

News Release



2015年3月13日
京都大学 iPS 細胞研究所(CiRA)
科学技術振興機構(JST)

FOP 患者さん由来 iPS 細胞を用いて、 病態再現と創薬に向けた評価系の構築に成功

ポイント

- FOP (Fibrodysplasia Ossificans Progressiva; 進行性骨化性線維異形成症)患者さんから作製した iPS 細胞 (疾患 iPS 細胞) の遺伝子を修復し、対照 iPS 細胞を作製した。
- 上記の対照 iPS 細胞と、疾患 iPS 細胞をそれぞれ軟骨細胞に分化誘導したところ、疾患 iPS 細胞からは軟骨ができやすいという病態を再現できた。
- MMP1 遺伝子と PAI1 遺伝子が軟骨生成を促し、FOP の病態に関与することを初めて示した。
- 患者さん由来の対照 iPS 細胞を用いて研究を進めることで、よりの確かな病態メカニズムの解明や創薬へとつながると期待される。

1. 要旨

松本佳久 医師(名古屋市立大学整形外科臨床研究医/元京都大学 CiRA/再生医科学研究所)、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、患者さん由来の疾患 iPS 細胞より、患者さんの遺伝情報をもつ対照 iPS 細胞を作製し、それぞれから軟骨細胞を誘導し、FOP の病態の再現やメカニズムの一端を明らかにしました。

具体的には、まず、FOP 患者さん由来の疾患 iPS 細胞において、FOP の原因となる遺伝子変異を野生型に修復しました。これにより、修復した変異以外はもとの患者さんと同じ遺伝情報をもつ対照 iPS 細胞を作製することに成功しました。患者さん由来の疾患 iPS 細胞と対照 iPS 細胞を軟骨細胞へと分化させたところ、疾患 iPS 細胞では軟骨への分化能が亢進していることを確認しました。また、双方の iPS 細胞から軟骨へと分化させる途中の段階(間葉系間質細胞)で様々な遺伝子の発現を調べたところ、MMP1 と PAI1 という2つの遺伝子が疾患 iPS 細胞で発現が亢進しており、FOP の病態に寄与していることが示唆されました。

今回の研究でのアプローチのように、FOP の変異以外は同じ遺伝情報をもつ細胞を対照細胞とし、比較することで、原因変異によるメカニズムに、より焦点をあてて調べることができます。そのため、よりの確かな病気のメカニズムの検討、より効率的で有効な創薬につながると期待されます。

この研究成果は 2015 年 3 月 12 日午前 9 時(米国東部時間)に「Stem Cells」で公開されます。

2. 研究の背景

FOP は筋肉や腱、靭帯などの軟部組織の中に、徐々に骨ができてしまう(異所性骨化)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、ACVR1 と呼ばれる遺伝子に変異が生じて、その遺伝子が過剰に働くとFOPとなることがわかっていました。しかし、FOP 患者さんの体内から組織サンプルを採取すると骨化を促進し病状を悪化してしまうことや、マウスを使った FOP 病態モデル^{注1}の限界から、FOP 発症の詳細なメカニズムについては不明な点が多いとされてきました。

これまでにグループは、iPS 細胞から軟骨への分化誘導法を確立し、異所性骨化の重要な過程の1つと考えられている軟骨への分化能について検討を行っています。しかし、これまでは病気のメカニズムを調べるために、患者さん由来の iPS 細胞と FOP ではない人由来の iPS 細胞からそれぞれ分化した細胞を比較しており、両者の遺伝的背景が異なっていました。そのため、両者の比較からは、病態に無関係な遺伝情報の個人差が病気の原因として検出される可能性があります。

そこで本研究では、FOP を引き起こす変異以外は同じ遺伝情報をもつ対照 iPS 細胞を作製し、それと疾患 iPS 細胞の軟骨への分化能を比較することにより、FOP のメカニズムの一端の解明を試みました。

