

妻木 範行

京都大学 iPS 細胞研究所・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. 研究実施体制

(1) 「妻木」グループ

① 研究代表者: 妻木 範行 (京都大学 iPS 細胞研究所、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
- ・軟骨前駆細胞の誘導過程の解析、及び作製効率を上げる技術開発
- ・センダイウイルスによる一過性発現による細胞の誘導
- ・ヒト皮膚線維芽細胞培養から軟骨細胞様細胞の誘導
- ・疾患モデル動物を用いた軟骨修復

(2) 「吉川」グループ

① 主たる共同研究者: 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

§ 2. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(3-1)に対応する)

研究のねらい

ES 細胞(胚性幹細胞)や iPS 細胞(人工多能性幹細胞)などは、筋肉や神経などの様々な細胞に分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、誘導される細胞集団の不均一性や、移植した時の奇形腫発生の危険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、iPS 細胞誘導を介さずに直接、細胞のタイプを変えるダイレクト・リプログラミング技術の開発が、行われている。軟骨は骨の端を覆い、滑らかな関節運動を担っている。軟骨の損傷・変性は運動時の疼痛を引き起こし、変形性関節症へと至る。大きな軟骨欠損を治癒させる薬は無く、再生医療による治療が期待され、移植する軟骨細胞を用意する方法の開発が望まれている。本研究では、軟骨再生治療に供することを目的に、ダイレクト・リプログラミングによって真皮線維芽細胞培養から軟骨細胞様細胞を直接誘導することがねらいである。

これまでの研究の概要

我々は22年度までに、マウス真皮線維芽細胞培養に2つのリプログラミング因子(c-Myc, Klf4)と1つの軟骨因子(Sox9)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¹⁾。この因子の組み合わせは、軟骨特異的に β geo レポーター遺伝子を発現するトランスジェニックマウスを作製し、そのマウスの真皮線維芽細胞に、リプログラミング因子と軟骨因子を種々の組み合わせで導入して、軟骨細胞の形質を獲得する細胞が出現すれば、その細胞は G418 存在下でも生存してコロニーを形成するという培養系システムを用いて探索した。

研究進捗状況、研究成果、今後の見通し

- ・ 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

22年度の最後に Dox-inducible システムを用いて、軟骨細胞様細胞を誘導後に、c-Myc, Klf4, SOX9 トランスジーン¹⁾の発現を低下させるマウス誘導軟骨細胞様細胞を作製し、23年度も引き続き、Dox-inducible システムを用いて軟骨細胞を誘導した。軟骨細胞様細胞を誘導後、chondrogenic medium 中で培養すれば、Dox を除去して c-Myc, Klf4, SOX9 トランスジーン¹⁾の発現を低下させても軟骨の形質は保たれることを示した。これにより、一過性発現でも直接誘導軟骨細胞様細胞を作れることが示唆された。この結果を受けて、一過性発現で、ゲノムに挿入されないようなベクターを用いて、安全な誘導細胞を作ることを目指す。

- ・ 軟骨前駆細胞の誘導過程の解析、及び作製効率を上げる技術開発

23年度は、真皮線維芽細胞培養から軟骨細胞様細胞が直接誘導される過程で、pluripotent stem cell の状態を経ているかどうかを検討した。Nanog-EGFP transgenic mouse の MDF に cMyc, Klf4, Sox9 の3因子を導入し、誘導経過中に GFP が陽性とならないことを、Nikon

Biostation CTを用いてdishの全域scanを8時間おきにタイムラプス観察を行って確認した²⁾。また、MDFに3因子を導入後、経時的にRNAを調整し、マーカー遺伝子の発現変化を解析し、リプログラミングの時間経過を調べた²⁾。軟骨細胞様細胞の誘導過程において、遺伝子導入後2日間で、線維芽細胞の形質が消去され、次いで5-7日かけて軟骨細胞の形質が獲得されていることが示唆された。また、作製効率を上げることを目的に、新たな誘導因子の探索を開始した。因子のスクリーニングに、Dox-inducibleシステムで誘導した軟骨細胞様細胞を用いるべく、スクリーニングの条件検討を始めた。

