

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) 作製・制
御等の医療基盤技術」
研究課題「組織幹細胞／前駆細胞を誘導するディ
レクテッドリプログラミング技術の開発」

研究終了報告書

研究期間 平成21年10月～平成27年3月

研究代表者: 妻木 範行
(京都大学iPS細胞研究所、教授)

§ 1 研究実施の概要

(1) 実施概要

軟骨は発生過程において、骨格の原基を形成し体を支えている。内軟骨性骨化の過程を経て軟骨は徐々に骨に置き換えられる一方で、関節軟骨と成長軟骨として生後も存在する。関節軟骨は骨の端に存在して、相対する骨の関節軟骨とで関節を作り、滑らかな関節運動を担う。関節軟骨は一生涯存在する。一方、成長軟骨は骨幹端に存在し、その軟骨細胞は活発に増殖し、内軟骨性骨化によって骨を伸長させて、体の成長を担う。成長軟骨は10歳代後半に活動を止め、閉じて無くなり、骨の伸長は止まる。軟骨は治癒能力に乏しく、損傷や変性を受けると自然治癒しない。外傷や加齢変化に伴う関節軟骨の損傷は容易に広範な変性に至り、運動時痛を引き起こして変形性関節症の発症へとつながる。また、遺伝性の多くの骨系統疾患では成長軟骨の機能不全により、低身長や胸郭形成不全による呼吸障害を引き起こす。

我々は、iPS細胞を軟骨細胞へと分化誘導する技術の開発に加えて、患者の皮膚線維芽細胞を軟骨細胞に直接リプログラミングして供する手段の開発を行った。その結果、iPS細胞を介して、あるいはiPS細胞を介さずに直接、軟骨細胞を誘導することが可能になった。関節軟骨損傷に対しては、誘導した軟骨細胞を移植する再生治療の開発を行っている。骨系統疾患に対しては、患者由来の皮膚線維芽細胞からiPS細胞を経て、あるいは経ずに直接、軟骨細胞を誘導し、疾患モデル研究とその創薬研究を行った。当チームは2つのグループで構成され、妻木チームが全体的に研究を行い、吉川グループは組織学的解析と動物実験のサポートを行った。当チームの研究内容、成果を以下に記載する。

1. iPS細胞を経ずに、真皮線維芽細胞を軟骨細胞に直接変換する方法(ダイレクト・リプログラミング)の開発。真皮線維芽細胞にiPS細胞を作るリプログラミング因子のセットの一部(cMycとKlf4)と軟骨の発生に重要な因子(Sox9)を同時に導入することにより、軟骨細胞様細胞(iChon細胞と名付けた)を誘導できることをマウスの細胞で発見した。次いでヒトの細胞でも同じ因子を導入することにより、軟骨細胞用細胞を誘導できることを示した。そして、この誘導の過程では多能性の状態を経ずに直接誘導されている事を、誘導過程をタイムラプス撮影することにより示した。
2. 軟骨細胞の生存ならびに分化の制御機構を分子レベルで解析した。Sox9は軟骨形成に必須な事が知られていたが、軟骨形成後の軟骨細胞生存にも必須な事を示した。そして、軟骨細胞分化に必須な新たな因子としてSIK3を同定した。また、軟骨細胞を単層培養でexpansionすると軟骨の性質を失い、線維芽細胞様に変化する過程を、リニエージトレーシングの方法を用いて示した。これら、軟骨細胞分化の制御機構の研究成果を元に、iPS細胞を軟骨細胞へ分化させ、軟骨組織を作る方法を開発した。
3. 骨系統疾患であるFGFR3軟骨無形成症とII型コラーゲン異常症の患者の真皮線維芽細胞から、iPS細胞を介して軟骨細胞を誘導する方法と、軟骨細胞へダイレクト・リプログラミングする方法を用いて、疾患細胞モデル研究を行った。軟骨無形成症をはじめとするFGFR3軟骨無形成症に対してはスタチンが有効である可能性を示した。

(2) 顕著な成果

<優れた基礎研究としての成果>

1. 真皮線維芽細胞にiPS細胞を作るリプログラミング因子のセットの一部(cMycとKlf4)と軟骨の発生に重要な因子(Sox9)を同時に導入することにより、軟骨細胞様細胞(iChon細胞と名付けた)を誘導できることをマウスの細胞で示し(1)、次いでヒトの細胞でも示した(2)。この誘導の過程では多能性の状態を経ずに、直接誘導されている事も示した(3)。

1. Hiramatsu, K., Sasagawa, S., Outani, H., Nakagawa, K., Yoshikawa, H., and Tsumaki, N. (2011). Generation of hyaline cartilaginous tissue from mouse adult dermal fibroblast culture by defined factors. *J Clin Invest* 121, 640-657.

2. Outani, H., Okada, M., Yamashita, A., Nakagawa, K., Yoshikawa, H., and Tsumaki, N. (2013). Direct induction of chondrogenic cells from human dermal fibroblast culture by defined factors. *PLoS ONE* 8, e77365.
 3. Outani, H., Okada, M., Hiramatsu, K., Yoshikawa, H., and Tsumaki, N. (2011). Induction of chondrogenic cells from dermal fibroblast culture by defined factors does not involve a pluripotent state. *Biochem Biophys Res Commun* 411, 607-612.
2. 軟骨細胞の生存ならびに分化の制御機構を分子レベルで解析した。Sox9 は軟骨形成に必須な事が知られていたが、軟骨形成後の軟骨細胞生存にも必須な事を示した(4)。そして、軟骨細胞分化に必須な新たな因子として SIK3 を同定し(5)、Cyp26b1 が軟骨細胞分化を制御している事を突き止めた(6)。また、軟骨細胞を単層培養で expansion すると軟骨の性質を失い、線維芽細胞用に変化する過程を、リニューエジトレーシングの方法を用いて証明した(7)。これらの知見を元に、ヒト iPS 細胞を軟骨細胞に分化させ、さらに軟骨組織を作る方法を開発した(8)。
4. Ikegami, D., Akiyama, H., Suzuki, A., Nakamura, T., Nakano, T., Yoshikawa, H., and Tsumaki, N. (2011). Sox9 sustains chondrocyte survival and hypertrophy in part through Pik3ca-Akt pathways. *Development* 138, 1507-1519.
 5. Sasagawa, S., Takemori, H., Uebi, T., Ikegami, D., Hiramatsu, K., Ikegawa, S., Yoshikawa, H., and Tsumaki, N. (2012). SIK3 is essential for chondrocyte hypertrophy during skeletal development in mice. *Development* 139, 1153-1163.
 6. Minegishi Y, Sakai Y, Yahara Y, Akiyama H, Yoshikawa H, Hosokawa K, Tsumaki N. Cyp26b1 within the growth plate regulates bone growth in juvenile mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2014; 454: 12-18.
 7. Minegishi, Y., Hosokawa, K., and Tsumaki, N. (2013). Time-lapse observation of the dedifferentiation process in mouse chondrocytes using chondrocyte-specific reporters. *Osteoarthritis Cartilage* 21, 1968-1975.
 8. 1. Yamashita A, Morioka M, Yahara Y, Okada M, Kobayashi T, Kuriyama S, Matsuda S, Tsumaki N. Generation of scaffoldless hyaline cartilaginous tissue from human iPS cells. *Stem Cell Reports* 2015; 4: 404-418.
3. 骨系統疾患である FGFR3 軟骨無形成症と II 型コラーゲン異常症の患者の真皮線維芽細胞ら、iPS 細胞を介して軟骨細胞を誘導する方法と、軟骨細胞へダイレクト・リプログラミングする方法を用いて、疾患細胞モデル研究を行った(9)。また、軟骨無形成症をはじめとする FGFR3 軟骨無形成症に対してはスタチンが有効である可能性を iPS 細胞疾患モデルを使って示した(10)。
9. Okada, M., Ikegawa, S., Morioka, M., Yamashita, A., Saito, A., Sawai, H., Murotsuki, J., Ohashi, H., Okamoto, T., Nishimura, G., *et al.* (2014). Modeling type II collagenopathy skeletal dysplasia by directed conversion and induced pluripotent stem cells. *Hum Mol Genet.*
 10. Yamashita, A., Morioka, M., Kishi, H., Kimura, T., Yahara, Y., Okada, M., Fujita, K., Sawai, H., Ikegawa, S., and Tsumaki, N. (2014). Statin treatment rescues FGFR3 skeletal dysplasia phenotypes. *Nature* 513, 507-511.

