



News Release

2023年3月26日
京都大学 iPS 細胞研究所(CiRA)

iMSC による ACVR2B-Fc 融合タンパク質の送達は 進行性骨化性線維異形成症モデルマウスの異所性骨化を抑制する

ポイント

- ACVR2B-Fc 融合タンパク質^{注1)}を安定発現する iMSC^{注2)} (iMSC^{ACVR2B-Fc}) を作製した。
- アクチビン A および BMP-9 を添加することで FOP 細胞が起こす BMP シグナルの異常活性化は、iMSC^{ACVR2B-Fc} の培養上清を添加することで抑制された。
- FOP モデルマウスの異所性骨化は、iMSC^{ACVR2B-Fc} を移植することで抑制された。

1. 要旨

Pan Gao 研究員、[池谷真准教授](#) (CiRA [臨床応用研究部門](#)) らの研究グループは、進行性骨化性線維異形成症 (Fibrodysplasia ossificans progressiva: FOP) の増悪因子である骨形成タンパク質 (Bone Morphogenetic protein, BMP) リガンド^{注3)} およびアクチビンの機能を阻害することができるタンパク質である ACVR2B-Fc を、iPS 細胞から作製した間葉系幹細胞 (iMSCs) に発現させ、さらにこの細胞をモデルマウスに移植することで、FOP 病態を一部改善することができるという結果を得ました。

FOP は、BMP リガンドの I 型受容体^{注4)} の1つである ACVR1 に点突然変異^{注5)} が生じることによって起こる希少難病^{注6)} です。この点突然変異により、リガンド結合を伴わない下流シグナルの活性化と、リガンド結合を伴う異常活性化が起こります。よって、リガンド結合を伴う異常活性化を抑制することは、FOP の病態の進行を阻害する有効な手段の1つとなり得ます。今回の研究では、FOP 変異型 ACVR1 に結合し、下流シグナルを異常活性化するリガンドであるアクチビン A および BMP-9 リガンドの機能を阻害することができるタンパク質である ACVR2B-Fc を、iPS 細胞から作製した間葉系幹細胞 (iMSCs) に発現させ、その細胞そのものと培養上清を研究に使用しました。結果として、限定的ではありますが、培養上清がアクチビンや BMP-9 によるシグナル異常活性化を阻害できるということ、そして ACVR2B-Fc を発現する iMSCs が異所性骨化を抑制するということを、細胞を使った実験系とモデルマウスを使った実験系の両方で示しました。

今回の方法による異所性骨化の抑制効果は、今後の FOP 治療開発に新たな視点を提供すること可能性が期待されます。

この研究成果は 2024 年 3 月 18 日に「Stem Cell Research & Therapy」で公開されました。

2. 研究の背景

FOP とは、筋肉組織など本来骨ができない組織中に異所性に骨が生じる遺伝性の希少難病です。原因遺伝子として、BMP の I 型受容体である ACVR1 という遺伝子の点突然変異が同定されています。

これまでの研究で、BMP リガンドおよびそのファミリー分子^{注7)}であるアクチビンが FOP 変異型 ACVR1 に結合し、BMP シグナルを異常に強く伝達することが分かっていました(CiRA ニュース 2015 年 12 月 1 日)。また、II 型受容体^{注4)}である ACVR2A または ACVR2B の細胞外ドメイン^{注8)}のみを免疫グロブリンの Fc 領域^{注1)}と融合させたタンパク質である ACVR2A-Fc 融合タンパク質または ACVR2B-Fc 融合タンパク質は、アクチビンや複数種類の BMP リガンドが受容体複合体^{注4)}に結合することを阻害する能力があることが分かっていました。

今回、研究グループは、健常人から作製した iPS 細胞から誘導した iMSC に ACVR2B-Fc 融合タンパク質を強制発現させました。そして、その細胞 (iMSC^{ACVR2B-Fc}) に異所性骨化を抑える効果があることを FOP 患者さん由来 iPS 細胞と FOP モデルマウスの両方で確認しました。

3. 研究結果

1) ACVR2B-Fc 融合タンパク質を発現する iMSC の作製

ピューロマイシン耐性遺伝子と ACVR2B-Fc を iMSC に導入しました (iMSC^{ACVR2B-Fc}) (Fig.1A)。コントロール細胞として、EGFP とピューロマイシン耐性遺伝子を iMSC に導入した細胞 (iMSC^{Control}) を作製しました。それぞれ 1 μg/ml のピューロマイシン^{注9)}で 7 日間処理することで、遺伝子が導入されていない細胞と分離しました。iMSC^{ACVR2B-Fc} でのみ ACVR2B-Fc タンパク質が発現していることを、ウェスタンブロッティング^{注10)}により確認しました (Fig.1B)。

