

平成 26 年 5 月 14 日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890101

研究課題名(和文) リプログラミング法を用いた致死性骨異形成症の病態解明と治療法の探索

研究課題名(英文) Disease modeling and drug screening of thanatophoric dysplasia using reprogramming technology

研究代表者

山下 晃弘 (Yamashita, Akihiro)

京都大学・iPS細胞研究所・研究員

研究者番号：00636855

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：致死性骨異形成症は難治性骨系統疾患であり、線維芽細胞受容体(FGFR3)の変異により発症すると報告されている。その患者は軟骨の発育異常により四肢短縮および脆弱な肋軟骨を特徴とする。現在その発症機序も不明であり、有効な治療方法はない。

そこで本研究では、患者由来線維芽細胞からinduced pluripotent stem cell(iPS細胞)を樹立し軟骨細胞への分化誘導を行うことにより、致死性骨異形成症の病態の解明および治療法の開発を行う研究課題である。

研究成果の概要(英文)：Thanatophoric dysplasia (TD) is a severe skeletal disorder caused by gain-of-function mutations in the fibroblast growth factor receptor-3 (FGFR3) gene. Patients with TD show short limbs and a narrow rib cage caused by abnormal cartilage formation. There are needs for drugs, however the disease mechanism is still unclear.

Here, we have generated induced pluripotent stem cells (iPSCs) from fibroblasts obtained from TD-patients. Then, we will understand disease mechanism and screen candidate drugs.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：8705

キーワード：iPS細胞 疾患 骨軟骨分化

1. 研究開始当初の背景

希少難治性疾患への予防および治療法の探索は重要な課題の一つではある。しかし生体の疾患組織から細胞を入手することは困難であるためヒトにおける病態の解明が困難であった。しかし近年のリプログラミング技術の発展は、患者の皮膚線維芽細胞などを採取して培養し、疾患臓器の細胞に変えることを可能とした。これにより、これまで困難とされてきた希少難治性疾患の病態解明およびその治療法の探索への新規アプローチが可能になってきた。そこでわれわれは希少難治性疾患のひとつである致死性骨異形成症に注目した。

致死性骨異形成症とは、小人症と骨格の変形を伴う先天性の骨・軟骨形成異常症である。脆弱な気管軟骨や肋軟骨は呼吸困難を引き起こし、出生後早期の死を引き起こす。近年の研究により、軟骨分化に関与する線維芽細胞増殖因子受容体(FGFR3)の遺伝子変異が原因であることが明らかとなった。しかし他の希少難治性疾患と同様、遺伝子の変異と骨・軟骨組織の発生、分化および組織形成への作用機序は不明の点が多い。そこで本研究では、リプログラミング法を用いた新規アプローチに着眼し、その病態を解明するとともに治療法の探索を試みた。

2. 研究の目的

本研究の主たる目的は、リプログラミング法を用いることにより、致死性骨異形成症の病態の解明と治療法の探索を行うことである。本研究を遂行するにあたり以下の研究を行う。

Aim 1) 疾患 iPS 細胞の樹立と軟骨誘導法の確立

Aim 2) FGFR3 遺伝子変異が軟骨組織形成異常をおこすしくみの解明

Aim 3) 治療法の探索

3. 研究の方法

Aim 1) 疾患 iPS 細胞の樹立と軟骨誘導法の確立

致死性骨異形成症の患者の皮膚線維芽細胞にゲノムへの障害が少ない integration-free のエピゾーマルベクターを用い、疾患 iPS 細胞を樹立する。

さらに健常者由来 iPS 細胞株を用い、効率の良い軟骨細胞様細胞および軟骨様組織への分化誘導法の確立を行う。

Aim 2) FGFR3 遺伝子変異が軟骨組織形成異常をおこすしくみの解明

確立した軟骨分化誘導を用い、健常者由来 iPS 細胞と致死性骨異形成症由来疾患 iPS 細胞を軟骨細胞および軟骨組織へ分化誘導する。そして軟骨組織における致死性骨異形成症疾患特異的症状を in vitro にて再現する。また、健常者由来 iPS 細胞からの軟骨への分化と比較することにより軟骨細胞関連遺伝子発現や軟骨組織形態の変化やその異常の原因を追求する。

