

日本医療研究開発機構 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 細胞の利活用促進・難病研究加速プログラム
事後評価報告書



I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) 難治性骨軟骨疾患に対する革新的 iPS 創薬技術の開発と応用

(英語) Development and application of innovative drug-screening technology using patient derived iPS cells for intractable bone and cartilage diseases

研究開発実施期間: 平成29年8月31日～令和5年3月31日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 戸口田 淳也

(英語) Junya Toguchida

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:

(日本語) 京都大学・iPS細胞研究所・特定拠点教授

(英語) Kyoto University, Center for iPS Cell Research and Application, Project-specific Professor

II 研究開発の概要

骨及び軟骨組織は運動器を構成する主たる組織であり、その病態はADLの維持に著しい影響を与える。数多くの遺伝性病態が存在するが、その大部分で有効な治療法が存在していない。本事業の目的は、遺伝性骨・軟骨疾患特異的 iPS 細胞を活用して、病態を解明し創薬へと展開することであり、そのためにまず多方面からの新規技術を用いた革新的な病態再現システムを開発し、それを応用して各疾患に対する解析を進めた。

まず骨疾患に対する病態評価法として、iPS細胞から短期間かつワンステップで骨細胞へと分化誘導する方法を確立した。そして短期間で誘導できる利点を活用して、共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いて分化過程を経時的に観察することに成功し、疾患 iPS 細胞を用いて骨基質形成過程の異常を可視化できる方法を確立した(Kawai, Nat Biomed Eng, 2019)。更にコラーゲンをを用いた三次元培養により、骨芽細胞から骨細胞へと分化する過程の可視化にも成功し、単一細胞遺伝子発現解析により、樹立したワンステップ誘導法は膜性骨化の過程を模していること、そして骨芽細胞から骨細胞への分化過程に TGF β シグナルが重要な役割を果たしていることを見いだした(Kawai, Sci Rep, 2022)。更に関連した技術開発として骨疾患での病的骨リモデリングの過程の *in silico* 実験を可能とする新しいシミュレーション基盤を構築し(Kim J, Biotech Bioeng, 2022)、旋回培養法を用いて骨芽細胞の3次元スフェロイドモデルを作製し、細胞凝集による骨細胞分化誘導法を開発した(Kim J, BBRX, 2022)。また変異細胞より産生されたコラーゲンを定性的に評価する方法として、ラマン分光法を試みた。

軟骨疾患に対する病態評価法として、*in vitro* と *in vivo* の技術を併用して iPS 細胞より作製した成長板類似組織の形成を目指した。まず iPS 細胞由来の軟骨細胞により *in vivo* で成長板組織の形成が可能であることを報告し

(Kimura, Osteoarthritis Cartilage, 2018)、次に体節から硬節を経た細胞によって安定して再現できることを報告 (Matsuda, Nature, 2020)、さらに T3 を用いることで肥大軟骨細胞まで誘導する方法を樹立報告した (Yann, Stem Cell Rep, 2020)。そして軟骨分化段階の初期及び中期の細胞を移植することで、それぞれ成長板類似組織及び内軟骨性骨形成過程を模した組織が作製可能であることを報告した (Kamakura, JBMR Plus, 2023)。更に事業の経過中に派生した新技術として、硬節から肥大軟骨細胞までの分化誘導系を全自動細胞培養システムを用いて実施するプログラムの樹立に成功した (投稿中)。以上の新規評価法を用いて各疾患の解析を行った。

まず代表的な遺伝性骨疾患である骨形成不全症に関しては、樹立したワンステップ誘導法を用いた解析で既知の治療薬候補の有効性を示し、創薬プラットフォームとしての有用性を確認した (Kawai, Nat Biomed Eng, 2019)。分担機関においても同方法を用いて分子シャペロンの治療薬としての有効性を示し報告した (Takeyari, JBC, 2021)。更に前駆細胞である間葉系幹細胞を標的とした創薬スクリーニングにより候補薬を同定し、骨形成不全症モデルマウスを用いて *in vivo* での有効性を確認した (投稿準備中)。また疾患の特徴の一つである歯芽形成不全に対する取組みとして患者由来 iPS 細胞から象牙細胞を誘導し、石灰化能の低下を再現することに成功した。TGF β の変異を原因とするカムラチ・エンゲルマン病 (CED) に対しては、標的細胞を間葉系幹細胞として解析を行い、活性型 TGF β の産生が亢進していることを示し、組織工学研究者との共同研究により TGF β の骨髓内徐放により病態が再現されること、そして類似の病変が変異細胞の骨髓内移植によっても再現されることを見いだした (投稿準備中)。またゲノム解析から新規の原因遺伝子の同定に成功、当該患者から樹立した iPS 細胞を用いて病態再現に成功した (投稿中)。本事業の特徴の一つである多因子疾患である後縦靭帯骨化症に対しては、患者会の協力のもと、遺伝性因子の強いと想定される同胞発症患者より樹立した iPS 細胞を用いた解析を行い、間葉系幹細胞を介した分化誘導法において、骨分化能が亢進していること、その亢進に特定の増殖因子のシグナルが関与していること、更に生体に存在する化合物により、骨化が抑制されることを見だし、ゲノム情報が関与していることを示す結果を得た (投稿中)。このように各骨疾患に関して適切な標的細胞と分化誘導系を用いることで、病態を再現し創薬につながるアッセイ系を構築できることを示すことができた。