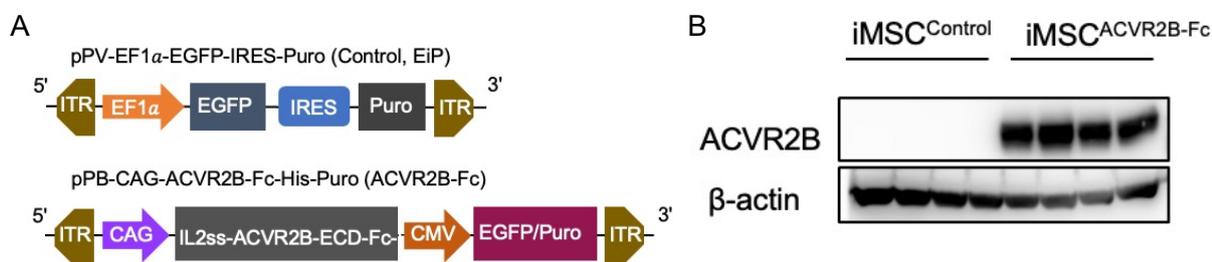


Fig.1 ACVR2B-Fc 融合タンパク質発現ベクターの構造とウェスタンブロッティングによる発現確認

A. コントロールベクター (pPV-EF1α-EGFP-IRES-Puro) と ACVR2B-Fc 融合タンパク質発現ベクター (pPB-CAG-ACVR2B-Fc-His-Puro) の構造の模式図。

B. ACVR2B 抗体によるウェスタンブロッティングを行い、培養上清中に ACVR2B-Fc タンパク質が分泌されていることを確認した。

2) iMSC^{ACVR2B-Fc} の培養上清は、アクチビンおよび BMP-9 による FOP-iMSC の BMP シグナル異常活性化を阻害した

研究グループは FOP 患者さん由来 iPS 細胞と、その細胞の変異遺伝子を修復した iPS 細胞を作製しており、またこれらの細胞からそれぞれ iMSC を作製していました (FOP-iMSC および resFOP-iMSC) ([CiRA ニュース 2015 年 3 月 13 日](#))。この FOP-iMSC および resFOP-iMSC に、BMP シグナルの活性化を検出できるベクター (BRE-Luc レポーターベクター) を導入し、そこにアクチビン A を添加して、FOP-iMSC では BMP シグナルが活性化すること、および resFOP-iMSC では BMP シグナルが活性化しないことを確認しました (Fig.2A)。さらに、iMSC^{ACVR2B-Fc} の培養上清を加えることで、アクチビン A で活性化された FOP-iMSC の BMP シグナルが抑制されることを確認しました。同様の実験を BMP リガンドの1つである BMP-9 でも実施し、こちらでは BMP-9 添加により FOP-iMSC と resFOP-iMSC の両方で BMP シグナルが活性化すること、および iMSC^{ACVR2B-Fc} の培養上清を加えることで活性化した BMP シグナルが抑制されることを確認しました (Fig.2B)。

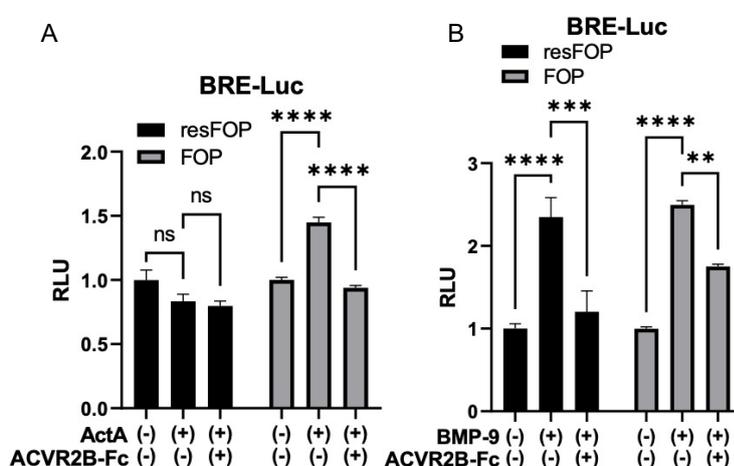


Fig.2 iMSC^{ACVR2B-Fc} の培養上清はアクチビンおよび BMP-9 による BMP シグナルの活性化を抑制した

FOP-iMSC と resFOP-iMSC に BMP シグナル活性化を検出できるルシフェラーゼレポーターベクター (BRE-Luc) を遺伝子導入し、さらにアクチビン A (ActA)、BMP-9 (BMP-9)、iMSC^{ACVR2B-Fc} の培養上清 (ACVR2B-Fc) を加え、その後ルシフェラーゼ活性を検出した。アクチビン A によって誘導される FOP-iMSC における BMP 異常活性化が iMSC^{ACVR2B-Fc} の培養上清により抑制されること (A)、および BMP-9 によって誘導される resFOP-iMSC と FOP-iMSC における BMP 活性化が iMSC^{ACVR2B-Fc} の培養上清により抑制されること (B) が確認された。