Aim 3) 治療法の探索

疾患 iPS 細胞から軟骨への分化過程において、同定した遺伝子や細胞シグナルに作用する薬剤等を添加する。そして、疾患特異的症状に対する改善の有無、および毒性などの影響を検討する。

4. 研究成果

Aim 1) 疾患 iPS 細胞の樹立と軟骨誘導法の確立

われわれは致死性骨異形成症 6 患者より疾患 iPS 細胞の樹立した(図 1)。この致死性骨異形成症由来疾患 iPS 細胞は未分化マーカーの発現、三胚葉から成る奇形腫形成能を有しており、樹立した細胞が iPS 細胞であることを確認した。

次にわれわれは健常者由来ヒト iPS 細胞

を用い、純度の高い軟骨様細胞および軟骨様組織への分化誘導法を確立した (Yamashita et al., manuscript submitted)。そして、樹立した疾患 iPS 細胞を軟骨様細胞および軟骨組織へ分化誘導した。

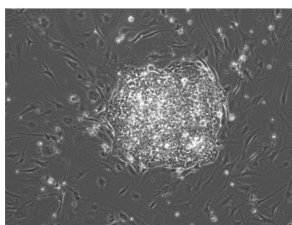


図1. 本研究室で樹立した疾患ヒトiPS細胞

Aim 2) FGFR3 遺伝子変異が軟骨組織形成異常をおこすしくみの解明

致死性骨異形成症の主たる原因は線維芽細胞増殖因子受容体(FGFR3)の遺伝子変異による機能亢進が挙げられる。そのため疾患由来 iPS 細胞では、線維性に富んだ軟骨が形成される可能性がある。また FGFR3 の過剰発現は軟骨細胞において細胞死を引き起こすことが知られている。

われわれは軟骨分化誘導後、健常者由来 iPS 細胞では Safranin O で染色される軟骨基質に富む軟骨様組織を形成した。しかし疾患由来 iPS 細胞では Safranin O で染色される軟骨基質が得られず、線維性に富んだ組織が形成された。遺伝子の発現を調べた結果、線維芽細胞遺伝子 1 型コラーゲンの発現の上昇および軟骨細胞遺伝子 2 型コラーゲンの発現の低下を認めた。さらに疾患由来 iPS 細胞の分化過程において細胞がアポトーシスを起こしていることを明らかにした (図 2)。つまり、致死性骨異形成症由来疾患 iPS 細胞を用い、病態の一部を in vitro にて再現した。(日本炎症・再生医学会、優秀演題賞受賞)。今後、FGFR3 の下流での鍵となる因子を同定し、病態を詳細に解析するとともに治療薬の候補を見出す。

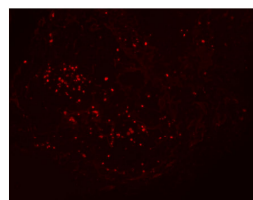


図2. 分化過程での疾患iPS細胞由来軟骨細胞様細胞のアポトーシス(TUNEL染色)

Aim 3) 治療法の探索

致死性骨異形成症の患者ではFGFR3遺伝子のGain of functionが原因であることが知られている。そこで致死性骨異形成症患者由来iPS細胞にshRNAを用いFGFR3遺伝子をノックダウンし、軟骨分化誘導を行った。その結果、疾患由来iPS細胞で認められた線維芽細胞に富んだ組織の改善し、Safranin Oで染色される軟骨基質に富む軟骨様組織を形成した。さらにFGFR3中和抗体を投与し分化誘導した結果、同様に線維性組織の改善と軟骨様組織の形成を確認した。つまり、FGFR3遺伝子のノックダウンは致死性骨異形成症の有効な治療法のひとつとなる可能性があることを明らかにした。今後、FGFR3遺伝子ノックダウンによる毒性などの副作用を調べ、その安全性を検討する。

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7件)

2013年

1) Yamashita A, Liu S, Woltjen K, Thomas B, Meng G, Hotta A, Takahashi K, Ellis J, Yamanaka S, Rancourt DE. 「Cartilage tissue engineering identifies abnormal human induced pluripotent stem cells.」『Sci Rep』査読有, 3, 2013, 1978. doi: 10.1038/srep01978.

