

患者由来iPS細胞を用いた進行性骨化性線維異形成症 (FOP) の病態解明

大日本住友製薬株式会社

先端創薬研究所

ゲノム科学研究所

京都大学

iPS細胞研究所

日野 恭介*¹

海老瀬 速雄

池谷 真

堀込 一彦*¹

戸口田 淳也*³

池田 篤史*²

はじめに

iPS細胞 (induced Pluripotent Stem cell、人工多能性幹細胞) は、山中4因子と呼ばれる4つの転写因子を線維芽細胞等の体細胞に導入することにより作製されるES細胞と同様の能力を持つ多能性幹細胞であり、2006年にマウスiPS細胞¹⁾、2007年にはヒトiPS細胞の作製が報告された²⁾。2017年はヒトiPS細胞の作製から10年の区切りの年となるが、iPS細胞から作製した網膜色素上皮細胞の加齢黄斑変性患者への移植がすでに行われるなど、iPS細胞を用いた再生医療は臨床応用の段階に入っている。また、本邦においてはパーキンソン病や網膜色素変性症及び脊髄損傷についても治験や臨床研究が計画されており、iPS細胞を用いた移植治療はますます発展していくものと思われる。

一方、基礎研究や創薬におけるiPS細胞の有用性についても多数報告されている。患者からの採取が難しい組織の細胞をiPS細胞から作製し、これを簡便な解析や薬剤スクリーニングに用いる試みは多くの製薬会社やアカデミアで精力的に行われている。また、ヒトでの薬効や毒性をより正確に予測するため、iPS細胞由来の細胞とデバイス等を組み合わせることで心臓や肝臓といった臓器の構造や機能を再構成することを目指した“Organ-on-a-chip”技術や、ヒトの臓器・組織の立体構造を*in vitro*で再現する“オルガノイド”技術の研究もさかに行われており、疾患の原因や病態の解明、治療薬の探索などに活用可能な試験系として大きく期待されている³⁾。近年、モデル動

物で有効であった薬剤がヒトでの臨床試験では無効であった例が多数報告されている⁴⁾。このような事情からも、iPS細胞は今後ますます、ヒトでの薬効や副作用を予測できる必須なツールとなっていくことが予想される。今回、患者由来iPS細胞を用いた研究の事例として、京都大学iPS細胞研究所との共同研究の成果を紹介する。

FOP患者由来iPS細胞を用いたFOP病態の解明

1. 進行性骨化性線維異形成症 (FOP) とは？

筆者らは、患者由来iPS細胞を用いることにより、FOP (Fibrodysplasia Ossificans Progressiva、進行性骨化性線維異形成症) の病態解析を行ってきた⁵⁻⁷⁾。FOPは、罹患率は約200万人に1人とされ、本邦での患者数は70-80人程度と考えられている非常に稀な遺伝子疾患である。臨床的には、筋、筋膜、腱、靭帯といった通常は骨が形成されない軟部組織に小児期から徐々に骨化巣が出現する、進行性の異所性骨化を特徴とする⁸⁾。また、外傷や外科的侵襲、感染などの炎症を惹起するエピソードにより骨化が劇的に進行する“フレアアップ”と称される現象が起こることが本疾患の特徴である。異所性骨の出現には強い痛みや炎症が伴い、また患者は脊柱、胸郭、四肢関節等の可動性が失われ、その結果、開口や喀痰排出や運動など、日常生活における動作が著しく障害される。BMP (Bone Morphogenetic Protein、骨形成因子) のI型受容体の1つであるACVR1の経配偶子性点突然変異がFOPの原因であることが2006年に報告されている⁹⁾。この変異の存在により、ACVR1がリガンドであるBMPの非存在下でも恒常的に活性化される、またはBMPによって過剰に活性化されることがFOPの病因であると考えられてきた。

