

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861715

研究課題名(和文)疾患特異的iPS細胞を用いた顎顔面領域における病態解明

研究課題名(英文)Pathogenesis in the maxillofacial area by using a disease-specific iPS cells

研究代表者

小山 典昭(Koyama, Noriaki)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：30599931

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：顎顔面領域には膜性骨化、内軟骨性骨化に異常を来すことで顎変形を呈する疾患が多く認められます。そこで、骨系統疾患特異的iPS細胞を樹立し、その病態解明ならびに各種因子を用いた治療法の確立を目指しました。また、線維性異形成症の患者から組織を採取し、多数のクローンのiPS細胞の株を樹立した。しかし、変異のないコントロール用のiPS細胞は多数確保することはできませんでしたが、変異のある疾患特異的iPS細胞の安定した樹立には至りませんでした。

研究成果の概要(英文)：There is a lot of disease that happen from abnormal membrane ossification and endochondral ossification occur to jaw deformation in the maxillofacial area.

To establish a treatment method using the Pathogenesis and various factors by using a bone lineage disease-specific iPS cells. We collected FD lesion from FD patients and we cultured human FD cells. Although we could get wild-type iPS cells, we couldn't establish human iPS cells from the FD cells mutation yet.

研究分野：外科系歯学

キーワード：iPS細胞 骨軟骨再生 軟骨異形成症 線維性異形成症

1. 研究開始当初の背景

顎顔面領域には膜性骨化、内軟骨性骨化に異常を来すことで様々な顎変形を呈する疾患がある。C型ナトリウム利尿ペプチド(CNP)には、軟骨伸長作用のある調節因子として注目されている。また骨形成因子(BMP)は骨を誘導する蛋白性因子で単独で異所性骨形成シグナルとしての作用を有する唯一のサイトカインであり、BMP-2については特に強い骨誘導能を持っている。そこで、骨系統疾患特異的iPS細胞を樹立し、その病態解明ならびに各種因子(CNP, BMP等)を用いた治療法の確立を目指す。臨床応用にむけた創薬開発、新たなアプローチでの治療法の確立のための評価系を検討するものである。

健常者から樹立されたiPS細胞を用いてin vitroにおける骨・軟骨細胞への分化誘導系の確立と評価系について検討を行っており、(1)未分化iPS細胞からの胚様(EB)形成、(2)培養皿上に接着させたEBからの細胞増殖、(3)単一細胞に解離させ残存EBを除去後の単層培養、(4)3次元のペレット培養の4段階から成る培養法により、軟骨細胞を誘導することに成功している。

2. 研究の目的

疾患特異的iPS細胞樹立後に、骨・軟骨分化誘導能について正常iPS細胞と比較の検討し、さらにCNPやBMPなどを用いた臨床応用に向けた有効性、投与量の検討を行う。また、添加因子により、正常な骨・軟骨分化へ誘導できるような評価系を確立する。創薬開発だけでなく病態解明においても、細胞治療に限らない広範囲での臨床応用に向けた研究を行う。

対象疾患は、Fibroblast growth factor receptor 3:FGFR3の遺伝子変異による軟骨形成不全症でFGFR3の恒常的活性により低身長をきたす疾患と、Runt-related transcription factor 2: RUNX2のsomatic mutationである線維性異形成症で名前のごとく線維性の骨異形成を呈する疾患である。外科的に削除された部位は、広範囲な骨欠損となるため、術後のQOLは著しく低下する。そこで、顎骨再建手段の一つとなることを目指し、疾患特異的iPS細胞を樹立後に各条件下で骨・軟骨細胞分化誘導刺激を行いin vitroにおける正常な骨・軟骨誘導を確立する。また効率的で確実な誘導条件を開発し、CNPやBMP-2といった添加因子により、創薬の開発を視野に入れた研究を行う。

