

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293320

研究課題名(和文) iPS細胞を用いた進行性骨化性線維異形成症の病態解明

研究課題名(英文) Analysis of fibrodysplasia ossificans progressive by using iPSCs

研究代表者

池谷 真 (Ikeya, Makoto)

京都大学・iPS細胞研究所・准教授

研究者番号：20442923

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：「異所性骨化」とは骨格筋、腱、靭帯等の骨組織以外の組織中に骨が形成される現象であり、実験的にもBMP等の増殖因子や人工骨基質材料を用いて誘導できることは、多くの研究により示されている。しかしながら、その細胞及び分子生物学的機構の詳細に関しては未だ不明な点が多い。本研究課題では遺伝的な変異が原因で異所性骨化が誘導される進行性骨化性線維異形成症(FOP)患者由来iPS細胞及びそれから作製したrescued-iPS細胞を用いて、異所性骨化の分子機構の解明を目指し研究を行った。

研究成果の概要(英文)：Heterotypic ossification (HO) is an event that forms bone in mesenchymal tissues such as skeletal muscle, tendon, and ligament. Previously, it has been shown that growth factors such as bone morphogenetic protein (BMP), and artificial bone scaffold can induce HO. However, the molecular mechanisms and cell-of-origin of the HO is not fully elucidated. In this grant, we used patient-specific iPSCs generated from fibrodysplasia ossificans progressive (FOP-iPSCs) and mutation-corrected FOP-iPSCs (rescued FOP-iPSCs) as genetically-matched control cells, and analyze the molecular mechanisms underlying HO.

研究分野：発生生物学

キーワード：異所性骨化

1. 研究開始当初の背景

「異所性骨化」とは骨格筋、腱、靭帯等の骨組織以外の組織中に骨が形成される現象であり、実験的にも BMP 等の増殖因子や人工骨基質材料を用いて誘導できることは、多くの研究により示されている。しかしながら、その細胞及び分子生物学的機構の詳細に関しては未だ不明な点が多い。

- (1) 骨化の起源細胞が不明：骨格筋、腱、靭帯等の組織中に形成されるが、骨化がこれらの組織中の分化細胞の metaplasia によるものなのか、あるいは組織中に存在する未分化細胞が骨細胞へと分化したものであるのか不明である。
- (2) 骨化の起点が不明：どのようなシグナルが異所性骨化を引き起こしたり、持続的に骨化を進めるのかが不明である。
- (3) 骨化の抑制機構の解明：どのようなシグナルを抑制することで骨化の進展が抑制されるのかが不明である。

以上の命題に対する答えを得るためには、いくつかのアプローチが考えられるが、その一つは、極端な異所性骨化病態を手がかりにするアプローチが考えられる。FOP は異所性骨化を生じる疾患の中で、唯一、原因遺伝子が判明している疾患であり、かつ最も顕著な骨化病態を呈する。原因遺伝子である ACVR1/ALK2 は骨形成因子 (Bone Morphogenetic Protein、以下 BMP) の受容体であり、過剰な BMP シグナルが異所性骨化を引き起こすと想定されているが、その詳細は解明されていない。FOP の病態の重要な特徴としては、BMP シグナルという骨形成において極めて重要なシグナルの異常であるにも関わらず、正常の骨形成過程は正常に遂行され、異常を認めないという現象である。このことは、二つの可能性を示している。

- (1) 異所性骨化の発生過程は、正常の内軟骨性骨化とは全く異なる機構により生じる。
- (2) 正常の *in vivo* での内軟骨性骨化では、FOP の原因遺伝子の変異による影響を阻害する因子が存在しているために、異常は生じない。

これらの可能性は、*in vitro* で骨化機構を再現することにより、初めて検証できる可能性がある。また *in vivo* では無数の増殖因子、サイトカイン等が関与する可能性があるが、*in vitro* ではこれを限定して解析できる利点がある。その意味で FOP 患者由来の間葉系細胞は異所性骨化を解析するための至適な材料と考えられるが、その採取は臨床病態を悪化させることから禁忌であった。しかし、この問題は iPS 細胞技術の創生により、一挙に解決された。すなわち末梢血の採取という最小限の侵襲により得られた体細胞より iPS 細胞を作製することにより、理論的には異所性骨化に関わる全ての細胞が入手でき、それを用いた *in vitro* の実験が可能となった。

