

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16540

研究課題名(和文) TGF-シグナルに反応するFOPフレア・アップ期のメカニズム解明及び候補薬探索

研究課題名(英文) Mechanism elucidation and drug development of early-stage FOP respond to TGF- β signaling using patient-derived iPSCs

研究代表者

趙 成珠 (Zhao, Chengzhu)

京都大学・iPS細胞研究所・特定研究員

研究者番号：50778678

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、希少遺伝性疾患である進行性骨化性線維異形成症(FOP)の骨化巣出現前の発病初期にフレア・アップと呼ぶ皮下軟組織腫張現象のメカニズム、及びそれを抑制する方法の解明を行なった。患者由来iPS細胞から*in vitro*再現系を構築し、スクリーニングよりFOP細胞のみが過剰に反応する新規リガンドAを同定した。その上、リガンドAの投与がFOPモデルマウスの筋肉に局在する線維性細胞の増殖を促進し、異所性骨化に導くことを見出した。今回の成果はこれまでほぼ研究されていないフレア・アップが起こる分子メカニズムの解明、および治療法の開発に繋ると期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年盛んに行われたFOPの骨化および軟骨化メカニズムの解明とそれを抑制する新規候補となる化合物探索研究と比較して、フレア・アップ期については現状では現象論的な臨床研究にとどまり、病態メカニズムも未解明な点が多い。本研究で構築した*in vitro*病態再現系、およびそれに基づいて見出したリガンドAはフレア・アップに関連する分子シグナルの解明、及びそれを抑える治療法の探索へとつながると期待される。

研究成果の概要(英文)：Fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP) is a genetic disorder characterized by progressive heterotopic bone (HO) formation in soft tissues. Early FOP lesion, also known as 'flare-up', initiates by soft tissue injury, followed by endochondral ossification to form HO. FOP patients harbor gain-of-function mutations in ACVR1, conferring overactivation of BMP signaling which induces differentiation of stromal cells in flare-up tissue into HO. However, the cause of flare-up formation has not been reported. In a this study, we established an *in vitro* flare-up model by using FOP patient-derived induced pluripotent stem cells (FOP-iPSCs). Based on this model, we found a 'ligand A' specifically increased proliferation activity of FOP cells. Besides, ligand A administration induced flare-up and HO in FOP model mice. The findings of this project could add substantially to our understanding and provide a new therapeutic target of FOP.

研究分野：分子生物学

キーワード：進行性骨化性線維異形成症 FOP iPS細胞

1. 研究開始当初の背景

進行性骨化性線維異形成症 (fibrodysplasia ossificans progressive, FOP) は、骨形成タンパク質 (bone morphogenetic protein, BMP) の I 型受容体である ACVR1 をエンコードする遺伝子の変異によって起因する。この変異により BMP シグナルを過剰に伝えて、筋組織内の未分化間葉系細胞から軟骨細胞や骨芽細胞の分化が誘導され、その結果異所性骨形成が進行するものと考えられる。発症初期の患者では熱感と疼痛を伴う腫脹が生じるフレア・アップと呼ぶ皮下軟組織の腫脹を始め、これが消退を繰り返しながら軟骨内骨化が進行している。この時期の生体内では、骨格筋の退縮、炎症性細胞の侵入および線維性細胞の増加が起こると推測される。しかし、この反応が起こる原因及び抑制する方法は未解明である。一方、現時点では FOP を根治的治療薬や治療法は見つかっていない。対症的治療として主に FOP のフレア・アップに対してステロイドなどの抗炎症薬、さらに異所性骨化に対してビスフォスフォネート製剤などを用いられたが、有効性が確認していない。従って、フレア・アップが起こる分子メカニズム解明、およびそれに対する治療法の開発への期待が高まっている。