*1 京都大学 iPS細胞研究所 民間等共同研究員

現所属: 大日本住友製薬株式会社 研究本部 疾患iPS創薬ラボ

*2 現所属: 大日本住友製薬株式会社 研究本部 疾患iPS創薬ラボ

*3 京都大学 ウィルス・再生医科学研究所、大学院医学研究科 兼務

しかしながら、外傷などの炎症を惹起するエピソードで骨化が劇的に進行する“フレアアップ”をうまく説明できないなど、詳細なメカニズムに関してはまだ不明な点が多く、治療薬の開発のためにはさらなる研究が必要であった。FOP患者と同じ変異を持つ遺伝子組み換えマウスの存在も知られていたが、出生後致死となることから、ヒトとマウスの病態に種差があることが示唆されていた¹⁰⁾。このような背景からFOP患者由来の組織を用いた解析が有効であると思われたが、外科的手術の刺激により、病状の悪化を引き起こす恐れがあることから、患者の異所性骨化部分からの試料採取は禁忌である。一方、FOP患者由来のiPS細胞は、一度作製すればほぼ無限に増殖することが可能であり、さらに理論的にはほぼすべての細胞に分化できる。このような特徴から、FOPの病態解析研究において患者由来iPS細胞とその分化細胞を活用することには非常に大きなメリットがある。

2. FOP特異的シグナルの同定

筆者らはまず、FOP患者の90%以上で見ついているR206H変異ACVR1 (FOP-ACVR1) を有する患者由来の体細胞からiPS細胞 (FOP-iPSCs) を樹立した。さらに、このiPS細胞から相同組換えによりFOP-ACVR1を野生型に修復した、遺伝子背景が同一のコントロール細胞 (Rescued FOP-iPSC、以下resFOP-iPSCs) を作製した。また、iPS細胞から骨や軟骨の起源細胞の一つである間葉系間質細胞 (induced Mesenchymal Stromal Cells、以下iMSCs) を経由してstep by stepに骨あるいは軟骨を分化誘導する実験系を構築した¹¹⁾。この実験系を用いてFOP-iPSCsからiMSCs (以下、FOP-iMSCs) を作製したところ、これまでに別の実験系で見出されていたBMPシグナルの亢進や骨軟骨への

分化能亢進が再確認された⁶⁾。しかし、FOP-iMSCsにおけるBMPシグナルの亢進はごくわずかであり、一般的なアッセイ条件における骨軟骨への分化能の亢進も顕著ではなかった。

このような背景から、FOPの本質的な原因は上記のBMP応答性の亢進以外にあると着想し、野生型のACVR1には作用しないが、FOP-ACVR1に対してはシグナルをonにする作用を持つリガンドがあるという仮説を立て、BMP同様にTGF- β スーパーファミリーに属するリガンド約30種類について、FOP-iMSCs及びresFOP-iMSCsへのBMPシグナル活性化能を検討した。その結果、本来はTGF- β シグナルを伝達するが、BMPシグナルは伝達しないActivin-Aが、FOP-iMSCsに対してのみBMPシグナルをonにするを見出した⁷⁾ (Fig. 1)。

3. FOP特異的シグナルの*in vitro*での解析

次に「Activin-AがFOP-ACVR1特異的にBMPシグナルを伝達する」という現象が、実際に病態に関与する表現型 (フェノタイプ) に影響するかどうか、*in vitro*で検討を行った。FOPにおける異所性骨化は、まず異所性に軟骨が出現し、続いてこの軟骨が骨組織へと置換される“内軟骨性骨化”という様式で形成される。そこで、骨化の最初のステップである軟骨分化に対するActivin-Aの作用を*in vitro*で解析した。まずは簡易なアッセイ系である2Dの軟骨分化アッセイを用いて、軟骨分化に重要なことがすでに知られているTGF- β 3やBMP-7の作用とActivin-Aの作用を比較検討した。その結果、TGF- β 3はFOP-iMSCsとresFOP-iMSCsではほぼ同様の分化誘導能を示し、BMP-7ではややFOP-iMSCsで分化亢進が認められたのに対し、Activin-AはresFOP-iMSCsと比較しFOP-iMSCsにおいて顕著な軟骨分化誘導能を示した (Fig. 2)。さらに、より成熟し

