62　体細胞運命転換技術を活用したゲノム矯正骨再生治療	松田　修

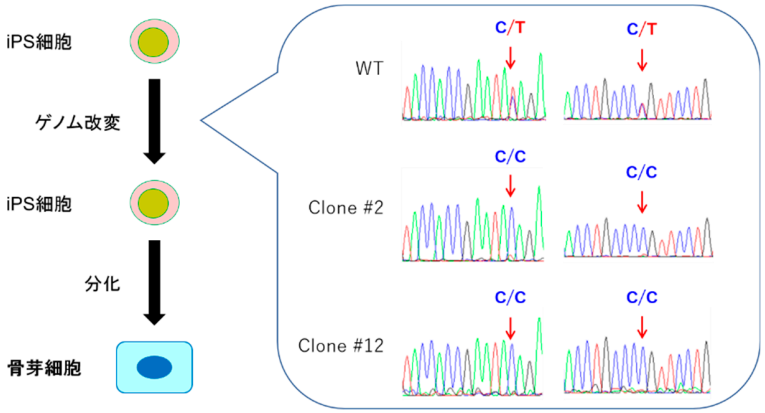
【目的】骨粗鬆症は,高齢化に伴って罹患者が 1,000 万人に増加しており、骨脆弱性を基盤とした骨折が多発している。骨粗鬆症の発症には遺伝的素因があり、骨粗鬆症に関連した多数の SNPs（一塩基多型）が GWAS で見出されている。しかし、これらの SNPs がどのようなメカニズムで骨粗鬆症の病態発現に関与するのかについてはほとんど明らかにされていない。このようなメカニズムを解明するためには、対象とする SNP のアロタイプのみが異なり他のゲノム配列は同一である細胞のペアを準備し、それらの機能を比較する必要があるが、従来ヒトの細胞ではこのような実験は容易ではなかった。ゲノム改変技術の進歩は、このような細胞のペアをヒトの体細胞でも供給することを可能とした。本研究では、骨密度と強い相関を示す Wls 遺伝子領域の 2 か所の SNPs に着目した。これらの SNPs は、骨芽細胞における Wnt の産生に関与する可能性が考えられるが、Wls SNP と Wnt の制御を結びつける分子機構は不明である。マウスではこの SNP 近傍配列はヒトとは異なるので、ヒト骨芽細胞でなければ解析できない。

そこで Wls 遺伝子領域の 2 か所の SNPs のアロタイプを特異的に改変した骨芽細胞を作出し、上記の分子機構の解明につなげることを目的とした。本研究の成果は、低骨密度型アロタイプを有する骨粗鬆症患者の病態を理解し新しい治療法の創出に繋がるものと期待できる。さらには、患者由来の骨芽細胞にゲノム矯正を施し、骨形成能を増強してから自家移植するという、骨粗鬆症に対する新しい「遺伝子矯正再生治療」につながると期待される。

【方法】ヒト iPS 細胞の Wls 遺伝子座のゲノム配列をシーケンシングし、Wls 遺伝子領域の 2 か所の SNPs がヘテロツァイゴートである 1 株を選んだ。この細胞のゲノムを改変し、上記 SNPs が低骨密度型のホモツァイゴートである 2 クローンを樹立した。Wnt 遺伝子、βカテニン遺伝子、および骨芽細胞特異的遺伝子群の mRNA 発現を、real time RT-PCR にて定量解析した。

【結果】WT、Clone#2、および Clone#12 の 3 種の細胞株それぞれについて、分化誘導前後の Wnt 遺伝子とβカテニン遺伝子の発現を解析したところ、WT に比して Clone #2 では Wnt2 の発現が上昇し Clone #12 では Wnt1 の発現が上昇していた。βカテニン遺伝子の mRNA 発現は、3 種の細胞間で差を認めなかった。分化誘導後の細胞の骨芽細胞特異的遺伝子の発現では、WT に比して、Clones#2 と#12 から誘導した骨芽細胞は、いずれも Runx2 と Osteocalcin、遺伝子の mRNA 発現が有意に低かった。このことから、低骨密度型のアリルをホモに有する細胞では、すくなくともこの誘導条件下においては、骨芽細胞への誘導能が低いか、あるいは骨芽細胞としてのフェノタイプが十分でない細胞にしか誘導されないことが強く示唆された。Clones#2 と#12 の差異には、エピジェネティックな差異が寄与している可能性があると考えられる。

