

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15662

研究課題名(和文) 遺伝子改変マウスを用いた異所性骨起源細胞の同定

研究課題名(英文) Identification of the cell-of-origin of ectopic bones using lineage tracing mice

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：進行性骨化性線維異形成症(Fibrodysplasia Ossificans Progressiva、以下FOP)は、小児期より筋、腱、靭帯等の線維性結合組織内に徐々に異所性骨が出現する疾患であるが、異所性骨の起源細胞についてははっきりしていなかった。本申請では、神経堤細胞がFOPの異所性骨の起源の1つであるという仮説のもと、遺伝子改変マウスを駆使して検証を行った結果、予備的な結果ではあるが本仮説裏付ける結果が得られた。

研究成果の概要(英文)：Fibrodysplasia Ossificans Progressiva (hereafter refer as FOP) is an intractable rare disease. In FOP patients, ectopic bones gradually appears in connective tissues such as muscles, tendons, and ligaments, and the cell-of-origin the ectopic bones were not clear. In this application, we hypothesized that neural crest cells are one of the origins of ectopic bone of FOP. By using genetically modified lineage tracing mice, we have succeeded to obtain a preliminary results that support this hypothesis.

研究分野：整形外科学

キーワード：異所性骨化

1. 研究開始当初の背景

(1) FOP の異所性骨起源細胞について  
 進行性骨化性線維異形成症 (Fibrodysplasia Ossificans Progressiva、以下 FOP) とは、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、進行性の異所性骨化症である。罹患率はおよそ 160 万人に 1 人とされており、本邦での患者数は 70 人程度、全世界でも 1200 人程度と考えられている。2007 年に難病指定を受け、難治性疾患克服研究事業の対象疾患となっている、いわゆる希少難病である。患者は、形成された異所性骨により脊柱、胸郭、四肢関節等の可動性が失われ、結果的に、摂食障害、呼吸障害等で QOL が極めて低い状態を強いられる。出生時には異所性骨化はほとんど認められないが、多くの場合、左右対称性の拇趾の異形成が存在し、早期診断の契機となる。最初の異所性骨化巣が首および上背に出現する年齢の中央値は 6 歳とされている。骨化巣の出現には誘因がない場合もあるが、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 flare-up と呼ばれる症状が出現した後に、その部位が骨化するとされている。

原因遺伝子は長く不明であったが、2006 年にペンシルバニア大学の Kaplan 博士のグループが連鎖解析などの手法を用い、骨形成因子 (Bone Morphogenetic Protein, BMP) の I 型受容体の 1 つである ACVR1/ALK2 の経配偶子性恒常活性化型点突然変異 (ACVR1<sup>R206H</sup>) であることが報告された。しかし、詳細な発症機構は未だ不明である。

解析が進んでいない原因の 1 つに、異所性骨の起源細胞が未だに不明であることが挙げられる。これまでに、野生型マウスの骨格筋組織中に BMP を過剰に投与あるいは発現させることにより作製された BMP 誘導型異所性骨の起源を探索する研究はいくつか行われてきたが、それによると骨格筋が異所性骨の起源細胞となるという考えは否定的である (Kan et al., 2009. Stem Cells; Lounev et al., 2009. J. Bone. Joint. Surg. Am.)。血管内皮細胞が骨化の原因細胞であるというデータも存在するが、反証データも存在し、まだ結論が得られていない。また、ヒトで見られる FOP 型変異を持ったモデルマウスを用いた解析はなかった。

		③	④
		P0-Cre <sub>R26R</sub>	遺伝子 X-CreER <sup>T2</sup> <sub>R26R</sub>
①	BMP 誘導型異所性骨	①-③	①-④
②	FOP モデルマウス (DOX 誘導型 ACVR1 <sup>R206H</sup> 発現マウス)	②-③	②-④

表 1. 本申請で実施する研究内容

(2) 作業仮説：神経堤細胞が異所性骨の起源細胞である

申請者らは、FOP 患者由来 iPS 細胞から神経堤細胞を経由して誘導した間葉系間質細胞では、骨化および軟骨化が亢進することを発見した (Matsumoto, Ikeya et al., 2014. Stem Cells)。この結果から、神経堤細胞が FOP の異所性骨の起源細胞である可能性を想定し、研究を開始した。

2. 研究の目的

FOP の異所性骨の起源細胞が神経堤細胞であることを、遺伝子改変マウスを用いて示すこと。

3. 研究の方法

【概要】

本研究は、(1) 遺伝子改変マウスの開発 (②④) と、(2) 異所性骨の起源探索実験 (①-③、①-④、②-③、②-④) の 2 つに大別し、下記のような実験計画を当初立案した。

(1) 遺伝子改変マウスの開発

② FOP モデルマウスの作製

(Rosa-rtTA\_Col1-tetOn-ACVR1<sup>R206H</sup>)

