

令和 4 年 5 月 2 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2021

課題番号：19K23996

研究課題名(和文)軟骨無形成症における特異的肥満と2型糖尿病罹患の関連の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the relationship between obesity and type 2 diabetes in achondroplasia

研究代表者

藤原 誠 (FUJIWARA, MAKOTO)

大阪大学・歯学研究科・助教

研究者番号：50625697

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：軟骨無形成症は先天性の骨系統疾患であり、特徴的な脂肪分布を伴う肥満を示すものの、2型糖尿病を来しにくい事が知られる。本研究では、本疾患の糖代謝におけるメカニズムを明らかにすることを目的とした。細胞レベルの検討として、軟骨無形成症患者および健常者から作成したiPS細胞について、間葉系幹細胞に分化誘導し、それぞれの脂肪細胞への分化能を比較検討した。結果、両者の脂肪分化能には明らかな差異は示されず、生体レベルでの脂肪分化と耐糖能の統合的なメカニズムが示唆された。この生体レベルでの検証のために必要である、全身の組織で病態が再現された軟骨無形成症モデルマウスを用いる実験系を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

2型糖尿病は本邦で社会・生活環境の変化に伴い罹患者数が増加しており、肥満はその重要な因子の一つである。軟骨無形成症では特異的な肥満と、2型糖尿病となりにくい性質が知られ、何らかの特有の糖・脂肪・エネルギーの代謝状態を発現している可能性があるが、その機序は不明である。本研究では、軟骨無形成症の病態の影響は、細胞レベルの脂肪分化において明らかでないことが示され、生体レベルでの統合的な調節が行われている可能性が示唆された。本研究で全身の組織で病態を再現する軟骨無形成症のモデルマウスを用いる実験系を確立したことは、今後この本疾患に特徴的な脂肪分化・糖代謝の解明に向けて大きな意義があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Achondroplasia is a congenital bone disease. Although the patients frequently show obesity with a characteristic fat distribution, it is known that the morbidity of type 2 diabetes mellitus is low. In this study, we aimed to elucidate the mechanism of glucose metabolism in this disease. We induced iPS cells from achondroplasia patients and healthy subjects respectively, differentiated them into mesenchymal stem cells, and compared and examined their ability to differentiate into adipocytes. As a result, no clear difference was shown in the adipogenesis between the patients and healthy control, suggesting an integrated mechanism of fat differentiation and glucose tolerance at the biological level. Therefore, we have established an experimental system using achondroplasia model mice, which is necessary for in vivo analysis.

研究分野：医学(小児骨系統疾患、内分泌疾患)

キーワード：軟骨無形成症 2型糖尿病 肥満

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

2 型糖尿病は、本邦で社会・生活環境の変化に伴い罹患者数が増加しており、その予防および有効な治療法の開発は重大な課題である。2 型糖尿病の病態と肥満には密接な関わりがあり、肥大した脂肪組織機能の異常によるインスリン抵抗性の惹起が耐糖能異常の機序として知られている。

軟骨無形成症は、著明な四肢短縮性低身長や特徴的な顔貌を呈する骨系統疾患であり、線維芽細胞増殖因子受容体 3 型(以下 FGFR3)の遺伝子異常が原因となる。ほぼ全ての患者に FGFR3 遺伝子の突然変異(Gly380Arg)が認められる。この変異 FGFR3 は恒常的に活性化された状態にあり、その下流の細胞内シグナル伝達分子の活性化を引き起こす。その結果、軟骨細胞の分化・増殖や軟骨基質の産生が抑制され、長管骨の伸長が著しく阻害される。肥満は軟骨無形成症でよく見られる合併症として知られており、13~43%と高率に認める(Am J Med Genet 31:597, 1988)。しかし、その一方で、軟骨無形成症では脂肪分布や脂肪細胞に特異性があり、インスリン感受性が維持されて 2 型糖尿病合併が少ないという報告がある(PLoS One. 13:e0195876,2018)。

