

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 20 日現在

機関番号：14301  
 研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2010 ～ 2012  
 課題番号：22591009  
 研究課題名（和文） 疾患特異的人工多能性幹細胞を用いた骨系統疾患への CNP 有効性評価システムの構築  
 研究課題名（英文） The establishment of the system to evaluate the effect of CNP on skeletal dysplasia by using iPS cells  
 研究代表者  
 三浦 晶子（MIURA MASAKO）  
 京都大学・医学研究科・特定講師  
 研究者番号：80437235

## 研究成果の概要（和文）：

本研究では、まず基盤となるヒト iPS 細胞から軟骨細胞への分化誘導法について確立し、論文発表を行った。また我々は軟骨無形成症を初めとする低身長症に対して CNP の臨床応用を目指しているが、CNP をこの分化誘導系に添加すると、ヒト iPS 細胞から軟骨細胞への分化が促進される傾向を示すことも確認した。さらに軟骨無形成症患者の皮膚組織から iPS 細胞を樹立することにも成功し、現在 CNP の効果について検討中である。

## 研究成果の概要（英文）：

In this study, we have tried to establish the system to evaluate the effects of CNP on iPS cells derived from skeletal dysplasia patients with dwarfism. First, we developed the culture method to induce chondrocytes from undifferentiated iPS cells *in vitro*. Second, we succeeded in generating iPS cells from the patient of achondroplasia. In our induction system, CNP promoted the chondrogenic differentiation of iPS cells from healthy donors. Now we are investigating the effects of CNP on the iPS cells derived from achondroplasia patient.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内分泌学

キーワード：内分泌学・骨代謝・低身長

## 1. 研究開始当初の背景

骨系統疾患 (skeletal dysplasia) は骨・軟骨組織の成長障害により骨格異常を来す先天性疾患の総称である。そのほとんどが単一遺伝子病と考えられ、近年その疾患原因遺伝子が次々と同定されているものの、その病因や病態が不明なものも多い。

骨系統疾患の中で最も頻度の高いものが軟骨無形成症であり、線維芽細胞増殖因子受容体 III 型 (FGFR3) の恒常活性型遺伝子異常により内軟骨性骨化が障害され、四肢短縮型の小人症となる。著しい低身長や合併症により患者の quality of life が著しく障害されているにもかかわらず、有効な薬物治療法が未

だ確立されていないのが現状である。我々はこれまでに軟骨無形成症のモデルマウスにおいて、C型ナトリウム利尿ペプチド (CNP) が低身長改善に有効であることを報告してきた。ヒトの軟骨無形成症における低身長に対しても、CNPは新たな治療薬となる可能性があり、患者由来の細胞でその効果を確認することが出来れば、臨床応用に向けてさらに大きな前進となることが期待された。

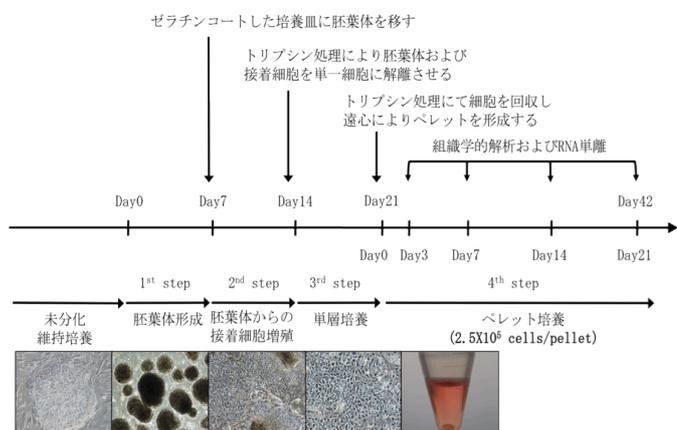
## 2. 研究の目的

そこで本研究では、軟骨無形成症患者組織から iPS 細胞を樹立し、患者由来の軟骨細胞における CNP の有効性について *in vitro* で評価する系の確立を目的とし、研究を行った。