<科学技術イノベーションに大きく寄与する成果>

1. 皮膚線維芽細胞から直接誘導した軟骨細胞は、軟骨細胞移植の材料と疾患細胞モデル研究に用いることができる。また、その誘導方法は生体内ダイレクト・リプログラミングに応用することにより、変性した関節軟骨の治療方法の開発につながる可能性がある。
2. 軟骨細胞の生存、分化機序解析で得た知見を用い、ヒト iPS 細胞を軟骨細胞へ分化誘導する方法を開発し、特許出願した。本手法で作ったヒト iPS 細胞由来軟骨細胞を用いて、関節軟骨欠損に対する臨床研究、そして治験へと進むプロジェクトが始まった。このプロジェクトは JST 再生医療医療実現拠点ネットワークプログラム拠点 B に採択された。

3. 疾患 iPS 細胞モデルの手法を用いて、スタチンが FGFR3 軟骨異形成症である軟骨無形成症とタナトフォリック骨異形成症の治療薬候補になることを示した。医師主導治験に進むために必要なデータを揃えていく予定である。その結果を受けて、可能であれば臨床応用をめざす。

§ 2 研究実施体制

(1) 研究チームの体制について

①「妻木」グループ

研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
妻木 範行	京都大学	教授	H21.10-H27.3
岡田 稔	同上	特定研究員	H23.4- H27.3
峯岸 芳樹	同上	特別研究学生	H22.5- H26.3
山下 晃弘	同上	特定研究員	H24.1-H26.3
藤田 香里	同上	特定研究員	H24.1- H27.3
森岡 美帆	同上	特定職員	H24.2-H25.9
箭原 康人	同上	技術補佐員	H24.4- H27.3
島田 英徳	同上	研究員	H21.10-H24.10
池田 悦子	同上	研究員	H22.2-H27.3
岸 宏美	同上	派遣社員	H24.9- H27.3
西野 麻里子	同上	派遣社員	H25.3- H27.3
平松 久仁彦	大阪大学	大学院生(博士課程)	H21.10-H22.9
池上 大督	同上	大学院生(博士課程)	H21.10.H23.3
岡本 美奈	同上	特任助教(常勤)	H21.10-22.12
中川 加奈子	同上	特任研究員	H21.10-H22.1 H23.2-H23.8

研究項目

- ・ 軟骨前駆細胞誘導過程の可視化
- ・ 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
- ・ 軟骨前駆細胞の誘導過程の解析
- ・ 作製効率を上げる技術開発
- ・ 一過性発現による細胞の誘導
- ・ ヒト軟骨前駆細胞の誘導
- ・ 脂肪細胞からの軟骨前駆細胞誘導
- ・ 疾患モデル動物を用いた軟骨修復
- ・ 骨芽細胞様細胞の誘導

②「吉川」グループ

研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
吉川 秀樹	大阪大学	教授	H21.10- H27.3
王谷 英達	大阪大学	大学院生(博士課程)	H21.10-H25.3
安井 広彦	大阪大学	大学院生(博士課程)	H22.4-H26.3
安井 行彦	大阪大学	大学院生(博士課程)	H26.4-H27.3

研究項目

- ・ 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
- ・ ヒト軟骨前駆細胞の誘導
- ・ 疾患モデル動物を用いた軟骨修復
- ・ 骨芽細胞様細胞の誘導

§ 3 研究実施内容及び成果

3-1. ヒト軟骨前駆細胞の誘導 (妻木、吉川グループ)

①研究のねらい: ねらいは、軟骨疾患の再生医療への応用に向けて、皮膚線維芽細胞から軟骨細胞様細胞を、iPS 細胞を経ずに直接誘導する技術を開発することである。軟骨は、骨の端を覆って関節面を構成し、滑らかな関節運動を担っている。軟骨は治癒能力に乏しく一旦、損傷や変性を受けると自然治癒しない。また軟骨を治癒させる薬も存在せず、再生医療による治療方法の開発が期待されている。そこで軟骨細胞を供給するソースとして、患者の皮膚線維芽細胞を軟骨細胞に直接変換して供する手段を開発する。また、軟骨疾患患者の皮膚細胞から軟骨細胞を誘導し、疾患モデル細胞を作って、病態解明や創薬へつなげる。

②研究実施方法: まず、1) マウス皮膚線維芽細胞から軟骨細胞様細胞を直接誘導する。ついで、2) ヒト皮膚線維芽細胞から軟骨細胞様細胞を直接誘導する。3) 軟骨疾患患者の皮膚線維芽細胞から軟骨細胞様細胞を誘導する。

③当初の研究計画(全体研究計画書)に対する現在の研究進捗状況(§ 2. と関連します)と得られた成果:

1) マウス皮膚線維芽細胞から軟骨細胞様細胞を直接誘導することに成功した。この成果は JCI, 2011 に発表した。次に、2) 同様の手法により、ヒト皮膚線維芽細胞からも軟骨細胞様細胞を直接誘導できることが判明した。この成果は PLoS One, 2013 に発表した。3) 軟骨疾患として重症骨系統疾患の患者の皮膚線維芽細胞を入手し、軟骨細胞様細胞の誘導を始めている。

1) マウス皮膚線維芽細胞から軟骨細胞様細胞を直接誘導。

発生過程において、真皮線維芽細胞と軟骨細胞は、脂肪細胞、骨芽細胞、筋細胞とともに、中胚葉の間葉系細胞に由来する。我々は、皮膚線維芽細胞にリプログラミング因子の一部と軟骨因子の一部を同時に導入することにより、軟骨細胞系譜に分化転換する細胞が出現するという仮説を立てた(図1)。

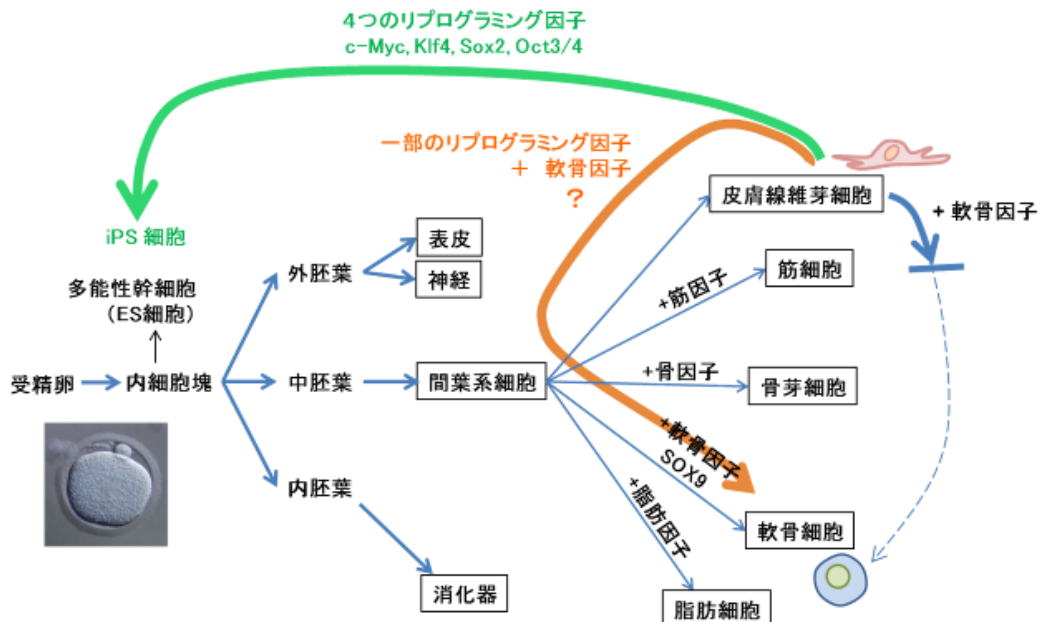


図1. 発生過程を図示したもの。中胚葉間葉系細胞が軟骨細胞にコミットするときには、SOX9 などの軟骨因子が働く。しかし、分化した細胞である皮膚線維芽細胞に SOX9 などの軟骨因子を導入しても軟骨細胞にはならない。もとの皮膚線維芽細胞の性質が強く残るためである。一方、iPS 細胞の誘導では、4つのリプログラミング因子を皮膚線維芽細胞に導入すると内部細胞塊と同様の未分化状態になる。このとき、皮膚線維芽細胞の性質は消去されている。そこで我々は、真皮線維芽細胞にリプログラミング因子の一部と軟骨因子の一部を同時に導入することにより、軟骨細胞系譜に分化転換する細胞が出現するという仮説を立てた。

その仮説の下、リプログラミング因子と軟骨因子を種々に組み合わせて、マウス培養真皮線維芽細胞に導入した。そこで、軟骨の形質を獲得した細胞を選別できるように、軟骨特異的レポーターとして、軟骨特異的コラーゲンである XI 型コラーゲン $\alpha 2$ 鎖遺伝子 (Col11a2) プロモーター/エンハンサーに、bgeo 遺伝子 (b-galactosidase とネオマイシン耐性遺伝子の融合遺伝子) を結合したトランスジーンコンストラクトを用意した (図2A)。これを持つトランスジェニックマウス (Col11a2-bgeo) を作った。このマウスは胎仔期には、四肢及び肋骨の軟骨原基特異的に b-galactosidase 活性を示した (図2B)。この大人のトランスジェニックマウスの皮膚から線維芽細胞 (MDF) を調整し、ネオマイシンの誘導体である G418 存在下で培養したところ、300 $\mu\text{g/ml}$ の G418 存在下で MDF は死滅した (図2C)。ところがこのトランスジェニックマウスの軟骨を培養したところ、900 $\mu\text{g/ml}$ の G418 存在下でも生存した。因みに野生型マウスの軟骨細胞は、300 $\mu\text{g/ml}$ の G418 存在下で殆ど死滅した。よって、このトランスジェニックマウスの MDF に因子を導入し、軟骨細胞様細胞に変換されれば、G418 存在下でも細胞は生存し続け、コロニーを作ると考えた。

