

妻木 範行

大阪大学大学院医学系研究科・独立准教授

組織幹細胞／前駆細胞を誘導するディレクトドリプログラミング技術の開発

## §1. 研究実施の概要

iPS細胞(人工多能性幹細胞)やES細胞(胚性幹細胞)などは、筋肉や神経などの様々な細胞に変化できる能力を持つ。これらは将来の再生医療に役立つと期待されるが、腫瘍化や不均一性などの問題がある。そこで、iPS細胞作製法を改良する研究や、別の方法で細胞運命を変える(リプログラム)技術の開発が、行われている。

我々は昨年度までに、マウス皮膚細胞に2つのリプログラミング因子と1つの軟骨因子を導入して培養すると、軟骨細胞様細胞が誘導されることを明らかにした。本年度は長期にわたり腫瘍化しない誘導軟骨細胞様細胞のラインが得られることを示した。また、軟骨特異的にGFPを発現するトランスジェニックマウスを開発し、ディレクトドリプログラミングによって皮膚細胞培養から軟骨細胞様細胞の塊が出来てくる過程を観察した。因子を入れた2日後にGFP陽性となる細胞が出現し、7日後に軟骨様の結節ができて始めることが判明した。さらに、Dox-inducibleシステムを用いて細胞を誘導し、軟骨細胞様の細胞が出来た後に、因子のトランスジーン発現をほぼ消失させることができた。この細胞がchondrogenic mediumに反応し、軟骨の性質を獲得していることを明らかにした。

## §2. 研究実施体制

### (1)「妻木」グループ

① 研究分担グループ長:妻木 範行(大阪大学大学院医学系研究科、独立准教授)

### ② 研究項目

- ・ 軟骨細胞様細胞誘導過程の可視化
- ・ 軟骨細胞様細胞の誘導過程の解析
- ・ トランスジーンが持続発現しない誘導軟骨細胞様細胞の作製
- ・ 誘導軟骨細胞様細胞の肥大化の検討
- ・ 皮下脂肪組織由来間質細胞培養からの軟骨前駆細胞誘導

(2)「吉川」グループ

① 研究分担グループ長: 吉川 秀樹 (大阪大学大学院医学系研究科、教授)

② 研究項目

- ・ トランスジーンが持続発現しない誘導軟骨細胞様細胞の作製 (誘導軟骨細胞様細胞をヌードマウス皮下移植した時の長期の経過を解析する。腫瘍形成能や軟骨としての安定性など)

### §3. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(4-1)に対応する)

軟骨前駆細胞誘導過程を可視化、および軟骨細胞様細胞の誘導過程の解析

3 因子導入後に軟骨前駆細胞が誘導される経過を知るために、レポーターに EGFP とピューロマイシン耐性遺伝子を IRES でつないだものを、軟骨細胞特異的 Col11a2 遺伝子のプロモーター/エンハンサーに結合して用意したトランスジーン *Col11a2-EGFP-IRES-Puro* を用意した。このトランスジェニックマウスは、軟骨細胞特異的に GFP を発した。このトランスジェニックマウスの Primary chondrocytes が puromycin 2.5 ug/ml でも生存するのに対し、MDF は 1 ug/ml で死滅した。また、GFP は 12.5 dpc の mesenchymal condensation で最初に陽性になった。このトランスジェニックマウスの MDF に軟骨細胞様細胞を誘導する 3 因子 (cMyc, Klf4, SOX9) を導入し、細胞の形態、増殖が変化していく様子と GFP の蛍光を経時的に観察した。Dish のどこに軟骨細胞様細胞が誘導されてコロニーができるかが分からないので、dish 全域を scan し、位相差像と GFP 蛍光画像を 24 時間おきに 28 日間撮影した。レトロウイルス感染後 1-2 週で軟骨細胞様細胞のコロニーが確認できるが、その部位の画像を遡って解析し、MDF が変化する様子を捉えた<sup>1)</sup>。MDF に 3 因子 (cMyc, Klf4, SOX9) を retrovirus を用いて導入後、6-well plate に播いた日 (day 1) は、GFP の蛍光を全く認めなかった。このことは MDF には、間葉系細胞凝集のステージに相当する、軟骨細胞の progenitor の様な細胞が含まれていないことを意味する。感染後翌日には細胞は活発に増殖を始めた。感染 2 日後には幾つかの細胞が GFP 蛍光陽性となった。感染 3 日後に puromycin 1 ug/ml を、線維芽細胞を殺して細胞数を減らすために加えた。感染後 7 日目には結節が出現し、その結節に一致して GFP 蛍光を強く認めた。その結節は軟骨細胞に特徴的な多角形の形をした細胞で構成されていた。また結節はアルシアンブルーに強く染色され、軟骨基質の特徴である、グリコサミノグリカンを高量に含んでいたことから、軟骨様の性質を獲得していると考えられた。この過程をムービーにすることにより、GFP 陰性の細胞が GFP 陽性に変化し、結節を作る様子が観察できた<sup>1)</sup>。