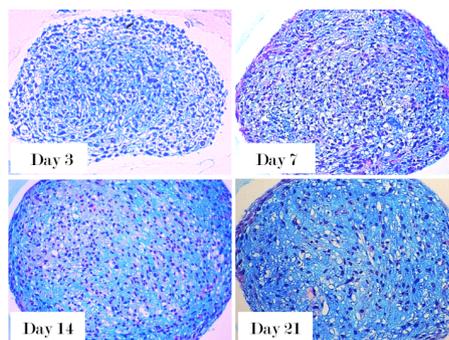
## 3. 研究の方法

### (1) 健常者由来の iPS 細胞を用いた軟骨細胞への分化誘導

本研究においてはまず、未分化 iPS 細胞から軟骨細胞に分化誘導させることが必須であったが、ヒト iPS 細胞を用いた軟骨細胞への分化誘導法に関する既報がほぼ皆無であった。このため ES 細胞や間葉系幹細胞を用いた既報を参考に基礎検討を重ね、最終的に下図に示す4段階 [胚葉体形成→胚葉体からの接着細胞増殖→単一細胞に解離後の単層培養→3次元のペレット培養] のステップを経る軟骨細胞への分化誘導法を確立した。



この誘導法により経時的に iPS 細胞の形態が軟骨細胞様に変化し、軟骨基質の産生も増加することを組織染色および分化マーカーの遺伝子発現により確認した。下図はペレット培養に伴う iPS 細胞塊の経時的な変化をアルシアンブルー染色で観察したものである。



### (2) 軟骨無形成症患者由来 iPS 細胞の作成、及び CNP の有効性に関する検討

京都大学 iPS 細胞研究所の協力を得て、軟骨無形成症患者の皮膚組織から iPS 細胞を樹立した。健常人由来 iPS 細胞と患者由来 iPS 細胞の軟骨細胞分化過程の違いを明らかにするため、現在組織学的検討ならびに軟骨分化マーカーの遺伝子発現についての検討を行っている。これにより CNP の効果を検証するために最適なバイオマーカーを明らかにしたい。

## 4. 研究成果

これまでの検討により、本研究の最も基盤となるヒト iPS 細胞から軟骨細胞への *in vitro* における分化誘導法について確立し、論文発表することが出来た (Stem Cells Dev. 2013 Jan 1;22(1):102-13.). また、我々が低身長に対する治療薬として臨床応用を目指している CNP をこの分化誘導系に添加すると、ヒト iPS 細胞から軟骨細胞への分化が促進される傾向を示すことも確認出来た。さらに、軟骨無形成症患者の皮膚組織から iPS 細胞を樹立することにも成功した。

本研究において軟骨無形成症患者から iPS 細胞を樹立したことにより、初めて患者細胞を用いて、CNP の効果を検討することが可能になった。現在 CNP の低身長改善効果のメカニズムについてさらに検討するため、健常者由来 iPS 細胞の軟骨細胞分化に及ぼす CNP の作用について解析を進めている。また健常者由来 iPS 細胞と軟骨無形成症患者由来 iPS 細胞との比較を行い、軟骨無形成症患者由来 iPS 細胞における CNP の作用を最も適切に評価するためのバイオマーカーについても探索中である。本研究をさらに進め、この評価系を確立することが出来れば、今後低身長をきたす他の骨系統疾患や他の薬剤にもこの系の応用が可能となり、非常に意義は大きいと考える。