3. 研究の方法

線維性異形成症

線維性異形成症は、病変部位において変異のある細胞と正常な細胞がモザイク状態で発生することが知られている。また、現在までの検討で、モザイク状態の割合は未知である

ため、摘出標本から直接iPS細胞を樹立する効率は低いことがわかっている。そこで、患者から得た組織を用いて以下の通り、研究を進める。

摘出標本のシーケンスを行い、遺伝子変異を特定する。

病変組織の初代培養を行いクローニングした後、シーケンスを行い遺伝子変異のある細胞および野生型の細胞を検出する。

遺伝子変異のある細胞および野生型の細胞それぞれからiPS細胞を樹立する。樹立されたiPS細胞を用いて、骨・軟骨細胞分化誘導を行い疾患特異的iPS細胞および正常iPS細胞について比較検討する。また、病態のモザイク状態に模して、共培養を行い発症のメカニズムについても検討する。

なお、軟骨細胞分化・骨芽細胞分化については、これまでに申請者らが報告してきた以下の方法を用いて、間葉系前駆細胞への分化を介した誘導を行う。

軟骨細胞分化誘導

維持培養されたiPS細胞を解離液を用いて回収後、bFGF不含の霊長類ES細胞用培地を用いて7日間浮遊培養する。EBを回収後、10% FBS含有のDMEMにてcell culture dish上で培養すると、EBが接着しoutgrowthしてくる。outgrowthした細胞をEBとともにTrypsin-EDTAにて回収し、セルストレイナーを用いて可及的にEBを取り除き、再度10% FBS含有DMEMにて単層培養する。接着細胞をTrypsin-EDTAにて回収し、各分化誘導に用いる。10% FBS含有DMEMにてcell culture dish上で培養すると、EBが接着しoutgrowthしてくる。outgrowthした細胞をEBとともにTrypsin-EDTAにて回収し、セルストレイナーを用いて可及的にEBを取り除き、再度10% FBS含有DMEMにて単層培養する。接着細胞をTrypsin-EDTAにて回収する。回収した約 3.0×10^5 の細胞をDMEM/F-12、10% FBS、1xITS+Premix、デキサメタゾン、アスコルビン酸、ピルビン酸、TGF- α を用いて、3次元培養(ペレットカルチャー法、マイクロマス法)下で行う。5% CO₂ インキュベーター内で3日おきに培地を交換する。

分化誘導における解析・評価

各分化系の関連遺伝子、タンパク質の定量・定性、組織学的検討を、real time RT-PCR法で分化に関連した発現遺伝子、各種Kitを使用しタンパク量を解析する。

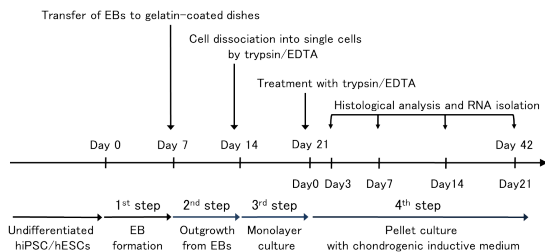
また、アリザリンレッド染色やアルシアンブルー染色ないしトルイジンブルー染色、免疫組織化学染色を行い、各分化誘導系における組織学的検討も併せて行う。

4. 研究成果

樹立した疾患特異的iPS細胞を用いた研究

軟骨無形成症の疾患特異的iPS細胞の軟骨誘導を行った。継代数や株ごとに軟骨分化

の成功率にばらつきを認めたため、従来の誘導培地にさらにいく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、誘導法の改良が軟骨細胞分化に予想した程の効果をもたらさなかった為、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 の有効性評価を行った。

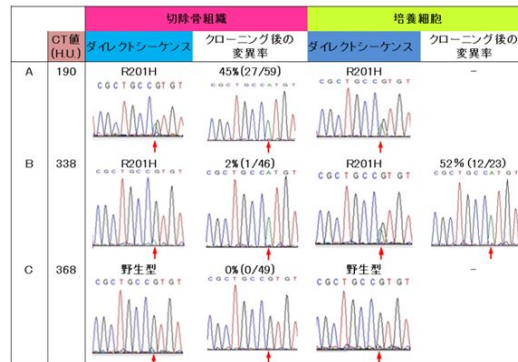
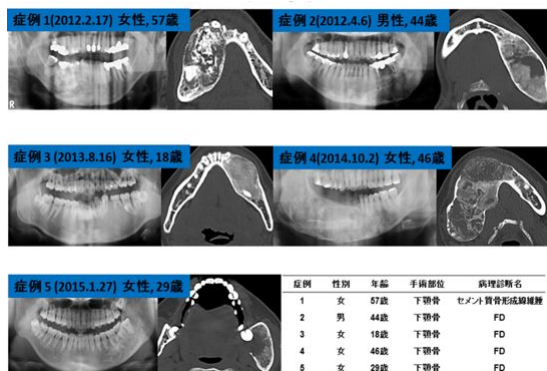