2) Taiani JT, Krawetz RJ, Yamashita A, Pauchard Y, Buie HR, Ponjevic D, Boyd SK, Rancourt DE, Matyas JR. 「Embryonic stem cells incorporate into newly formed bone and do not form tumors in an immunocompetent mouse fracture model.」『Cell Transplant』 査読有, 22(8), 2013, 1453-62. doi: 10.3727/096368912X658755.

3) Outani H, Okada M, **Yamashita A**, Nakagawa K, Yoshikawa H, Tsumaki N. 「Direct induction of chondrogenic cells from human dermal fibroblast culture by defined factors.」『PLoS One』 査読有, 8(10), 2013, e77365. doi: 10.1371/journal.pone.0077365. eCollection 2013.

4) **山下晃弘**, 妻木範行. 「iPS 細胞由来軟骨細胞を用いた再生治療開発」『Phama Medica』招待論文, 31 巻 4 号, 2013, 29-32,

5) 妻木範行, 岡田稔, **山下晃弘**. 「iPS 細胞を使うー軟骨の研究へ」『整形外科』招待論文, 64 巻 10 号, 1106-1109, (2013)。

2012 年

6) Shafa M, Day B, **Yamashita A**, Meng G, Liu S, Krawetz R, Rancourt DE. 「Derivation of iPSCs in stirred suspension bioreactors.」『Nat Methods』 査読有, 9(5), 2012, 465-6. doi: 10.1038/nmeth.1973.

7) Shafa M, Sjonnesen K, **Yamashita A**, Liu S, Michalak M, Kallos MS, Rancourt DE. 「Expansion and long term maintenance of induced pluripotent stem cells in stirred suspension bioreactors」『J of Tissue. Eng. Regen. Med』 査読有, 6(6), 2012, 462-72. doi: 10.1002/term.450.

〔学会発表〕(計 7 件)

国際学会

口演

1) **Yamashita A**, Morioka M, Yahara Y, Okada M, Tsumaki N. Derivation of transplantable cartilage from human induced pluripotent stem cells. (April 24-27 2014), Paris, France

ポスター

2) **Yamashita A**, Tsumaki N. Abnormal chondrogenic differentiation of induced pluripotent stem cells established from patients with a severe skeletal disease, thanatophoric dysplasia. Takeda symposium. (January/16-18 2014), Osaka, Japan.

3) **Yamashita A**, Tsumaki N. Abnormal chondrogenic differentiation of induced pluripotent stem cells with a severe skeletal disease, thanatophoric dysplasia. CiRA International Symposium 2013 Raising the Next Generation of Stem Cell Research. (March/11-12 2013), Kyoto, Japan.

4) **Yamashita A**, Thomas B, Rancourt DE. The activation of c-MYC and LIN28B causes iPSC tumor formation during *in vitro* cartilage differentiation. 10th Annual Meeting of the International Society for Stem Cell Research.

(Jun/13-16 2012), Yokohama, Japan.

国内学会

口演

5) **山下晃弘**, 妻木範行. ヒト iPS 細胞から軟骨細胞への分化における GDF5 の効果。BMP 研究会(7/5, 2013) 浜松

6) **山下晃弘**, 妻木範行. ヒト iPS 細胞から軟骨細胞への分化誘導。ORC 研究会 (10/12-13, 2013) かずさ

ポスター

7) **山下晃弘**, 妻木範行. ヒト iPS 細胞を用いた致死性骨異形成症の病態解明。日本炎症・再生学会(7/2-3, 2013) 京都。(優秀演題賞受賞)

〔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〕

ホームページ等

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山下 晃弘 (YAMASHITA, Akihiro)

研究者番号 : 00636855