更に多能性幹細胞の大きな特質の一つで

ある、遺伝子相同組み換えという現象を応用して、遺伝的欠損を修復することが可能であり、そのようないわゆる rescued 細胞は、遺伝子変異以外、全く同一の遺伝的背景を有する究極の対照細胞であり、変異の生物学を正しく理解するためには極めて有力なツールとなる。

本研究課題を申請するにあたって、我々は以下の試料、技術を既に確保していた。

- (1) FOP 患者由来 iPS 細胞：我々は既に 4 名の FOP 患者より、それぞれ複数の iPS 細胞のクローンを樹立し、その iPS 細胞としての基本的性質の確認を終了している。
- (2) 野生型 iPS 細胞から骨及び軟骨細胞への分化誘導技術：申請者は、iPS 細胞から胚様体形成により得られた細胞を骨分化誘導培地または軟骨誘導培地にて培養することにより、アリザリンレッド陽性結節を形成する骨芽細胞あるいはアルシアンブルー陽性基質を産生する軟骨細胞を得る事に成功している (図 2A,B)。また胚様体形成を経ない方法で軟骨前駆細胞を得る事にも成功しており、この細胞から成熟軟骨の作製に成功している (図 2C)。さらには共同研究により iPS 細胞から骨格筋細胞の誘導に成功しており、また血管内皮細胞や未分化間葉系細胞への誘導にも着手している。FOP は病態も骨化の起源細胞も未知の疾患であるため、複数の誘導法を持つ事は重要である。

また、開始当初の世界的な研究状況から、本研究は下記の特徴をもっていた。

- (1) iPS 細胞技術の応用：上述の如く、FOP 研究の障壁は病態の起源細胞自体の解析が困難であったことであり、この課題を iPS 細胞技術を用いてクリアする点に独創性がある。
- (2) rescued iPS 細胞の利用：FOP の原因遺伝子である ACVR1/ALK2 の変異部位を相同組換えにより野生型に置換した rescued FOP-iPS 細胞は、遺伝的背景が FOP 罹患者由来 iPS 細胞と同一であることから、理想的な対照群として病態解明に使用できる。

また、本研究は主に希少疾患である FOP における骨化機序の解明を目指す。この課題が達成された暁には、より一般的な異所性骨化についての知見につながる事が期待できる。さらに、FOP の病態を *in vitro* で再現することにより、骨化の起源細胞や、骨化を引き起こすシグナルなどが同定されれば、骨化を抑制する治療薬開発への足がかりが得られることが期待されるため、その意義は極めて高いと考えられた。

2. 研究の目的

本研究課題では FOP 患者由来 iPS 細胞及びそれから作製した rescued-iPS 細胞を用いて、以下の命題に対する解答を得ることで異

所性骨化の分子機構の解明を目指す。

(1) FOP における異所性骨化の起源細胞は何か？

(2) ACVR1/ALK2 遺伝子異常が異所性骨化のどの段階でどのように作用しているのか？

(3) 異所性骨化の引き金となる因子は何か？

3. 研究の方法

申請当初に打ち立てた実験計画は以下の通りである。

(1) 対象患者のリクルートと iPS 細胞の作製：

・すでに、R206H 変異をもつ国内罹患者 3 名から皮膚線維芽細胞、および G356D 変異をもつ国内罹患者 1 名より歯根細胞の提供を受けている。

・上記 4 名に加え、異なる部位の変異を有する者を含め、3 名の罹患者より研究協力の承諾を受けており、必要な手続きを経てリクルートする。

(2) FOP 罹患者由来 iPS 細胞からの rescued iPS 細胞の作製：

・遺伝子相同組み換えにより、FOP-iPS 細胞における変異 ACVR1/ALK2 を野生型に置換し、rescued iPS 細胞を作製する。解析対象とする罹患者につき、少なくとも 1 クローンについて rescued iPS 細胞を 2 ライン以上得る。

(3) FOP-iPS 細胞の骨軟骨分化能評価：

・これまでに確立した骨誘導法および軟骨誘導法を用いて、作製した FOP 罹患者由来 iPS 細胞の骨分化能および軟骨分化能を評価する。また(3)により作製した rescued FOP-iPS 細胞にこの誘導法を適用し、表現型も rescue されているかどうかを検証する。

(4) 骨格筋細胞を経た骨・軟骨分化能の評価：

・FOP の骨化の起源細胞の候補の一つである骨格筋細胞へ分化誘導した後に、更に骨および軟骨分化を誘導する実験を FOP-iPS 細胞と FOP-rescued iPS 細胞法を用いて行う。

