

News Release



2015年12月1日

京都大学 iPS 細胞研究所(CiRA)

科学技術振興機構(JST)

日本医療研究開発機構(AMED)

大日本住友製薬株式会社

FOP 変異型受容体を介して、アクチビン A が BMP シグナルを活性化する ～FOP の異所性骨形成における新たなメカニズムを発見～

ポイント

- 進行性骨化性線維異形成症(Fibrodysplasia Ossificans Progressiva; FOP)患者さんから作製した iPS 細胞を用いることにより、通常では他のシグナルを伝達するアクチビン A^{注1}が、疾患細胞では BMP^{注2}シグナルを異常に伝達し、異所性骨形成を促進することを明らかにした。
- アクチビン A 阻害剤が FOP 治療薬となる可能性が示された。
- 疾患 iPS 細胞から作製した間葉系間質細胞^{注3}を、アクチビン A 発現細胞と共に免疫不全マウスに移植し、患者さん由来細胞を用いた異所性骨形成モデルの作製に世界で初めて成功した。

1. 要旨

日野 恭介 共同研究員(京都大学 CiRA/大日本住友製薬株式会社 先端創薬研究所)、池谷 真 准教授(京都大学 CiRA)、戸口田 淳也 教授(京都大学 CiRA/再生医科学研究所/医学研究科)らの研究グループは、FOP 患者さんから作製した iPS 細胞(FOP-iPS 細胞)を分化させて作製した FOP 患者さん由来細胞(FOP 細胞)を用いて、本来別のシグナルを伝える分子であるアクチビン A が、FOP 細胞では BMP シグナルを異常に伝達し、骨軟骨形成を促進することを示しました。

FOP とは、筋肉や腱、靭帯など本来は骨が出来てはいけない組織の中に異所性骨とよばれる骨が徐々にできる疾患です。原因は、BMP 受容体である ACVR1^{注4}の一部が突然変異により変化して、BMP シグナルを過剰に伝えるためと考えられています。研究グループは FOP-iPS 細胞を用いて、本来は別のシグナルを伝えるアクチビン A が、FOP 細胞では BMP シグナルを異常に伝達することを突き止めました。さらに FOP-iPS 細胞から作製した間葉系間質細胞を、アクチビン A 発現細胞と共に免疫不全マウスに移植することで、患者由来細胞を用いた異所性骨形成モデルの作製に世界で初めて成功しました。これらの結果はアクチビン A の阻害剤が FOP 治療薬の候補となる可能性を示唆しており、異所性骨形成モデルを用いて治療候補薬の効果を生体で検証することが可能となりました。この研究成果は 2015 年 11 月 30 日(米国東部時間)に「Proceedings of the National Academy of Sciences(米国科学アカデミー紀要)」で公開されました。

2. 研究の背景

FOP は筋肉や腱、靭帯などの軟部組織の中に異所性骨とよばれる骨組織ができてしまう病気で、200 万人に1人程度の割合で患者さんがいると言われている希少難病の一つです。これまでの研究により、この病気は骨形成を司る増殖因子である BMP の受容体の1つである ACVR1 遺伝子に突然変異が生じ

て変異型 ACVR1 へと変化し、BMP シグナルを過剰に伝えることにより異所性に軟骨が形成され、それが骨になると考えられています。発症に至る詳しいメカニズムは分かっていませんでした。

これまでに研究グループは、FOP-iPS 細胞や、変異型 ACVR1 遺伝子を修復した対照 iPS 細胞 (resFOP-iPS 細胞^{注5}) の作製に成功しています。また、iPS 細胞から間葉系間質細胞^{注3} (induced mesenchymal stromal cells; iMSC) を経て、軟骨へと分化させる方法も確立しており、FOP 細胞では軟骨への分化能が促進することを確認していました (参照: CiRA プレスリリース 2015/03/13)。

今回は、これらの細胞を用いて、FOP 細胞でどのように BMP シグナル伝達が活性化され骨・軟骨形成が促進されるのか、という病態メカニズムに迫りました。これまで、変異型 ACVR1 に BMP が結合することによりシグナルが過剰に伝達されるという説と、BMP との結合に関係なくシグナルが恒常的に伝達されるという説の、2つのメカニズムが提唱されていますが、いずれも観察されている現象を十分説明できるものではありませんでした。そこで研究グループは、BMP 以外のリガンド^{注6}が作用して BMP シグナルを伝達するという仮説をたて、検討を行いました。