## 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 10 件)

1. Koyama N, Miura M, Nakao K, Kondo E, Fujii T, Taura D, Kanamoto N, Sone M, Yasoda A, Arai H, Bessho K, Nakao K. Human induced pluripotent stem cells differentiated into chondrogenic lineage via generation of mesenchymal progenitor cells. *Stem Cells Dev.* 2013;22(1):102-13. 査読有り。 doi: 10.1089/scd.2012.0127.
  2. Nakao K, Okubo Y, Yasoda A, Koyama N, Osawa K, Isobe Y, Kondo E, Fujii T, Miura M, Nakao K, Bessho K. The effects of C-type natriuretic peptide on craniofacial skeletogenesis. *J Dent Res.* 2013;92(1):58-64. 査読有り。 doi: 10.1177/0022034512466413.
  3. Nambu T, Mori K, Shinoto Y, Izumi R, Matsuo K, Kanai Y, Kanamoto N, Miura M, Yonemitsu S, Yasoda A, Muro S, Arai H, Oki S, Nakao K. Diabetic ketoacidosis accompanied by hypothermia: a case report. *Diabetes Res Clin Pract.* 2012;96(3):326-30. 査読有り。 doi: 10.1016/j.diabres.2012.01.013.
  4. Inuzuka M, Tamura N, Sone M, Taura D, Sonoyama T, Honda K, Kojima K, Fukuda Y, Ueda Y, Yamashita Y, Kondo E, Yamada G, Fujii T, Miura M, Kanamoto N, Yasoda A, Arai H, Mikami Y, Sasano H, Nakao K. A case of myelolipoma with bilateral adrenal hyperaldosteronism cured after unilateral adrenalectomy. *Intern Med.* 2012;51(5):479-85. 査読有り。 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22382563>
  5. Kanamoto N, Tagami T, Ueda-Sakane Y, Sone M, Miura M, Yasoda A, Tamura N, Arai H, Nakao K. Forkhead box A1 (FOXA1) and A2 (FOXA2) oppositely regulate human type 1 iodothyronine deiodinase gene in liver. *Endocrinology.* 2012;153(1):492-500. 査読有り。 doi: 10.1210/en.2011-1310.
  6. Kondo E, Yasoda A, Tsuji T, Fujii T, Miura M, Kanamoto N, Tamura N, Arai H, Kunieda T, Nakao K. Skeletal analysis of the long bone abnormality (lbab/lbab) mouse, a novel chondrodysplastic C-type natriuretic peptide mutant. *Calcif Tissue Int.* 2012;90(4):307-18. 査読有り。 doi: 10.1007/s00223-011-9567-0.
  7. Sonoyama T, Sone M, Miyashita K, Tamura N, Yamahara K, Park K, Oyamada N, Taura D, Inuzuka M, Kojima K, Honda K, Fukunaga Y, Kanamoto N, Miura M, Yasoda A, Arai H, Itoh H, Nakao K. Significance of adrenocorticotropin stimulation test in the diagnosis of an aldosterone-producing adenoma. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96(9):2771-8. 査読有り。 doi: 10.1210/jc.2011-0573.
  8. Masago K, Miura M, Toyama Y, Togashi Y, Mishima M. Good clinical response to erlotinib in a patient with anaplastic thyroid carcinoma harboring an epidermal growth factor somatic mutation, L858R, in exon 21. *J Clin Oncol.* 2011;29(16):e465-7. 査読有り。 doi: 10.1200/JCO.2010.34.0216.
  9. Hattori Y, Kanamoto N, Kawano K, Iwakura H, Sone M, Miura M, Yasoda A, Tamura N, Arai H, Akamizu T, Nakao K, Maitani Y. Molecular characterization of tumors from a transgenic mouse adrenal tumor model: comparison with human pheochromocytoma. *Int J Oncol.* 2010;37(3):695-705. 査読有り。 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20664939>
  10. Fujii T, Komatsu Y, Yasoda A, Kondo E, Yoshioka T, Nambu T, Kanamoto N, Miura M, Tamura N, Arai H, Mukoyama M, Nakao K. Circulating C-type natriuretic peptide (CNP) rescues chondrodysplastic CNP knockout mice from their impaired skeletal growth and early death. *Endocrinology.* 2010;151(9):4381-8. 査読有り。 doi:10.1210/en.2010-0078.
- [学会発表] (計 23 件)
1. 本郷恭子、金本巨哲、山下唯、上田依利子、近藤絵里、藤井寿人、三浦晶子、八十田明宏、荒井宏司、中尾一和 「パセドウ病合併類もやもや病が疑われる 2 例」 日本甲状腺学会 2012 年 11 月 29 日 (福岡)
  2. 小山典昭、三浦晶子、中尾一祐、上田依利子、山下唯、近藤絵里、藤井寿人、田浦大輔、金本巨哲、曾根正勝、八十田明宏、荒井宏司、別所和久、中尾一和 「ヒト iPS 細胞は間葉系前駆細胞を介して軟骨細胞へ分化する」 日本骨代謝学会 2012 年 7 月 20 日 (東京)
  3. 藤井寿人、八十田明宏、近藤絵里、中尾一祐、小山典昭、山下唯、上田依利子、