骨粗鬆症関連 SNPs が病態発現に寄与する機構の解析



62. 体細胞運命転換技術を活用したゲノム矯正骨再生治療

松田　修

京都府立医科大学 大学院医学研究科 免疫学

Key words：骨粗鬆症，一塩基多型，骨芽細胞，ゲノム改変

緒　言

骨粗鬆症は、高齢化に伴って罹患者が 1,000 万人に増加しており、骨脆弱性を基盤とした骨折が多発し社会問題ともなっている。骨粗鬆症性骨折の予防として、骨密度を高めることが啓蒙されている。運動療法および食餌療法にくわえて、カルシウム、ビタミン D、ビスホスホネート、副甲状腺ホルモンなどの薬物療法が行われている。これらの薬物は骨折予防に対して一定の成績をあげているが、その効果発現には長期間を要するため、効果が出るまでに骨折を生じることも多い。また、病的骨折の危険性が高い重度の骨粗鬆症患者に対しては従来の治療法とは異なる迅速な骨密度の回復が求められる。

骨粗鬆症の発症には遺伝的素因があり、骨粗鬆症に関連した多数の SNPs（一塩基多型）が GWAS で見出されている。その中でも、Wntless（Wls）遺伝子のイントロンに存在する 2 つの SNP（rs2566755 と rs1430742）は、骨密度と高い相関を示し、低骨密度の C アリル（アリル頻度 : 21%）と高骨密度の T アリル（同 79%）が存在する［1］。Wls は Wnt の発現と分泌に必須の分子であり［2］、Wnt は骨芽細胞の分化、骨形成、破骨細胞の制御等に必須である。骨芽細胞特異的に Wls をノックアウトしたマウスでは、著しい骨密度低下病変を呈し、骨芽細胞の分化と骨産生が抑制されている［3］。これらの事実から、Wls の SNP が C アリルである骨芽細胞は、T アリルの骨芽細胞より Wnt の産生能が低く、これが骨密度の低下の原因であると考えられる。しかしながら、この SNP が、どのようなメカニズムで Wls の発現制御に関与するのかについてはほとんど何も分かっていない。その理由として、骨密度に影響する他の多くの遺伝子座の多型があるので、Wls の SNP のみが異なり他のゲノム配列はすべて同一であるような、ヒトの骨芽細胞のペアを作ってそれらを比較することが、従来技術ではできなかったことが挙げられる。マウスではこの SNP 近傍配列はヒトとは異なるので、ヒト骨芽細胞でなければ解析できない。すなわち、この機構を解明するには、機能的なヒト骨芽細胞を誘導し、かつそれらのゲノムをピンポイントで改変する技術が求められる。

そこで本研究では、CRISPR/Cas9 技術を用いて Wls の SNP を変異させたヒト iPS 細胞を樹立し、これから骨芽細胞を誘導する。ゲノム改変前後の細胞は、Wls の SNP のみが異なり他のゲノム配列はすべて同一であるので、これらを比較することにより、他の多型の影響を排除して、Wls の SNP のみの効果を解析することが始めて可能となる。このようにして、Wls の SNP と Wnt の制御をつなぐ分子機構を明らかにすることにより、骨粗鬆症の遺伝素因のメカニズム解明に迫るとともに、骨粗鬆症の「遺伝子矯正再生治療」への基盤に繋げる。

方　法

1. 細胞

ヒト iPS 細胞株、hiPS253G1 細胞が、2 か所の SNPs（rs2566755 と rs1430742）のアロタイプがいずれも C/T（高骨密度型と低骨密度型のヘテロツァイゴート）であることを確認した。ゲノム改変は CRSPER/Cas9 を用いて行った。得られたクローンの Wls 遺伝子座のゲノム配列をシーケンシングし、Clones #2 と#12 が、rs2566755 と rs1430742 のアロタイプがいずれも C/C（低骨密度型のホモツァイゴート）であることを確認した（図 1）。

