

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23791636

研究課題名（和文） 進行性骨化性線維異形成症性の病態解明および創薬に向けたアッセイ系の確立

研究課題名（英文） Establishment of the assay system of drug screening for fibrodysplasia ossificans progressiva

研究代表者

池谷 真 (IKEYA MAKOTO)

京都大学・iPS細胞研究所・准教授

研究者番号：20442923

研究成果の概要（和文）：

異所性骨化を示す難治性疾患の一つである進行性骨化性線維異形成症(Fibrodysplasia ossificans progressiva、以下 FOP)罹患者より iPS 細胞を樹立した。作製した FOP-iPS 細胞は野生型 iPS 細胞に比べて、石灰化結節形成能および軟骨細胞分化が亢進していることが分かった。同時に、石灰化結節形成の亢進を抑制する化合物スクリーニングのアッセイ系を構築した。

研究成果の概要（英文）：

I have generated iPSCs from patients of fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP), a rare genetic disorder characterized by progressive ossification in soft tissues. I have revealed that FOP iPSCs showed increased mineralization and enhanced chondrogenesis in vitro. I also established the assay system of drug screening to suppress the enhanced mineralization of FOP-iPSCs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：発生生物学、幹細胞生物学、整形外科学

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：進行性骨化症線維異形成症

## 1. 研究開始当初の背景

骨系統疾患とは、骨や軟骨など骨格を形成する組織の発生・分化・発達の過程において、何らかの障害が発生し、骨格の形態や構造に系統的な異常をきたす疾患の総称である。低身長、骨格の変形、運動機能異常、易骨折性などが主な症状であり、特に低身長は最も頻度の高い症状である。骨軟骨以外の中胚葉系組織（筋、靭帯、関節包、血管、心臓、生殖器、腎臓など）や外胚葉系組織（表皮、爪、神経、眼、歯など）の異常を伴うことが多いとされ、そのような合併症に留意する必要がある。近年、骨系統疾患の原因遺伝子が徐々に同定されてきているが、多くの疾患におい

てその分子病態は不明確であり、有効な治療法は確立されていない。

FOP は、小児期より、筋、筋膜、腱、靭帯といった線維性結合組織が徐々に骨化していく疾患であり、厚生労働省の難治性疾患克服研究事業の対象疾患に指定されている。罹患者率は約 200 万人に 1 人とされており、性差や人種間の差は認められていない。本邦では 50 人ほどの患者がいると考えられている。出生時には異所性骨化は認められないが、多くの場合、左右対称性の拇趾の異形成が存在しており、早期診断の契機となる重要な所見である。最初の異所性骨化巣は多くの場合 10 才頃までに出現する。誘因なく出現する場合

もあるが、多くは軽微な外傷やウイルス感染などを契機に、熱感と疼痛を伴う腫脹が生じるフレア・アップと呼ばれる症状が出現した後に、その部位が骨化する。骨化巣は体幹部から四肢、近位から遠位、頭側から尾側へと広がりを見せ、結果的にあらゆる関節の可動性が失われ、摂食障害、呼吸障害で生命維持が困難な状態となる。

原因は、骨形成因子 (Bone Morphogenetic Protein, BMP) の I 型受容体の 1 つである ACVR1/ALK2 遺伝子の経配偶子性変異であり、大多数の患者において、同一部位のアミノ酸置換型点突然変異 (R206H 変異) が検出されている。この変異により受容体が恒常的活性型に変化し、リガンド非依存性に BMP シグナルを伝達することや、リガンドが存在する場合には野生型 ACVR1/ALK2 よりも強力に BMP シグナルを伝達することが解明されている。少数ではあるが R206H 以外の部位の変異も存在しており、その中には極めて軽症の表現型を呈するもの (L196P) もある。しかし、生化学的には R206H と同等であることも示されており、同一部位の変異であっても、表現型が著しく異なる場合があることなど、それぞれの変異がどのような機構で異所性骨化を引き起こすかについては解明されておらず、発症および症状の進行を阻害する治療法も確立されていない。

研究が立ち後れている大きな原因の 1 つとして、FOP は外傷によって症状が進行するため、患者からの筋肉組織等の解析試料採取が禁忌である事が挙げられる。また、同様の ACVR1/ALK2 点突然変異を持つモデルマウスは現在までに報告されていない。このような背景から、FOP 研究には適切な実験系の構築が必要不可欠である。一方、2006 年にマウスで、2007 年にヒトで創成された iPS 細胞作製技術は、皮膚線維芽細胞などの成熟分化した体細胞に、多能性誘導因子である Oct3/4, Sox2, Klf4, cMyc をウイルスで導入し、強制発現することにより、様々な組織や臓器の細胞に分化する能力を獲得した細胞である。この技術を応用すれば、FOP 罹患者の皮膚細胞から筋細胞を含むあらゆる細胞を分化誘導することができる。そこで申請者は、iPS 細胞作製技術を応用し、これまで解析できなかった FOP 患者由来の筋細胞等の骨化標的細胞を作製し、その細胞を用いた FOP の真の病態の解明及び創薬に向けたアッセイ系の確立を計画するに至った。