軟骨疾患に関しては、成長板の形成異常を特徴とする三疾患を対象とした。まず COL2A1 遺伝子の変異を原因とする II 型コラーゲン病の一つである先天性脊椎骨端異形成症 (SEDC) に関しては、樹立した分化誘導系を用いた病態再現に加えて、この疾患群の課題の一つである遺伝子型と表現型の関連性を解析するために、同一ゲノム背景の細胞に異なる変異を導入した細胞を作製し分化能を比較した。その結果、各患者の臨床症状と関連した表現型が再現され、遺伝子型が病態を決定することを示す結果が得られた (投稿準備中)。MATN3 遺伝子の変異を原因とする多発性骨端異形成症 (MED) 及び COL10A1 遺伝子の変異を原因とするシュミット型骨幹端軟骨異形成症 (MCDS) に対しては肥大軟骨細胞まで誘導する方法を用いて病態解析を行った。それぞれの疾患でミスセンス変異あるいはフレームシフト変異を有する細胞を解析したところ、いずれも変異遺伝子より産生された変異ペプチドが ER に蓄積する病態が観察され、それに伴い heat shock protein 等の unfolded protein response に関連した遺伝子群の発現が亢進することを見いだした。そして分子シャペロン等の治療薬候補の効果が各変異で異なることを報告した (Yann, Stem Cell Rep, 2020)。更に MCDS に関しては、永年、未解決であったヒト軟骨細胞における X 型コラーゲンの役割を解明するために、COL10A1 遺伝子の完全欠損 iPS 細胞を作製し、*in vitro* と *in vivo* の解析を行うことで、ヒト細胞においても X 型コラーゲンは成長板構造の形成及び内軟骨性骨化に必須ではないことを明らかにし、MCDS に対して遺伝子発現抑制治療が治療法の候補となることを示した (Kamakura, JBMR Plus, 2023)。

以上の研究活動を拠点全体として遂行するために、各年度において担機関の研究者及び連携企業を含む事業参加者による拠点運営会議を対面及び WEB で開催し、研究者間の交流・情報交換に努めた。また先行事業において、同一拠点内で活動を実施した骨格筋研究者との交流として「筋疾患に対する治療薬の創出を目指した研究」拠点との合同カンファレンスを実施し、CED に関しては疾患由来 iPS 細胞を提供し骨格筋病態に関する共同研究を行った。

患者さんを含む一般社会への研究内容紹介等の広報活動として 2018 年 1 月 22 日に iPS 細胞研究所が主催す

る「iPS 創薬に関するオープンカフェ」において「iPS 細胞が支えるくすりの研究：iPS 細胞を使って「ホネ」の病気に挑む！」の講演を実施、2022 年 12 月 3 日に大阪市難病患者療養相談会主催の講演会で「iPS 細胞が切り拓く難病治療 ～夢の治療の実現に向けて～」を講演、そして 2023 年 3 月 17 日に iPS 細胞研究所が主催した市民公開講座「iPS 細胞を活用した骨格筋・骨・軟骨疾患への創薬研究：現状と未来」において「患者さん由来の iPS 細胞を使った骨軟骨疾患の研究」の講演を行った。

総括として、臨床現場に届くまでには至らなかったが、骨及び軟骨疾患を対象とした iPS 細胞を活用した病態解明から創薬へのプラットフォームの確立には成功し、当該分野の研究者の今後の研究に資する成果があげられたと考える。

Bone and cartilage tissues are main components of the locomotive system, impairment of which will cause profound effects on activities of daily living (ADL). Despite the large number of genetic disorders affecting bone or cartilage tissues, no effective treatments are available for most of the diseases in question. The purpose of this project is to disclose the pathomechanism and discover drugs for hereditary bone and cartilage diseases using disease-specific induced pluripotent stem cells (iPSCs). At first we develop innovative disease recapitulation systems using new technologies of various scientific fields and then apply them for the analyses of each disease.

As for the evaluation system for bone diseases, we established one step differentiation method and succeeds to visualize the process of bone-like nodule formation by time-lapse imaging using confocal laser scanning microscope. In addition, the transition process from osteoblast to osteocytes was also visualized using 3D culture system in collagen gels and single cell RNA sequence analyses demonstrated that the process of one step method mimicked the membranous ossification process. For the evaluation system for cartilage diseases, we aimed to create growth-plate like structures by the combination of in vitro and in vivo methods. Cartilage cells were successfully induced via sclerotome, from which hypertrophic chondrocytes were further induced using T3. Transplantation of induced chondrocytes produced tissues showing growth-plate like structure indicating that the established method is applicable for the diseases affecting the growth plates. iPS cells established from patients with target diseases and mutation rescued iPS cells were analyzed using these new evaluation systems.

In the case of osteogenesis imperfecta, the effect of candidate drugs was clearly demonstrated using one-step induction method, validating the efficacy of this method. The method was also useful to show the effect of chemical chaperone. In the case of ossification of posterior longitudinal ligament, we analyzed mesenchymal stem cells induced by the multistep method, which showed high osteogenic differentiation properties. Genotype-phenotype correlation of type II collagen diseases including spinoepiphyseal dysplasia congenita was clearly demonstrated using iPS cell with an identical genetic background except specific mutations in the COL2A1 gene. Accumulation of mutant peptides created by missense or frame-shift mutations of MATN3 gene or COL10A1 gene were demonstrated in ER of hypertrophic chondrocytes induced from iPS cells of multiple epiphyseal dysplasia or metaphyseal chondrodysplasia Schmidt type, inducing the upregulation of unfolded protein responses. In addition, we demonstrated that type X collagen is dispensable for the formation of growth plates using COL10A1-deficient iPSCs.

As for the public relation activity, we folded several open forums to inform our project and broaden the knowledge of iPSCs.

In summary, we have established new platforms for disease-modeling using disease-specific iPSCs derived from hereditary bone and cartilage diseases, which will be useful for researchers in this field.