

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861716

研究課題名(和文)患者由来iPS細胞を用いたFGFR3病の病態の解明と治療法の探索

研究課題名(英文)Elucidation of disease mechanism and therapy of FGFR3 skeletal dysplasia using patient-derived iPSCs

研究代表者

山下 晃弘(Yamashita, Akihiro)

京都大学・iPS細胞研究所・特定拠点助教

研究者番号：00636855

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)：FGFR3の遺伝子変異は四肢の短縮を伴う先天性の骨・軟骨形成異常症のFGFR3骨形成不全症を発症する。その治療法の開発には疾患の病態を再現するヒトモデルの構築が必要である。そこで本研究では、FGFR3骨形成不全症由来 iPS 細胞を樹立し、軟骨に分化誘導させ、疾患軟骨分化誘導モデルを構築した。この疾患特異的iPS細胞モデルで見られた軟骨組織形成の異常は、スタチンを投与することで回復した。また、iPS細胞疾患モデルに加え、疾患モデルマウスにスタチンを投与することにより、軟骨の形成が回復することから、スタチンがFGFR3遺伝子変異で起こるこれら疾患の治療に有効である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Gain-of-function mutations in the fibroblast growth factor receptor 3 gene (FGFR3) result in skeletal dysplasias, such as thanatophoric dysplasia (TD) and achondroplasia (ACH). The lack of disease models using human cells has hampered the identification of a clinically effective treatment for these diseases. Here, we have generated induced pluripotent stem cells (iPSCs) from patients' fibroblasts to establish iPSC disease models, followed by their differentiation toward chondrocytes. The chondrogenic differentiation of patients-iPSCs resulted in the formation of degraded cartilage. We found that statins could rescue the degraded cartilage in both chondrogenically differentiated patients-iPSCs. Treatment of ACH model mice with the statin led to a significant recovery of bone growth. These results suggest that statins could represent a medical treatment for infants and children with FGFR3 skeletal dysplasia.

研究分野：軟骨代謝学

キーワード：iPS細胞 軟骨 骨系統疾患 FGFR3

1. 研究開始当初の背景

希少難治性疾患の病態解明および治療法の開発は重要な課題の一つではある。しかしその治療法の実現には疾患の病態を再現するヒトモデルの構築が必要である。近年のリプログラミング技術の発展により、これまで困難とされてきた希少難治性疾患の病態解明およびその治療法の探索への新規アプローチが期待できるようになった(疾患 iPS 細胞モデル研究)。そこで本研究では難治性骨系統疾患の一つである FGFR3 骨形成不全症に注目した。

FGFR3 骨形成不全症とは、四肢の短縮を伴う先天性の骨・軟骨形成異常症である。その中でも軟骨無形成症は四肢の短縮を伴い、FGFR3 骨形成不全症の中で最も頻度が高い疾患である。また、タナトフォリック骨異形成症患者は脆弱な肋軟骨により呼吸困難を引き起こす重症例であり、その延命には人工呼吸器を必要とする非常に QOL の低い疾患である。近年の研究により、軟骨分化に関与する線維芽細胞増殖因子受容体(FGFR3)の遺伝子変異による機能亢進(gain of function)が原因であることが明らかとなった。しかし他の希少難治性疾患と同様、遺伝子の変異と骨・軟骨組織の発生、分化および組織形成への作用機序は不明の点が多い。そこで本研究では、疾患 iPS 細胞モデル研究により、その病態を解明するとともに治療法の探索を試みた。

2. 研究の目的

本研究の主たる目的は、患者由来疾患特異的ヒト iPS 細胞を用いることにより、FGFR3 骨形成不全症の病態解明と治療法の探索を行うことである。本研究を遂行するにあたり以下の研究を行う。

Aim 1) FGFR3 遺伝子変異と軟骨組織形成異常のしくみの解明

Aim 2) 治療法の探索

Aim 3) 疾患モデルマウスへの薬剤投与

3. 研究の方法

Aim 1) FGFR3 遺伝子変異と軟骨組織形成異常のしくみの解明

FGFR3 骨形成不全症の患者の皮膚線維芽細胞より樹立した疾患 iPS 細胞を、われわれが確立したヒト iPS 細胞からの軟骨分化誘導方法をもちいて軟骨様細胞および軟骨様組織へ分化誘導する。そして疾患特異的症状を生体外で再現する。また、正常なヒト iPS 細胞からの軟骨への分化と比較することにより FGFR3 の下流での遺伝子発現の変化や形態異常の原因を追求する。