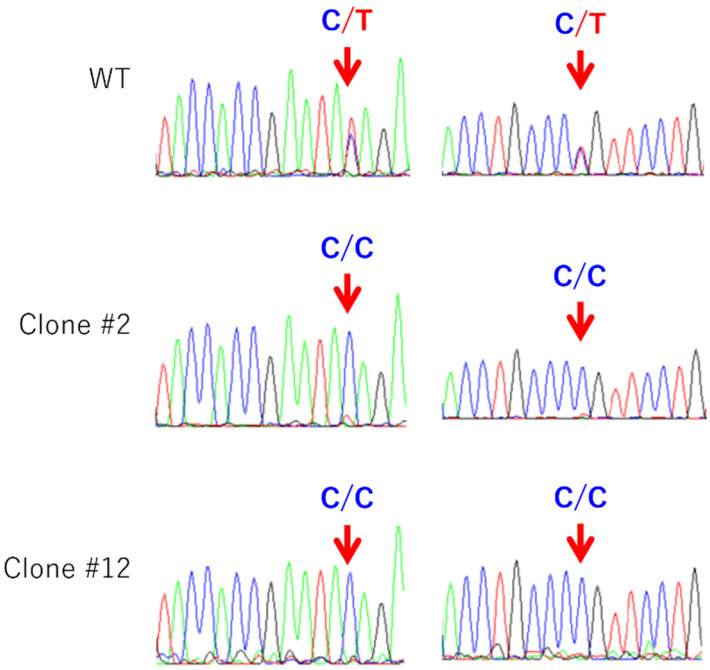


図 1. ゲノム改変による骨粗鬆症関連 SNPs の変異導入

記載の細胞のゲノムシーケンシングの結果を示す。赤矢印は rs2566755 (左) と rs1430742 (右) の部位を示す。Wildtype (WT) の hiPS253G1 は、いずれの部位も C アリルと T アリルの両者を有する heterozygote であった。hiPS253G1 をゲノム改変して得られた 2 つのクローン、Clones #2 と #12 はいずれも、両方の部位がどちらも C アリルの homozygote であることが確認できた。

2. 骨芽細胞誘導

hiPS253G1 細胞、Clone #2、Clone #12 をそれぞれ、1% Non-essential amino acids、2.5 mM L-Glutanime、1.25% KSR、0.1 mM 2-mercaptoethano を添加した DMEM-F12 培地（EB 培地 I）で 6 日間培養した。PBS (-) で洗浄後、accutase を用いて回収し、1% Non-essential amino acids、2.5 mM L-Glutanime、1.25% KSR、12.5% Fetal bovine serum、0.1 mM 2-mercaptoethano を添加した DMEM-F12 培地（EB 培地 II）で 4 日間培養して、Embryoid body（EB）を誘導した。その後、10% Fetal bovine serum、3% SNP、50 microg/mL アスコルビン酸、10 nM デキサメサゾン、10 mM β-グリセロフォスフェート、25 ng/mL Fibroblast growth factor-2（FGF-2）、1 ng/mL Tumor grow factor（TGF）-β1、100 ng/mL Insulin like growth factor-1（IGF-1）を添加したαMEM 培地（骨芽細胞培地）で 13 日間培養した。得られた細胞が骨芽細胞であることは、real time RT-PCR による骨芽細胞特異的遺伝子の mRNA 発現の定量化、免疫染色による骨芽細胞特異的たんぱくの発現、Alizarin 染色と von Kossa 法による染色による石灰化骨基質の産生、アルカリフォスファターゼ染色等により確認した。

3. 遺伝子発現解析

RNA は細胞から ISOGEN II（Nippon Gene、Tokyo、Japan）を用いて回収し、ReverTra Ace qPCR RTMaster Mix （Toyobo）を用いて逆転写した。Real-time RT-PCR は、Real-Time PCR Master Mix（Toyobo）と下記のプライマー／プローブを加えて、7300 Real-Time PCR システム（Applied Biosystems）にて行った。オステオカルシン遺伝子：Applied Bioscience Hs01587814_g1、Runx2 遺伝子：Applied Bioscience Hs00231692-m1、オステオポンチン遺伝子：Applied Bioscience Hs00959010-m1。