④ 発生期の神経堤細胞を特異的に標識する遺伝子 X-CreER<sup>T2</sup> マウスの作製

(2) 異所性骨の起源探索実験

①-③: BMP 誘導型異所性骨が P0-Cre<sub>R26R</sub> マウスの LacZ で染色される (R26R マウス: Rosa26-loxP-stop-loxP-LacZ マウス)

①-④: BMP 誘導型異所性骨が遺伝子 X-CreERT<sub>2</sub><sub>R26R</sub> マウスの LacZ で染色される

②-③: FOP モデルマウスの異所性骨が P0-Cre<sub>R26R</sub> マウスの LacZ で染色される

②-④: FOP モデルマウスの異所性骨が遺伝子 X-CreERT<sub>2</sub><sub>R26R</sub> マウスの LacZ で染色される

しかし、④のマウス (遺伝子 X-CreERT<sub>2</sub> マウス) の母体に胎生 9.5 日目にタモキシフェン投与を行ったところ全て流産したこと、および①-③のマウスを得るための交配でホモマウス取得に失敗したことから、研究計画を変更し、⑤神経堤系譜細胞特異的に ACVR1<sup>R206H</sup> を発現するマウス (P0-Cre<sub>Rosa-loxP-stop-loxP-rtTA\_Col1-tetOn-ACVR1<sup>R206H</sup></sub> マウス) を作製し、異所性骨が形成されるかを検討した (後述)。

【詳細】

(1) 遺伝子改変マウスの作製

②: FOP モデルマウス (Rosa-rtTA\_Col1-tetOn-ACVR1<sup>R206H</sup>) の作製

FOP 変異は経配偶子性突然変異であり、患者のすべての細胞は生まれながらにして ACVR1<sup>R206H</sup> 遺伝子をヘテロに持っている。しかし、同様の変異を全身性を持つノックインマウスは周産期致死であることが 2012 年

に示された(Chakkalakal et al., 2012. J Bone Miner Res)ため、FOP モデルマウスとしては薬剤等による誘導型で ACVR1<sup>R206H</sup> を発現するマウスを作製することが適切と考えられた。ごく最近になって、Cre のシステムを用いて時期特異的に ACVR1 の内在性プロモーター制御のもと ACVR1<sup>R206H</sup> を発現することができるノックインマウスが発表された(Hatsell et al., 2015. Sci Transl Med)。しかしこのマウスは、特殊な遺伝子改変のデザインのためか、Cre 活性化以前に半分程度の mRNA が遺伝子改変部位のエクソンをスキップすることが判明し、この特殊な分子が表現型に影響している可能性は否定できない。そこで、申請者の所属する iPS 細胞研究所の山田泰広教授研究室との共同研究のもと、FOP モデルマウスの作製を行う。

### ③ : P0-Cre\_R26R マウス

P0-Cre マウスは熊本大学山村研一教授研究室より分与を受ける。R26R マウスは Philippe Soriano 研究室より分与を受ける。

### ④ : 発生期の神経堤細胞を特異的に標識する遺伝子 X-CreER<sup>T2</sup> マウスの作製

P0-Cre マウスは神経堤細胞を標識するのに使用される最も実績のあるマウスである。しかし、P0-Cre で標識される細胞は神経堤細胞を含んだ細胞集団であり、本申請研究の目的には発生期の神経堤細胞を特異的に標識することができるマウスが最も理想的である。遺伝子 X は胎生 8 日から 10 日の胚において神経堤細胞に特異的に発現する遺伝子である。そこでこの遺伝子の 3'UTR 領域にタモキシフェン誘導により核移行する CreER<sup>T2</sup> を自己切断配列 (2A) で連結した形でノックインしたマウス (遺伝子 X-CreER<sup>T2</sup> マウス) の作製を、iPS 細胞研究所の山田泰広教授研究室との共同研究のもと行う。

#### (2) 異所性骨の起源探索実験

### ①-③および①-④ : BMP 誘導型異所性骨の神経堤細胞起源説の検証

P0-Cre\_R26R の産後 6~10 週齢で BMP タンパクを骨格筋組織中に過剰投与して異所性骨を誘導する。その異所性骨が LacZ で標識されるかを検証する。

遺伝子 X-CreER<sup>T2</sup>\_R26R マウスの、胎生 9.5 日目にタモキシフェンを母体に投与して神経堤細胞を標識し、産後 6~10 週齢で BMP タンパクを骨格筋組織中に過剰投与して異所性骨を誘導する。その異所性骨が LacZ で標識されるかを検証する。

②-③ : Rosa-rtTA\_Col1-tetOn-ACVR1<sup>R206H</sup> のホモマウス、および P0-Cre\_R26R のホモマウスを交配し、Rosa-rtTA\_Col1-tetOn-ACVR1<sup>R206H</sup>\_P0-Cre\_R26R クアドロヘテロマウスを作製する。6~10 週齢でドキシサイクリンの投与により

全身性に ACVR1<sup>R206H</sup> を誘導し、そこにカルディオトキシン等による骨格筋破壊刺激を与えることにより異所性骨を誘導し、その異所性骨が LacZ で標識されるかを検証する。