2. 研究の目的

本研究では本研究は FOP 病態初期のフレア・アップ現象における線維性細胞増加の過程に着目し、FOP 患者由来 iPS 細胞 (FOP-iPSC) を用いて *in vitro* 病態再現系を構築する。その上、FOP 細胞における TGF- β シグナルに特異的に反応する分子メカニズムの探索および候補治療薬のスクリーンを行うことにより、FOP 初期病態メカニズムの解明およびそれに基づいた新しい治療法の開発を目的とする。

3. 研究の方法

1. *in vitro* 線維性細胞増殖・遊走能評価系の構築

FOP-iPS 細胞及び変異型 ACVR1 遺伝子を修復した対照 iPS 細胞 (resFOP-iPS 細胞) から作製した MSC (FOP-iMSC 及び resFOP-iMSC) の増殖速度及び細胞遊走能を指標として、FOP 初期病態に起こる線維性細胞増加の *in vitro* 評価系を構築する。方法は比色 (細胞増殖) 及び蛍光 (細胞遊走) 検出キットを用いて評価系を構築し、FOP-iMSC でのみ増殖を亢進するリガンドを探索する。

2. FOP モデルマウスを用いたフレア・アップ組織の TGF- β シグナルの解明

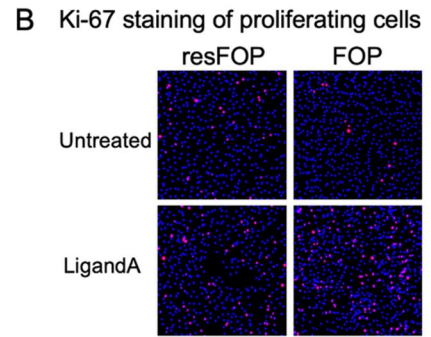
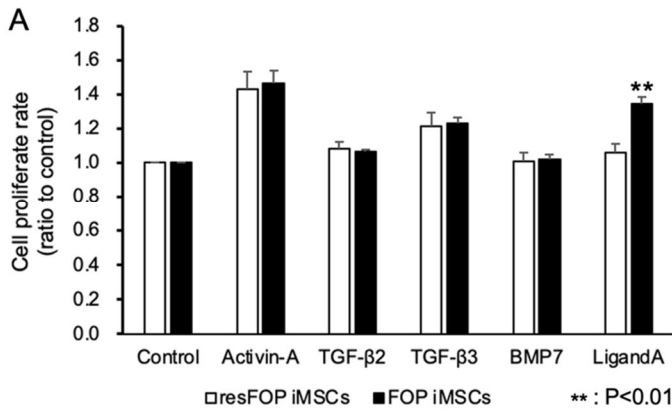
所属研究室が作製したドキシサイクリン (doxycycline, Dox) 誘導性変異型 ACVR1 を発現するマウス (FOP モデルマウス) に、カルディオトキシン注射による筋肉を破壊する刺激を加え、フレア・アップを誘導して、FOP モデルマウス組織の HE 染色及び TGF- β 、pSmad2/3 及び MSC マーカー、増殖マーカーの免疫共染色を行い、TGF- β シグナルとフレア・アップの関連性を確認する。また、フレア・アップ組織において TGF- β 1-ROS-PAI-1 経路の亢進を免疫染色及びウエスタンブロット法によって確認する。

3. フレア・アップ現象を抑制する候補治療薬の探索

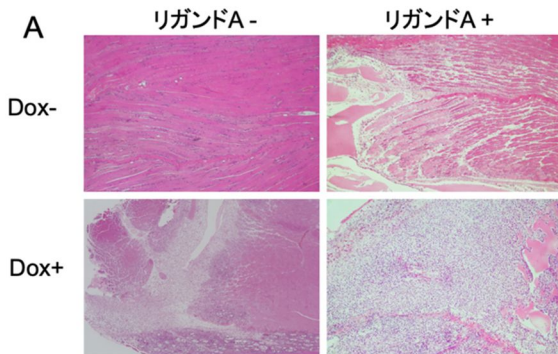
1 で見出したリガンド分子の FOP-iMSC 増殖に対する濃度依存活性及び安全性の検証を行う上で、2 と同じ方法によってリガンド分子及び中和抗体を FOP モデルマウスに投与し、フレア・アップに対する抑制効果を *in vivo* で検証する。

