

京都大学	博士 (医学)	氏名	川井俊介
論文題目	In vitro bone-like nodules generated from patient-derived iPSCs recapitulate pathological bone phenotypes (iPS細胞からの in vitro 骨様結節形成と骨疾患病態再現への応用)		
(論文内容の要旨)			
<p>骨組織は常に骨形成と骨吸収の過程を繰り返す(骨改変)動的組織である。正常な骨改変過程及びその病的状態を理解する上で、遺伝子改変マウスを用いた <i>in vivo</i> での解析は重要な役割を果たしてきたが、創薬への応用を考えると、<i>in vitro</i> での骨改変過程モデルの構築も重要なアプローチである。</p> <p>本研究では骨形成過程に焦点を絞り、ヒト iPS 細胞を用いて、化合物スクリーニングに適した骨形成過程の <i>in vitro</i> 再現系の構築を試みた。その結果、従来法にレチノイン酸を併用することで、10日間で iPS 細胞から骨前駆細胞、骨芽細胞、そして成熟骨細胞を順次誘導し、骨様組織骨様結節の形成に至る誘導法の開発に成功した。遺伝子発現及び免疫組織染色から、その過程は未分化細胞から、骨前駆細胞、骨芽細胞を経由して成熟骨細胞に至っていることが確認された。また、共焦点顕微鏡を用いたイメージング、タイムラプスイメージングを用いて誘導分化過程の観察を行ったところ、誘導した結節表面には立方上で敷石状に配列した骨芽細胞様細胞を、結節内部には複数の突起を有した樹状の骨細胞様細胞を認め、さらに、骨細胞様細胞が結節表面から内部へ移動する過程を可視化した。また、誘導した骨芽細胞を主体とする誘導7日目の細胞塊は <i>in vivo</i> で膜性骨組織を形成する能力を有していた。</p> <p>誘導された遺伝子群のオントロジー解析及び阻害剤を用いた実験から、レチノイン酸は α 型及び β 型レチノイン酸受容体を介して、BMP 及び WNT シグナルの両者を誘導することで骨分化誘導を促進していることが判明した。</p> <p>この誘導系を用いて、遺伝性骨疾患の一つである骨形成不全症(OI)の病態再現を行った。COL1A1 遺伝子変異陽性の OI 患者由来の iPS 細胞を用いて、上記の分化誘導実験を行うと、標準的 iPS 細胞と比較して骨様組織形成能の低下、Ca 塩沈着の低下、コラーゲン線維の質的量的異常、及び ER ストレスの亢進など、これまで指摘されている OI の病態が再現された。これらの機能異常は患者由来 iPS 細胞の変異を修復することにより改善されることから、原因遺伝子の変異に起因することが確認された。更にこの誘導系が薬剤スクリーニングに応用可能であることを検証するために、既報から有効性が示唆されている mTOR 阻害剤を用いた実験を行ったところ、病態が部分的に改善されることが確認された。</p> <p>以上の結果より、この iPS 細胞から骨様結節を分化する誘導系が、骨形成過程に関わる疾患に対する病態解析・創薬において、有用なアプローチであると期待できる。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

骨組織は常に骨形成と骨吸収の過程を繰り返す(骨改変)動的組織である。正常な骨改変過程及びその病的状態を理解する上で、遺伝子改変マウスを用いた *in vivo* での解析は重要な役割を果たしてきたが、創薬への応用を考えると、*in vitro* での骨改変過程モデルの構築も重要なアプローチである。そこで骨形成過程に焦点を絞り、ヒト iPS 細胞を用いて、化合物スクリーニングに適した骨形成過程の *in vitro* 再現系の構築を試みた。その結果、従来の誘導法にレチノイン酸を併用することで、10日間で iPS 細胞から骨前駆細胞、骨芽細胞、そして成熟骨細胞を順次誘導し、骨様組織を形成する方法の開発に成功した。誘導した骨芽細胞は *in vivo* で膜性骨を形成する能力を有していた。この誘導系を用いて、遺伝性骨疾患の一つである骨形成不全症(OI)の病態再現を行った。COL1A1 遺伝子変異陽性の OI 患者由来の iPS 細胞を用いた解析で、骨様組織形成能の低下、Ca 塩沈着の低下、コラーゲン線維の質的量的異常、及び ER ストレスの亢進など、これまで指摘されている OI の病態が再現された。これらの異常は COL1A1 遺伝子の変異を修復することにより改善し、また、オートファジー促進剤により部分的に改善されることも確認した。

以上の研究は骨組織形成過程の詳細な解析を可能とし、難治性骨疾患の病態解明及び創薬に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士(医学)の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、令和元年10月23日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日： 年 月 日以降