4. 統計解析

Real-time RT-PCR 解析の結果は、β-アクチン遺伝子の mRNA レベルで補正し、WT の hiPS253G1 細胞の値を 1.0 として、平均±標準偏差で表した。有意差は Student's t test で検定し、$t < 0.05$ を有意差ありと判定した。

結　果

1. ゲノム改変 iPS 細胞における Wnt 遺伝子の発現

WT、Clones #2 と#12 における、Wnt 遺伝子群とβカテニン遺伝子の mRNA 発現を解析した。その結果を図 2A に示す。WT に比して、Clone #2 では Wnt2 の発現が上昇し Clone #12 では Wnt1 の発現が上昇していた。βカテニン遺伝子の mRNA 発現は、3 種の細胞間で差を認めなかった。

2. 誘導骨芽細胞における Wnt 遺伝子の発現

WT、Clones #2 と#12 の 3 種の細胞株を、EB に分化させた後骨芽細胞に誘導した。これら細胞における Wnt 遺伝子群とβカテニン遺伝子の mRNA 発現を解析した。その結果を図 2B に示す。Clone #2 が Wnt3 とβカテニン遺伝子の mRNA を有意に高く発現していた。他には 3 種の細胞間でとくに有意な差異は認められなかった。

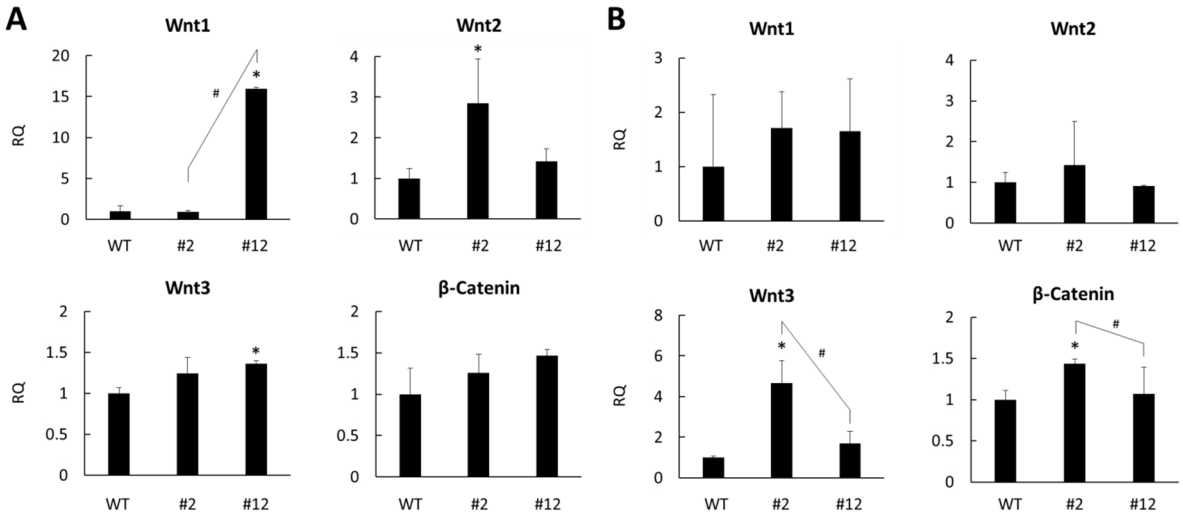


図 2. ゲノム改変 iPS 細胞と誘導骨芽細胞における Wnt 遺伝子の発現

A)、WT、Clones #2 と#12 から RNA を採取し、記載の遺伝子の mRNA 発現を real time RT-PCR で定量した。B)、WT、Clones #2 と#12 の hiPS253G1 細胞から EB を経て骨芽細胞を誘導した。これらから RNA を採取し、A と同様の解析に供した。*P < 0.05、vs. WT. #P < 0.05、between the groups。