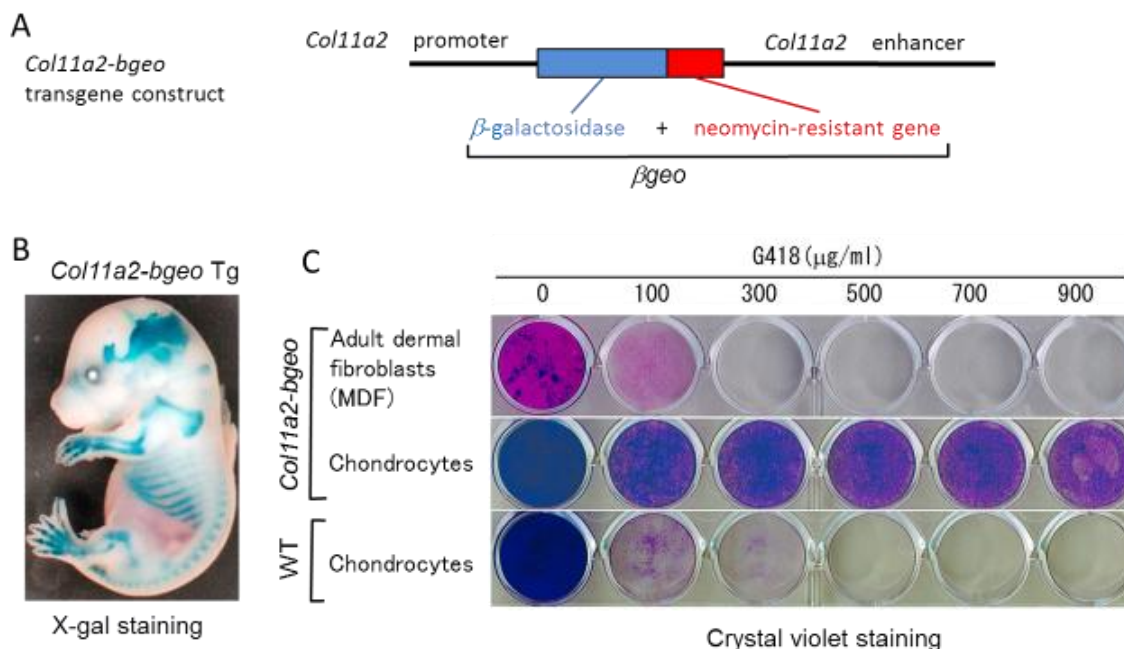


図2. Col11a2-bgeo トランスジェニックマウス。

これまでのヒト及びマウス genetics の研究から、軟骨発生に必須とされる因子として、Sox9, Sox5, Sox6, Nkx3.2, BMP シグナルに係る因子などが知られている。Col11a2-bgeo トランスジェ

ニックマウスの MDF を用意し、これら軟骨発生に係るとされる因子と、4つのリプログラミング因子 (c-Myc, Klf4, Oct3/4, Sox2) を、様々に組み合わせて、レトロウイルスベクターを用いて導入して、G418 存在下に培養した(図3)。その結果、ネガティブコントロールとして GFP を導入した場合は、細胞は全て死滅し、コロニーは出来なかった。Sox9 や、候補に挙げた軟骨因子だけを導入しても、細胞は死滅してコロニーは出来なかった。4つのリプログラミング因子を導入すると少数のコロニーが出現したが、いずれもアルシヤンブルー染色に染まらなかった。アルシヤンブルーは軟骨基質の成分であるグリコサミノグリカン青色に染色する。一方、4つのリプログラミング因子に SOX9 を混ぜて50万個の MDF に導入すると、100個以上のコロニーが出現し、その3分の1がアルシヤンブルーに染色された。コロニーを構成する細胞の形は多角形で、初代培養細胞軟骨細胞の形に似ており、紡錘形の MDF の形とは異なっていた。次に、4つのリプログラミング因子のうち、どの因子が必須かを調べるために、種々の組み合わせを検討したところ、結局、c-Myc, Klf4 の2つのリプログラミング因子と SOX9 があれば、G418 存在下に生き残り、多角形をしたアルシヤンブルーに染まる細胞を得ることができることが判明した。この、MDF に c-Myc, Klf4, SOX9 を導入して得られたコロニーをピックアップし、細胞数を増やして、細胞ライン樹立し、解析した。樹立した誘導細胞ラインに、MK-番号の名前を付けた。

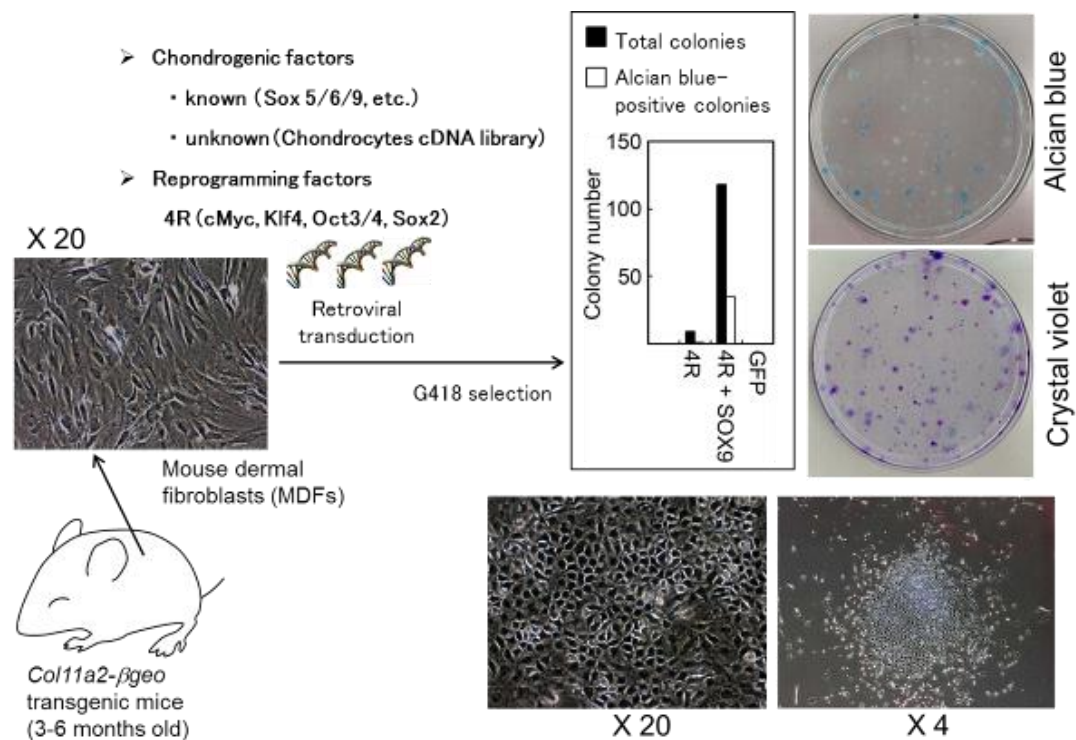
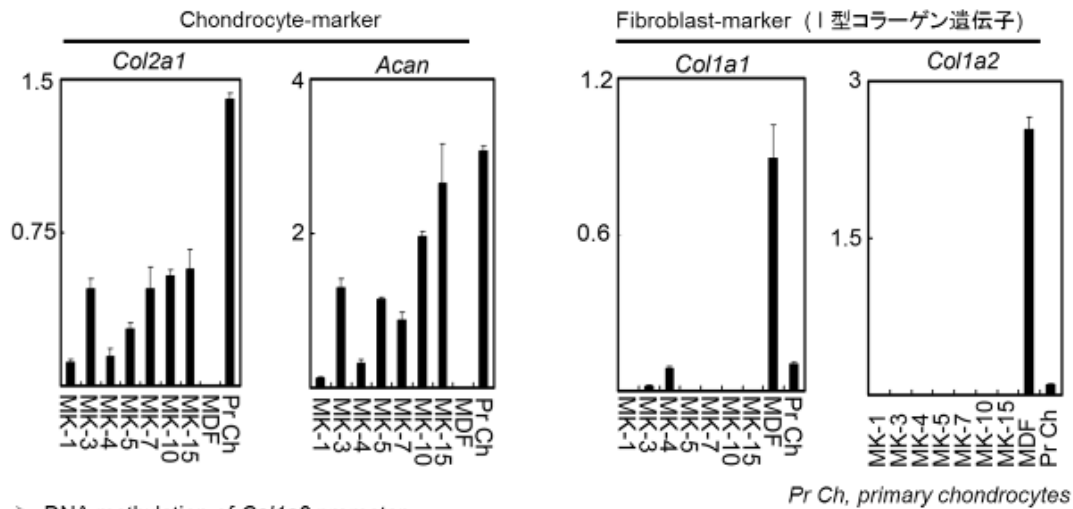


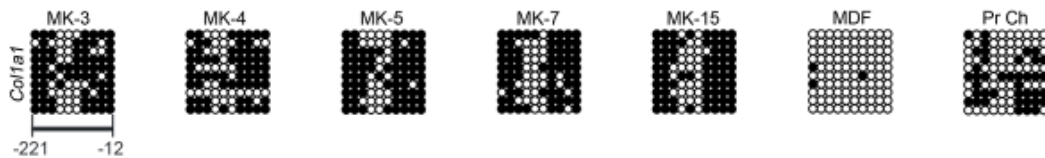
図3. Col11a2-bgeo MDF にリプログラミング因子と軟骨因子を種々の組み合わせで導入し、G418 存在下に培養して、形成されるコロニー数を計測した。

樹立した各細胞ラインの遺伝子発現を解析した(図4)。樹立した誘導細胞ラインは、軟骨細胞のマーカーであるII型コラーゲン遺伝子(Col2a1)とアグリカン遺伝子(Acan)を発現していた。

➤ Real-time RT-PCR



➤ DNA methylation of *Col1a2* promoter



親細胞の MDF はこれらの軟骨マーカー遺伝子を全く発現しておらず、初代培養軟骨細胞は発現していた。一方、線維芽細胞マーカーである I 型コラーゲン $\alpha 1$ 鎖遺伝子 (*Col1a1*) と $\alpha 2$ 鎖遺伝子 (*Col1a2*) を、MDF は発現していたが、誘導細胞ラインは発現していなかった。初代培養軟骨細胞では *Col1a1* と *Col1a2* の少量の発現を認めたが、これは、細胞を用意するときに線維芽細胞がコンタミしたためと考えられる。*Col1a2* 遺伝子のプロモーターのメチル化を調べたところ、誘導細胞では高度にメチル化されており、このことは線維芽細胞マーカーである I 型コラーゲン遺伝子がサイレンシングを受けていることを示す(図4)。