3) iMSC^{ACVR2B-Fc} の投与により FOP マウスモデルの異所性骨化が抑制された

生体での機能を調べるため、研究グループがこれまでの研究で作製していた FOP モデルマウス ([CiRA ニュース 2017 年 8 月 1 日](#)) に、iMSC^{ACVR2B-Fc} を投与する実験を行いました。0日目から FOP 変異型 ACVR1 を全身に発現させ、1週間後にカルディオトキシン (CTX)^{注1)} を右腓腹筋に注射して筋肉を損傷させ異所性骨化を誘導しました (Fig.3A)。8日目から、 1.5×10^6 個の iMSC^{ACVR2B-Fc} および iMSC^{Control} をカルディオトキシン注射部位 (Local) または腹腔内 (i.p.) に、5日ごとに投与しました。28日目に全身麻酔下で X 線および μ CT スキャンで異所性骨化の形成を観察しました。結果として、iMSC^{ACVR2B-Fc} の投与は、

基礎培地 (α MEM) または $iMSC^{Control}$ の局所注射と比較して、異所性骨化が抑制されました (Fig.3B, C)。また、運動機能を比較すると、 $iMSC^{ACVR2B-Fc}$ を局所投与されたマウスは、トレッドミル^{注12)} で最も長い距離を走りました (Fig.3D)。しかし、ロタロッド^{注13)} ではグループ間に差はありませんでした (Fig.3E)。