トランスジーンが持続発現しない誘導軟骨前駆細胞の作製。

トランスジーンの影響を調べるために、軟骨前駆細胞が誘導された後にトランスジ

ーンの発現を低減あるいはオフできるように、テトラサイクリン(ドキシサイクリン)による発現誘導システムを用いて誘導軟骨前駆細胞を樹立した。そのためにレンチウイルスベクターをベースに、**tetracycline-responsive element (TRE)**に**cMyc**, **Klf4**, **Sox9**をそれぞれ結合したコンストラクトを作製した。**rt-TA** については高発現を得るために、レトロウイルスで導入した。**Col11a2-EGFP-IRES-Puro** トランスジェニックマウスのMDFにレトロウイルス**rt-TA**を導入後翌日に、**TRE-cMyc**, **TRE-Klf4**, **TRE-Sox9**をレンチウイルスを用いて導入した。**Dox** 存在下に軟骨細胞様細胞を樹立し、**Dox** 存在下、あるいは非存在下に軟骨細胞としての表現系と増殖を解析した。軟骨細胞様細胞の培養において、**Dox** の除去後2日目にはトランスジーン発現が劇的に減少した。**Dox** の除去により、細胞増殖スピードが低下した。このことは、誘導細胞の **vitro** における盛んな増殖がトランスジーン発現に依存していることを示す。次に、軟骨様の表現型がトランスジーン発現に依存するか否かを検討した。**Dox-inducible** 誘導細胞は **DMEM+10%FBS** 培地において、**Dox** 存在下ではアルシヤンブルーに中程度染まったが、**Dox** 非存在下では殆ど染まらなかった。一方、**BMP** や **TGF-beta** を含む **chondrogenic medium** 中では、**Dox-inducible** 誘導細胞は **Dox** の存在あるいは非存在にかかわらず、アルシヤンブルーによく染まった。また、**chondrogenic medium** 中では、**Dox** を除去することにより、**endogenous Sox9** や、軟骨のマーカーである **Col2a1**、アグリカンの発現が上昇した。このことは、誘導軟骨細胞様細胞は、トランスジーン発現が低下すると **chondrogenic medium** に良く反応し、軟骨細胞の性質を保つことを示す<sup>1)</sup>。

また、現状のレトロウイルスベクターで作った誘導軟骨細胞様細胞のヌードマウス皮下における腫瘍形成能を長期(3-4か月)に評価し、16 週間においても腫瘍化せずに軟骨として安定に存在する細胞ラインが得られることがわかった<sup>1)</sup>。

#### 誘導軟骨細胞様細胞の肥大化の検討

軟骨には成長軟骨と関節軟骨がある。成長軟骨細胞は絶えず肥大化し、骨に置き換わる。一方、関節軟骨は殆ど肥大化せずに軟骨細胞として存在し続ける。誘導軟骨細胞様細胞は、軟骨細胞肥大化のマーカーである **X型コラーゲン** や **MMP13** を発現していなかった。また、ヌードマウスに移植して出来た軟骨様組織を長期(16 週)観察しても、**X型コラーゲン** の発現上昇は殆ど認められなかった。一方、**Dox-inducible** 誘導軟骨細胞様細胞では、**Dox** を除去して **transgene** 発現を低下させると、**chondrogenic medium** 中で **X型コラーゲン** や **MMP13** の発現が上昇した。このことから、**Sox9** トランスジーン発現が軟骨細胞様細胞の肥大化を抑制し、軟骨細胞様の表現型の維持に貢献していると考えた。トランスジーン発現が低下すると、**chondrogenic medium** の刺激により、内在性の軟骨分化プログラムが働き、細胞の肥大化がおこると考えられる。**Sox9** を持続発現する誘導細胞は、軟骨の表現型を保つ点で、関節軟骨疾患の治療に向いている。一方、トランスジーン発現を低下させた **Dox-inducible** 誘導軟骨細胞様細胞は、成長軟骨に似た挙動を示すことから、先天性の軟骨形成異常症の病態解析に貢献できる可能性がある。即ち、軟骨形成異常症患者の皮膚細胞を採取し、軟骨細胞様細胞を誘導して調べることで、軟骨形成

異常の原因の解明に役立つことが期待できる<sup>1)</sup>。

また、軟骨原基器官培養系において軟骨組織を増大させる低分子化合物の発見<sup>2)</sup>、軟骨細胞分化過程における TGF- $\beta$  シグナル<sup>3)</sup>と Sox9<sup>4)</sup> の機能の解析を行った。これらの結果を、誘導軟骨細胞様細胞の誘導メカニズムの解明、高品質の軟骨細胞様細胞の誘導に役立てていく。

皮下脂肪組織由来間質細胞培養からの軟骨前駆細胞誘導

マウス皮下脂肪組織由来間質細胞培養に cMyc, Klf4, Sox9 を導入することで、MDF から誘導する場合とほぼ同じ効率で、軟骨細胞様の細胞が誘導できることがわかった。

## §4. 成果発表等

### (4-1) 原著論文発表

#### ●論文詳細情報

- 1) Hiramatsu K, Sasagawa S, Outani H, Nakagawa K, Yoshikawa H, and Tsumaki N. Generation of hyaline cartilaginous tissue from mouse adult dermal fibroblast culture by defined factors. *J Clin Invest.* 2011; 121:640-657. (DOI: 10.1172/JCI44605.)
- 2) Ikegami D, Iwai T, Ryo SI, Gu N, Sugiyama T, Oh I, Yoshikawa H, and Tsumaki N. Identification of small molecular compounds and fabrication of its aqueous solution by laser-ablation, expanding primordial cartilage. *Osteoarthritis Cartilage.* 2011; 19:233-241. (DOI:10.1016/j.joca.2010.11.007)
- 3) Hiramatsu K, Iwai T, Yoshikawa H, and Tsumaki N. Expression of dominant negative TGF $\beta$  receptors inhibits cartilage formation in conditional transgenic mice. *J Bone Miner Metab,* in press (DOI: 10.1007/s00774-010-0248-2)
- 4) Ikegami D, Akiyama H, Suzuki A, Nakamura T, Nakano T, Yoshikawa H, and Tsumaki N. Sox9 sustains chondrocyte survival and hypertrophy in part through Pik3ca-Akt pathways. *Development.* 2011; 138:1507-1519. (doi:10.1242/dev.057802)

### (4-2) 知財出願

- ① 平成22年度特許出願件数(国内 0 件)
- ② CREST 研究期間累積件数(国内 0 件)