なお、本研究については、2011 年から大日本住友製薬株式会社と共同研究を行っています。

3. 研究結果

1. 患者さん由来疾患 iPS 細胞から対照 iPS 細胞の作製

まず、FOP 患者さんから作製した疾患 iPS 細胞(FOP-iPSC。以降、本文章中では患者さん由来の疾患モデル細胞を FOP にて表す)のゲノム中の原因変異(ACVR1 遺伝子の 7 番目のエクソン^{注2}にある変異)を BAC(大腸菌人工染色体)^{注3}ベクターを用いた相同組換え^{注4}により、野生型に修復しました(遺伝子修復)。その結果、変異の修復された iPS 細胞株(resFOP-iPSC。以降、本研究で作製した患者さん由来の対照細胞を resFOP にて表す)を作製することに成功しました。この resFOP-iPSC は、修復した変異以外は、もとの患者さん由来 iPS 細胞と、同じ遺伝情報をもっているため、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ります。

なお、resFOP-iPSC では、多能性を示すマーカーが発現しており、またテラトーマ(奇形腫)^{注5}を形成することから多能性を持つことが確認されました。resFOP-iPSC の形や増殖能、テラトーマ内の軟骨組織部分は、もとの FOP-iPSC と同様でした。

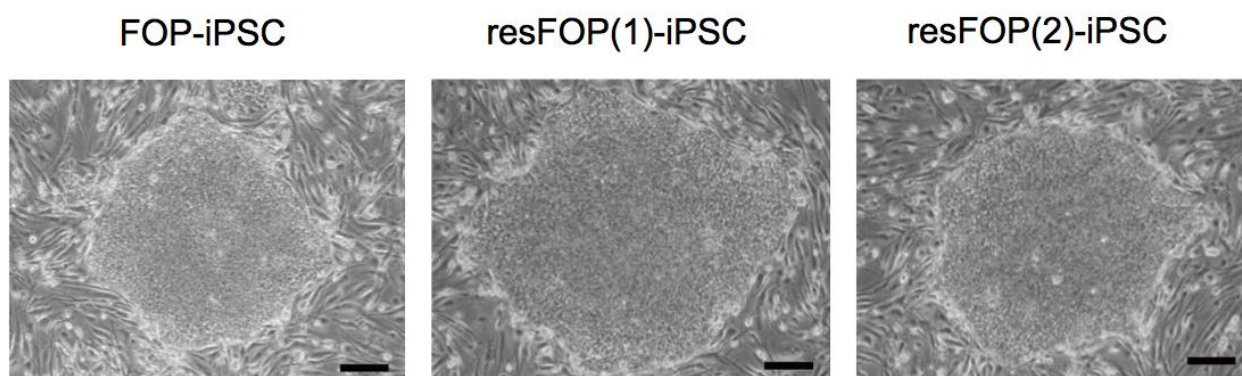


図1 FOP 患者さん由来 iPS 細胞(FOP-iPSC; 左)と
遺伝子修復した iPS 細胞(resFOP-iPSC; 中・右)
スケールバー: 200 μ m

2. FOP-iPSC と resFOP-iPSC の、軟骨分化能の確認と病態再現

次に、FOP-iPSC と resFOP-iPSC それぞれから神経堤細胞(NCC)^{注6}、間葉系間質細胞(MSC)^{注7}を介して、マイクロマス培養法^{注8}により軟骨へと分化誘導しました。MSC の段階から誘導 10 日後の軟骨組織を観察したところ、FOP-iPSC 由来の軟骨では、resFOP-iPSC 由来の軟骨よりも軟骨のマーカー遺伝子(SOX9, COL2A1, ACAN)が高く発現しており、より大きな軟骨組織が形成されました。このことは、FOP 患者さんの軟骨ができやすいという病態の一部を培養皿の上で再現することができたと考えられます。また、これにより、FOP 患者さん体内に存在する変異 ACVR1 が軟骨への分化と成熟を促進していることが確認されました。