図4. 誘導細胞ラインの解析。上段、遺伝子発現解析。下段、Bisulfite シークエンスによる、プロモーター領域のメチル化解析

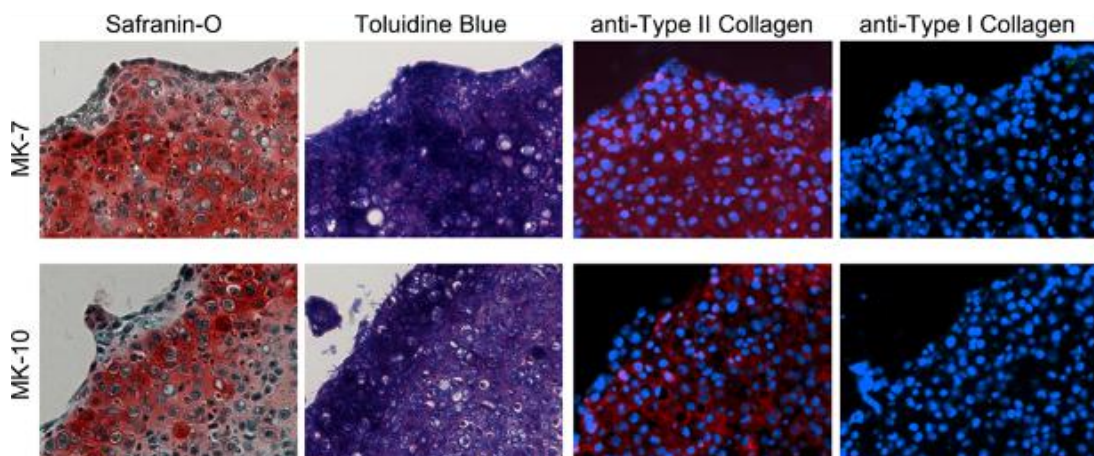


図5. 誘導細胞ラインをペレットカルチャーして、組織学的解析を行った。誘導細胞は軟骨マトリックスを作った。

さらに誘導細胞が軟骨様の組織を作れるかどうかを調べるために、3次元培養をペレットカルチャーで行った。誘導細胞は塊を作り、組織学的に解析したところ、サフランin Oに赤く、トルイジンブルーに紫色に濃く異染する細胞外マトリックスを作っていた(図5)。これはこのマトリックスが軟骨に含まれるグリコサミノグリカンを含むことを示す。さらに、免疫組織により、このマトリックスはII型コラーゲンを含み、I型コラーゲンを含まないことが判明した。以上のことより、マウス皮膚線維芽細胞に c-Myc, Klf4, SOX9 を導入して誘導したこれらの細胞は、培養で軟骨様組織を作りうる、軟骨細胞様の細胞であると考えた。

2) ヒト皮膚線維芽細胞から軟骨細胞様細胞を直接誘導。

マウス皮膚線維芽細胞から軟骨細胞様細胞を直接誘導できたので、ヒト皮膚線維芽細胞(Human dermal fibroblast, HDF)からも誘導できるか否かを検討した。HDF に c-MYC, KLF4, SOX9 をレンチウイルスベクターを用いて導入したところ、多角形の細胞は得られなかった。そこで、ベクターの種類を変えることを試みた。HDF にレトロウイルス受容体である Slc7a1 をスクレオフェクションにて導入し、次いで c-MYC, KLF4, SOX9 をレトロウイルスベクターを用いて導入した。すると、多角形の細胞を得ることが出来た。この細胞は重層化して結節を作り、結節はアルシアンブルーに染まった。

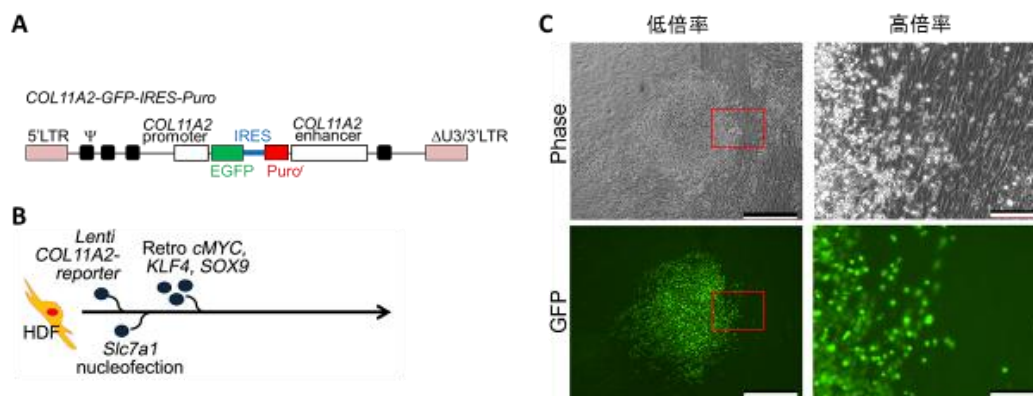


図6. HDF に COL11A2-EGFP-IRES-Puro レンチレポーターベクターを導入後、Slc7a1 をスクレオフェクションし、c-MYC, KLF4, SOX9 をレトロウイルスベクターを用いて導入した

HDF のうち多角形の細胞になるのは一部で、この多角形の細胞は、紡錘形をした線維芽細胞に取り囲まれていた。多角形の細胞をピックアップしても、線維芽細胞用の細胞がコンタミしてしまい、除去できなかった。そこで、軟骨細胞様細胞のみを選別するために、レポーターベクターをレンチウイルスを使って作製した。ヒトXI型コラーゲン α 2鎖遺伝子プロモーター、エンハンサーに EGFP-IRES-ピューロマイシン耐性遺伝子をレンチウイルスベクター上に構築した(図6A)。HDF に COL11A2-EGFP-IRES-Puro レンチレポーターベクターを導入後、Slc7a1 をスクレオフェクションし、c-MYC, KLF4, SOX9 をレトロウイルスベクターを用いて導入した(図6B)。多角形の形をした、重層化する細胞が誘導され、その細胞はEGFPを特異的に発現した(図6C)。この培養にピューロマイシンを添加しておく、紡錘形をした線維芽細胞用の細胞は死滅し、多角形の細胞からなる結節がコロニー状に残存した。残存した結節の多くがアルシアンブルーに染色された(図7)。これらのコロニーをピックアップし、細胞数を増やし、誘導細胞のラインを樹立した。ピックアップしたコロニーのうち、約9割は増殖を止めたが、約1割は10cmのdishを超えて増やすことが出来た。

樹立した各細胞ラインの遺伝子発現を解析した(図8A)。樹立した誘導細胞ラインは、軟骨細胞のマーカであるII型コラーゲン遺伝子(COL2A1)とアグリカン遺伝子(ACAN)を発現していた。親細胞の

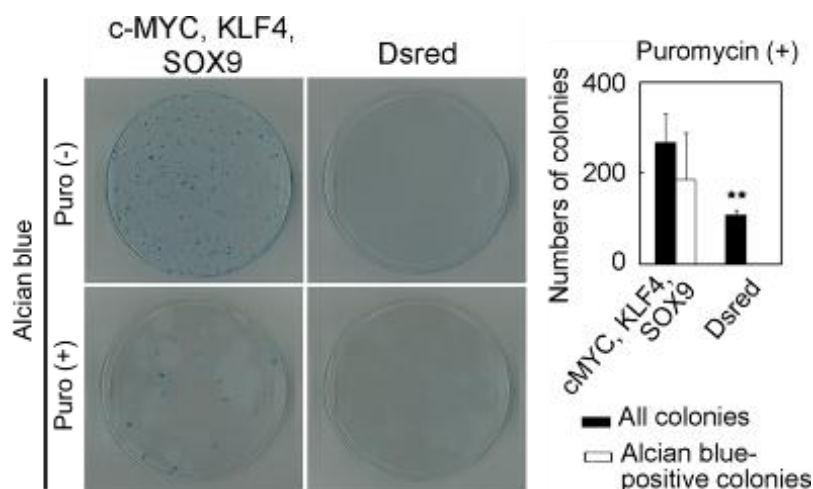


図7. HDF に COL11A2-EGFP-IRES-Puro レンチレポーターベクターを導入後、Slc7a1 をヌクレオフェクションし、c-MYC, KLF4, SOX9 をレトロウイルスベクターを用いて導入した。その後ピュロマイシンを培地に添加した。

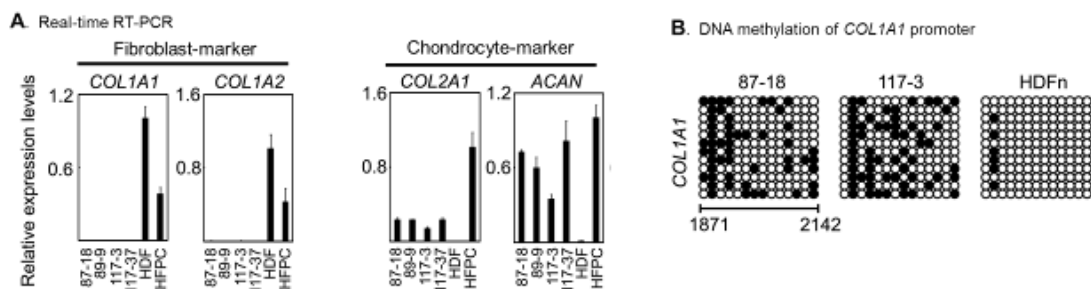


図8. 誘導細胞ラインの解析。A、遺伝子発現解析。B、Bisulfite シークエンスによる、プロモーター領域のメチル化解析

HDF はこれらの軟骨マーカー遺伝子を全く発現しておらず、初代培養軟骨細胞は発現していた。一方、線維芽細胞マーカーであるI型コラーゲン α 1鎖遺伝子(COL1A1)と α 2鎖遺伝子(COL1A2)を、HDF は発現していたが、誘導細胞ラインは発現していなかった。初代培養軟骨細胞ではCOL1A1とCOL1A2の少量の発現を認めたが、これは、細胞を用意するときに線維芽細胞がコンタミしたためと考えられる。COL1A1 遺伝子のプロモーターのメチル化を調べたところ、誘導細胞では高度にメチル化されており、このことは線維芽細胞マーカーであるI型コラーゲン遺伝子がサイレンシングを受けていることを示す(図8B)。