Aim 2) 治療法の探索

疾患 iPS 細胞から軟骨への分化過程において、同定した遺伝子や細胞シグナルに作用する薬剤等を添加する。そして、疾患特異的症状に対する改善の有無、および毒性などの影響を検討する。

Aim 3) 疾患モデルマウスへの薬剤投与

疾患由来の薬剤を、疾患を再現したモデルマウスに投与する。四肢の短縮など、骨・軟骨病変の改善を調べる。

4. 研究成果

Aim 1) FGFR3 遺伝子変異と軟骨組織形成異常のしくみの解明

まずはじめに、われわれは FGFR3 骨形成不全症の患者(軟骨無形成症 3 患者、致タナトフォリック骨異形成症 6 患者)の皮膚細胞から疾患 iPS 細胞を樹立した。この致死性骨異形成症由来疾患 iPS 細胞は未分化マーカーの発現、三胚葉から成る奇形腫形成能を有しており、樹立した細胞が iPS 細胞であることを確認した。

次にわれわれは健常者由来ヒト iPS 細胞を用い、純度の高い軟骨様細胞および軟骨様組織への分化誘導法を確立した(Yamashita et al., Stem Cell Reports. 2015)。この方法

を用い、樹立した疾患 iPS 細胞を軟骨様細胞および軟骨組織へ分化誘導し、健常者由来 iPS 細胞と比較検討した。その結果、健常者由来 iPS 細胞では Safranin O で染色される軟骨基質に富む軟骨様組織を形成した。しかし疾患由来 iPS 細胞では Safranin O で染色される軟骨基質が得られず、線維性に富んだ組織が形成された。つまり、疾患由来 iPS 細胞では十分な軟骨形成に至らず、疾患による影響が考えられた。

FGFR3 軟骨形成不全症の主たる原因は軟骨分化に関与する FGFR3 遺伝子に変異が生じ、FGFR3 シグナルが大量に細胞内に取り込まれること考えられている(機能獲得性変異)。その機序として、変異により FGFR3 タンパクが分解抵抗性となり、過剰の FGFR3 タンパクが存在することが考えられている。過剰な FGFR3 シグナルにより軟骨細胞の増殖および分化が抑制されるため軟骨形成異常起こすと考えられている。疾患由来 iPS 細胞由来軟骨では FGFR3 タンパクの発現が増加しており、この影響による軟骨形成不全の可能性が考えられた。

FGFR3 の影響を調べるため、FGFR3 遺伝子を shRNA を用いてノックダウンし、軟骨分化誘導を行った。その結果、疾患由来 iPS 細胞で認められた線維芽細胞に富んだ組織は改善し、Safranin O で染色される軟骨基質に富む軟骨様組織が形成された。さらに FGFR3 中和抗体を投与し分化誘導した結果、同様に線維性組織の改善と軟骨様組織の形成が確認できた。つまり、疾患由来 iPS 細胞の軟骨形成異常は FGFR3 の機能亢進が原因であることを明らかにした。

以上の結果より、疾患由来 iPS 細胞を用い、病態を再現することに成功した。また、原因と考えられる FGFR3 をノックダウンしたところ病態が改善したことにより、薬剤を探索する上でこの疾患軟骨分化誘導モデルは有用となることが示唆された。

Aim 2) 治療法の探索

次にこのこの疾患軟骨分化誘導モデルを用いて治療薬の探索を行った。これまで報告されている FGFR3 遺伝子関連を標的とした因子や、軟骨分化に効果がある化合物を中心に調べた。この中にわれわれはスタチンを含めた。

スタチンはコレステロール生合成を担うメバロン酸を阻害する薬物である。肝臓の肝細胞でコレステロールを低下させることにより、血液中のコレステロール値を低下させる。動脈硬化に起因する心疾患や脳梗塞の治療や予防に用いられている。一方、スタチンは癌細胞や骨芽細胞をはじめとする様々な細胞や組織に効果がある多面性を有している。軟骨に対しても実験レベルにおいて、軟骨細胞の分化を促進する、また変形性関節症(OA)などの軟骨の変性を防ぐ作用があることが報告されている。興味深いことにロバスタチンを投与した細胞において軟骨形成能の改善が認められた。症状が重篤なタナトフォリック骨異形成症と症状がマイルドな軟骨無形成症、いずれの疾患においても症状が改善していた。また、他のスタチン、ロスバスタチン、プラバスタチン、アトルバスタチンなどにおいても効果が認められた。