CNP 添加群と非添加群を比較した結果、添加後 1 週間と 3 週間のペレットより抽出した RNA を用いて比較すると、real time RT-PCR 法で分化に関連した発現遺伝子の発現に継代数によりばらつきは認められたが、発現量の増大を認めるものを多数確認した。また、その組織学的検討でも同様の結果を得た。

軟骨無形成症においては 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為、CNP の軟骨無形成症に対する有効性が示唆された。

疾患特異的 iPS 細胞の樹立

次に、歯科口腔外科領域の代表的な骨系統疾患である線維性異形成症のヒト疾患特異的 iPS を用いた病態解析を行った。疾患を制御する薬剤候補物質を探索することで、予防・治療へのアプローチが確立され、罹患患者に提供することを目指した。医の倫理委員会の承認を受け、京大病院ですでに研究がスタートしている「ヒト疾患特異的 iPS 細胞の樹立とそれに用いた疾患解析に関する研究」のプロジェクトの一つとして取り組んだ。研究参加の同意の得られた線維性異形成症の患者 5 人の病変部の手術検体より細胞を採取した。線維性異形成症の患者から多数のクローンの iPS 細胞の株を樹立したが、研究に必要な変異のないコントロール用の iPS 細胞は多数確保することはできたが、変異のある疾患特異的 iPS 細胞の安定した樹立には至っていない。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Isobe, Y., Koyama, N., Nakao, K., Osawa, K., Ikeno, M., Yamanaka, S., Okubo, Y., Fujimura, K., Bessho, K. Comparison of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovial fluid, adult dental pulp, and exfoliated deciduous tooth pulp. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, Volume 45, Issue 1, 1 January 2016, Pages 124-131. 査読有
DOI: 10.1016/j.ijom.2015.06.022

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. *Scientific Reports*, Volume 5, 27 May 2015, Article number 10554. 査読有
DOI: 10.1038/srep10554.

〔学会発表〕(計 6 件)

Nakao K, Yasoda A, Okubo Y, Yamanaka S, Isobe Y, Ikeno M, Koyama N, Miura M, Bessho K. The effects of C-type natriuretic peptide on craniofacial growth. 43rd Annual Meeting and Exhibition of the AADR Charlotte, USA, 2014.3.19-22

小山典昭、三浦晶子、中尾一祐、上田依利子、山下唯、近藤絵里、藤井寿人、磯部悠、池野正幸、山中茂樹、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、第 13 回日本再生医療学会総会、京都市、2014.3.4-6

中尾一祐、八十田明宏、大澤賢次、山中茂樹、小山典昭、近藤絵里、藤井寿人、三浦晶子、稲垣暢也、別所和久、中尾一和: CNP/GC-B 系は局所因子として内軟骨骨化を促進する、第 32 回骨代謝学会学術集会、大阪市、2014.7.24-26

山中茂樹、中尾一祐、八十田明宏、小山典昭、磯部悠、池野正幸、藤井寿人、近藤絵里、三浦晶子、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～第 87 回日本内分泌学会総会、福岡市、2014.4.24-26

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 細胞からの軟骨細胞分化誘導における CNP の作用に関する検討第 87 回日本内分泌学会学術総会、福岡市、2014.4.24-26

山中茂樹、中尾一祐、八十田明宏、小山典昭、磯部悠、池野正幸、藤井寿人、近藤絵里、三浦晶子、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第 33 回日本骨代謝学会学術集会、新宿区、2015.7.23-25

〔図書〕(計 0 件)

なし

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

なし

○取得状況(計 0 件)

なし

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

小山 典昭 (KOYAMA Noriaki)

京都大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号: 30599931