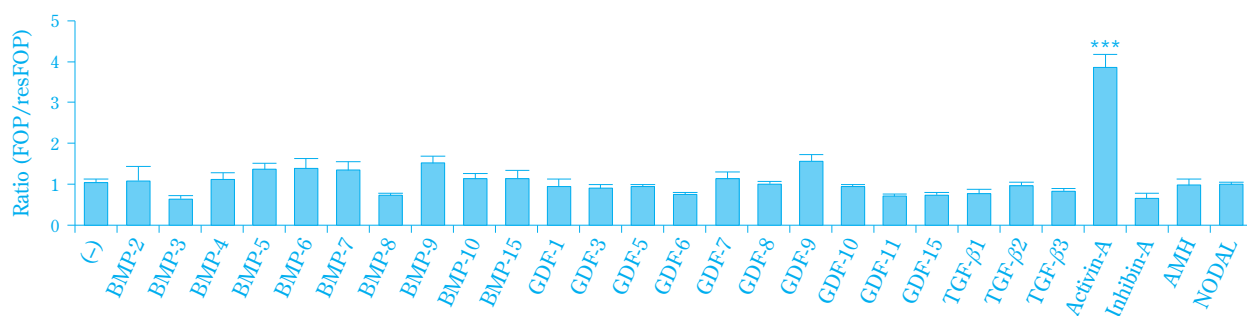


Fig. 1 FOP-ACVR1 specific ligand screening⁷⁾

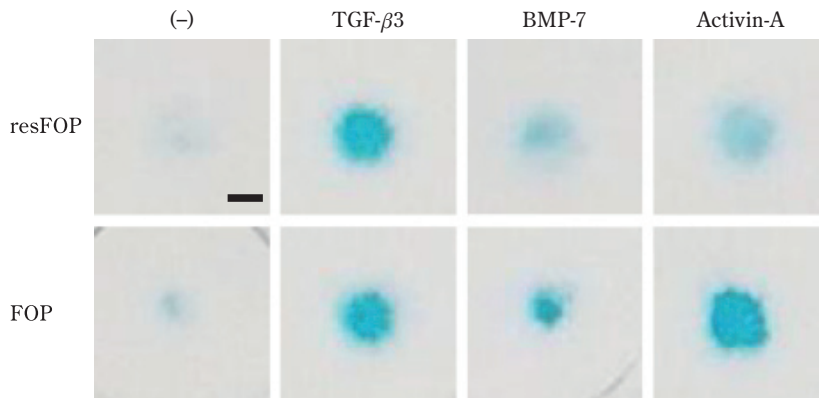


Fig. 2 Enhanced chondrogenesis of 2D chondrogenic micromass of FOP-iMSCs by Activin-A stimulation⁷⁾

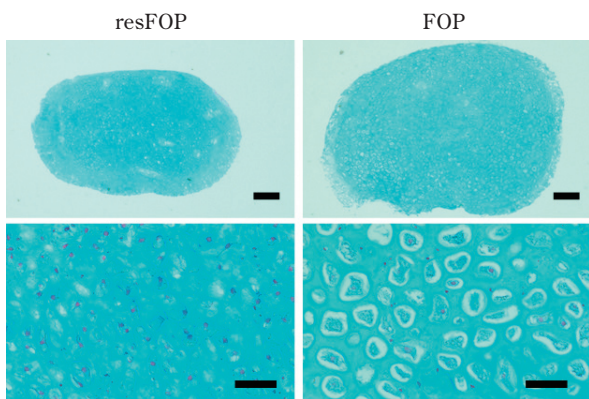


Fig. 3 Enhanced chondrogenesis of 3DCI pellets of FOP-iMSCs by Activin-A stimulation⁷⁾