FGFR3 の変異は FGFR3 タンパクの分解を抑制し、蓄積した状態になると考えられる。興味深いことにロバスタチンを添加すると FGFR3 タンパクの発現は低下した。つまり、FGFR3 骨形成不全症に対するスタチンの作用機序は、分解抵抗性である FGFR3 タンパクを分解する可能性が示唆されました。

以上の結果より、スタチンは FGFR3 骨形成不全症の治療薬になる可能性があることが示唆された。

Aim 3) 疾患モデルマウスへの薬剤投与

最後にスタチンの FGFR3 骨形成不全症に対する効果について、モデルマウスを用いて調べた。体長や四肢の短縮が認められる軟骨無形成症 (ACH) モデルマウスにおいて、生後 3 日から生後 2 週間、ロスバスタチンの腹腔内投与を連日行った。頭蓋骨や四肢の骨長を測定したところ、正常のマウスと同程度に成長していた。つまりスタチンの投与は FGFR3 骨形成不全症の症状を改善することを明らかにした。

本研究において FGFR3 骨形成不全症由来 iPS 細胞を樹立し、軟骨に分化誘導させ、疾患軟骨分化誘導モデルを構築した。この疾患特異的 iPS 細胞モデルで見られた軟骨組織形成の異常は、スタチンを投与することで回復した。また、iPS 細胞疾患モデルに加え、疾患モデルマウスにスタチンを投与することにより、軟骨の形成が回復することから、スタチンが FGFR3 遺伝子変異で起こるこれら疾患の治療に有効である可能性が示唆された。

スタチンは高コレステロール血症治療薬として既に臨床で使用されており、安全性や体内動態が臨床レベルで確認されていることから、通常の医薬品開発と比較すると時間とコストを削減して早く安く安全な薬を提供できる、ドラッグ・リポジショニングの可能性がある。しかし、実際の治療への応用までには、成人の心疾患や脳梗塞の治療・予防として使用されているスタチンを作用機序の異なる小児の疾患に使用できるのか、用量や副作用など安全性・有効性について詳細な検討が必要と考えられる。

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)

2016 年

1) Yahara Y, Takemori H, Okada M, Kosai A, Yamashita A, Kobayashi T, Fujita K, Itoh Y, Nakamura M, Fuchino H, Kawahara N, Fukui N, Watanabe A, Kimura T, Tsumaki N.

「Pterostatin B prevents chondrocyte hypertrophy and osteoarthritis in mice by inhibiting *Sik3*.」

『Nat Commun』7, 10959. (2016) doi: 10.1038/ncomms10959. 査読有

2) Kimura T, Yamashita A, Ozono K, Tsumaki N

「Limited immunogenicity of human iPS cell-derived cartilage」『Tissue Eng Part A』22, 1367-1375. (2016) 査読有

3) 山下晃弘, 妻木範行。「iPS細胞を用いた軟骨疾患に対する再生医療開発」『月刊糖尿病』8巻6号、91-97、(2016) 招待論文 査読無

2015 年

4) Yamashita A, Morioka M, Yahara Y, Okada M, Kobayashi T, Kuriyama S, Matsuda S, Tsumaki N. 「Generation of scaffoldless hyaline cartilaginous tissue from human iPSCs」『Stem Cell Reports』4(3), 404-418. (2015) doi: 10.1016/j.stemcr.2015.01.016. 査読有

5) Okada M, Ikegawa S, Morioka M, Yamashita A, Saito A, Sawai H, Murotsuki J, Ohashi H, Okamoto T, Nishimura G, Imaizumi K, Tsumaki N. 「Modeling type II collagenopathy skeletal dysplasia by directed conversion and induced pluripotent stem cells.」『Hum Mol Genet』24, 299-313. (2015). 査読有

6) Tsumaki N, Okada M, Yamashita A. 「iPS cell technologies and cartilage regeneration.」『Bone』70:48-54 doi: 10.1016/j.bone.2014.07.011. (2015) (Review). 査読有

7) 山下晃弘, 妻木 範行。「ヒト iPS 細胞からの軟骨細胞分化と硝子軟骨組織の作成」『日本再生医療学会』14 巻 4 号 70-74、(2015) 招待論文 査読無