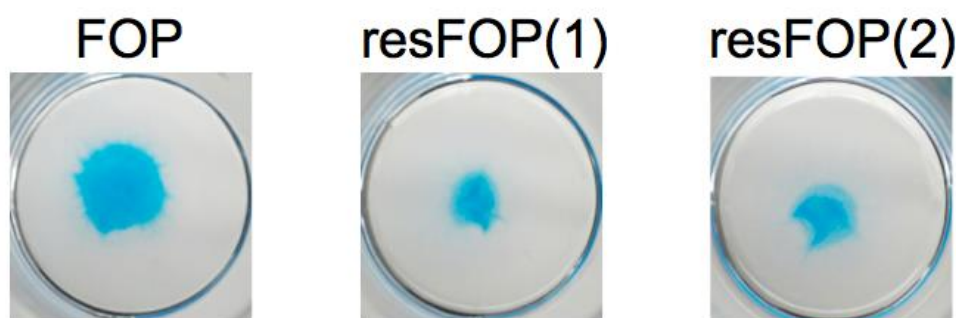


図2 FOP-iMSC(FOP-iPSC 由来 MSC)と resFOP-iMSC(resFOP-iPSC 由来 MSC)から分化誘導した軟骨組織(それぞれ、左、中・右)

FOP-iMSC と resFOP-iMSC から分化誘導 10 日目の軟骨組織の様子を示している。

軟骨組織の軟骨基質がアルシアン青染色にて青く染められている。

FOP-iMSC からは resFOP-iMSC からよりも大きな軟骨組織が形成された。

3. 網羅的遺伝子解析による発現量の違う遺伝子群の同定

また、iPS 細胞、NCC、MSC それぞれの段階で、マイクロアレイ^{注9}を用いて、様々な遺伝子の発現を調べ、比較しました。それぞれの段階において、患者さん由来の疾患細胞と対照細胞はまとめて、標準的な細胞と異なる群に分類されています。これは遺伝子発現パターンが極めて近いことを示し、遺伝的背景がほぼ同一な細胞であることに一致した結果であると考えられます。

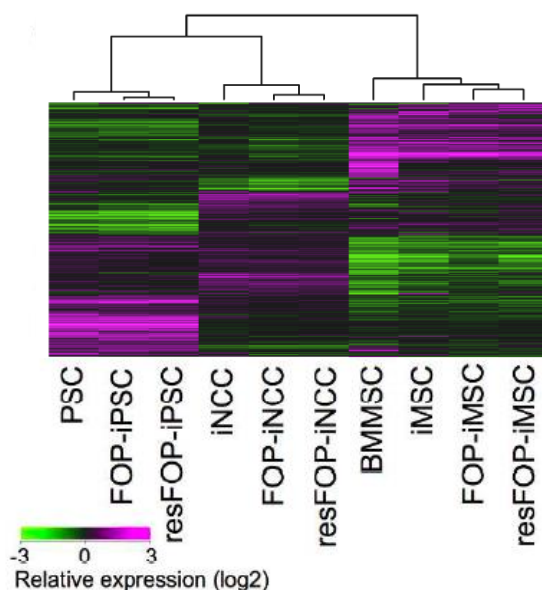


図3 それぞれの細胞の遺伝子発現の近似性

マイクロアレイで遺伝子の発現を調べ、各細胞の遺伝子発現の近似性を調べた。

下のヒートマップでは紫色が発現の高い遺伝子、緑色が発現の低い遺伝子を示している。また、上の樹形図では、低い位置で枝分かれしているほど遺伝子発現パターンが近いことを示している。

これらより FOP 細胞は標準細胞よりも、resFOP 細胞に近似していることが分かる。

PSC, iNCC, iMSC :標準的な iPS 細胞、それから分化した神経堤細胞、間葉系間質細胞

また、FOP-iPSC と resFOP-iPSC、また途中の段階の FOP-iNCC (FOP-iPSC 由来 NCC) と resFOP-iNCC (resFOP-iPSC 由来 NCC) では遺伝子の発現にほとんど違いが見られませんでした。ところが、MSC の段階では、FOP-iMSC で resFOP-iMSC に比べ 191 もの遺伝子が 2 倍以上高く発現し、110 遺伝子が 2 倍以上発現が低いことが確認されました。これより、FOP 細胞と resFOP 細胞は、MSC の段階でいくつか異なる遺伝子発現が見られるようになることが分かりました。中でも MMP1 遺伝子と PAI1 遺伝子がとりわけ FOP-iMSC で高く発現していました。また、これらの遺伝子には軟骨分化を促進する働きがあり、FOP の病態に寄与していることが分かりました。