た軟骨を作製することが可能な3Dの軟骨ペレットアッセイでもActivin-Aの作用を検討したところ、FOP-iMSCs由来の軟骨ペレット内の細胞は肥大軟骨細胞の像を呈しており、より成熟した軟骨へと分化していることがわかった (Fig. 3)。また、GAG/DNA比 (軟骨基質であるグリコサミノグリカン量とDNA量の比であり、この値が高いほど軟骨分化が亢進していることを示す) やCOL10A1、MMP13及びVEGFAなどの後期の軟骨分化マーカーの発現も同様にFOP-iMSCs由来の軟骨ペレットで高い値を示していた。これらの結果から、*in vitro*において、Activin-AはFOP-iMSCsの軟骨分化を顕著に促進することが示された。

4. FOP特異的シグナルの*in vivo*での解析

最後に*in vivo*でのActivin-Aの作用を検討するため、

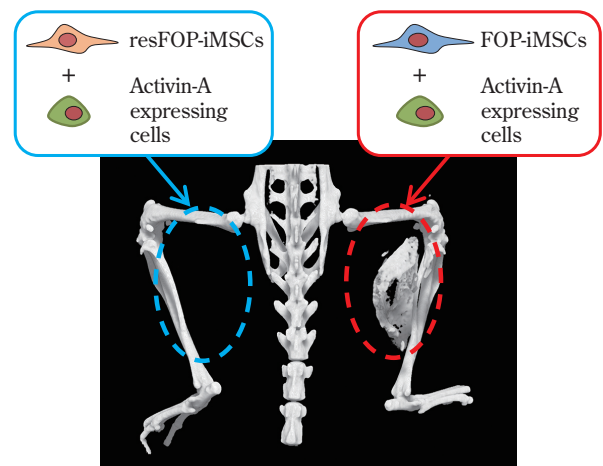


Fig. 4 Transplanted FOP-iMSCs were ossified *in vivo* by Activin-A stimulation

Press conference presentation of Center for iPS Cell Research and Application (CiRA)

FOP-iMSCsあるいはresFOP-iMSCsをDoxycyclineに反応してActivin-Aを産生するC3H10T1/2細胞株と共に免疫不全マウス (NOD/SCID) に移植し、6週間観察した。その結果、FOP-iMSCsを移植し、かつDoxycyclineでActivin-Aを誘導した部位でのみ、顕著な異所性骨が認められた (Fig. 4)。この結果より、Activin-Aが*in vivo*でFOP患者iPS細胞由来の異所性骨形成を促進することが示された。

おわりに

FOP患者由来のiPS細胞を用いた検討により、Activin-AがFOPに特異的なシグナル伝達を惹起すること

を見出した。さらに *in vitro* 及び *in vivo* で異所性骨形成の最初のステップである軟骨分化を Activin-A が強力に促進することを明らかにした。この発見は、これまでの通説を覆す予想外の結果であり、患者由来 iPS 細胞の疾患研究における有用性を示す成果である。また、筆者らの報告とほぼ同時期に、別のグループから FOP-ACVR1 ノックインマウスの異所性骨形成が抗 Activin-A 抗体で抑制されるという報告もされており¹²⁾、FOP 型の変異を導入したマウス個体において Activin-A が病態に関与することが示されている。一方、今回筆者らによって得られた知見は、患者由来細胞を用いた検討であることから、FOP 患者の骨化においても実際に Activin-A が寄与している可能性が高いと考えられる。Activin-A は炎症や創傷に関与するとの報告が多く、フレアアップ時の骨化に実際に寄与している可能性が高い。今回、*in vitro* 及び *in vivo* で FOP 病態を反映した実験系が構築できたことから、iPS 細胞を用いた新規 FOP 治療剤のスクリーニング、ヒット化合物の薬効評価を進めていきたいと考えている。

