

令和元年6月20日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K17027

研究課題名（和文）疾患特異的iPS細胞を用いた症候群性頭蓋縫合早期癒合症の発症機序の解明

研究課題名（英文）Establishment of disease-specific induced pluripotent stem cell lines from the patients of syndromic craniosynostosis

研究代表者

池 大官（Chi, Daekwan）

自治医科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：50784344

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：症候群性頭蓋骨縫合早期癒合症患者より初代培養した皮膚線維芽細胞に対して、センダイウイルスを用いてOCT3/4, SOX2, KLF4, L-MYCの4遺伝子を導入することにより、疾患特異的iPS細胞株を樹立した。樹立した細胞株は各種マーカー染色（Oct4, SOX2, Nanog, SSEA-4）陽性であり、今後の病態解明研究に有用なソースとなる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝疾患の病態解明には、患者さん由来の細胞が不可欠ですが、骨・軟骨などの組織を研究材料として頂くことは現実的ではありません。手術の際に切除された不要な組織からiPS細胞を樹立して、それを様々な細胞に分化させれば、ほぼ無限に研究材料を得ることができます。今回我々は症候群性頭蓋骨縫合早期癒合症という希少疾患の疾患特異的iPS細胞を樹立することに成功しました。今後この細胞を用いて症候群性頭蓋骨縫合早期癒合症の病態解明に挑むことができます。

研究成果の概要（英文）：We established disease-specific induced pluripotent stem cell lines from the patients of syndromic craniosynostosis. These iPS cell lines will be useful sources for the future research.

研究分野：形成外科学

キーワード：症候群性頭蓋骨縫合早期癒合症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

症候群性頭蓋縫合早期癒合症 (Crouzon症候群・Apert症候群・Pfeiffer症候群など) は、頭蓋縫合の早期癒合だけでなく、中顔面低形成や指趾奇形など種々の症状を呈する疾患である。線維芽細胞増殖因子受容体 (FGFR) の変異が原因として同定されているが、研究対象となる材料 (患者由来の骨芽・軟骨細胞) の獲得が倫理的に困難であるため、発症機序の詳細は不明であり、治療法は対症療法としての手術治療しかない。

人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) は、皮膚線維芽細胞や末梢血単核細胞より樹立される多能性幹細胞であり、主に再生医療のソースとして注目されてきた。しかし、近年では タナトフォリック骨異形成症の疾患特異的 iPS 細胞を用いた薬剤スクリーニングにより、高脂血症治療薬であるスタチンが疾患特異的 iPS 細胞の軟骨分化能を著明に改善することが示された報告や、Smith-Lemli-Opitz 症候群の疾患特異的 iPS 細胞を用いた解析により、7DHC の細胞内蓄積による Wnt/ β -catenin 経路阻害がその真の病態であることが示された報告などが相次いでおり、研究材料が有限もしくは入手不可能な遺伝疾患の研究材料におけるソースとしても、iPS 細胞は非常に有用であると考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、症候群性頭蓋縫合早期癒合症の詳細な発症機構を分子生物学的に明らかにすることにより、新規治療法開発への道を開くことである。具体的には、まず症候群性頭蓋縫合早期癒合症の患者から初代培養した皮膚線維芽細胞を用いて人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) を樹立する。そして、樹立した疾患特異的 iPS 細胞が軟骨・骨系統に分化する過程を分子生物学的に解析して症候群性頭蓋縫合早期癒合症の病態生理を解明する。さらに、解明された発症機序をもとに候補薬剤をピックアップしたうえで、薬剤スクリーニングによるドラッグリポジショニングといった新規治療法の開発することを最終目標とする。

3. 研究の方法

ファイファー症候群の患者2名とアペール症候群の患者より採取した真皮組織より皮膚線維芽細胞を分離・培養した。この皮膚線維芽細胞に対して、Oct3/4, Sox2, Klf4, L-Myc 遺伝子をセンダイウイルスを用いてよって導入することにより iPS 細胞を樹立した。樹立した iPS 細胞に対して、マーカー蛋白 (Oct4, Sox2, Nanog, SSEA-4) の免疫蛍光染色によってその品質を確認した。