8) 妻木 範行、山下晃弘、岡田稔。「小児疾患の新規治療開発—iPS 細胞の有用性」『骨と

腎代謝』 28 卷 3 号、241-247、(2015) 招待論文 査読無

2014 年

9) Yamashita A, Morioka M, Kishi H, Kimura T, Yahara Y, Okada M, Fujita K, Sawai H, Ikegawa S, Tsumaki N. 「Statin treatment rescues FGFR3 skeletal dysplasia phenotypes.」 『Nature』 513(7519), 507-11. doi: 10.1038/nature13775. (2014). 査読有

〔学会発表〕(計 7 件)

国際学会

口演(招待講演)

1) Yamashita A, Tsumaki N 「Regenerative treatment of focal defects of articular cartilage with iPS cell-derived cartilage」 『APLAR』 (Sep/27-30, 2016) 上海

ポスター

2) Yamashita A, Morioka M, Kishi H, Kimura T, Yahara Y, Okada M, Fujita K, Sawai H, Ikegawa S, Tsumaki N. 「Statin treatment rescues FGFR3 skeletal dysplasia phenotypes.」 『Takeda symposium』 (January/15-17 2015), Osaka, Japan

国内学会

口演(招待講演)

3). 山下 晃弘, 妻木 範行。「ヒト iPS 細胞由来軟骨の開発」 『骨代謝学会』 (July/21-23, 2016) 大阪

4). 山下 晃弘, 妻木 範行。「ヒト iPS 細胞由来軟骨を用いた関節軟骨再生治療の試み」 『日本炎症・再生医学会』 (June/16-17, 2016) 京都

5). 山下 晃弘, 森岡 美帆、岸 宏美、木村 武司、箭原 康人、岡田 稔、藤田 香里、澤井 英明、池川 志郎、妻木 範行。「スタチンによる FGFR3 軟骨形成異常症の病態回復」 『軟骨代謝学会』 (Feb/19-20, 2016) 広島

6). 山下 晃弘, 妻木 範行。「スタチンによる FGFR3 軟骨形成異常症の病態回復 - iPS 細胞疾患モデルを用いて-」 『第 30 回日本整形外科学会基礎学術集会』 (Oct/22-24, 2015) 富山

7). 山下 晃弘, 妻木 範行。「iPS 細胞疾患

モデルを用いた FGFR3 軟骨形成異常症の研究」 『骨代謝学会』 (July/23-25, 2015) 東京 8) 山下 晃弘。「スタチンによる FGFR3 病の病態改善 - 疾患特異的 iPS 細胞を用いて-」 『第 17 回日本骨代謝研究会』 (Nov/27, 2014) 東京、慶応義塾大学

9) 山下 晃弘, 妻木 範行。「ヒト iPS 細胞から軟骨細胞への分化誘導」 『日本骨代謝学会』 (July/24-26, 2014) 大阪

口演

10) 山下 晃弘, 森岡美帆、小林与人、奥谷祐希、栗山新一、小屋松冴子、矢島伸之、島伸行、松田秀一、妻木 範行。「フィーダーフリー iPS 細胞から移植用軟骨の作成」 京都 (3/3-4, 2017)

ポスター

11) 山下 晃弘, 森岡美帆、箭原康人、岡田稔、妻木 範行。「ヒト iPS 細胞を用いた移植可能な軟骨様組織の作成」 『再生医療学会』 横浜 (3/19-21, 2015) (ポスター)

12) 山下 晃弘, 森岡美帆、箭原康人、岡田稔、小田直純、妻木 範行。「ヒト iPS 細胞から硝子軟骨様組織への分化誘導法の確立」 『軟骨代謝学会』 東京 (3/6-7, 2015)

〔図書〕(計 0 件)
該当なし

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

発明の名称: FGFR3 病の予防および治療剤ならびにそのスクリーニング方法

発明者: 妻木 範行、山下 晃弘

出願人: 国立大学法人大京都大学

出願日: 2013/12/2

出願番号: 特願 2013-249221

出願国: PCT 出願

PCT 出願日: 2014/11/25

PCT 出願番号: PCT/JP2014/081093

取得状況（計0件）
該当なし

〔その他〕
ホームページ等
該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山下 晃弘 (YAMASHITA, Akihiro)
京都大学 iPS 細胞研究所 特定拠点助教
研究者番号：00636855