さらに誘導細胞が軟骨様の組織を作れるかどうかを調べるために、3次元培養をペレットカルチャーで行った。誘導細胞は塊を作り、組織学的に解析したところ、トルイジンブルーに紫色に濃く異染する細胞外マトリックスを作っていた。これはこのマトリックスが軟骨に含まれるグリコサミ

ノグリカンを含むことを示す。さらに、免疫組織により、このマトリックスは II 型コラーゲンを含み、I 型コラーゲンを含んでいないことが判明した。以上のことより、ヒト皮膚線維芽細胞に c-MYC, KLF4, SOX9 を導入して誘導したこれらの細胞は、培養で軟骨様組織を作る、軟骨細胞様の細胞であると考えた。

ヒト直接誘導軟骨細胞様細胞のカリオタイプは、ほぼ正常であった。3ラインの細胞について調べ、うち2ラインは20細胞ずつを調べて、全てが正常の核型であった。残る1ラインの細胞については、14細胞が正常核型で、6細胞が 46XY, i(17)(q10)であった。

3) 軟骨疾患患者の皮膚線維芽細胞から軟骨細胞様細胞を誘導

Type II collagenopathy は II 型コラーゲン遺伝子に変異があることで引き起こされる軟骨疾患である。遺伝子の中の変異の場所により、重症から軽症まで様々の程度の表現型が引き起こされる。重症型では成長軟骨の障害が強く、小人症、肋軟骨の脆弱性による呼吸困難による致死が引き起こされる。軽症例では早期発症の変形性関節症が引き起こされる。重症例である Achondrogenesis の患者より皮膚線維芽細胞を入手し、c-MYC, KLF4, SOX9 を導入して、軟骨細胞様細胞を誘導した。疾患細胞から誘導した軟骨細胞様細胞はアポトーシスが起こり (図 9 A)、電顕で ER の拡大が見られ (図 9 B)、RT-PCR で ER ストレスシグナル分子の発現上昇、を認めた。病態には、変異による不良 II 型コラーゲンペプチドの産生に伴う過度の ER ストレスが関与することが考えられた。また、軟骨形成を刺激する作用がある BMP, TGF β を添加すると、変異 II 型コラーゲンが発現が上昇し、結果として不良タンパクを増やして ER ストレスを増大させ、患者由来直接誘導軟骨細胞用細胞では軟骨形成が低下する事が判明した。このことは、type II collagenopathy の治療薬として、軟骨形成性の薬剤は症状を悪化させる事を示唆する。一方、タンパクフォールディングをアシストする分子シャペロンの一つである TMAO を添加すると、患者由来直接誘導軟骨細胞用細胞の生存が回復することを示した。このことは分子シャペロンが type II collagenopathy の治療薬の候補になり得ることを示す。これらの成果を Hum. Mol. Genet., 2014 に発表した。

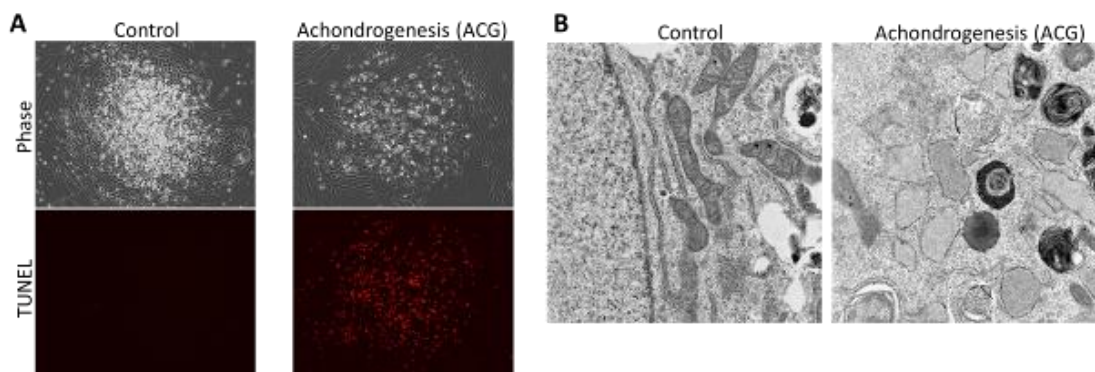


図9. Achondrogenesis 患者の皮膚線維芽細胞に c-MYC, KLF4, SOX9 を導入して、軟骨細胞様細胞を直接誘導した。(A) TUNEL アッセイ。Achondrogenesis の誘導細胞は細胞数が少なく、タナネル陽性で、アポトーシスに陥った。(B) コントールの直接誘導軟骨細胞の rER は扁平だが、Achondrogenesis の誘導細胞では rER が拡大していた。

もう一つの遺伝性軟骨疾患である、FGFR3 軟骨形成異常症について、疾患 iPS 細胞研

究を行った。この成果は、Nature, 2014 に発表した。iPS 細胞を軟骨細胞へと分化誘導するプロトコールについては、至適化した chondrogenic medium の下に、平面培養の後に浮遊培養に移行させることにより、軟骨組織を作ることができることを示した。この分化誘導方法については別途、論文にサブミット中である。FGFR3 軟骨形成異常症には、軟骨無形成症 (ACH) およびタナトフォリック骨異形成症 (TD) がある。ACH、TD ともに FGFR3 遺伝子に機能獲得変異が生じておこる。その機序として、変異により FGFR3 タンパクが分解抵抗性となり、過剰の FGFR3 タンパクが存在することが考えられている。

タナトフォリック骨異形成症 I 型 (TD1) の患者さんの皮膚の線維芽細胞から iPS 細胞株を樹立し、軟骨細胞に分化誘導させ、健康な方から作製した iPS 細胞 (正常) 株と比較した。正常 iPS 細胞株では軟骨組織の構造体である細胞外マトリックスが形成されているのに対し、TD1-iPS 細胞株 (図 10) からは細胞外マトリックスが作られず、軟骨の形成に異常を認めた。TD1-iPS 細胞株における軟骨誘導マーカー (Sox9 : 軟骨転写因子、COL2A1, ACAN : 軟骨細胞外マトリックス成分) の発現については、分化誘導開始後 14~21 日までは正常株と同程度の発現を示したが、28 日では低下していたことから、初期の段階までは軟骨細胞が正常株と同様に誘導されて、その後抑制されることが判明した。また、誘導 28 日後では、増殖細胞数も減少していた。

また、TD1-iPS 細胞で FGFR3 遺伝子をノックダウンしたところ、FGFR3 発現量が減少し、軟骨の誘導が回復することから、今回使用した TD1-iPS 細胞が疾患軟骨分化誘導モデルとして有用であることを確認した。

正常 iPS 細胞由来軟骨 TD1-iPS 細胞由来軟骨

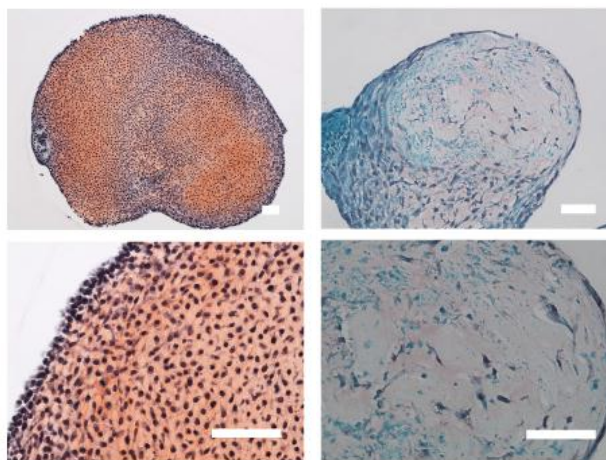


図 10. タナトフォリック骨異形成症 (TD1) 疾患特異的 iPS 細胞の軟骨誘導結果軟骨組織の構造体である細胞外マトリックスは赤色に染色される。誘導 42 日後、TD1-iPS 細胞株では軟骨の形成に異常が見られた。

TD1-iPS 細胞から軟骨細胞へと誘導する時にスタチンの一種であるロバスタチンを投与すると、異常の見られていた細胞外マトリックスの形成が回復した (図 11 左)。加えて、その他のスタチン類である、メバスタチン、アトルバスタチン、プラバスタチン、ロスバスタチン、フルバスタチンにおいても、TD1-iPS 細胞の軟骨形成を回復させる効果があることを確認した。