(5) iPS 細胞から血管内皮細胞への分化誘導法の確立：

・FOP の骨化の起源細胞の候補の一つである未分化間葉系細胞への分化誘導法を確立する。確立後は FOP-iPS 細胞と FOP-rescued iPS 細胞法に適用して比較検討へと進む。

(6) iPS 細胞から未分化間葉系細胞への分化誘導法の確立：

・FOP の骨化の起源細胞の候補の一つである未分化間葉系細胞への分化誘導法を確立する。確立後は FOP-iPS 細胞と FOP-rescued iPS 細胞法に適用して比較検討へと進む。

(7) 誘導型 ACVR1/ALK2(R206H)を遺伝子導入した野生型 iPS 細胞の作製：

・ACVR1/ALK2 は恒常的に発現している遺伝子であることが知られている。そこで野生型 iPS 細胞に薬剤誘導型 ACVR1/ALK2(R206H)を遺伝子導入して、誘導型変異陽性 iPS 細胞を作製する。

・作製した iPS 細胞に(3)の分化誘導法を適用する。その過程で時期特異的に変異を誘導し、ACVR1/ALK2(R206H)が分化誘導過程のどの時期に重要な機能を果たしているかを解明する。

(8) FOP 罹患者由来 iPS 細胞を用いた病態解明：

・解析により得られた遺伝子群のノックダウン、およびシグナル阻害薬添加などを行い、骨化抑制効果を検討する。

(9) in vivo モデルマウスでの検証：

・解析により得られた遺伝子群とシグナル伝達経路について、in vivo で検討する。

・対象としては、すでに作製されている ACVR1/ALK2(R206H)キメラマウスによるモデルマウスを用い、そこにノックダウン用 siRNA の投与、あるいはシグナル伝達阻害剤の投与を行う。

・モデルマウスについては、作製元であるペンシルバニア大学の Eileen Shore 博士より提供についての同意を得ている。

4. 研究成果

(1) 対象患者のリクルートと iPS 細胞の作製：

新たに 3 名の罹患者より研究協力の承諾を受けた。必要な手続きを経て、対象患者から末梢血を採取し、そこから単核球を分離して、エレクトロポレーションによりエピソードベクターを導入して、iPS 細胞を樹立した。

(2) FOP 罹患者由来 iPS 細胞からの rescued iPS 細胞の作製：

2 名の FOP 患者由来 iPS 細胞の 2 クローンから、変異 ACVR1/ALK2 を遺伝子相同組み換えにより野生型に置換した rescued iPS 細胞を、それぞれ 2 ラインずつ作製することに成功した。

(3) FOP-iPS 細胞の骨軟骨分化能評価：

申請時に確立していた骨誘導法および軟骨誘導法を用いて、作製した FOP 罹患者由来 iPS 細胞の骨分化能および軟骨分化能を評価したところ、野生型に比べて有為に亢進していることが分かった。また、FOP-iPS 細胞で観察された骨軟骨分化能の亢進は、rescued FOP-iPS 細胞では抑制されていることが分かった。

(4) 骨格筋細胞を経た骨・軟骨分化能の評価:

FOP の骨化の起源細胞の候補として、骨格筋細胞が挙げられる。そこで、iPS 細胞から骨格筋の誘導法を模索した。しかし、骨格筋細胞への分化誘導は骨格筋細胞の特異的表面抗原がないため誘導後の単離が難しく、今回の研究としては断念した。

(5) iPS 細胞から血管内皮細胞への分化誘導法の確立:

FOP 罹患者由来 iPS 細胞、および遺伝子修復をした対照 iPS 細胞から、血管内皮細胞への分化誘導を試みた。しかし、従来法では誘導効率が 1% 程度と非常に低く、また誘導された細胞は市販の血管内皮用培地で増殖しなかった。

(6) FOP 罹患者由来 iPS 細胞および rescued-iPS 細胞からの、未分化間葉系細胞の作製:

FOP 罹患者由来 iPS 細胞、および遺伝子修復をした対照 iPS 細胞から、未分化間葉系細胞を分化誘導することに成功した。さらに得られた FOP-iPS 細胞由来、あるいは rescued FOP-iPS 細胞由来の未分化間葉系細胞から骨軟骨への誘導能を評価し、FOP-iPS 細胞由来間葉系細胞の方が、骨軟骨誘導能が高いことがわかった。

また、FOP 罹患者由来 iPS 細胞、および遺伝子修復をした対照 iPS 細胞から、未分化間葉系細胞を分化誘導し、それらを軟骨細胞へと誘導する過程における網羅的遺伝子発現解析による骨化を誘導する遺伝子群の同定、あるいはパスウェイ解析によるシグナル伝達経路の解明を行った。解析の結果、FOP 細胞でのみ活性化している遺伝子群を同定するに至った。