3. 研究結果

1. アクチビン A は FOP 細胞において、異常な BMP シグナル伝達を引き起こす

まず変異遺伝子を修復した細胞では反応せず、FOP 細胞でのみ BMP シグナルを活性化するリガンドのスクリーニングを実施しました。FOP-iPS 細胞および resFOP-iPS 細胞から、それぞれ間葉系間質細胞 (FOP-iMSC および resFOP-iMSC) を作製し、BMP シグナルを検出するルシフェラーゼ・レポーター遺伝子を導入しました。それらの細胞と、TGF- β スーパーファミリー^{注7}に属する BMP と類似の構造を持つ 27 種類のリガンドを反応させ、16 時間後に、ルシフェラーゼ活性を測定しました。これまでの報告通り、BMP6 や BMP7 などいくつかの BMP を添加すると、resFOP-iMSC と比べて FOP-iMSC において BMP シグナルがより活性化されましたが、その比は 1.4 倍程度でした。これに対して、アクチビン A を添加するとその比は 4 倍以上と大きく増大させることが分かりました (図 1)。

さらに、FOP-iMSC において変異型 ACVR1 をノックダウンすると、BMP シグナルの活性化が見られず、また変異型 ACVR1 を別の骨系統細胞で過剰発現させると、アクチビン A に反応して BMP シグナル活性が高まりました。これらの結果により、アクチビン A は変異型 ACVR1 を介して異常な BMP シグナル伝達を引き起こすことが示されました。

BMP シグナルにตอบสนองする
ルシフェラーゼ活性の比
(FOP/resFOP)

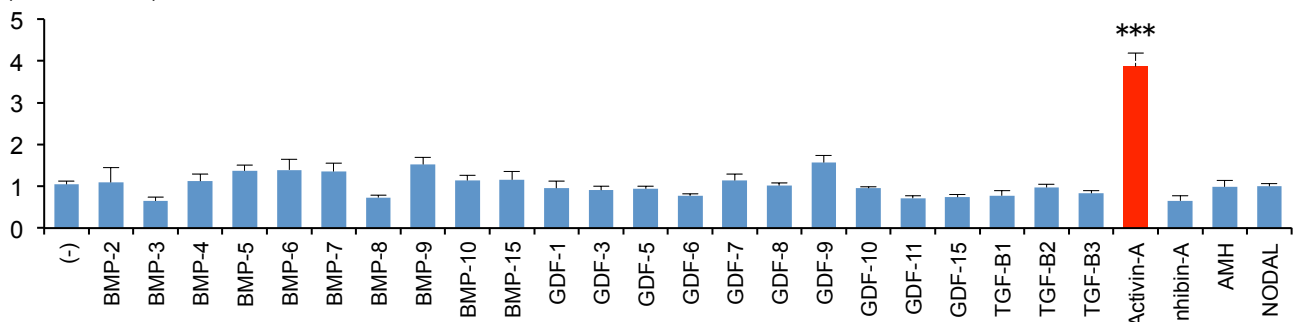


図 1. BMP シグナルを促進する FOP 細胞特異的リガンドのスクリーニング

BMP に類似の構造をもつ TGF- β スーパーファミリーのうち、アクチビン A で処理すると、FOP 細胞のみで BMP シグナルが活性化することが分かりました。

(mean \pm S.E., N=3-4, *** P<0.01)

2. アクチビン A により、FOP 細胞の軟骨形成が促進された

軟骨への分化におけるアクチビン A の影響を調べました。FOP-iMSC と resFOP-iMSC から 2 次元のマイクロマス培養法^{注8}により軟骨を誘導し 7 日目に比較したところ、FOP 細胞ではアクチビン A 添加で、より大きな軟骨様組織が形成されました(図2)。また、この現象はアクチビン A 阻害剤で抑えられ(図3)、アクチビン A の阻害が FOP における異所性骨化を抑える新たな治療ターゲットとなる可能性を示しました。