- 金本巨哲、曾根正勝、三浦晶子、荒井宏司、中尾一和 「ムコ多糖症7型モデルマウスの骨伸長障害に対するC型ナトリウム利尿ペプチド(CNP)の有効性の検討<生存率に与える影響を含めて>」 日本骨代謝学会 2012年7月21日(東京)
4. 小山典昭、三浦晶子、中尾一祐、大澤賢次、上田依利子、山下唯、近藤絵里、藤井寿人、野口倫生、園山拓洋、田浦大輔、金本巨哲、曾根正勝、八十田明宏、荒井宏司、別所和久、中尾一和 「ヒトiPS細胞から間葉系前駆細胞への分化を介した軟骨細胞分化誘導法の確立」 日本再生医療学会 2012年6月14日(神奈川)
  5. 三浦晶子、小山典昭、上田依利子、山下唯、近藤絵里、中尾一祐、藤井寿人、田浦大輔、曾根正勝、金本巨哲、八十田明宏、荒井宏司、中尾一和 「ヒト多能性幹細胞の*in vitro*における軟骨細胞分化能に関する検討」 日本内分泌学会 2012年4月21日(愛知)
  6. 中尾一祐、八十田明宏、大澤賢次、小山典昭、近藤絵里、藤井寿人、金本巨哲、三浦晶子、曾根正勝、荒井宏司、別所和久、中尾一和 「内軟骨性骨化におけるCNP/GC-B系の生理的意義-軟骨特異的ノックアウトマウスの解析-」 日本内分泌学会 2012年4月19日(愛知)
  7. 藤井寿人、八十田明宏、近藤絵里、中尾一祐、小山典昭、山下唯、上田依利子、金本巨哲、曾根正勝、三浦晶子、荒井宏司、中尾一和 「モデルマウスを用いたムコ多糖症7型の骨伸長障害に対するC型ナトリウム利尿ペプチド(CNP)の有効性の検討」 日本内分泌学会 2012年4月21日(愛知)
  8. 金本巨哲、田上哲也、上田依利子、山下唯、近藤絵里、藤井寿人、曾根正勝、三浦晶子、八十田明宏、荒井宏司、中尾一和 「ヒト1型脱ヨード酵素遺伝子の肝臓における転写調節」 日本内分泌学会 2012年4月19日(愛知)
  9. 園山拓洋、曾根正勝、宮下和季、田村尚久、山原研一、朴貴典、小山田尚史、田浦大輔、犬塚恵、小嶋正勝、本田恭子、福永康智、金本巨哲、三浦晶子、八十田明宏、荒井宏司、伊藤裕、中尾一和 「アルドステロン産生腺腫の診断におけるACTH負荷試験の意義」 日本内分泌学会 2012年4月19日(愛知)
  10. 上田依利子、金本巨哲、山下唯、近藤絵里、藤井寿人、三浦晶子、八十田明宏、荒井宏司、島津章、中尾一和 「頭蓋咽頭腫術後にadipsic diabetes insipidus(Adipsic DI)を呈し、水分管理に難渋している1例」 日本内分泌学会 2012年4月20日(愛知)
  11. 越智ゆかり、後藤伸子、勝浦五郎、山下唯、有安宏之、金本巨哲、三浦晶子、八十田明宏、荒井宏司、細田公則、中尾一和 「急性ストレスによる報酬系に関わる神経核における $\delta$  fosB mRNAの発現変化」 日本内分泌学会 2012年4月21日(愛知)
  12. 後藤伸子、勝浦五郎、越智ゆかり、山下唯、海老原健、日下部徹、有安宏之、金本巨哲、三浦晶子、八十田明宏、荒井宏司、細田公則、中尾一和 「肥満に合併するうつ状態に対するアミリンおよびレプチンの抗うつ作用の検討」 日本内分泌学会 2012年4月21日(愛知)
  13. 三浦晶子、八十田明宏、藤井寿人、近藤絵里、上田依利子、山下唯、曾根正勝、金本巨哲、荒井宏司、中尾一和 「アロマターゼ阻害薬服用乳癌患者におけるリセドロネートの骨密度改善効果に関する検討」 日本内科学会 2012年4月15日(京都)
  14. 三浦晶子、八十田明宏、藤井寿人、近藤絵里、山下唯、上田依利子、酒井鉄博、宍戸順一、曾根正勝、金本巨哲、上野貴之、杉江知治、荒井宏司、戸井雅和、中尾一和 「リセドロネートはアロマターゼ阻害薬服用乳癌患者の骨密度を改善する」 日本骨粗鬆学会 2011年11月3日(神戸)
  15. 中尾一祐、三浦晶子、小山典昭、大澤賢次、上田依利子、山下唯、近藤絵里、藤井寿人、金本巨哲、八十田明宏、荒井宏司、別所和久、中尾一和 「アドレノメデュリンはcAMPシグナルを介して破骨細胞形成を抑制する」 日本骨代謝学会 2011年7月28日(大阪)
  16. 中尾一祐、大久保康則、八十田明宏、小山典昭、大澤賢次、藤井寿人、近藤絵里、金本巨哲、三浦晶子、中尾一和、別所和久 「C型ナトリウム利尿ペプチドの顎顔面骨における影響および臨床応用の可能性」 日本骨代謝学会 2011年7月28日(大阪)
  17. 藤井寿人、八十田明宏、近藤絵里、曾根正勝、金本巨哲、三浦晶子、荒井宏司、中尾一和 「ムコ多糖症7型の骨伸長障害に対するC型ナトリウム利尿ペプチド(CNP)の有効性について-モデルマウスを用いた検討-」 日本骨代謝学会 2011年7月28日(大阪)
  18. 山下唯、三浦晶子、近藤絵里、城孝尚、上田依利子、藤井寿人、金本巨哲、曾根正勝、八十田明宏、荒井宏司、中尾一和 「バセドウ病術後に遷延している難治性低カルシウム血症の1例」 日本骨代謝学会 2011年7月30日(大阪)