また、ACH-iPS 細胞においても、ロバスタチンで軟骨形成を回復させる、同様の効果が確認された (図 11 右)。

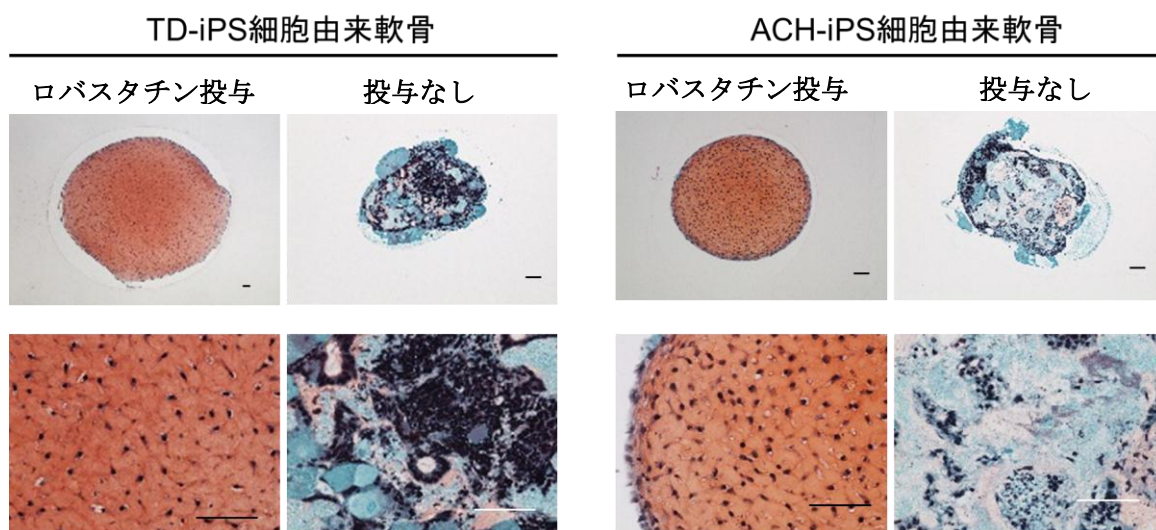


図 11 タナトフォリック骨異形成症 (TD1) および軟骨無形成症 (ACH) 疾患特異的 iPS 細胞の軟骨誘導に対するスタチンの影響。軟骨組織の構造体である細胞外マトリックスは赤色に染色される。ロバスタチンの投与により、TD1-iPS 細胞株ならびに ACH-iPS 細胞株は軟骨組織を作った。(誘導 28 日後)

さらに、体長や手足の短縮が見られる軟骨無形成症 (ACH) モデルマウスにおいて、生後 3 日から生後 2 週間までの間、ロバスタチンの腹腔内投与を毎日行うことにより、頭蓋骨の前後、前腕部、太ももの部分、すねの部分の骨の長さを測定したところ、正常のマウスと同程度に成長していることが判明した。

以上の結果から、スタチンが **FGFR3** 遺伝子変異で起こるこれら疾患の治療に有効である可能性が示された。スタチンは高コレステロール血症治療薬として既に臨床で使用されており、安全性や体内動態が臨床レベルで確認されていることから、通常の医薬品開発と比較すると時間とコストを削減して早く安く安全な薬を提供できる、ドラッグ・リポジショニングの可能性がある。しかし、実際の治療への応用までには、成人の心疾患や脳梗塞の治療・予防として使用されているスタチンを作用機序の異なる小児の疾患に使用できるのか、用量や副作用など安全性・有効性について詳細な検討が必要である。

3-2. 疾患モデル動物を用いた軟骨修復 (妻木、吉川グループ) (早期開始)

- ①研究のねらい： 再生医療への応用に向けて、誘導した軟骨細胞様細胞を実験動物に移植して、どのような組織を作りうるかを検討する。また、動物に関節軟骨欠損モデルを作り、誘導した細胞を移植して、関節軟骨修復への臨床応用に向けた、基礎データを得る。
- ②研究実施方法： マウスおよびヒトの皮膚線維芽細胞から誘導した軟骨細胞様細胞を、順次、動物の生体内に移植して、挙動を観察する。 1) マウス軟骨細胞様細胞をヌードマウスの皮下に移植して結果を観察する。 2) ヒト軟骨細胞様細胞を、ヌードマウスの皮下に移植して、結果を観察する。 そして、3) ヌードラットに関節軟骨欠損モデルを作り、ヒト軟骨細胞様細胞を移植して結果を観察する。
- ③当初の研究計画(全体研究計画書)に対する現在の研究進捗状況(§ 2. と関連します)と得られた成果：

マウスおよびヒト直接誘導軟骨細胞様細胞をヌードマウスの皮下に移植したところ、組織学的に均一な硝子軟骨組織を作った。そして、ヌードラットの関節軟骨に欠損を作り、

ヒト直接誘導軟骨細胞様細胞を移植したところ、欠損部を埋める軟骨組織を認める結果を得た。今後は、イヌやブタなど、より大動物における軟骨欠損モデルに対して、直接誘導軟骨細胞様細胞を移植する実験を検討する。

1) マウス軟骨細胞様細胞をヌードマウスの皮下に移植。

マウス皮膚線維芽細胞に c-Myc, Klf4, SOX9 を導入して直接誘導した軟骨細胞様細胞をヌードマウスの皮下に移植して、4 週後に観察したところ、ホストの皮下脂肪の組織の中に、サフラニン O に染色する軟骨様の組織が形成された (図 1 A)。誘導細胞には GFP を導入している。抗 GFP 抗体を用いて免疫染色したところ、GFP を発現する細胞の領域 (図 1 B) は、サフラニン O に染まる領域 (図 1 A) とほぼ完全に一致した。このことから、移植した細胞は、ほぼ全て軟骨を作ることに参加した、即ち軟骨細胞であると考えた。

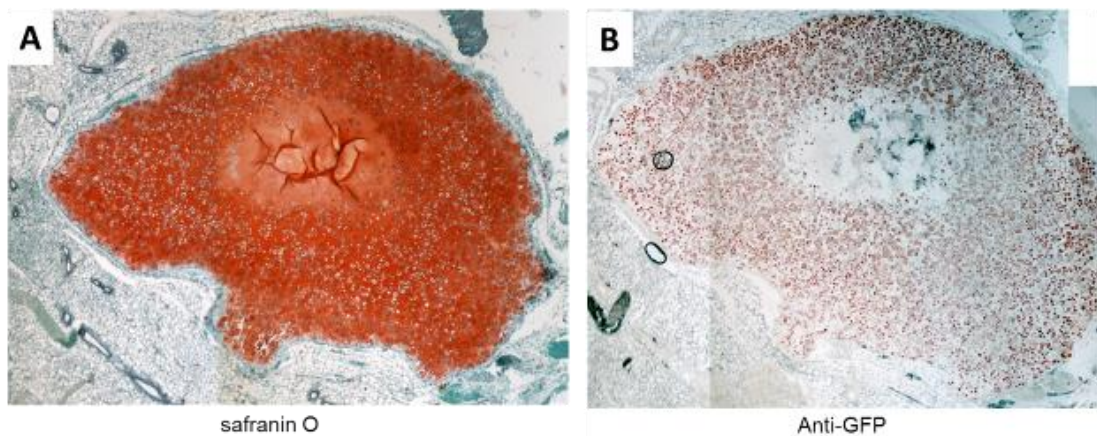


図1. マウス直接誘導軟骨細胞をヌードマウスの皮下に移植後4週が経過した局所の組織像。

その組織の拡大は、サフラニンOに濃染する細胞外マトリックスの中に細胞が散在する像で、免疫染色にてマトリックスは軟骨特有の II 型コラーゲンでできていた。線維芽細胞が作る I 型コラーゲンは存在しなかった。このことから出来た組織は、良質な軟骨である硝子軟骨に相当すると考えた。

移植後、継時的に組織を回収して軟骨が形成される過程を観察した。移植後、1 週では細胞は BrdU でよくラベルされ、増殖していた。移植後 3 週、4 週と経つに連れて軟骨マトリックスが産生されて組織が成熟するとともに、BrdU でラベルされる細胞が著減し、4 週ではほとんどなくなった。このことは移植後、細胞の分化が進み、増殖が抑制されたことを示す。移植後、細胞の増殖は抑制され、移植後 12 週経っても腫瘍を作らない誘導細胞ラインがある一方で、腫瘍を作る細胞ラインもあった。腫瘍を免疫染色で調べると、線維芽細胞のマーカーである I 型コラーゲンを強く発現していた。このことから、軟骨への細胞リプログラミングが不十分で、線維芽細胞の性質が残存している細胞は、移植すると腫瘍を作ることが考えられた。誘導細胞では c-Myc, Klf4 トランスジーンの持続発現があり、腫瘍化に関連していると思われた。

2) ヒト軟骨細胞様細胞をヌードマウスの皮下に移植。

ヒト皮膚線維芽細胞に c-MYC, KLF4, SOX9 を導入して誘導、樹立した軟骨細胞様細胞ラインの、生体における軟骨形成能を調べるために、ヒト直接誘導軟骨細胞様細胞をヌードマウスの皮下 4 2 か所に移植した。4 週後に移植部を調べたところ、1 4 か所に

塊が出来ており、いずれも組織学的にサフランin Oに染まる軟骨組織が出来ていた（図2）。免疫組織でこのマトリックスにはII型コラーゲンが含まれ、I型コラーゲンは周辺部を除いて殆ど含まれなかった。ヒトのビメンチンのみを認識する抗ヒトビメンチン抗体で免疫染色を行うと、軟骨部に一致してシグナルを認めた。これらのことより、移植したヒト誘導細胞は、マウスの皮下において硝子軟骨を作りうる事が判明した。残る28か所には何も存在せず、移植した細胞は死滅したと考えられた。より長期の観察では、ヒト直接誘導軟骨細胞様細胞をヌードマウスの皮下17か所に移植し、3か月観察したところ、3か所で軟骨組織の形成を認め、残る14か所にはには何も存在しなかった。いずれの移植部においても、腫瘍は出来なかった。