次に、軟骨の成熟度を確認するために、FOP-iMSC と resFOP-iMSC を 3 次元で塊(ペレット)にして培養し、軟骨を誘導しました。アクチビン A を添加した条件での誘導 21 日後には、FOP 細胞でより成熟した軟骨細胞が見られました(図4)。また、FOP-iMSC 由来軟骨組織では後期の軟骨マーカー(COL10A1、VEGFA、MMP13)の発現が高いことも確認しており、アクチビン A は軟骨成熟を促進することが分かりました。

さらに、これらの軟骨ペレットを免疫不全マウスの背に移植すると、4 週間後、res-FOP 細胞由来軟骨ペレットでは骨化がほぼ生じなかった(1/10 匹)のに対して、FOP 細胞由来軟骨ペレットでは高頻度に骨が形成されました(9/10 匹)。これにより、これらの軟骨ペレットは生体内ではアクチビン A 刺激なしでも骨化することが分かりました。

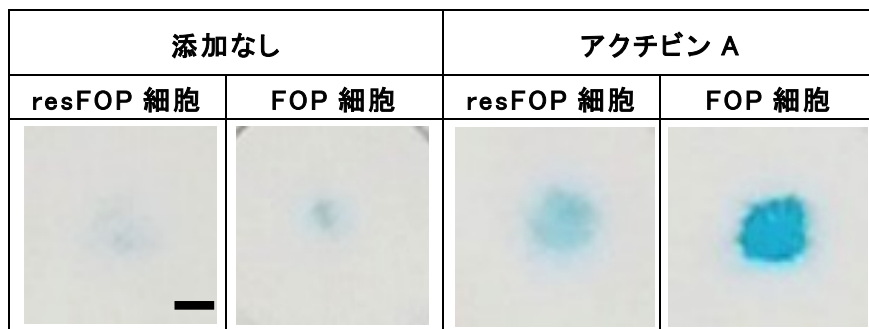


図2. FOP 細胞および resFOP 細胞から分化誘導した軟骨様組織

FOP-iMSC と resFOP-iMSC から分化誘導 7 日後の軟骨様組織の様子を示しています。軟骨様組織のうち軟骨基質がアルシアン・ブルー染色にて青く染まっています。アクチビン A の添加により、resFOP-iMSC と比較して FOP-iMSC はよりも大きな軟骨様組織を形成しました。(スケールバー: 200 μm)

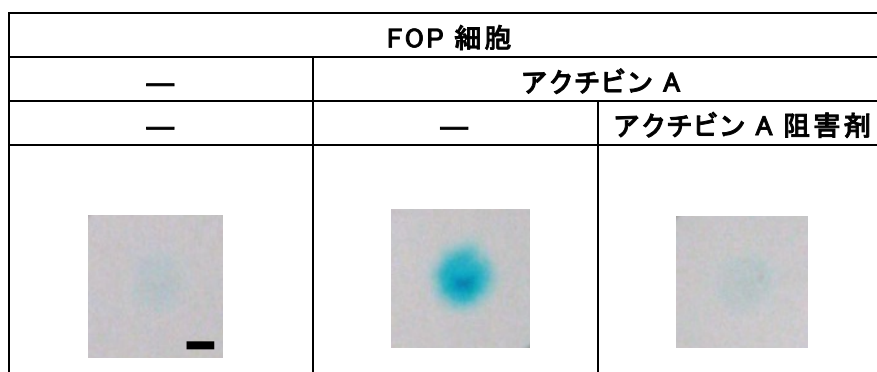


図3. FOP 細胞から軟骨様組織誘導におけるアクチビンA阻害剤の影響

アクチビンAによる FOP 細胞の軟骨様組織形成は、アクチビンA阻害剤により抑制されました。(アルシアン・ブルー染色、スケールバー: 200 μm)