19. 近藤絵里、三浦晶子、城孝尚、山下唯、上田依利子、藤井寿人、山田豪、金本巨哲、曾根正勝、八十田明宏、田村尚久、楯谷一郎、荒井宏司、中尾一和 「甲状腺超亜全摘術後に低 Ca 血症が遷延した難治性バセドウ病の一例」 日本内分泌学会 2011 年 4 月 22 日 (神戸)
20. 藤井寿人、八十田明宏、小松弥郷、近藤絵里、吉岡徹朗、金本巨哲、三浦晶子、田村尚久、荒井宏司、向山政志、中尾一和 「CNP の骨伸長促進作用の臨床応用-血中濃度上昇型 CNP トランスジェニックマウスの開発とその意義-」 日本内分泌学会 2011 年 4 月 22 日 (神戸)
21. 三浦晶子 「再生医療と歯髄幹細胞研究の新展開 -再生医療と歯髄幹細胞-」 第 65 回日本口腔科学会学術集会 (招待講演) 2011 年 4 月 20 日 (東京)
22. 金本巨哲、田上哲也、近藤絵里、山田豪、藤井寿人、曾根正勝、三浦晶子、田村尚久、荒井宏司、中尾一和 「USF および FOXA1/2 は肝臓においてヒト 1 型脱ヨード酵素遺伝子発現を制御する」 日本甲状腺学会 2010 年 11 月 (長崎)
23. 城孝尚、金本巨哲、中川靖章、上田依利子、山下唯、近藤絵里、藤井寿人、三浦晶子、八十田明宏、荒井宏司、中尾一和 「アミオダロンによる破壊性甲状腺炎を来し甲状腺機能異常が遷延している一例」 日本甲状腺学会 2010 年 11 月 (長崎)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

三浦 晶子 (MIURA MASAKO)  
京都大学・医学研究科・特定講師  
研究者番号：80437235

### (2) 研究分担者 なし

### (3) 連携研究者

八十田 明宏 (YASODA AKIHIRO)  
京都大学・医学研究科・講師  
研究者番号：50378642