謝辞

本研究は、京都大学 iPS 細胞研究所 戸口田 淳也 教授及び池谷 真 准教授と大日本住友製薬株式会社との共同研究で成し得た成果であり、日野及び堀込の派遣先である京都大学にて行われました。また、本研究に用いた iPS 細胞樹立のために、ご協力頂きました患者様とご家族の皆様には厚く御礼申し上げます。最後になりますが本研究において多くのご支援を頂いた共同研究者の先生方に厚く御礼申し上げます。

引用文献

- 1) K. Takahashi and S. Yamanaka, *Cell*, **126**, 663 (2006).
- 2) K. Takahashi, K. Tanabe, M. Ohnuki, M. Narita, T. Ichisaka, K. Tomoda and S. Yamanaka, *Cell*, **131**, 861 (2007).
- 3) Y. Shi, H. Inoue, J. C. Wu and S. Yamanaka, *Nature reviews Drug discovery*, **16**, 115 (2017).
- 4) S. Aggarwal and M. Cudkowicz, *Neurotherapeutics*, **5**, 516 (2008).
- 5) Y. Matsumoto, Y. Hayashi, C. R. Schlieve, M. Ikeya, H. Kim, T. D. Nguyen, S. Sami, S. Baba, E. Barruet, A. Nasu, I. Asaka, T. Otsuka, S. Yamanaka, B. R. Conklin, J. Toguchida and E. C. Hsiao, *Orphanet J. Rare Dis.*, **8**, 190 (2013).
- 6) Y. Matsumoto, M. Ikeya, K. Hino, K. Horigome, M. Fukuta, M. Watanabe, S. Nagata, T. Yamamoto, T. Otsuka and J. Toguchida, *Stem Cells*, **33**, 1730 (2015).
- 7) K. Hino, M. Ikeya, K. Horigome, Y. Matsumoto, H. Ebise, M. Nishio, K. Sekiguchi, M. Shibata, S. Nagata, S. Matsuda and J. Toguchida, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **112**, 15438 (2015).
- 8) E. M. Shore and F. S. Kaplan, *Nature reviews. Rheumatology*, **6**, 518 (2010).
- 9) E. M. Shore, M. Xu, G. J. Feldman, D. A. Fenstermacher, T. J. Cho, I. H. Choi, J. M. Connor, P. Delai, D. L. Glaser, M. LeMerrer, R. Morhart, J. G. Rogers, R. Smith, J. T. Triffitt, J. A. Urtizberea, M. Zasloff, M. A. Brown and F. S. Kaplan, *Nat. Genet.*, **38**, 525 (2006).
- 10) S. A. Chakkalakal, D. Zhang, A. L. Culbert, M. R. Convente and R. J. Caro, *J. Bone Miner. Res.*, **27**, 1746 (2012).
- 11) M. Fukuta, Y. Nakai, K. Kirino, M. Nakagawa, K. Sekiguchi, S. Nagata, Y. Matsumoto, T. Yamamoto, K. Umeda, T. Heike, N. Okumura, N. Koizumi, T. Sato, T. Nakahata, M. Saito, T. Otsuka, S. Kinoshita, M. Ueno, M. Ikeya and J. Toguchida, *PloS ONE*, **9**, e112291 (2014).
- 12) S. J. Hatsell, V. Idone, D. M. A. Wolken, L. Huang, H. J. Kim, L. Wang, X. Wen, K. C. Nannuru, J. Jimenez, L. Xie, N. Das, G. Makhoul, R. Chernomorsky, D. D'Ambrosio, R. A. Corpina, C. J. Schoenherr, K. Feeley, P. B. Yu, G. D. Yancopoulos, A. J. Murphy and A. N. Economides, *Science translational medicine*, **7**, 303ra137 (2015).