

論文の内容の要旨

論文題目 ゲノム編集による軟骨無形成症特異的 iPS 細胞を用いた軟骨細胞分化の評価

氏名 堀江 尚弘

軟骨無形成症 (Achondroplasia; ACH) は軟骨内骨化の障害に起因する四肢短縮型低身長、水頭症、脊髄圧迫、中耳炎、歯列不正などの症候を呈する先天疾患であり、*FGFR3* 遺伝子の gain of function が原因で生じる事が判明している。同変異の受容体への影響については諸説あり、受容体の内在化の阻害や、ユビキチン化の阻害によるリソソームでの分解の遅延が、シグナルの異常な活性化を引き起こすこと等が報告されている。

こうした、異常に活性化されたシグナルが軟骨細胞に与える影響として、*FGFR3* の下流シグナルである、MAPK 経路に存在する ERK や p38 が軟骨細胞の増殖、基質形成、肥大軟骨細胞への分化を抑制し、STAT1 が細胞増殖を抑制することが報告されている。

更に、組織学的特徴については、ヒト胎児、疾患モデルマウスにおいて成長板組織の異常を認めており、ACH 胎児では肥大軟骨細胞層の短縮を、ACH モデルマウスにおいては増殖軟骨細胞層、肥大軟骨細胞層の狭小化を確認している。よって、同疾患のメカニズムとして *FGFR3* シグナルの異常な活性化が、組織学的な所見として肥大軟骨細胞層が短縮することが判明しているのだが、こうしたシグナルの異常が、軟骨組織の異常を生じさせるまでの過程において、障害を受ける軟骨細胞の分化段階が特定されていない。

現在、同疾患の治療方針は主に外科手術であり、例えば低身長に対しては四肢延長術、重度の水頭症に対しては脳室シャント術、脊髄圧迫には減圧術を施行している。但し、これらの治療法は対症療法であり、疾患を根本から治癒させることは出来ない上、病態によっては低年齢の患者に高侵襲な治療を選択しなくてはならない。一方、薬剤を用いた治療法に関しては、成長ホルモンが患者に投与されているのだが、その作用は ACH の症状を根本的に改善するまでには至らない。そのため、疾患の原因に直接作用し得る薬剤も開発されており、これまでに C 型ナトリウム利尿ペプチド (CNP) アナログ、メクロジン、スタチンなどに関する研究報告が認められる。しかし、これらの薬剤は有効性あるいは安全性の確立には未だ至っていない。故に、新たな治療薬候補となる化合物の探索が望まれるが、今のところ、*FGFR3* の変異によるシグナル異常活性化を是正し得る化合物をスクリーニングする為の評価系が存在していない。化合物スクリーニングシステムを構築し、ACH の新たな治療薬を開発する為には、その病態に関する更なる知見が求められる。

病態研究の手法として、人工多能性幹細胞 (Induced Pluripotent Stem cell; iPS 細胞) の応用が挙げられる。応用法としては、患者の組織より疾患特異的 iPS 細胞を樹立し、同細胞に

分化誘導を施すことで、異常がどの分化段階で発現するか、解析可能となる。ただ、希少疾患の場合など、患者から細胞を採取する事が困難な状況に陥ることも考えられる。

同問題を解決する手段の一つとして、疾患モデル細胞をゲノム編集により人工的に作成する事が挙げられる。ゲノム編集技術には clustered regularly interspaced palindromic repeat (CRISPR)/Cas9 や TAL effector nucleases (TALEN)、zinc finger nuclease (ZFN) といった手法があり、同手法は任意の遺伝子の塩基配列を挿入・欠失させる事が出来る。これらのゲノム編集技術の応用により、希少疾患でサンプルが手に入りづらい場合でも、原因となる遺伝子配列が判明していれば、疾患特異的細胞を樹立可能となった。

本研究で採用したゲノム編集は CRISPR/Cas9 システムである。同システムは原核生物の獲得免疫機構を応用したもので、任意の DNA 配列に相補的に結合するガイド RNA (gRNA) 及び、gRNA と複合体を形成し protospacer-adjacent motif (PAM) 配列上流で DNA 鎖を切断する Cas9 より構成されている。更に、切断された DNA が修復される際に鋳型として利用できる Oligo DNA を設計し、gRNA、Cas9 と共に遺伝子導入すると、相同組換えによる任意の塩基配列のノックインが可能となる。TALEN、ZFN システムが、標的遺伝子配列ごとに基質タンパクを設計する必要があるのに対して、CRISPR/Cas9 システムでは gRNA の配列を変更するだけで良いため、実験への応用が比較的容易である。