これらの知見から、2 型糖尿病の病態において、FGFR3 シグナルが脂肪細胞や脂肪組織の分化や機能に関わることで、インスリン感受性ひいては耐糖能に影響している機序が示唆された。軟骨無形成症に特異的な肥満と、2 型糖尿病の低罹患者率の関係について、その機序は不明であるが、本症に特異的な脂肪組織・脂肪細胞には特有の糖・脂肪・エネルギーの代謝状態を発現している可能性が考えられた。換言すれば、FGFR3 シグナル亢進は耐糖能に影響し、その機序の解明は 2 型糖尿病に対する新たな治療戦略に有用な知見が得られると考えられた。

2. 研究の目的

軟骨無形成症における脂肪細胞の分化や機能の特性を明らかにすること、およびその特異性と耐糖能の関連を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 軟骨無形成症患者由来 iPS 細胞における脂肪細胞の分化や機能の解析

軟骨無形成症患者由来 iPS 細胞および健常人由来の iPS 細胞それぞれを用いて、神経堤細胞を經由して間葉系幹細胞を誘導し、さらに脂肪細胞に分化誘導を行う(PLoS One. 2;9:e112291,2014)。得られた脂肪細胞の特性を比較することで、本症特異的な脂肪細胞の分化・機能的特性を示す。具体的には、iPS 細胞を神経堤細胞誘導培地で培養後、ソーティングにより神経堤細胞を精製・採取し、さらに誘導培地を用いて間葉系幹細胞に分化誘導したうえで、脂肪分化培養を約 2 週間行う。得られた脂肪細胞の分化の程度は、Oil Red O 染色による脂肪滴の形成で評価する。

(2) 全身組織での FGFR3 シグナル亢進を来した軟骨無形成症モデルマウスの確立

ヒトと類似した骨症状を呈し、世界的に幅広く使用されている軟骨無形成症マウスが存在するが、これは軟骨細胞のみで FGFR3 シグナルが亢進したトランスジェニックマウスである(Naski MC et al. Development 125, 1998)。これまで軟骨無形成症と脂肪分布および耐糖能の関連を研究した報告は上記の 2018 年の PLoS One の 1 報のみであるが、この報告も、この軟骨細胞特異的 FGFR3 シグナル亢進のトランスジェニックマウスであった。FGFR3 シグナル亢進が全身組織で見られるマウスは一般的でなく、このように脂肪分化・糖代謝を検討した報告は無い。本研究では、脂肪組織を含めた全身組織での FGFR3 シグナル亢進を必要とするため、そのような FGFR3 シグナル亢進が全身組織で見られる軟骨無形成症モデルマウスの確立手段を検討した。

4. 研究成果

(1) 軟骨無形成症患者由来 iPS 細胞からの誘導脂肪細胞の検討

軟骨無形成症患者 3 人および健常人 3 人に由来する iPS 細胞について、神経堤細胞を経て間葉系幹細胞を分化誘導し得た。間葉系幹細胞の FGFR3 遺伝子についてサンガーシーケンス法にて塩基配列を確認し、患者由来の間葉系幹細胞には、患者で認められた病的バリエーションである Gly380Arg が確認された一方で、健常人由来では正常配列であることを確認した(図 1)。それぞれの間葉系幹細胞を脂肪分化誘導培地で培養した結果、Oil Red O 染色で脂肪滴が確認される細胞が誘導出来た(図 2)。しかし、この脂肪細胞誘導の効率は低く、また実験間で差異が大きいものであり、軟骨無形成症患者と健常人それぞれに由来する間葉系幹細胞の間に、明らかな定量的な違いを示すことは無かった。

この結果から、軟骨無形成症患者における脂肪細胞の特性は、幹細胞から脂肪細胞への分化に

おける細胞レベルでの内因的な要因は明らかなものではなく、生体レベルでの統合的なメカニズムが大きな影響を与えている可能性が示唆された。このため、全身の組織で病態を再現した軟骨無形成症モデルマウスによる生体レベルでの検証の必要性が改めて明らかとなった。