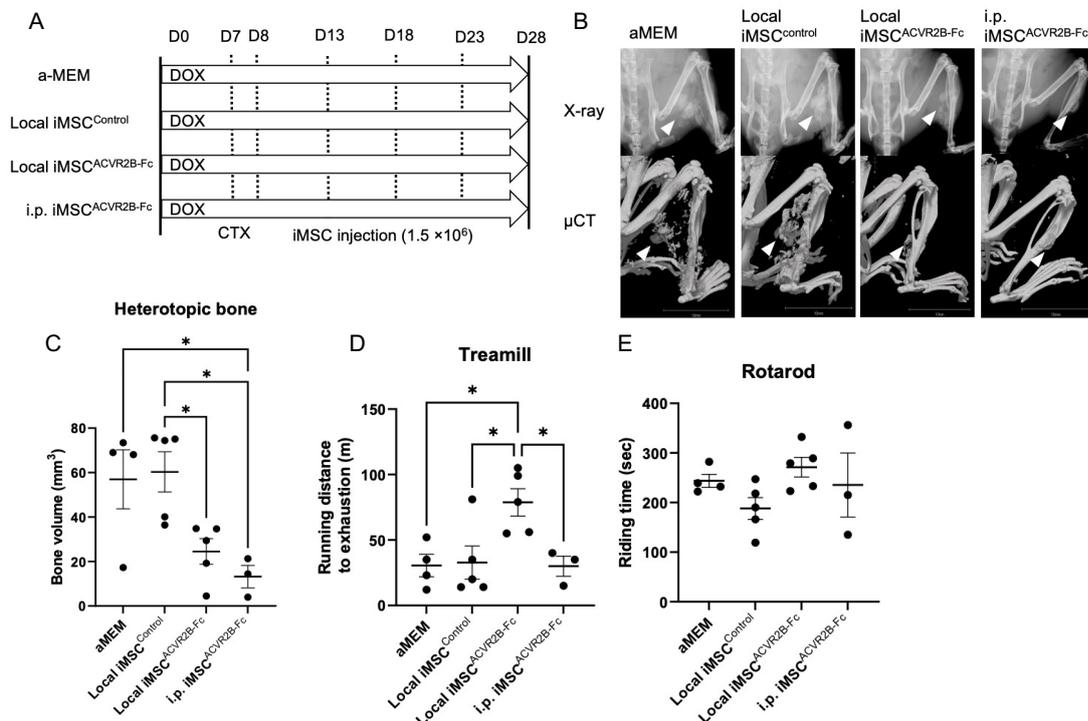


Fig. 3 $iMSC^{ACVR2B-Fc}$ 投与は FOP マウスモデルの異所性骨化を抑制する

A. 投与スケジュール。B. X線写真と μ CT写真。C. μ CT解析から得られた骨量の比較。
D. トレッドミルによる運動機能の比較。E. ロタロッドによる運動機能の比較。

4) $iMSC^{ACVR2B-Fc}$ の投与により外科的除去後の再骨化をわずかに抑制した

FOP 患者に対する異所性骨除去などの外科的介入は、手術部位だけでなく全身性に病態が進行するため禁忌とされています。今回研究者らは、外科的除去後の再骨化に対する $iMSC^{ACVR2B-Fc}$ の抑制効果を、FOP モデルマウスを使って調べました (Fig.4A)。実験開始から 21 日目に誘導された異所性骨の量を μ CT で記録し、可能な限り外科的に切除した後、手術直後の残留異所性骨の量を μ CT で記録しました (Fig.4B, C)。次にマウスを 1) 基礎培地投与群 (α MEM)、2) $iMSC^{Control}$ 投与群、および 3) $iMSC^{ACVR2B-Fc}$ 投与群の 3 グループに無作為に分け、22 日目からそれぞれを腹腔内に投与 (i.p.) しました。細胞は 3×10^6 細胞を使用し、4 日ごとに 3 回注射しました。35 日目に、すべてのマウスの異所性骨量を μ CT と X 線により評価したところ、 $iMSC^{Control}$ を投与したマウスは、基礎培地を投与したグループと同様の再骨化を示したのに対し、 $iMSC^{ACVR2B-Fc}$ を投与したマウスでは、他の 2 グループのマウスと比較して再骨化の量がわずかに減少していましたが、この差は統計的に有意ではありませんでした。

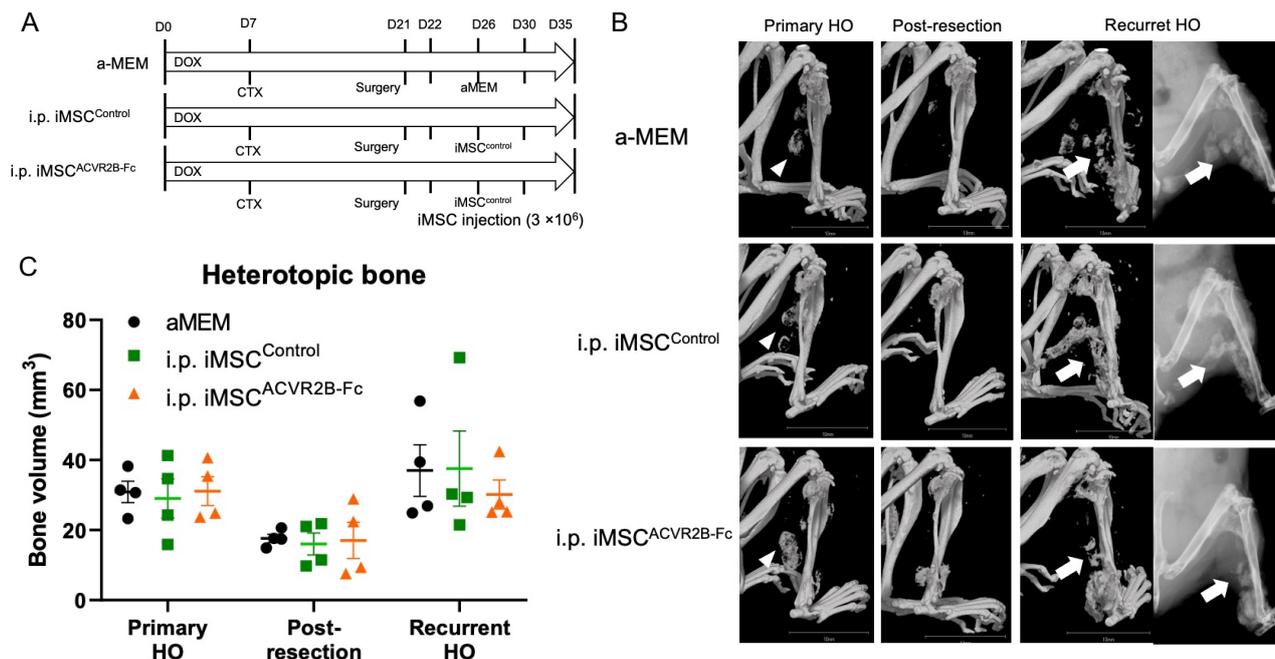


Fig. 4 iMSC^{ACVR2B-Fc} 投与は FOP マウスモデルの再骨化をわずかに抑制する
 A. 投与スケジュール。B. X線写真とμCT写真。C. μCT解析から得られた骨量の比較。