今回我々は、CRISPR/Cas9 システムを用い、ACH モデル hiPS 細胞の樹立を試みた。gRNA、Oligo DNA、Cas9 タンパク質発現プラスミド DNA を hiPS 細胞にエレクトロポレーションにて共導入し、95 個の細胞クローンを得た。得られたクローン 95 個それぞれに、*FGFR3* のダイレクトシーケンシングを行ったところ、2 種類のクローンに ACH の原因となる 1138G→A のホモ変異が導入されたことが確認された。ACH 患者において最も高頻度に見受けられるのが、*FGFR3* のヘテロ変異である事に対して、ヒトにホモの同変異が挿入されると、実際には致死的な状態に陥るため、ゲノム編集にて樹立した *FGFR3* ホモ変異導入細胞は、ヘテロ変異をもつ ACH 患者にみられる病態よりも、フェノタイプが強く発現していると考えられ、in-vitro の解析に適した細胞だと言える。

研究全体を通じて、実験群としてゲノム編集にて ACH の原因遺伝子を組み込んだ細胞を、対照群にはゲノム編集を試みたが変異が組み込まれなかった細胞を設定した。実験群、対照群とで細胞の形態に明らかな違いは認められず、更に、両群共にテラトーマアッセイにて三胚葉系への分化能を有していた事が確認され、iPS 細胞としての特性を持った細胞であると見なした。

次に、ゲノム編集を施した hiPS 細胞の軟骨細胞への分化誘導実験を行った。軟骨分化誘導の手法としては Oldershaw らの報告を一部改変したものを採用し、分化誘導開始日を 1 日目と数えて、4 日目の細胞を Stage 1 原条/中内胚葉、9 日目を Stage 2 中胚葉、14 日目を Stage 3 軟骨細胞と見なした。

分化誘導 Stage 3 における実験群の *FGFR3* タンパク質発現と ERK のリン酸化は、対照群と比較して上昇していた。また、遺伝子発現については、対照群は軟骨成熟が進むにつれ *FGFR3* 発現が上昇したのに対し、実験群では Stage 3 での *FGFR3* 発現は低下していた。よって、*FGFR3* 遺

伝子発現はネガティブフィードバック機構によって調節されている可能性が示唆された。

また、軟骨マーカー遺伝子に関する検討の分化誘導 Stage 3 (軟骨細胞の段階) において、*COL2* 遺伝子発現は実験群と対照群共に高発現であったが、*IHH* 遺伝子は同分化段階の実験群において対象群よりも低発現だった。*IHH* は前肥大軟骨期より発現する遺伝子である事から、我々の所見より、変異導入細胞において前肥大軟骨細胞分化が障害されていると想定された。

ここで先行研究として、本結果とは反対の状態にあたる *Ihh* 遺伝子発現の亢進が、*Fgfr3* ノックアウトマウスの顎関節で生じ、同部位の軟骨のホメオスタシスが障害される事で、変形性関節症が惹起されたとの報告があり、関連した文献では *Fgfr3* タンパク質の蓄積が無い場合、*ERK* シグナルが低下し、*Ihh* 遺伝子発現は上昇することが述べられている。このように、*FGFR3* 遺伝子発現制御の乱れは *IHH* 発現の異常につながり、成長板軟骨の分化が障害される。故に、生理的な条件において、ネガティブフィードバック機構による *FGFR3* 遺伝子発現の制御が、*IHH* 遺伝子の発現量を適切に調節し、成長板軟骨の正常な分化に寄与している可能性がある。

加えて、テラトーマに形成された軟骨様組織については、実験群細胞由来テラトーマの軟骨様組織はコントロールと比較して細胞密度が高く、基質が少なくなっており、前肥大軟骨細胞分化の障害を反映している事が示唆された。

以上より、我々はゲノム編集により ACH モデル hiPS 細胞を樹立し、同細胞の軟骨細胞への分化誘導・解析を通じて、ACH の軟骨細胞における前肥大軟骨細胞の段階に、障害が発生することを示した。

本研究で樹立した *FGFR3* ゲノム編集 hiPS 細胞に関する将来的な展望として、前肥大軟骨細胞をターゲットとする創薬研究への応用が考えられる。具体的には、軟骨分化誘導 Stage 3 の *FGFR3* 変異導入細胞に対し、抑制されている *IHH* 遺伝子発現を上昇させ、最終的に ACH の前肥大軟骨細胞分化を促進することが期待される、化合物のハイスループットスクリーニングシステムの構築を目指す。

また、このような過程を経て開発する治療薬のうち、前肥大軟骨細胞の段階に選択的に作用し、他の分化段階の軟骨細胞には影響を及ぼさないものを選択することは重要である。本研究より、ACH においては前肥大軟骨細胞の段階に障害が発生すると示された事から、同治療薬は ACH における障害を受けた軟骨細胞に対して特異的に作用することが予想され、高い効力を持ち、安全な用量で投与できると期待される。