



Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	第 1017 号
氏名	松本 佳久
授与年月日	平成 26 年 3 月 25 日
学位論文の題名	<p>Induced pluripotent stem cells from patients with human fibrodysplasia ossificans progressiva show increased mineralization and cartilage formation (進行性骨化性線維異形成症患者由来ヒト多能性幹細胞は、石灰化及び軟骨形成が亢進する)</p> <p>Orphanet Journal of Rare Diseases 2013, 8:190</p>
論文審査担当者	<p>主査： 澤本 和延 副査： 飛田 秀樹, 大塚 隆信</p>

論文内容の要旨

[背景]

進行性骨化性線維異形成症 (Fibrodysplasia Ossificans Progressiva、以下FOP) は、筋肉や腱、靭帯などの軟部組織の中に、徐々に異所性骨が形成される病気で、200万人に1人程度の割合で患者がいると言われている希少難病の1つである。臨床病態としては、拇趾の先天性奇形、幼少期に始まる全身の異所性骨化、軽微な外傷に伴う急性増悪（フレアアップ）などが挙げられる。異所性骨化は進行性であり、進行すると嚥下障害や呼吸障害をおこす致死性疾患であり、現在有効な治療法がない。これまでの研究により、BMP (Bone Morphogenetic Protein) type1 受容体の1つであるACVR1/ALK2遺伝子に変異が生じていることが判明している。しかしながら、FOP患者からの組織サンプル採取が患者の骨化を促進してしまうことや、マウスを使ったFOP病態モデルの限界から、FOP発症の詳細なメカニズムについては不明であった。本研究に皮膚及び血液から作製できるiPS細胞技術を用いることにより、患者からの組織採取を避けることができる。さらに、FOPは異所性骨化の起源細胞が不明であるため、様々な細胞へと分化誘導が可能なiPS細胞を利用することは有用である。

[目的]

FOP患者由来 iPS 細胞を作製し、骨及び軟骨誘導を行い、その病態の一部を再現する。

[方法]

FOP患者より、2種類の方法（レトロウイルス、エピソーマルベクター）を用いてFOP患者由来 iPS 細胞を複数クローン作製し、骨及び軟骨誘導を行い、野生型 iPS 細胞との違いを観察した。

[結果]

レトロウイルスを用いて山中4因子を導入することで樹立したFOP-iPS細胞は、Transgeneのsilencing、未分化マーカーの発現、核型正常、奇形腫形成能等の標準的評価基準に合致するクローンであった。

これらのiPS細胞を骨化が促進される条件下で15日間培養した所、野生型iPS細胞よりもFOP-iPS細胞で石灰化が促進していることが観察された。この石灰化した部分では、電子顕微鏡下にcollagen様線維が確認された。

また、BMP阻害薬の1つである低分子化合物であるDMH1を一定濃度以上培地に添加することで、石灰化が抑制されることが確認された。

これらのiPS細胞を、胚葉体 (Embryoid Body、EB) 形成を経て、軟骨誘導を行ったところ、野生型iPS細胞から作製した軟骨ペレットよりも、FOP-iPS細胞より作成した軟骨ペレットの大きさが大きく、内部の軟骨様細胞の割合や軟骨基質の指標であるGAG (Glucoseaminoglycan) の値が有位に高く、軟骨マーカー遺伝子の発現も有意に上昇していることが確認され、石灰化のみならず軟骨化もFOP-iPS細胞は促進していることが確認された。

次により安全性の高いエピソーマルベクターを用いて、FOP患者由来 iPS 細胞を複数クローン作製した。樹立したFOP-iPS細胞は、未分化マーカーの発現、核型正常、奇形腫形成能等の標準的評価基準に合致することを確認した。

またこれらのFOP-iPS細胞は、定常状態及びBMP4添加にて、BMP下流シグナルであるSMAD1/5/8のリン酸化が、野生型と比較して亢進していることが確認できた。これらのintegration free iPS細胞を上述の骨化が促進される条件下で12日間培養した所、野生型iPS細胞

胞よりも **FOP-iPS** 細胞で石灰化が促進していることが観察された。

[考察]