4. 研究成果

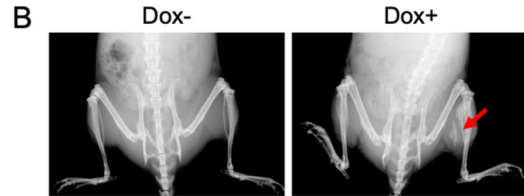
FOP 患者における異所性骨化の原因は、変異 ACVR1 (FOP-ACVR1) が過剰に BMP シグナルを伝えるためとされている。しかし、BMP シグナルは一般的に細胞増殖を制御しないため、病態初期のフレア・アップが進行するメカニズムが説明できない。本研究ではフレア・アップの発生機構を解明するため、患部の増殖亢進の線維性細胞の主な由来である MSC に着目して、患者由来 iPS 細胞から MSC を誘導し、*in vitro* の増殖評価系を構築した。この評価系を用いたスクリーニングより、FOP 細胞でのみ過剰的に反応させるリガンド A を同定した (図 1)。



また、リガンド A の投与が FOP モデルマウスにおいて患部組織の線維性細胞増殖を促進し、異所性骨化に導くことを見出した(図 2)。



A. H&E染色したフレア・アップ期の筋肉組織 (左)
B. リガンドAが誘発した異所性骨 (右)



本研究によって構築した *in vitro* 病態再現系に基づいて、フレア・アップに関連する分子シグナルの解明、及びそれを抑える治療法の探索を行うことで、今まで未解明の FOP 初期病態メカニズムの解明や、新規治療標的の発現及びスクリーニングによる治療薬の開発が期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Mitsuzawa S, Zhao C, Ikeguchi R, Aoyama T, Kamiya D, Ando M, Takeuchi H, Akieda S, Nakayama K, Matsuda S, Ikeya M	4. 巻 10(1)
2. 論文標題 Pro-angiogenic scaffold-free Bio three-dimensional conduit developed from human induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells promotes peripheral nerve regeneration	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-15
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-68745-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yoshimatsu M, Ohnishi H, Zhao C, Hayashi Y, Kuwata F, Okuyama H, Kawai Y, Hiwatashi N, Kishimoto Y, Sakamoto T, Ikeya M, Omori K	4. 巻 52
2. 論文標題 In vivo regeneration of rat laryngeal cartilage with mesenchymal stem cells derived from human induced pluripotent stem cells via neural crest cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Stem Cell Research	6. 最初と最後の頁 102233
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/micr.30507	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sadaki Mitsuzawa; Ryosuke Ikeguchi; Tomoki Aoyama; Maki Ando; Hisataka Takeuchi; Hirofumi Yurie; Hiroki Oda; Takashi Noguchi; Souichi Ohta; Chengzhu Zhao; Makoto Ikeya; Shuichi Matsuda	4. 巻 39(8)
2. 論文標題 Induced pluripotent stem cell derived mesenchymal stem cells prolong hind limb survival in a rat vascularized composite allotransplantation model	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Microsurgery	6. 最初と最後の頁 737-747
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/micr.30507	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Chengzhu Zhao
2. 発表標題 Indirect mTOR Inhibition Attenuates Fibrodysplasia Ossificans Progressiva (FOP) Identified by Using Patient-Derived iPSCs
3. 学会等名 ISSCR 2019 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Chengzhu Zhao
2. 発表標題 Suppression of Heterotopic Ossification in Fibrodysplasia Ossificans Progressiva Models by an mTOR Signaling Modulator
3. 学会等名 ASBMR 2019 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Chengzhu Zhao
2. 発表標題 BIO THREE-DIMENSIONAL CONDUIT DEVELOPED FROM HUMAN IPSC-DERIVED MESENCHYMAL STEM CELLS PROMOTES PERIPHERAL NERVE REGENERATION
3. 学会等名 ASBMR 2020 Annual Meeting
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関