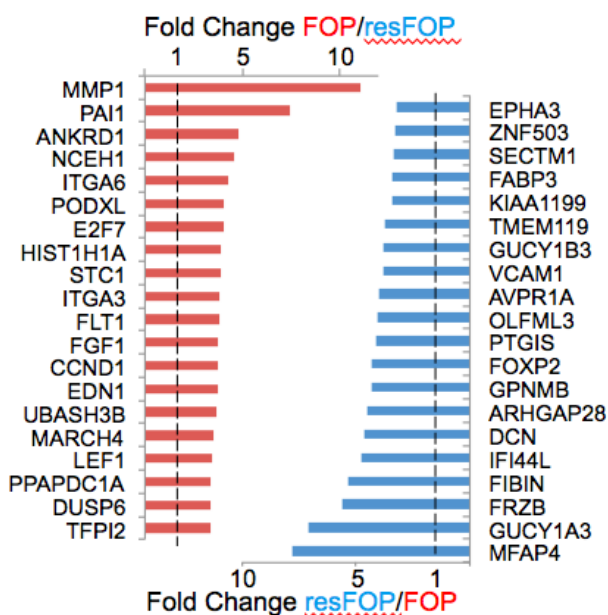


図4 FOP-iMSC と resFOP-iMSC での遺伝子発現の違い

赤い棒グラフは FOP-iMSC で resFOP-iMSC よりも発現が高い遺伝子、

青い棒グラフは resFOP-iMSC で FOP-iMSC よりも発現が高い遺伝子を示している。

横軸の数字は、遺伝子発現量の違いを倍数で示したものの。

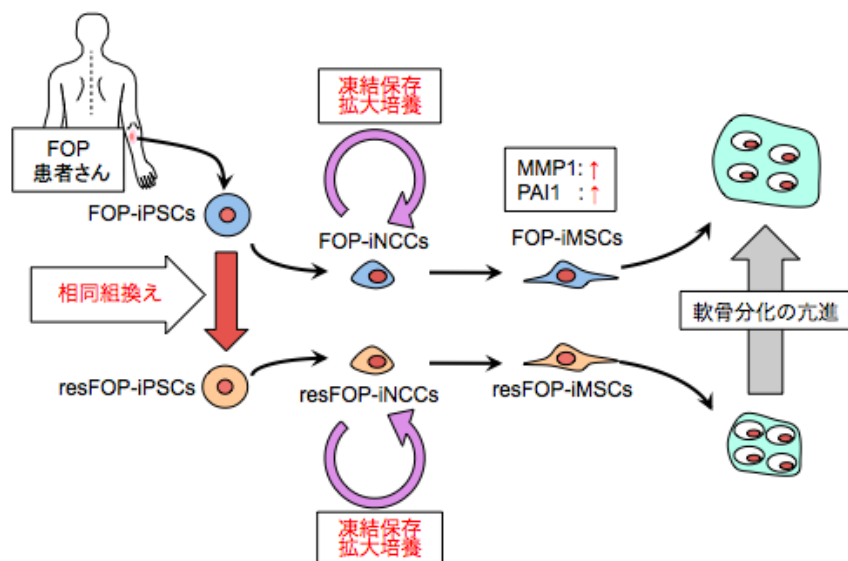


図 5 今回の研究のまとめ

4. まとめ

本研究では、FOP 患者さん由来疾患 iPS 細胞の FOP 変異を修復することで、FOP 変異以外の遺伝的背景が同一の患者さん由来対照 iPS 細胞を作製することに成功しました。疾患 iPS 細胞と対照 iPS 細胞を軟骨へと分化誘導させることで、疾患 iPS 細胞からは軟骨ができやすいという病態を体外で再現できました。また疾患モデル細胞と対照細胞を比較すると、とりわけ 2 つの遺伝子が疾患モデル細胞で発現が高く、また、軟骨生成を促し、FOP の病態に関与することが分かりました。