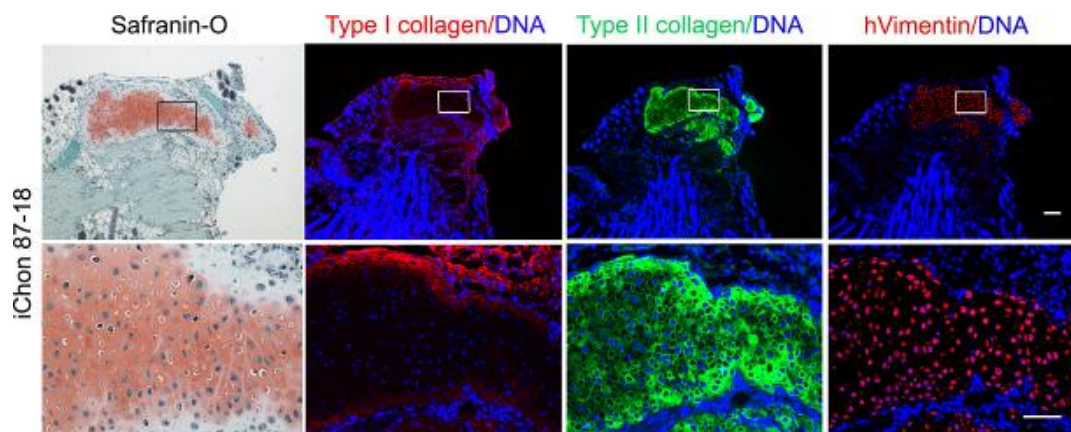


図2. ヒト直接誘導軟骨細胞様細胞をヌードマウスに移植後4週に形成されたものの組織像。

3) ヌードラットに関節軟骨欠損モデルを作り、ヒト軟骨細胞様細胞を移植

次に、ヒト直接誘導軟骨細胞様細胞が正所性の軟骨形成に貢献しうるかを調べるために、ヌードラットの膝関節軟骨に直径1 mmの欠損を作り、この細胞を3週間ペレットカルチャーしたものを移植した。移植後4週で移植部を組織学的に解析した（図3）。欠損部には軟骨様組織が存在し、免疫染色でII型コラーゲンが存在し、抗ヒトビメンチン抗体に免疫染色された。このことから、ヒト直接誘導軟骨細胞様細胞は軟骨欠損を軟骨組織で埋めることに貢献しうると考えた。現状では、組織学的に完全な修復とは言えないレベルであるが、細胞を適切なスキヤフォールドに入れるなどしてから移植することにより、成績を改善しうる可能性がある。

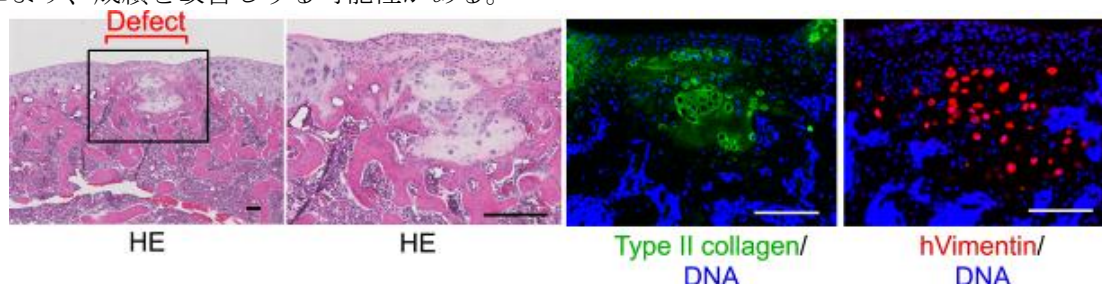


図3. ヌードラットの膝関節の大腿骨頭部に直径1 mmの欠損を作り、ヒト直接誘導軟骨細胞様細胞を3週間ペレットカルチャーしたものを移植した。移植後4週の組織像。

以上より、ヒト皮膚線維芽細胞にc-MYC, KLF4, SOX9を導入して直接誘導した細胞は軟骨様組織を作り、関節軟骨欠損部に移植すると組織を支えうることが示された。

3-3. 軟骨前駆細胞誘導過程の可視化 (妻木グループ) 及び 脂肪細胞からの軟骨前駆細胞誘導 (妻木グループ) 及び 骨芽細胞様細胞の誘導 (妻木、吉川グループ)

① 研究のねらい: 我々は、2つのリプログラミング因子(c-Myc, Klf4)と一つの軟骨因子(SOX9)を導入することにより、マウス皮膚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出来ることを発見した。誘導した細胞をマウスの皮下に移植すると、均一な軟骨組織を作ったことから、誘導した細胞は軟骨細胞様細胞であると考えた。しかし、培養皮膚線維芽細胞が、どのような経路、仕組みでもって、軟骨細胞様の細胞に変換されるかについては、これからの研究課題である。本研究項目のねらいは、真皮線維芽細胞が軟骨細胞様の形質を獲得する過程を捉えうる培養系を構築し、線維芽細胞培養中のどのような細胞が軟骨細胞になるかについて洞察を得ることである。軟骨の性質を獲得した細胞を選別するために、軟骨特異的 Col112 プロモーター/エンハンサーに、bgeo(b-galactosidase とネオマイシン耐性遺伝子の融合遺伝子)を結合したレポーターマウスを作製して用いたが、b-galactosidase の発現は、細胞を固定して X-gal 染色しないと観察できない。そのため、リアルタイムでの発現解析、タイムラプス観察が不可能であった。そこで、本研究項目では、軟骨特異的 Col112 プロモーター/エンハンサーに、EGFP を結合したレポータートランスジェニックマウスを作製し、軟骨細胞直接誘導における、リアルタイムでの発現解析、タイムラプス観察を可能にすることを目指す。また、ネオマイシンに比べて細胞死を短時間で引き起こすピューロマイシンを細胞選別に使うことを目的に、ピューロマイシン耐性遺伝子を IRES でつないだレポーターを採用する。

また、この細胞のタイプ変換技術の普遍性を調べる目的で、リプログラミング因子と組織特異的因子を組み合わせて導入することにより、真皮線維芽細胞 → 軟骨細胞だけでなく、脂肪細胞 → 軟骨細胞、真皮線維芽細胞 → 骨芽細胞といった分化転換も可能であるか否かを検討する。

- ② 研究実施方法: 1)真皮線維芽細胞培養から軟骨細胞様細胞が誘導される過程を可視化するために、軟骨特異的レポーターとして、軟骨特異的コラーゲンである XI 型コラーゲン $\alpha 2$ 鎖遺伝子(Col11a2)プロモーター/エンハンサーに、EGFP / Puromycin 耐性遺伝子を結合したトランスジーンコンストラクトを用意した。これを持つトラスにジェニックマウス(Col11a2-EGFP-Puro)を作り、皮膚線維芽細胞(MDF)を用意した。Col11a2-EGFP-Puro MDF に c-Myc, Klf4, SOX9 を導入して軟骨細胞様細胞を作り、その過程をタイムラプス撮影した。2)脂肪細胞 → 軟骨細胞の細胞変化が可能か否かを調べるために、マウス皮下脂肪から調整した細胞に、c-Myc, Klf4, SOX9 を導入して軟骨細胞様細胞を誘導できるか検討する。3)骨の再生に貢献するために、皮膚線維芽細胞から骨芽細胞様細胞を直接誘導する方法を開発する。
- ③当初の研究計画(全体研究計画書)に対する現在の研究進捗状況(§2. と関連します)と得られた成果:

1)軟骨前駆細胞誘導過程の可視化は、軟骨に特異的に GFP を発現するトランスジェニックマウスが早くつくれ、それに伴って早期に完了した。2)脂肪細胞からの軟骨前駆細胞誘導は、脂肪細胞からも、線維芽細胞からと同様の手法で軟骨細胞様細胞が誘導できることが判明し、脂肪組織も軟骨再生の細胞ソースになりうる事が示唆された。3)骨芽細胞様細胞の誘導については、当研究チームは軟骨に専念することとし、中止した。

1)軟骨前駆細胞誘導過程の可視化

Col11a2-EGFP-Puro トランスジェニックマウスが早くに作れ、高度に軟骨特異的なレポーター発現を得ることが出来た(図1)。GFP 発現の軟骨特異性が極めて高いことにより、以降の実験を正確に行うことが出来た。Col11a2-EGFP-PuroトランスジェニックマウスのMDFを用意し、c-Myc, Klf4, SOX9 をレトロウイルスベクターを用いて導入した。MDF は GFP を発現しないが、MDF の細胞が軟骨の形質に変わると、GFP を発現しだす。軟骨細胞への誘導過程ではレトロウイルス導入後、GFP は3日で出現し、8日で細胞は重層化して結節を作り GFP の蛍光をはっきりと認めた(図2)。よって、線維芽細胞が軟骨細胞に変換されるのは 3-8 日以内であることが分かった。

また、軟骨細胞は、Col11a2-EGFP ネガティブの細胞から誘導されることが判明した。Col11a2-EGFP は軟骨前駆細胞に発現する。このことから、直接誘導軟骨細胞様細胞は、皮膚線維芽細胞培養中の、少なくとも軟骨系譜以外の細胞から lineage reprogramming によって誘導されていることが示された。