3. 誘導骨芽細胞における骨芽細胞特異的遺伝子群の発現

WT、Clones #2 と#12 から誘導した骨芽細胞における、Runx2、Osteocalcin、Osteopontin の mRNA 発現を解析した。結果を図 3 に示す。WT に比して、Clones #2 と#12 から誘導した骨芽細胞は、いずれも Runx2 と Osteocalcin、遺伝子の mRNA 発現が有意に低かった。このことから、rs2566755 と rs1430742 が C/C アロタイプの細胞では、すくなくともこの誘導条件下においては、骨芽細胞への誘導能が低いか、あるいは骨芽細胞としてのフェノタイプが十分でない細胞にしか誘導されないことが強く示唆された。

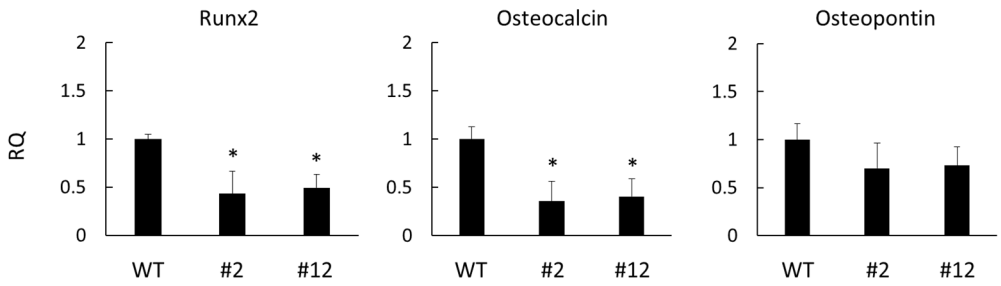


図 3. ゲノム改変誘導骨芽細胞における骨芽細胞特異的遺伝子の発現

WT、Clones#2 と#12 の hiPS253G1 細胞から EB を経て骨芽細胞を誘導した。RNA を採取し、記載の遺伝子の mRNA 発現を real time RT-PCR で定量した。*P < 0.05、vs.WT.

考　察

骨密度と相関する SNP には多くのものが知られている。その中でも、本研究で Wls の SNP に焦点を当てたが、その理由には以下が挙げられる。

1. 他の SNP は、破骨細胞の機能等、骨芽細胞以外に関与して骨密度に影響している可能性があるが、Wls は骨芽細胞で関与していることが知られているので［3］、解析の対象を広げることなく骨芽細胞に着目して解析ができる。
2. 多くの SNP は、骨密度と相関する理由が不明であるが、Wls は骨芽細胞内で、Wnt の発現と分泌を正に制御することが分かっているので［2，3］、本 SNP が骨密度と相関するメカニズムの解析を、Wls―Wnt システムに絞って行うことができる。
3. 骨密度と相関が比較的高い。
4. 低骨密度アリルの頻度が比較的高い。

WlsのSNPがWntの発現に影響するメカニズムが分かれば、Cアリルを有する骨粗鬆症患者に対する、新しい治療戦略の創生に繋がると考えられる。

さらに、ゲノムを矯正した骨芽細胞を、患者に自家移植するという、骨粗鬆症の「再生遺伝子治療」の道を開くと期待できる。

本来、骨粗鬆症の病態は、加齢や加齢に伴うホルモンバランスの乱れによって、骨芽細胞が破骨細胞と比較して相対的に不足し、骨吸収が亢進することにあるので、骨再生医療は、骨粗鬆症性骨折の予防や治療として、非常によい適応となるであろう。骨粗鬆症性骨折では脊椎椎体骨折と大腿骨頚部骨折の頻度が高く、死亡あるいは長期臥床の転機をとる患者も多い。椎体骨折では、治療としてコルセットやギプスによる保存療法が選択されるが、高齢者では骨再生能が低下しているため、椎体の癒合不全によって疼痛や神経症状が残存し、患者の ADL を著しく低下させる原因となる。その際、骨欠損部にセメントを挿入する場合もあるが、脆弱な骨の間に強度の高いセメントを留置するため、隣接椎体の骨折を合併する危険性がある。これに対して、骨欠損部に再生骨を充填することができれば、安全に生理的な脊椎を再建することができ、効果的な治療法となる。