FOP は本邦での総罹患者数が約 50 名と極めて稀な疾患である。さらに、上述の如く、FOP 研究の最大の障壁は罹患者から病態の標的細胞を得ることが禁忌であったことであり、病態解明そして創薬への道は極めて困難なものであった。iPS 細胞技術を応用した本研究により、創薬への道が開けたならば、

稀少難治性疾患の治療法開発モデルとして、その社会的意義は極めて高いものと考えられる。さらに本研究が将来的には異所性骨化のモデルとして、後縦靭帯骨化症や手術後の異所性骨化の研究へと応用できる可能性も考えられる。

## 2. 研究の目的

(1) 難治性骨系統疾患の一つである FOP の病態を、iPS 細胞作製技術を応用して *in vitro* で再現する。

(2) *in vitro* で再現された病態を抑制する化合物あるいは核酸製剤などをスクリーニングするためのアッセイ系を構築する。アッセイ系には骨化過程を鋭敏に検出する手法の開発も含まれる。

## 3. 研究の方法

(1) FOP 罹患者から最小限の侵襲により体細胞を採取し、そこから罹患者由来 iPS 細胞を複数クローン樹立する。

(2) 野生型 iPS 細胞から骨化標的細胞を誘導する系を確立する。

(3) 野生型 iPS 細胞と FOP-iPS 細胞の両方から骨化標的細胞を誘導し、そこからさらに軟骨あるいは骨細胞を誘導して両者を比較する。この比較検討により、FOP-iPS 細胞で骨化の過程が亢進していることを示すことができる実験系を確立する。

(4) 骨化標的細胞が、骨化する過程を *in vitro* で鋭敏に検出するアッセイ系を確立する。

## 4. 研究成果

(1) FOP 患者由来細胞から iPS 細胞の作製：3 人の日本人 FOP 患者からレトロウイルスによる 4 因子導入により iPS 細胞作製を行った。作製された iPS 細胞は、導入遺伝子のサイレンシング、ES 細胞マーカー遺伝子の発現、染色体異常の有無、胚葉体形成による多分化能の評価、奇形腫形成能による多分化能の評価等の標準的機能評価法を用いて、至適なクローンを複数クローン得ることに成功した。

(2) 野生型 iPS 細胞から骨化標的細胞を誘導する系の確立：野生型 iPS 細胞からいったん胚葉体形成を経て、骨細胞および軟骨細胞を含む細胞集団を誘導する分化誘導法を確立した。また野生型 iPS 細胞から直接単層培養を行うことにより、石灰化結節形成を誘導する分化誘導法を確立した。これ以外に、骨化標的細胞の候補とされる骨格筋細胞、筋衛星細胞、血管内皮細胞、間葉系幹細胞、腱細胞への分化誘導法の確立を試みたが、いずれも誘導されない、あるいはフローサイトメーターなどを使用しても解析に十分な数の細胞数が取れるほどの誘導効率が得られない

等の理由により、本研究期間内での誘導法の確立には至らなかった。

(3) 異所性骨化の *in vitro* アッセイ系の確立：(2)において野生型 iPS 細胞から胚葉体形成を経て、骨細胞および軟骨細胞を含む細胞集団の誘導法の確立に成功したこと、および野生型 iPS 細胞から単層培養を経て石灰化結節を分化誘導する方法の確立に成功したことを受け、これらの分化誘導系を FOP-iPS 細胞に適用した。その結果、特に単層培養から石灰化結節を分化誘導する方法で、野生型 iPS 細胞に比べて FOP-iPS 細胞の石灰化結節形成能が亢進していることが判明した。

(4) *in vitro* アッセイ系の確立：骨化の アッセイ系として、リン酸カルシウム量をアリザリンレッド染色により検出し、そこから色素を抽出して数値化する方法を確立した。この方法でも、FOP-iPS 細胞の方が野生型 iPS 細胞よりもアリザリンレッド染色陽性の石灰化結節の形成が亢進していることが確認できた。

(5) アッセイ系の評価：(4)の アッセイ系の評価を行うため、すでに知られている BMP 阻害物質 Dorsomorphin, LDN193189, DMH1 を培地中に添加して石灰化結節誘導実験を行ったところ、予想通り FOP-iPS 細胞で確認された石灰化結節誘導の亢進が抑制された。