4. まとめと展望

研究者らは今回、ACVR2B-Fcを発現するiMSCを作製し、培養上清中に分泌されたACVR2B-FcがアクチビンAおよびBMP-9で異常活性化されたBMPシグナルを抑制できることを示しました。さらにモデルマウスを使い、ACVR2B-Fc発現iMSCに異所性骨化の抑制効果があることを示しました。異所性骨の抑制効果、運動機能、移植されたiMSCの生存率などにまだ向上の余地があり、さらなる改善が求められますが、本研究で得られた知見は、ACVR2B-Fc融合タンパク質がFOPの治療薬候補であり、この治療タンパク質の送達方法としてiMSCが有効であることを示しています。

5. 論文名と著者

○ 論文名

“iMSC-mediated delivery of ACVR2B-Fc fusion protein reduces heterotopic ossification in a mouse model of fibrodysplasia ossificans progressiva”

DOI: <https://doi.org/10.1186/s13287-024-03691-7>

○ ジャーナル名

Stem Cell Research & Therapy

○ 著者

Pan Gao^{1,2}, Yoshiko Inada¹, Akitsu Hotta¹, Hidetoshi Sakurai¹, Makoto Ikeya^{1*}

○ 著者の所属機関

1. 京都大学 iPS 細胞研究所(CiRA)
2. 四川大学華西口腔医学院

* 責任著者

6. 本研究への支援

本研究は、以下の支援を受けて実施されました。

- 日本医療研究開発機構 (AMED)
「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」(JP15bm0104001)
「再生医療実現拠点ネットワークプログラム 再生・細胞医療・遺伝子治療研究開発課題」
(JP22bm1123006)
「再生・細胞医療・遺伝子治療実現加速化プログラム 再生・細胞医療・遺伝子治療研究中核拠点」(23bm1323001h0001)
- 京都大学教育研究振興財団
- 公益財団法人ひょうご科学技術協会 (#5024)
- iPS 細胞研究基金
- 中国国家留学基金 (202008510007)

7. 用語説明

注 1) Fc 融合タンパク質

抗体の定常領域の一部である Fc 領域と、機能をもった別のタンパク質の一部を融合したタンパク質。融合することにより、血液の中で分解される速度が遅くなることが期待される。

注 2) iMSCs

間葉系幹細胞は、成体内に存在する幹細胞の一種で、骨や軟骨、脂肪などに分化する能力がある。これを iPS 細胞から誘導したものが iPS 細胞由来間葉系幹細胞 (iMSC)。

注 3) リガンド

受容体と複合体を形成して、シグナルを伝える物質。

注 4) 受容体

細胞外からやってくる様々なシグナルを受け取って、選択的に細胞内に伝えるタンパク質。BMP の受容体は I 型受容体、II 型受容体があり、それぞれ 2 分子ずつの 4 分子と、BMP リガンドが結合して受容体複合体を形成し、シグナルを細胞内に伝える。

注 5) 点突然変異

遺伝物質である DNA のヌクレオチド塩基 (A、T、G、C) のうち、一箇所だけ別の塩基に置き換わってしまう変異のこと。

注 6) 希少難病

治療法が確立されていない病気 (難病) の中でも、特に患者さんの数が少ない病気。

注 7) ファミリー分子

似た構造をもち、進化の過程で共通のタンパク質から派生して生まれたと考えられるタンパク質をまとめたグループのこと。

注 8) 細胞外ドメイン

タンパク質は機能を持ったドメインと呼ばれるまとまりが複数集まって構成されている。中でも、細胞膜の外側に存在しているドメインを細胞外ドメインと呼ぶ。BMP やアクチビンなどの細胞外から来た情報を受け取る機能がある。

注 9) ピューロマイシン

抗生物質の一種。タンパク質の合成を阻害して細胞の働きを止めてしまう。細胞に目的の遺伝子を導入する際に、ピューロマイシン耐性遺伝子を一緒に導入することで、目的遺伝子を持った細胞のみを選び出す事ができる。

注 10) ウェスタンブロッティング

たくさんのタンパク質が混ざった状態のサンプルから、タンパク質を分離した後に、抗体を使って特定のタンパク質を検出する方法。

注 11) カルディオトキシン

コブラ毒の主成分。骨格筋を脱分極させることで、壊死を引き起こす。

注 12) トレッドミル

ルームランナーのように、ベルトが動くことで走行を測る装置。

注 13) ロタロッド

回転する棒の上にマウスをのせて徐々に速度を上げ、マウスが落下するまでの時間を測定する装置。協調運動を測定することができる。