今回のような患者さん由来の対照 iPS 細胞の作製は FOP 以外の疾患においても、よりの確な病態メカニズムの解明や有効な創薬へとつながると期待されます。

5. 論文名と著者

○ 論文名

“New protocol to optimize iPS cells for genome analysis of fibrodysplasia ossificans progressiva”

○ ジャーナル名

Stem Cells

○ 著者

Yoshihisa Matsumoto^{1,2,3,†}, Makoto Ikeya^{2,†,*}, Kyosuke Hino^{2,4}, Kazuhiko Horigome^{2,4}, Makoto Fukuta^{1,2,3}, Makoto Watanabe^{2,5}, Sanae Nagata², Takuya Yamamoto^{2,6}, Takanobu Otsuka³, and Junya Toguchida^{1,2,7}

*

† 筆頭著者

* 責任著者

○ 著者の所属機関

1. 京都大学再生医科学研究所
2. 京都大学 iPS 細胞研究所 (CiRA)
3. 名古屋市立大学大学院医学研究科
4. 大日本住友製薬株式会社研究本部先端創薬研究所
5. 島津製作所基盤技術研究所
6. 京都大学物質-細胞統合システム拠点 (iCeMS)
7. 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「iPS 細胞研究中核拠点」

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」

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) 病態モデル

その病気に特徴的な症状や性質を再現したもの。研究を行う際には、病態モデルを用いて病気の原因究明を行う。これまでも病態を再現した実験動物が、病態モデルとして多くの基礎研究に利用されていた。しかし、ヒトと実験動物とはシステムが異なることもあり、有効な病態モデルが得られないこともあった。ヒトの疾患特異的 iPS 細胞から病態が再現できれば、病態解明、創薬を目指した研究が進めやすくなると期待されている。

注2) エクソン

遺伝子を構成する DNA のうち、転写後、最終的に mRNA となる部分。mRNA はリボソームにおいて翻訳されタンパク質を形成する。

注3) BAC (bacterial artificial chromosome: 大腸菌人工染色体)

約 300kb までの長い遺伝子をクローニングできる、大腸菌が宿主のベクター(運び屋)である。大腸菌内での相同組換えにより、容易に遺伝子を任意に導入できる。

注4) 相同組換え

DNA の塩基配列がよく似た領域(相同部位)で起こる DNA の組換えのこと。二本鎖の DNA には、切断や変異が起こっても相補鎖を元に修復する機能が備わっており、これらの性質を応用して目的の場所の遺伝情報を変える技術。

注5) テラトーマ(奇形腫)

ES 細胞や iPS 細胞といった多能性幹細胞を免疫不全マウスの皮下などに注射すると、腫瘍を形成する。この腫瘍はテラトーマと呼ばれ、様々な種類の組織が混在している。テラトーマを観察し、様々な組織に分化していることを確認することは、細胞の分化多能性を調べる一般的な方法の一つである。

注6) 神経堤細胞 (neural crest cell: NCC)

頭頸部骨格系、角膜、末梢神経系、皮膚色素細胞など多様な細胞種への分化能を有する、胎児期に一過的に現れる移動性の細胞集団。神経冠細胞と呼ばれることもある。

注7) 間葉系間質細胞 (mesenchymal stromal cells: MSC)

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。軟骨への分化過程の一つに、神経堤細胞から間葉系間質細胞を経由して分化する過程が知られている。

注8) マイクロマス培養法

細胞を高濃度で調製し、滴状で培養皿上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。

注9) マイクロアレイ

多種類の微量な分子(核酸や抗体など)を基盤上に固定し、それに解析対象とするサンプルを作用させることで、一度に膨大な数のDNAやRNA、タンパク質の質や量を網羅的に検査することができる解析技術。