

## 総括研究報告書

1. 研究開発課題名：進行性骨化性線維異形成症患者由来 iPS 細胞を活用して作製した異所性骨形成モデルマウスによる病態進行過程解明および治療薬候補化合物評価
2. 研究開発代表者：国立大学法人京都大学 iPS 細胞研究所 准教授 池谷 真
3. 研究開発の成果

進行性骨化性線維異形成症 (FOP) は、小児期より筋、腱、靭帯等の線維性結合組織内に徐々に骨化巣が出現する疾患である。原因遺伝子は骨形成因子 (BMP) の I 型受容体の 1 つである ACVR1 の経配偶子点突然変異であり、FOP 型 ACVR1 が BMP シグナルを過剰に伝えることにより異所性骨が形成されると考えられているが、詳細な機序は未だ不明である。われわれはこれまでに、共同研究拠点で樹立した FOP 患者由来 iPS 細胞 (FOP-iPS 細胞) を用いて、以下の重要な発見および技術開発を行った。

1. 独自開発した分化誘導法を適用し、FOP-iPS 細胞から骨軟骨前駆細胞の作製に成功。さらに *in vitro* 病態再現にも成功。
2. FOP 型 ACVR1 が BMP シグナルを過剰に伝える機序として、本来 TGF $\beta$  シグナルを伝える分子であるアクチビン A が FOP 型 ACVR1 を介して BMP シグナルを伝えることを発見。
3. FOP-iPS 細胞から作製した骨軟骨前駆細胞を、アクチビン A 発現細胞と共に免疫不全マウスに移植し、異所性骨形成モデルマウスの作製に成功。

FOP-iPS 細胞を用いて *in vitro* 病態再現に成功しているのは世界でもわれわれのグループのみであり、また、FOP に限らず患者由来 iPS 細胞から分化した細胞をマウスに移植して病態再現に成功した例は世界的に見てほとんど存在しない。また、FOP は患者からの標本採取が禁忌であるため骨化過程の解析は事実上不可能であったが、本申請のモデルマウスによりそれが可能となった。

これらの知見を基盤とし、当該年度は「異所性骨形成モデルマウスの最適化」を開発項目とした。方法としては (1) 移植する骨軟骨前駆細胞の細胞数を再検討し、異所性骨を形成するために必要な骨軟骨前駆細胞の最小の細胞数、アクチビン A 発現細胞の最適な混合割合 (あるいはこれ以下では異所性骨を形成しないという最大数) を検討する予定であったが、さらに実験の精度を上げるために、追加で (2) アクチビン A 発現細胞に替えてアクチビン A 徐放ビーズを移植して異所性骨を誘導する条件の検討を実験に加えた。具体的には、NOD-SCID マウスに FOP 患者由来骨軟骨前駆細胞とアクチビン A を発現する細胞あるいはアクチビン A 徐放ビーズを移植し、6、8、10 週間経過を観察した。観察は単純 X 線を主に用い、最終的な評価には  $\mu$ CT を用いた。

アクチビン A 徐放ビーズは一回投与ではなく、週一回の二回投与、および三回投与を試みた。また移植に用いることのできる最大容量を用いた。しかし結果としては、三回投与群でも異所性骨の形成能はわずかであり、これまでに使用していたアクチビン A 発現細胞との供移植に比べて明らかに弱かったため、徐放ビーズによる異所性骨形成実験は難しいと判断した。

次に、これまで移植に使用してきた骨軟骨前駆細胞の細胞数を減らすことで、異所性骨を形成するために必要な骨軟骨前駆細胞の最小の細胞数、アクチビン A 発現細胞の最適な混合割合 (あるいはこれ以下では異所性骨を形成しないという最大数) を検討した。これまで移植に使用してきた骨軟骨前駆細胞の細胞数を 1/2、1/4 に減らしたところ、1/4 では異所性骨形成が見られない個体が現れ、また 1/2 の場合もこれまでの量に比べると形成される異所性骨の体積が約半分になることがわかった。このことから、最も安定な異所性骨形成の実験系としては、これまでに行ってきた細胞数が最も適当であると判断した。現在、上述の最適化したモデルマウスを用いて異所性骨形成過程を解析するため、移植細胞の継時的標本作製、免疫抗体染色用の抗体の整備を進めている。