今回の研究では主に以下の点を示した。

- 1) **FOP**患者由来の*iPS*細胞をレトロウイルスあるいはエピソーマルベクターを用いて樹立した。
- 2) 樹立した**FOP-iPS**細胞から骨及び軟骨細胞を分化誘導する方法を開発した。
- 3) **FOP-iPS**細胞は、標準的な*iPS*細胞と比較して、骨及び軟骨分化能が著しく亢進していることを示した。
- 4) **FOP**の病態を*in vitro*で再現できたことで、**FOP**に対する創薬に向けて*iPS*細胞を用いることの正当性が実証された。

本研究により、**FOP**の病態を体の外で一部再現することができ、骨化・軟骨化を緩和するような薬の候補となる物質を探すための評価系を確立したといえる。これにより、**FOP**の創薬研究が一層加速することが期待される。また**FOP**のみならず、希少疾患の患者から研究試料の採取が困難な疾患について、*iPS*細胞技術を活用してその病態を再現できる可能性を示し、創薬研究ならびに疾患メカニズムの解明に、*iPS*細胞技術が利用できることを示した。

論文審査の結果の要旨

本論文では、筋肉や腱、靭帯などの軟部組織に異所性骨化が出現する難病の一つである進行性骨化性線維異形成症（Fibrodysplasia Ossificans Progressiva, FOP）の創薬につながる病態再現をiPS細胞(induced pluripotent stem cells iPS細胞)を用いて行った。

[方法]

FOP患者より、二種類の手法（レトロウイルス、エピソーマルベクター）を用いてFOP患者由来iPS細胞を複数クローン作製し、骨及び軟骨誘導を行い、野生型iPS細胞との違いを観察した。

[結果・考察]

レトロウイルス、エピソーマルベクターを用いて樹立したFOP-iPS細胞は、標準的評価基準に合致するクローンであった。これらのiPS細胞を骨化が促進される条件下で培養した所、野生型iPS細胞よりもFOP-iPS細胞で石灰化が促進していることが観察された。この石灰化した部分では、電子顕微鏡下にcollagen様線維が確認された。また、BMP阻害薬の一つである低分子化合物であるDMH1を一定濃度以上培地に添加することで、石灰化が抑制されることが確認された。

これらのiPS細胞を、胚様体形成を経て、軟骨誘導を行ったところ、野生型iPS細胞から作製した軟骨ペレットよりも、FOP-iPS細胞より作成した軟骨ペレットの大きさが大きく、内部の軟骨様細胞の割合が有位に高く、軟骨マーカー遺伝子の発現が有意に上昇していることが確認された。

主に以下の点を明らかにしたことに意義があると考えられる。

- 1) FOP患者由来のiPS細胞をレトロウイルスあるいはエピソーマルベクターを用いて樹立した。
- 2) 樹立したFOP-iPS細胞から骨及び軟骨細胞を分化誘導する方法を開発した。
- 3) FOP-iPS細胞は、標準的なiPS細胞と比較し、骨及び軟骨分化能が亢進していることを示した。
- 4) FOPの病態をin vitroで再現できたことで、FOPに対する創薬に向けてiPS細胞を用いることの正当性が実証された。

[審査内容]

主査より、レトロウイルス及びエピソーマルベクターにおける遺伝子導入法の原理や違い、骨及び軟骨分化誘導培地に含まれるどの成分が主に分化を促進しているか、von Kossa染色の原理などの八項目の質問があった。第一副査より、軟骨分化誘導で3Dペレット法を選択した理由、EB形成を行う上でのポイント、今後血清を使用しない分化誘導法を検討しているかなどの八項目、第二副査より、脊髄損傷の現在及び今後期待される治療法について、後縦靭帯骨化症の原因についての質問があった。これらの質問に対して、申請者から適切な回答が得られ、学位論文の内容を十分に理解していると判断した。

FOPの病態をin vitroで、再現することができ、骨化・軟骨化を緩和するような薬の候補となる物質を探すための評価系を確立したといえる。これにより、FOPの創薬研究が一層加速することが期待される。またFOPのみならず、希少疾患の患者から研究試料の採取が困難な疾患について、iPS細胞技術を活用してその病態を再現できる可能性を示し、創薬研究ならびに疾患メカニズムの解明に、iPS細胞技術が利用できることを示した。種間の生物学的反応の相違の問題もあるため、創薬という観点から考えた場合、ヒトの細胞を用いて研究することにも、大きな意義があったと考えられる。

よって本論文の著者は博士(医学)の学位を授与されるに相応しいと判定した。

論文審査担当者 主査 澤本 和延 副査 飛田 秀樹 大塚 隆信