4. 研究成果

ファイファー症候群の患者2名、アペール症候群の患者1名より採取した肉芽組織より線維芽細胞を初代培養した。(ファイファー症候群由来線維芽細胞:PfF1, PfF2、アペール症候群由来線維芽細胞:ApF3)同様に患者より採取した皮膚片よりヒト由来正常線維芽細胞を初代培養した。(正常線維芽細胞:Nf1, Nf2)これら4株に対して、センダイウイルスを用いてOCT3/4, SOX2, KLF4, L-MYC の4遺伝子を導入した。ウイルス感染して1週間培養した後に、Lamini511-E8 fragment (i-Matrix 511)にてコーティングしたディッシュにリプレATINGした。iPS細胞専用培地 (StemFit) を2日おきに交換し、約3週間後に形成されてきたiPS細胞様コロニー (図1) をピックアップした。

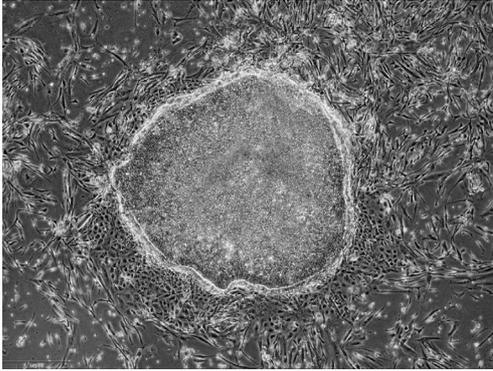


図 1

NF1, PfF1, PfF2, ApF3の各細胞につき それぞれ31, 46, 15, 42コロニーずつクロニングすることができた。(NF2ではiPS様コロニー出現せず) その後i-Matrix 511コーティングによるフィーダーフリー培養を継続し、継代の過程において線維芽細胞・分化細胞のコンタミネーションや分化傾向の明らかなコロニーを破棄していった結果、NF1, PfF1, PfF2, ApF3それぞれ6, 8, 8, 5株ずつiPS細胞状の敷石状コロニーを形成する細胞株を確立した。(図2)

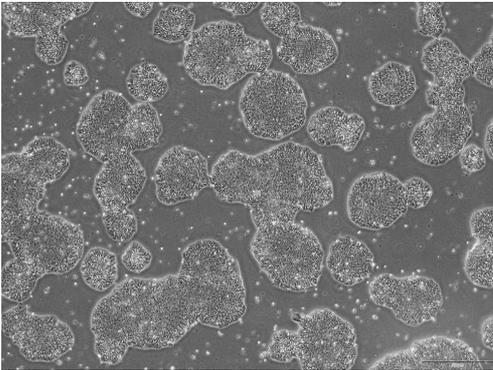


図 2

これらのiPS細胞株のコロニーは全てアルカリフォスファターゼ染色陽性かつOct4, SOX2, Nanog, SSEA-4抗体を用いた免疫蛍光染色陽性であり(図3)、未分化能を有していると考えられた。今後は今回樹立した疾患特異的iPS細胞を用いて、骨・軟骨分化障害の原因を探求していきたい。

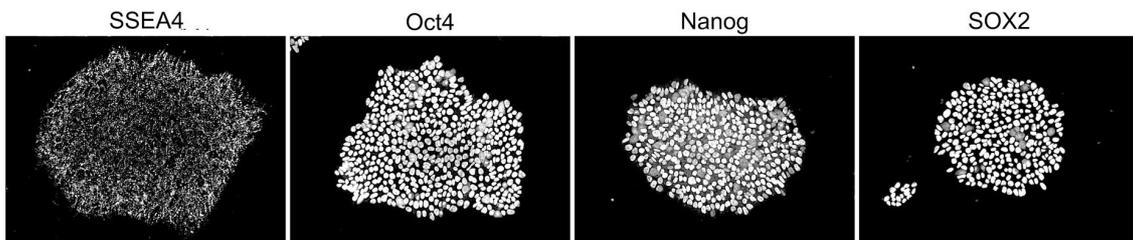


図 3

5. 主な発表論文等

なし

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

該当なし

6. 研究組織

(1)研究分担者

該当なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：須永 中

ローマ字氏名：(SUNAGA, ataru)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。