軟骨細胞の形成にTGF-betaシグナルが重要なこと³⁾、軟骨細胞の生存にSOX9が必須なこと^{4,5)}、軟骨細胞肥大化をSalt-inducible kinase 3(SIK3)が制御していること⁶⁾を明らかにした。また、軟骨組織を増大させる化合物を発見した⁷⁾。今後、これらの因子を制御して、より安定した軟骨細胞の維持方法の開発を目指す。また、生体において軟骨と連続する組織である骨の維持を、破骨細胞BMPシグナルが担っていることを示した⁸⁾。

・ センダイウイルスによる一過性発現による細胞の誘導

23年度はSOX9センダイウイルスベクターを作製し、予備実験を行った。温度感受性にウイルスベクターを除去できるシステムを採用した。24年度は、タイターなどの感染条件を検討する。

・ ヒト皮膚線維芽細胞培養から軟骨細胞様細胞の誘導

23年度にレトロウイルスによるc-MYC, KLF4, SOX9の導入により、ヒト皮膚線維芽細胞から軟骨細胞様細胞を誘導することを試みた。軟骨前駆細胞に誘導される細胞をセレクションするために、レンチレポーターベクターを開発した。24年度にかけて誘導条件の開発を続ける。また、次のステップとして、ゲノムインテグレーションフリーで安全な軟骨細胞の誘導を試みる。

・ 疾患モデル動物を用いた軟骨修復

23年度に、ヌードラットに関節軟骨欠損モデルをつくる実験系を構築した。ヌードラットに麻酔を行い、関節包を開けて、関節軟骨に直径1mmの穴をあけた。24年度にかけてペレットカルチャーした軟骨細胞様細胞を移植し、細胞の生着と欠損軟骨の修復を組織学的に評価する。今後、iPS細胞から軟骨細胞を分化させて関節軟骨修復に用いる実験も行っていく。

§3. 成果発表等

(3-1) 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.*, **121**: 640-57, 2011. (10.1172/JCI44605)
2. Outani, H., Okada, M., Hiramatsu, K., Yoshikawa, H. and Tsumaki, N.: Induction of chondrogenic cells from dermal fibroblast culture by defined factors does not involve a pluripotent state. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **411**: 607-12, 2011. (10.1016/j.bbrc.2011.06.194)
 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.*, **29**: 493-500, 2011. (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*, **138**: 1507-19, 2011. (10.1242/dev.057802)
 5. Nakamura, Y., Yamamoto, K., He, X., Otsuki, B., Kim, Y., Murao, H., Soeda, T., Tsumaki, N., Deng, J. M., Zhang, Z., Behringer, R. R., Crombrughe, B., Postlethwait, J. H., Warman, M. L., Nakamura, T. and Akiyama, H.: Wwp2 is essential for palatogenesis mediated by the interaction between Sox9 and mediator subunit 25. *Nat Commun*, **2**: 251, 2011. (10.1038/ncomms1242)
 6. Sasagawa, S., Takemori, H., Uebi, T., Ikegami, D., Hiramatsu, K., Ikegawa, S., Yoshikawa, H. and Tsumaki, N.: SIK3 is essential for chondrocyte hypertrophy during skeletal development in mice. *Development*, **139**: 1153-63, 2012. (10.1242/dev.072652)
 7. Ikegami, D., Iwai, T., Ryo, S., 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*, **19**: 233-41, 2011. (10.1016/j.joca.2010.11.007)
 8. Okamoto, M., Murai, J., Imai, Y., Ikegami, D., Kamiya, N., Kato, S., Mishina, Y., Yoshikawa, H. and Tsumaki, N.: Conditional deletion of Bmpr1a in differentiated osteoclasts increases osteoblastic bone formation, increasing volume of remodeling bone in mice. *J. Bone Miner. Res.*, **26**: 2511-22, 2011. (10.1002/jbmr.477)

(3-2) 知財出願

- ① 平成 23 年度特許出願件数(国内 1 件)
- ② CREST 研究期間累積件数(国内 1 件)