(7) 薬剤誘導型 ACVR1 発現細胞株の作製:

ヒト骨肉腫細胞株 (U2OS) に薬剤誘導型の野生型 ACVR1 と FOP 型 ACVR1 を発現するコンストラクトを遺伝子導入し、誘導型 ACVR1 発現株を作製した。作製した U2OS 細胞株に ACVR1 を発現誘導し、さらに BMP7 を添加する実験を行ったところ、これまでに示されていたように、FOP 型 ACVR1 を発現させた株で BMP リガンド非依存的な恒常活性化と BMP リガンド依存的な過剰活性化が確認できた。

(8) FOP 罹患者由来 iPS 細胞を用いた病態解明:

解析のより FOP の表現型に関与していると考えられる遺伝子が複数得られたため、それぞれに対する siRNA を用いたノックダウン実験により、遺伝子 1 つ 1 つの役割を検討し、軟骨化抑制効果のある遺伝子を複数得た。FOP 細胞でのみ活性化しているシグナル経路の解析をパスウェイ解析により行ったが、こちらに関しては BMP シグナルが活性化してい

るという従来から言われていたシグナル経路以外のシグナル経路を同定することができず、シグナル経路を同定できるような別の方法を探るべきであるという結論に至った。

(9) in vivo モデルマウスでの検証: 当初の予定では、解析により得られた遺伝子群とシグナル伝達経路について、すでに作製されている FOP-ACVR1 キメラマウスによるモデルマウスを、作製元であるペンシルバニア大学の Eileen Shore 博士より提供して頂く計画を立てており、同意も得られていた。しかし、キメラマウスは作製のたびにキメラ率が変動し、薬剤の効果を検討するには不十分なモデルと考えられたため、新たに別資金を獲得し、ドキシサイクリン誘導下に全身性に FOP-ACVR1 を発現するトランスジェニックマウスを作製することに計画変更した。現在、このマウスの作製を進めている。

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)

Hino K, Ikeya M*, Horigome K, Matsumoto Y, Ebise H, Nishio M, Sekiguchi K, Shibata M, Nagata S, Matsuda S, Toguchida J*.

Neofunction of ACVR1 in fibrodysplasia ossificans progressiva. Proc Natl Acad Sci U S A. 査読有、2015 Dec 15; 112(50): 15438-43. doi: 10.1073/pnas.1510540112. Epub 2015 Nov 30.

Matsumoto Y†, Ikeya M†*, Hino K, Horigome K, Fukuta M, Watanabe M, Nagata S, Yamamoto T, Otsuka T, Toguchida J*. New Protocol to Optimize iPS Cells for Genome Analysis of Fibrodysplasia Ossificans Progressiva. Stem Cells. 査読有、2015 Mar 13.

Fukuta M, Nakai Y, Kirino K, Nakagawa M, Sekiguchi K, Nagata S, Matsumoto Y, Yamamoto T, Umeda K, Heike T, Okumura N, Koizumi N, Sato T, Nakahata T, Saito M, Otsuka T, Kinoshita S, Ueno M*, Ikeya M*, Toguchida J*. Derivation of Mesenchymal Stromal Cells from Pluripotent Stem Cells through a Neural Crest Lineage using Small Molecule Compounds with Defined Media. PLOS ONE. 査読有、2014 Dec 2;9(12):e112291

戸口田淳也、横山宏司、池谷真、平家俊男、西小森隆太
慢性自己炎症性疾患における成長軟骨板の病態
臨床免疫・アレルギー科, 64(2): 205-211, 科学評論社 (2015)

戸口田淳也、横山宏司、池谷 真、平家俊男、西小森隆太
疾患特異的iPS細胞を活用した筋骨格系難病研究
日本臨牀 73 卷 増刊号 5 再生医療、416-422、日本臨牀社 (2015)

戸口田淳也、池谷 真、西小森隆太
疾患特異的iPS細胞を活用した骨軟骨疾患研究
病理と臨床 2015 年 6 月号 (33 卷 6 号) 病理医を誘う iPS 細胞を使った疾患研究、599-606、文光堂 (2015)

戸口田淳也、池谷 真
患者由来iPS細胞を用いた疾患モデル作製研究：骨軟骨疾患
医学の歩み Vol.252 No.12、iPS細胞研究最前線－疾患モデルから臓器再生まで、1245-1250、医歯薬出版 (2015)