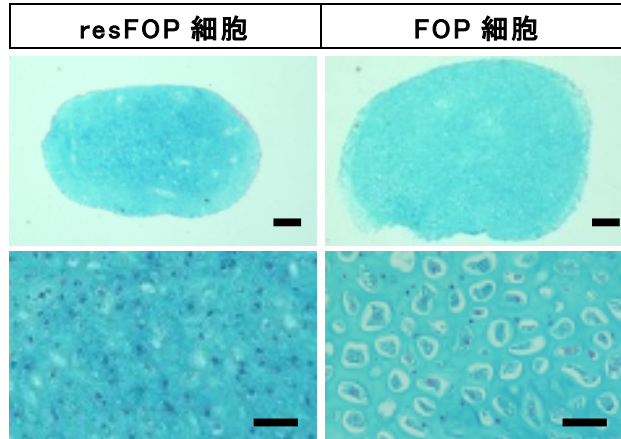


図4. 3次元軟骨ペレット培養による軟骨様組織

FOP-iMSCとresFOP-iMSCからアクチビンAを添加した条件下での分化誘導 21 日後の軟骨様組織の様子を示しています(アルシアン・ブルー染色)。FOP 細胞では、細胞質が大きく成熟した軟骨細胞が観察されました。(スケールバー: 上段 200 μm、下段 50 μm)

3. FOP-iPS 細胞から作製した間葉系間質細胞を用いて、異所性骨形成モデルが作製できた

さらに、FOP-iMSCまたはresFOP-iMSCと、ドキシサイクリン誘導によりアクチビンAを発現する細胞を混合して、免疫不全マウスに移植しました。移植 6 週間後の観察で、ドキシサイクリンを用いてアクチビンAを誘導した場合にのみ、FOP 細胞を移植した箇所に異所性骨の形成が認められました(図5)。

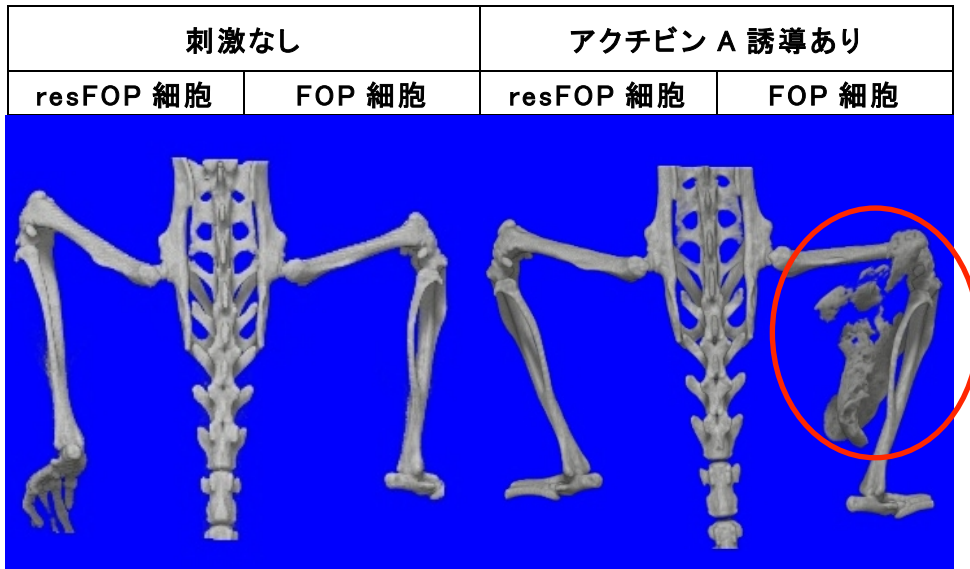


図5. FOP-iPS 細胞由来間葉系間質細胞を用いた異所性骨モデル

FOP 細胞を移植しアクチビンAを誘導した場合のみ、異所性骨が形成されました。

4. まとめ

本研究では、FOP-iPS 細胞を用いて、本来 TGF- β シグナルを伝える分子であるアクチビン A が FOP 細胞では BMP シグナルを伝え、骨軟骨形成を促進することを明らかにし、このメカニズムが FOP における異所性骨化形成に大きく寄与している可能性を示しました。またこの結果は、アクチビン A 阻害剤が FOP 治療薬の候補となる可能性を示唆します。