### ②-④ : Rosa-rtTA\_Col1-tetOn-ACVR1<sup>R206H</sup> 遺伝子 X-CreER<sup>T2</sup>\_R26R マウスの作製

Rosa-rtTA\_Col1-tetOn-ACVR1<sup>R206H</sup> のホモマウス、および遺伝子 X-CreER<sup>T2</sup>\_R26R のホモマウスを交配し、Rosa-rtTA\_Col1-tetOn-ACVR1<sup>R206H</sup> 遺伝子 X-CreER<sup>T2</sup>\_R26R クアドロヘテロマウスを作製する。胎生 9.5 日目にタモキシフェンを母体に投与して神経堤細胞を標識し、産後 6~10 週齢でドキシサイクリンの投与により全身性に ACVR1<sup>R206H</sup> を誘導し、そこにカルディオトキシン等による骨格筋破壊刺激を与えることにより異所性骨を誘導し、その異所性骨が LacZ で標識されるかを検証する。

#### 4. 研究成果

申請時の計画のうち、遺伝子改変マウスの作製については計画通りに成功した。しかし、遺伝子 X-CreER<sup>T2</sup> マウスを妊娠させ、胎児が E9.5 になった段階でタモキシフェンを投与して神経堤細胞を標識する予定であったが、タモキシフェン投与により全ての母体が流産した。タモキシフェン投与量と投与時期の最適化、およびカウンターとなるプロジェステロンの投与を試みたが、いずれも良好な結果は得られず、①-④、②-④実験は断念した。

①-③については良好な結果が得られ、BMP により誘導された異所性骨は、lacZ で染色された。これより、神経堤細胞が BMP 誘導型の異所性骨の起源の 1 つである可能性が示唆された。

次に ② - ③ 実験のため、Rosa-rtTA\_Col1-tetOn-ACVR1<sup>R206H</sup> のホモマウス化、および P0-Cre\_R26R のホモマウス化を試みたが、いずれもホモマウスを得ることに失敗した。そこで計画を変更し、⑤神経堤系譜細胞特異的に ACVR1<sup>R206H</sup> を発現するマウス (P0-Cre\_Rosa-loxP-stop-loxP-rtTA\_Col1-tetOn-ACVR1<sup>R206H</sup> マウス) を作製し、異所性骨が形成されるかを検討した (図 1)。このマウスは P0 プロモーター下に Cre を発現することで、部位特異的組換え反応を触媒し、Rosa 遺伝子座に存在する stop 配列を高効率に切り出す。これにより、stop 配列の下流に組み込まれた rtTA が P0 陽性系譜細胞で特異的に発現するようになる。rtTA はドキシサイクリンと結合して tetOP に結合し、下流に組み込んだ ACVR1<sup>R206H</sup> を発現する。結果的にこのマウスは、ドキシサイクリン刺激後に P0 陽性系譜細胞で ACVR1<sup>R206H</sup> を発現するようになる。このマウスにカルディオトキシン注射による筋破壊を行ったところ、得られた標本数は少ないながらも、異所性骨が形成されることが示された。

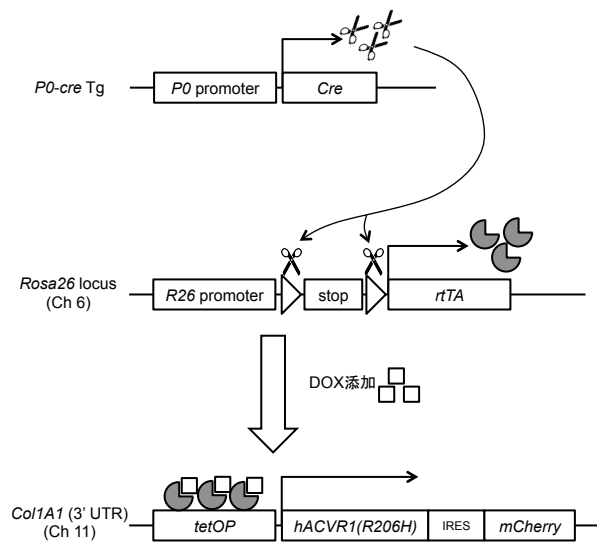


図 1. P0-Cre\_Rosa-loxP-stop-loxP  
-rtTA\_Col1-tetOn-ACVR1<sup>R206H</sup> マウス

(4) 研究協力者  
該当なし

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 0 件)  
該当なし

〔学会発表〕 (計 0 件)  
該当なし

〔図書〕 (計 0 件)  
該当なし

〔産業財産権〕  
○出願状況 (計 0 件)  
該当なし

○取得状況 (計 0 件)  
該当なし

〔その他〕  
該当なし

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

該当なし

(3) 連携研究者

山田 泰広 (YAMADA, Yasuhiro)  
京都大学・iPS 細胞研究所・教授  
研究者番号： 70313872