池谷 真、松本佳久、戸口田淳也
進行性骨化性線維異形成症
遺伝子医学MOOK 27号、203-207、メディカルドゥ (2015)

戸口田淳也、池谷 真、西小森隆太、松本佳久、横山宏司
疾患特異的iPS細胞を用いた難治性骨軟骨疾患の病態解析・創薬
実験医学増刊 Vol.33 No.2、再生医療 2015 幹細胞と疾患 iPS 細胞の研究最前線、147-151、羊土社 (2015)

戸口田淳也、福田誠、池谷真
Special Review 間葉系幹細胞を巡る最近の進歩について
細胞工学 Vol.33 No.12、1282-1287、秀潤社 (2014)

〔学会発表〕(計 11 件)
Yoshihisa Matsumoto, Makoto Ikeya, Makoto Fukuta, Takanobu Otsuka, Junya Toguchida.
New protocol to optimize iPS cells for genome analysis of fibrodysplasia ossificans progressive
ポスター
米国骨代謝学会
シアトル (米国)
2015/10/11

Yoshihisa Matsumoto, Makoto Ikeya, Makoto Fukuta, Takanobu Otsuka, Junya Toguchida.
ESTABLISHMENT OF NEW DRUG SCREENING SYSTEM USING FIBRODYSPLASIA OSSIFICANS PROGRESSIVA IPS CELLS
ポスター
第 13 回国際幹細胞生物学会
ストックホルム (スウェーデン)

2015/6/26

松本佳久、池谷真、福田誠、永田早苗、浅香勲、大塚隆信、戸口田淳也
疾患特異的 iPS 細胞を用いた進行性骨化性線維異形成症の創薬に向けた薬剤スクリーニング系の構築
ポスター
第 14 回日本再生医療学会総会
2015/3/20
パシフィコ横浜、神奈川県横浜市

Makoto Fukuta, Yoshinori Nakai, Kosuke Kirino, Morio Ueno, Makoto Ikeya, Takanobu Otsuka, Junya Toguchida
Derivation of mesenchymal stromal cells from pluripotent stem cells through a neural crest lineage using small molecule compounds with defined media
ポスター
第 18 回武田科学振興財団生命科学シンポジウム
2015/1/15
武田薬品工業 (株) 研修所、大阪府吹田市

松本佳久、池谷真、福田誠、永田早苗、浅香勲、大塚隆信、戸口田淳也
疾患特異的 iPS 細胞を用いた進行性骨化性線維異形成症の病態解析
口頭
日本整形外科学会基礎学術集会
2014/10/9
城山観光ホテル、鹿児島県鹿児島市

池谷真
Application of iPS cells for rare and intractable bone and cartilage diseases
口頭 (招待)
日本整形外科学会基礎学術集会
2014/10/9
城山観光ホテル、鹿児島県鹿児島市

Yoshihisa Matsumoto, Makoto Ikeya, Makoto Fukuta, Edward Hsiao, Yohei Hayashi, Isao Asaka, Takanobu Otsuka, Bruce R. Conklin, Junya Toguchida
Identification of gene sets dysregulated by mutant ACVR1 gene causing a rare intractable disease, fibrodysplasia ossificans progressive
ポスター
米国骨代謝学会
2014/9/14
Houston, Texas, USA

Yoshihisa Matsumoto, Makoto Ikeya, Makoto Fukuta, Edward Hsiao, Yohei Hayashi, Isao Asaka, Takanobu Otsuka, Bruce R. Conklin, Junya Toguchida
Identification of gene sets dysregulated

by mutant ACVR1 gene causing a rare
intractable disease, fibrodysplasia
ossificans progressive
ポスター
第12回国際幹細胞生物学会
2014/6/18
Vancouver, Canada

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：異所性骨化の予防・治療剤及びそのスクリーニング方法

発明者：戸口田淳也/池谷真/松本佳久

権利者：国立大学法人京都大学

種類：特願

番号：2014-261086

出願年月日：2014/12/24

国内外の別：国内

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

特になし。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池谷 真 (IKEYA, Makoto)

京都大学・iPS細胞研究所・准教授

研究者番号：20442923

(2) 研究分担者

戸口田 淳也 (TOGUCHIDA, Junya)

京都大学・再生医科学研究所・教授

研究者番号：40273502

(3) 連携研究者

櫻井 英俊 (SAKURAI, Hidetoshi)

京都大学・iPS細胞研究所・准教授

研究者番号：80528745