(6) スループットの向上：薬剤のスクリーニングへと進むため、上述の石灰化実験について、ウェル数の多いプレートへの適用を試みた。その結果、24 ウェルプレートフォーマットで FOP-iPS 細胞の石灰化結節形成能の亢進を検出する条件は決定した。しかし、48 ウェル、96 ウェルプレートフォーマットでは結果の安定性に問題があることが分かった。

また、アリザリンレッド染色陽性の石灰化結節が検出できるようになるための誘導期間の短縮を図ったが、14 日と比較的長期間の培養を必要とし、アリザリンレッド染色による検出では 24 ウェル以上のスループットの向上は不可能と判断した。

以上まとめると、ヒト iPS 細胞から間葉系の細胞を誘導することに成功し、野生型 iPS 細胞と比較して FOP-iPS 細胞は石灰化結節形成能が亢進しているという結果を得た。さらに石灰化結節を染めるアリザリンレッド染色の数値化にも成功し、これらの実験の 24 ウェルフォーマットへの適用にも成功した。これらの結果から、本研究は FOP 病態に対して未知の化合物を用いた薬剤スクリーニングを実施するために重要な第 1 歩となる研究であったと考える。

## 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 1 件)

- (1) Nasu A, Ikeya M, Yamamoto T, Watanabe A, Jin Y, Matsumoto Y, Hayakawa K, Amano N, Sato S, Osafune K, Aoyama T, Nakamura T, Kato T, Toguchida J. Genetically matched human iPS cells reveal that propensity for cartilage and bone differentiation differs with clones, not cell type of origin. PLoS One. (査読有) 2013;8(1):e53771. doi: 10.1371/journal.pone.0053771.

[学会発表] (計 6 件)

- ①松本佳久、池谷真、Edward Hisao、那須輝、浅香勲、大塚隆信、戸口田淳也：人工多能性幹細胞を用いた希少難治性骨疾患への取り組み。第 12 回日本再生医療学会、一般演題 (ポスター) M-4-4、横浜、2013 年 3 月 22 日
- ②松本佳久、池谷真、那須輝、Edward Hisao、大塚隆信、戸口田淳也：iPS 細胞を用いた難治性骨疾患への取り組み。第 27 回日本整形外科学会基礎学術集会、一般口演 1-7-29、名古屋、2012 年 10 月 26 日
- ③松本佳久、池谷真、Edward Hisao、那須輝、浅香勲、大塚隆信、戸口田淳也：iPS 細胞を用いた難治性骨疾患への取り組み。第 11 回日本再生医療学会、一般演題 (ポスター) C-1-04、横浜、2012 年 6 月 13 日
- ④Matsumoto Y, Ikeya M, Hsiao E, Schlieve C, Nasu A, Asaka I, Otsuka T, Conklin B, Toguchida J: Application of iPS cells to the research of Fibrodysplasia Ossificans Progressiva. 第 10 回国際幹細胞生物学会、ポスター発表、横浜、2012 年 6 月 15 日
- ⑤Schlieve R, Matsumoto Y, Hayashi Y, Kim H, Nguyen T, Sami S, Yamanaka S, Ikeya M, Toguchida J, Conklin B, Hsiao E: Modeling Inherited Skeletal Disease in Human iPS Cells. 第 10 回国際幹細胞生物学会、ポスター発表、横浜、2012 年 6 月 15 日
- ⑥Matsumoto Y, Ikeya M, Nasu A, Asaka I, Otsuka T, Hsiao E, Toguchida J: Application of iPS cells to the research of fibrodysplasia ossificans progressive. アメリカ骨代謝学会、ポスター発表 SU0187, サンディエゴ、アメリカ、2011 年 9 月 16 日

[図書] (計 3 件)

- (1) 池谷真、松本佳久、横山宏司、戸口田淳也、金原出版株式会社、iPS 細胞—その基礎と臨床応用に向けた展望—、整形・災害外科 第 56 巻第 5 号、4 月臨時増刊号、

2013、507-514

- (2) 戸口田淳也、池谷 真 (編集)、メディカルドゥ、最新疾患モデルと病態解明・創薬応用研究・細胞医薬創製研究の最前線、遺伝子医学MOOK 22号、2012、276
- (3) 松本佳久、池谷 真、戸口田淳也、メディカルドゥ、難治性骨軟骨疾患罹患者由来iPS細胞を用いた病態再現と治療薬開発の試み、遺伝子医学MOOK 22号、2012、190-194

[その他]

ホームページ等

[http://www.cira.kyoto-u.ac.jp/j/research/ikeya\\_summary.html](http://www.cira.kyoto-u.ac.jp/j/research/ikeya_summary.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

池谷 真 (IKEYA MAKOTO)

京都大学・iPS細胞研究所・准教授

研究者番号：20442923

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし