京、2014/10/3
 19. 山下唯, 後藤伸子, 勝浦五郎, 宮崎由理, 今吉格, 金本巨哲, 三浦晶子, 八十田明宏, 大日向耕作, 影山龍一郎, 稲垣暢也, 中尾一和: 中枢 CNP/NPR B シグナルの肥満および脂肪肝形成における役割の検討、日本神経内分泌学会、東京、2014/10/3
 20. 三浦晶子, 松尾奈緒美, 金丸良徳, 早川尚雅, 堀井和子, 八十田明宏, 土居健太郎, 稲垣暢也: デノスマブ投与後の骨粗鬆症患者における血清カルシウム値の変動に関する検討、日本神経内分泌学会、東京、2014/10/3
 21. 松尾浩司, 曾根正勝, 大同恵, 福田賢英, 本田恭子, 小嶋勝利, 藤井寿人, 田浦大輔, 八十田明宏, 稲垣暢也: パセドウ眼症に合併した ITP 様血小板減少にステロイドパルスが著効した 1 例、日本神経内分泌学会、東京、2014/10/3
 22. 廣田圭昭, 金本巨哲, 山下唯, 金井有吾, 桑原智子, 上田依利子, 藤井寿人, 田浦大輔, 曾根正勝, 三浦晶子, 八十田明宏, 荒井宏司, 田上哲也, 稲垣暢也: 心房細動を契機に診断した R429Q 変異甲状腺ホルモン不応症の一例、日本神経内分泌学会、東京、2014/10/3
 23. 中平真衣, 八十田明宏, 廣田圭昭, 森栄作, 金井有吾, 山下唯, 上田依利子, 藤井寿人, 田浦大輔, 金本巨哲, 曾根正勝, 三浦晶子, 荒井宏司, 向山政志, 稲垣暢也: ガストリン高値と低血糖を認めた多発性内分泌腫瘍症 1 型(MEN1)の 1 症例、日本神経内分泌学会、東京、2014/10/3
 24. 山下唯, 後藤伸子, 勝浦五郎, 宮崎由理, 今吉格, 金本巨哲, 三浦晶子, 八十田明宏, 大日向耕作, 影山龍一郎, 稲垣暢也, 中尾一和: 脂肪肝病態形成における中枢 CNP/GC B シグナルの役割 高脂肪食負荷脳特異的 GC B 欠損マウスによる検討、日本内分泌学会、東京、2014/04/24
 25. 藤井寿人, 八十田明宏, 近藤絵里, 曾根正勝, 金本巨哲, 三浦晶子, 荒井宏司, 稲垣暢也, 中尾一和: 著しい骨伸長障害を呈した C 型ナトリウム利尿ペプチドノックアウトラットの解析、日本内分泌学会、東京、2014/04/24
 26. 金本巨哲, 上田依利子, 金井有吾, 山下唯, 藤井寿人, 三浦晶子, 曾根正勝, 八十田明宏, 荒井宏司, 中尾一和, 稲垣暢也: 重症型成人成長ホルモン分泌不全症例に対する GH 治療 自験例のまとめ、日本内分泌学会、東京、2014/04/24
 27. 福田賢英, 曾根正勝, 田浦大輔, 小嶋勝利, 本田恭子, 金本巨哲, 三浦晶子, 八十田明宏, 稲垣暢也: 副腎静脈サンプリングにおける ACTH 負荷前後のデータの比較検討、日本内分泌学会、東京、2014/04/24
 28. 三浦晶子, 小山典昭, 中尾一祐, 上田依利子, 山下唯, 近藤絵里, 藤井寿人, 金本巨哲, 曾根正勝, 八十田明宏, 荒井宏司, 別所和久, 稲垣暢也, 中尾一和: ヒト iPS 細胞から軟骨細胞への分化誘導過程における CNP の作用に関する検討、日本内分泌学会、東京、2014/04/24
 29. 山中茂樹, 中尾一祐, 八十田明宏, 小山典昭, 藤井寿人, 近藤絵里, 三浦晶子, 稲垣暢也, 中尾一和, 別所和久: 内軟骨骨化の顎顔面形態に対する影響~軟骨細胞特異的 CNP 遺伝子改変マウスを用いた研究~、日本内分泌学会、東京、2014/04/24
 30. 本田恭子, 曾根正勝, 田村尚久, 田浦大輔, 園山拓洋, 小嶋勝利, 福田賢英, 田中司朗, 保野慎治, 藤井寿人, 木下秀之, 有安宏之, 金本巨哲, 三浦晶子, 八十田明宏, 荒井宏司, 上嶋健治, 稲垣暢也, 中尾一和: 原発性アルドステロン症患者の片側副腎摘除術後の副腎予備能の評価、日本内分泌学会、東京、2014/04/24
 31. 小嶋勝利, 曾根正勝, 田浦大輔, 本田恭子, 福田賢英, 金本巨哲, 三浦晶子, 八十田明宏, 荒井宏司, 中尾一和, 稲垣暢也: ヒト ES/iPS 細胞からの血管細胞分散培養法と血管内皮細胞および血管平滑筋細胞誘導法の改良、日本内分泌学会、東京、2014/04/24
 32. 廣田圭昭, 金本巨哲, 金井有吾, 上田依利子, 山下唯, 藤井寿人, 田浦大輔, 曾根正勝, 三浦晶子, 八十田明宏, 荒井宏司, 稲垣暢也: TSH 産生腫瘍と甲状腺ホルモン不応症との鑑別に苦慮した一例、日本間脳下垂体腫瘍学会、福岡、2014/02/21
6. 研究組織
- (1)研究代表者
三浦 晶子 (MIURA Masako)
京都大学・医学研究科・特定講師
研究者番号: 80437235
 - (2)研究分担者 なし
 - (3)連携研究者
八十田 明宏 (YASODA Akihiro)
京都大学・医学研究科・講師

研究者番号：50378642