さらに FOP-iPS 細胞から作製した間葉系間質細胞を、アクチビン A 発現細胞と共に免疫不全マウスに移植することで、FOP 患者由来細胞を用いた異所性骨形成モデルの作製に世界で初めて成功しました。このモデルを用いることで、FOP に対する薬剤の効果を生体で検証することが可能となり、治療薬のスクリーニングに役立つことが期待されます。

5. 論文名と著者

○ 論文名

“Neofunction of ACVR1 in fibrodysplasia ossificans progressiva”

○ ジャーナル名

Proceedings of the National Academy of Sciences

○ 著者

Kyosuke Hino^{1,2}, Makoto Ikeya^{1*}, Kazuhiko Horigome^{1,2}, Yoshihisa Matsumoto^{1,3,4}, Hayao Ebise⁵, Megumi Nishio¹, Kazuya Sekiguchi^{1,3,6}, Mitsuaki Shibata¹, Sanae Nagata¹, Shuichi Matsuda⁶, and Junya Toguchida^{1,3,6*} (* 責任著者)

○ 著者の所属機関

1. 京都大学 iPS 細胞研究所 (CiRA)
2. 大日本住友製薬株式会社 研究本部 先端創薬研究所 疾患 iPS 創薬グループ
3. 京都大学 再生医科学研究所
4. 名古屋市立大学大学院 医学研究科
5. 大日本住友製薬株式会社 研究本部 ゲノム科学研究所 オミックスグループ
6. 京都大学大学院 医学研究科

6. 本研究への支援

本研究は、下記機関より資金的支援を受けて実施されました。

日本学術振興会 科学研究費補助金

文部科学省 「再生医療の実現化プロジェクト」

JST 再生医療実現拠点ネットワークプログラム 「疾患特異的 iPS 細胞を活用した難病研究」

AMED 再生医療実現拠点ネットワークプログラム 「疾患特異的 iPS 細胞を活用した難病研究」

JST 研究成果展開事業 研究成果最適展開支援プログラム「A-STEP」

iPS 細胞研究基金

7. 用語説明

注1) アクチビン A

TGF- β (Transforming Growth Factor β ; トランスフォーミング増殖因子 β)ファミリーに属するタンパク質で、細胞増殖や分化など多くの生理機能を調節する作用を持つ。

注2) BMP (Bone Morphogenetic Protein; 骨形成因子)

骨組織や軟骨の分化を誘導、促進するタンパク質。TGF- β スーパーファミリー^{注7}に属する。

注3) 間葉系間質細胞 (Mesenchymal Stromal Cells)

骨・軟骨・脂肪細胞などといった間葉系の細胞に分化する能力を持った間質(結合組織)の細胞。本報では、iPS 細胞から作製したものを iMSC (induced Mesenchymal Stromal Cell) としている。

注4) ACVR1 (Activin receptor type-1)

BMP 受容体の一部を構成するタンパク質で、BMP と結合することにより骨形成のシグナルを伝達する。アクチビン A とは、結合はするがシグナルは伝えないことが知られていた。FOP では ACVR1 遺伝子の変異により、ACVR1 タンパク質の 206 番目のアルギニンがヒスチジンに変化し、アクチビン A との結合で本来伝えないはずの BMP シグナルを伝えていた。

注5) resFOP-iPS 細胞

FOP 患者さんから作製した疾患 iPS 細胞のゲノム中の原因変異を修復した細胞。この resFOP-iPS 細胞は、修復した変異以外は、もとの患者さん由来 iPS 細胞と、同じ遺伝情報を持っているため、FOP 変異やそれに関連する病気のメカニズムを調べる上で、より厳密な対照細胞となる。

注6) リガンド

特定の受容体に特異的に結合する物質。

注7) TGF- β スーパーファミリー

TGF- β 、BMP、アクチビンなど構造上類似した因子で構成される集合体の総称。スーパーファミリーには他に、免疫グロブリンスーパーファミリー、核ホルモン受容体スーパーファミリーなどが存在する。

注8) マイクロマス培養法

細胞を高濃度で調製し、培養皿上に滴状に播種することで作製される高密度の細胞塊をマイクロマスと呼び、その状態で培養する方法をマイクロマス培養法と呼ぶ。軟骨分化の際に用いられる。