骨腫瘍切除後の骨欠損部に対しては、自家骨髄細胞移植の有効性が確認されており、間葉系幹細胞（MSC）から分化する骨芽細胞によって、骨再生が促進すると考えられている。しかし骨粗鬆症患者から骨髄を採取するのは侵襲が大きい。また高齢者の MSC は、1. 得られる細胞数が不十分な例が多い、2. 増殖能が低い、3. 脂肪細胞に分化しやすく骨芽細胞には比較的分化しにくい、といった問題点がある。

高齢者のMSCは、増殖能が低くまた骨芽細胞に分化しにくい原因は、老化に伴うエピジェネティックな変化と考えられる。iPS細胞の誘導では、高齢者の線維芽細胞から誘導しても、エピジェネティクスがゲノムワイドに刷新されることによって多能性が獲得される。我々は最近、ヒト骨芽細胞を線維芽細胞から直接誘導（ダイレクト・リプログラミ

ング）する技術を確立した［4，5］（Yamamoto et al、submitted）。我々の技術で誘導する骨芽細胞は、極めて骨再生治療に適し、本研究が提唱するゲノム矯正再生遺伝子治療にも理想的な細胞であると考えられる。ダイレクト・リプログラミングで誘導した骨芽細胞も、線維芽細胞のエピジェネティック・ステートが完全に骨芽細胞のそれに書き換えられているので、線維芽細胞が高齢であったというエピジェネティック・ステートも刷新されると期待できる。

しかし、エピジェネティックな異常とは異なり、ジェネティックな異常はリプログラミングによって是正できるものではない。骨粗鬆症患者由来の骨芽細胞のゲノムDNAを改変して、Wls遺伝子内のSNPを矯正することができれば、遺伝的に低かった骨形成能を増強した骨芽細胞に、改造してから移植することができると考えられる。

なお、Clones #2と#12の差異には、エピジェネティックな差異が寄与している可能性があると考えられる。

本研究の成果は、低骨密度型アロタイプを有する骨粗鬆症患者の病態を理解し新しい治療法の創出に繋がるものと期待できる。さらには、患者由来の骨芽細胞にゲノム矯正を施し、骨形成能を増強してから自家移植するという、骨粗鬆症に対する新しい「遺伝子矯正再生治療」につながると期待される。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、京都府立医科大学大学院医学研究科・免疫学の岸田綱郎准教授、およびNova Southeastern大学の山本健太博士である。

文　献

1) Rivadeneira F, Styrkarsdottir U, Estrada K, Halldorsson BV, Hsu YH, Richards JB, et al. Twenty bone-mineral-density loci identified by large-scale meta-analysis of genome-wide association studies. Nat Genet. 2009 Nov;41(11):1199-206. PubMed PMID: 19801982; PubMed Central PMCID: PMCPMC2783489. doi: 10.1038/ng.446.

2) Banziger C, Soldini D, Schutt C, Zipperlen P, Hausmann G, Basler K. Wntless, a conserved membrane protein dedicated to the secretion of Wnt proteins from signaling cells. Cell. 2006 May 5;125(3):509-22. PubMed PMID: 16678095. doi: 10.1016/j.cell.2006.02.049.

3) Zhong Z, Zylstra-Diegel CR, Schumacher CA, Baker JJ, Carpenter AC, Rao S, et al. Wntless functions in mature osteoblasts to regulate bone mass. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012 Aug 14;109(33):E2197-204. PubMed PMID: 22745162; PubMed Central PMCID: PMCPMC3421196. doi: 10.1073/pnas.1120407109.

4) Yamamoto K, Kishida T, Sato Y, Nishioka K, Ejima A, Fujiwara H, et al. Direct conversion of human fibroblasts into functional osteoblasts by defined factors. Proc Natl Acad Sci USA. 2015 May 12;112(19):6152-7. Epub 2015/04/29. PubMed PMID: 25918395. doi: 10.1073/pnas.1420713112.

5) Yamamoto K, Sato Y, Honjo K, Ichioka H, Oseko F, Sowa Y, et al. Generation of Directly Converted Human Osteoblasts That Are Free of Exogenous Gene and Xenogenic Protein. J Cell Biochem. 2016 Nov;117(11):2538-45. PubMed PMID: 26990860. doi: 10.1002/jcb.25546.