図1. iPS細胞から分化誘導した間葉系幹細胞のFGFR3遺伝子における変異の有無

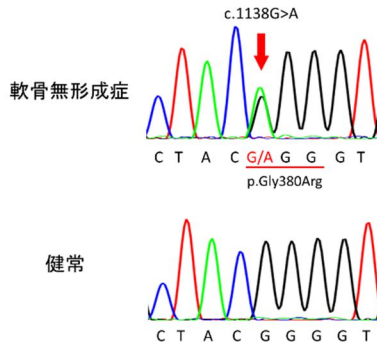
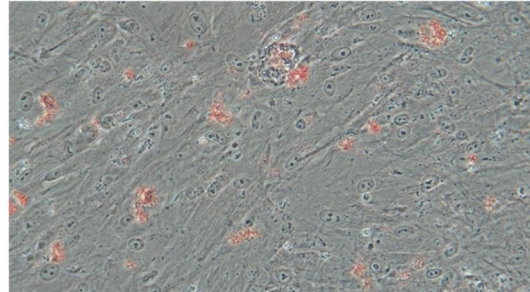


図2. 間葉系幹細胞から分化した脂肪細胞 (Oil Red O 染色)



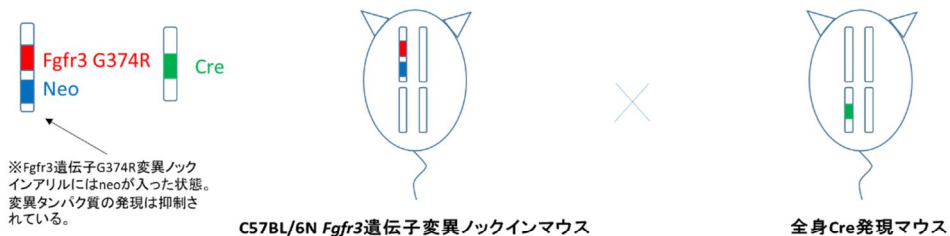
(2) 全身組織での FGFR3 シグナル亢進を来した軟骨無形成症モデルマウスの確立

Fgfr3 遺伝子の p.Gly347Arg 変異 (ヒトの FGFR3 遺伝子の p.Gly380Arg 変異と同等の変異) を相同組み換え法を用いて全身の細胞にノックインしたモデルマウスが外部機関にて開発され、その凍結胚の導入を試みた。しかし、このマウスは生後 5 週間ほどで死亡するため、系統の維持が困難であるという問題が判明した。このため、図3のように、FGFR3 の p.Gly347Arg 変異は有するものの、Cre 蛋白 (本来、野生のマウスには存在しない蛋白) が発現していない状態では軟骨無形成症を発症しないノックインマウスの系統 (C57BL/6N Fgfr3 遺伝子変異ノックインマウス) と、全身で Cre 蛋白を発現するように遺伝子操作したトランスジェニックマウス (全身 Cre 発現マウス) の 2 系統を、それぞれ確立する方法を採用することとした。全身組織での FGFR3 シグナル亢進を来した軟骨無形成症モデルマウス (図3の ACH モデルマウス) は、この 2 系統の交配によって、その都度得ることになる。

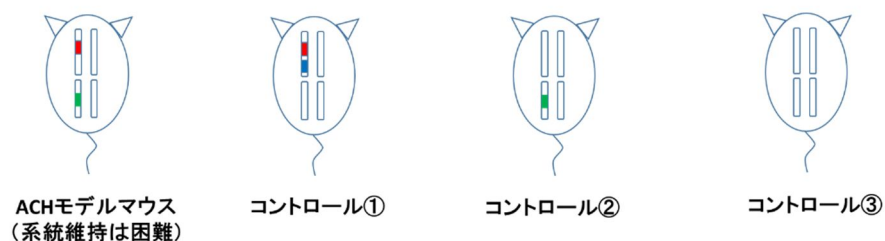
2 系統は、それぞれ外部機関で入手可能であることを確認し、当施設での動物実験計画の承認を得たうえで、それぞれの凍結胚導入の契約を行った。2022 年 5 月に導入が完了する予定であり、今後の実験は、科学研究費助成事業の若手研究「軟骨無形成症における特異的肥満の耐糖能機序の解明」(21K16354) に引き継ぐ予定である。

図3. 全身組織でのFGFR3シグナル亢進を来した軟骨無形成症モデルマウス

F0(それぞれ凍結胚で導入、維持)



F1(実験で使用)



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------