これらの成果を J Clin Invest, 2011 の中で発表した。

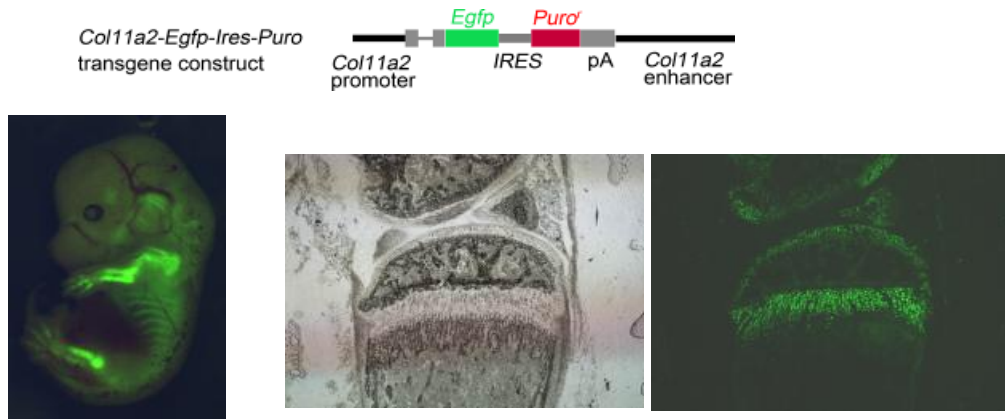


図1. Col11a2-EGFP-Puro トランスジェニックマウス。(A)トランスジーンコンストラクト。(B) 交配後 13.5 日目の胎仔では、四肢および肋骨の軟骨原基特異的に GFP が発現している。(C) 生後 3 週齢の膝関節。関節軟骨と成長軟骨に特異的に GFP が発現している。

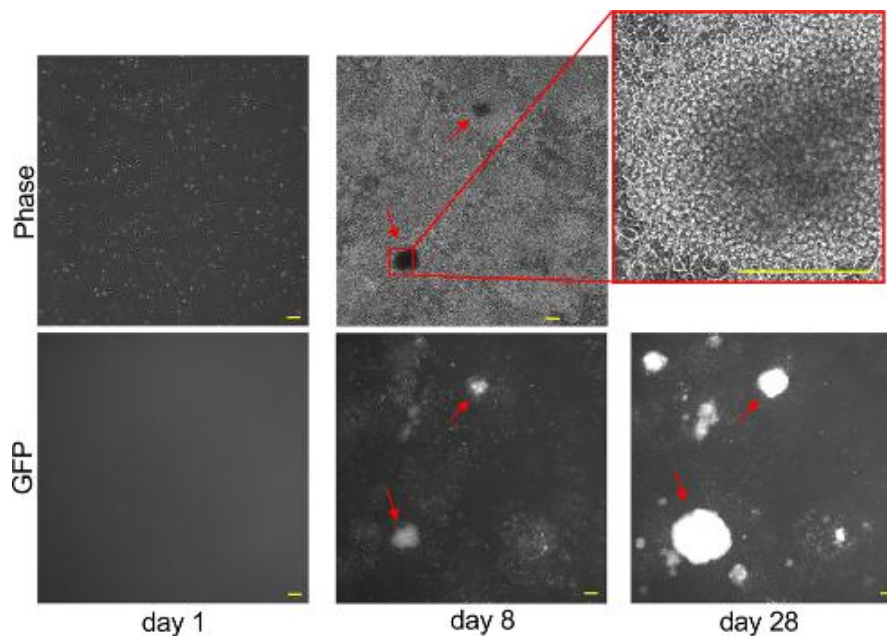


図2. Col11a2-EGFP-Puro トランスジェニックマウスの MDF に c-Myc, Klf4, SOX9 レトロウイルスベクターを導入後、タイムラプス撮影を行った。上段は phase、下段は GFP 蛍光画像。レトロウイルス導入直後の day1 では、どの細胞も GFP を発現していなかった。この中から、GFP を発現する細胞が出現した。

2) 脂肪細胞からの軟骨前駆細胞誘導 (妻木グループ)

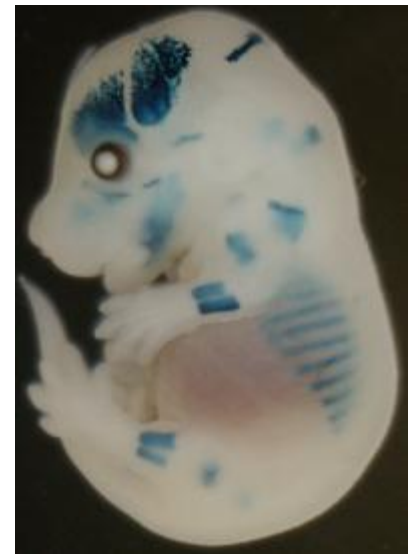
Col11a2-bgeo (bgeo は b-galactosidase とネオマイシン耐性遺伝子の fusion gene) トランスジェニックマウスの皮下脂肪から調整した細胞 (ADSC) に、c-Myc, Klf4, SOX9 をレトロウイルスベクターを用いて導入後、G418 存在下に培養し、出現したコロニー数を計測したところ、コロニーの約半数はアルシヤンブルーに染色され、軟骨細胞様細胞であると考えた (アルシヤンブルーは軟骨基質のプロテオグリカンを染色する)。

誘導効率は、皮膚線維芽細胞を用いた時に比べて、少し低かったものの、軟骨細胞様細胞の細胞ソースとして皮下脂肪も使えると考えた。軟骨細胞様細胞への細胞変換が線維芽細胞だけでなく、脂肪細胞からも行えることから、この変換方法には普遍性がある可能性が示唆された。この成果を J Clin Invest, 2011 の中で発表した。

3) 骨芽細胞様細胞の誘導 (妻木、吉川グループ) (途中中止)

骨芽細胞特異的に b-geo (b-galactosidase とネオマイシン耐性遺伝子の fusion gene) を発現するトランスジェニックマウス (2.3kb Col1a1-bgeo transgenic mice) を作製できた (右図。16.5 dpc の胎仔マウス。頭蓋骨、四肢及び肋骨の骨に特異的に b-galactosidase 活性を示した。)。このマウスの真皮線維芽細胞を培養し、4つのリプログラミング因子 (c-Myc, Klf4, Sox2, Oct3/4) と骨芽細胞因子 (Runx2, Osterix, b-Catenin) などを種々に組み合わせ導入した。予備実験による検討では、石灰化を起こすような骨芽細胞様の細胞はまだ得られず、候補遺伝子の対象を広げる必要性が示唆された。

一方、軟骨への誘導は順調に進み、本研究チームは軟骨細胞様細胞の誘導を研究して、その技術を再生医療と軟骨疾患モデルへの応用することに専念し、骨芽細胞の誘導は中止することとした。



3-4. 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 (妻木、吉川グループ) 及び 5. 一過性発現による細胞の誘導 (妻木グループ)

①研究のねらい: 細胞リプログラミングによって線維芽細胞から軟骨細胞が誘導されているならば、c-Myc, Klf4, SOX9 トランスジーン発現は誘導時のみに必要で、誘導後はその発現が無くても誘導細胞は軟骨細胞として維持されるはずである。その場合、軟骨細胞様細胞は cMYC, KLF4, SOX9 の一過性発現で誘導できることとなり、ゲノムにインテグレートされないベクターを用いて安全な軟骨細胞様細胞を誘導することが望みうる。再生医療への応用に向けて、移植しうる安全な細胞を誘導することが最終目標である。

②研究実施方法: 1)レトロウイルスベクターで導入した cMYC, KLF4, SOX9 トランスジーン発現は、誘導後の軟骨細胞でも発現し続け、サイレンシングは起こっていなかった。そこで、Doxycyclin-inducible lentiviral vector を用い、Dox 存在下に cMYC, KLF4, SOX9 を発現させて軟骨細胞様細胞を誘導し、その後 Dox を除去しても細胞が軟骨の形質を保つか否かをマーカー遺伝子の発現などで検討する。2)また、軟骨疾患の細胞移植治療に向けて、安全な軟骨細胞様細胞を誘導するために、センダイウイルスベクターを用いて細胞誘導することを検討する。

③当初の研究計画(全体研究計画書)に対する現在の研究進捗状況(§ 2. と関連します)と得られた成果:

1) Doxycyclin-inducible system を用いた cMYC, KLF4, SOX9 発現による、軟骨細胞様細胞の誘導。

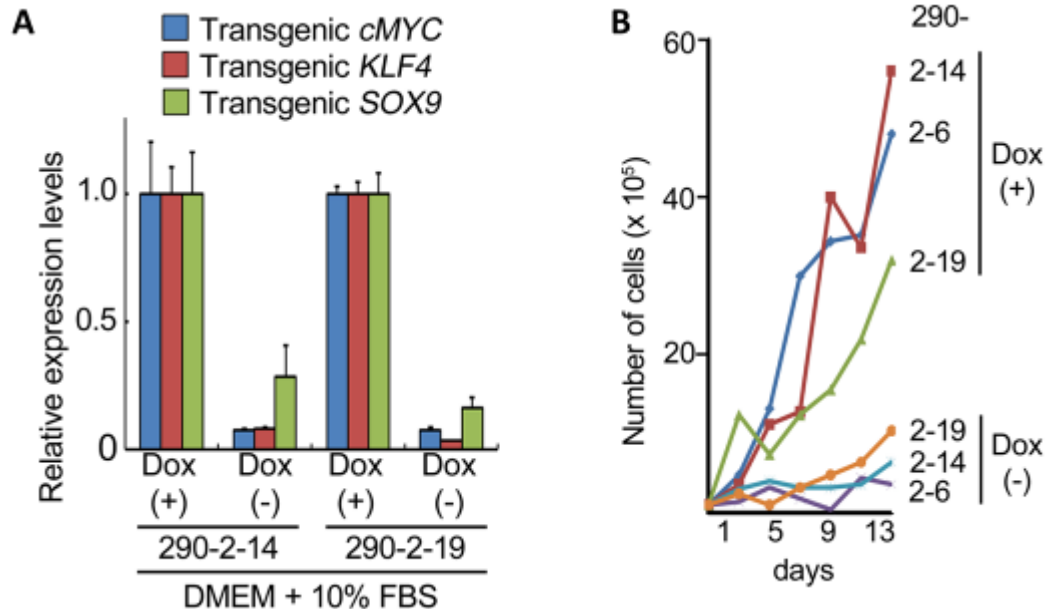
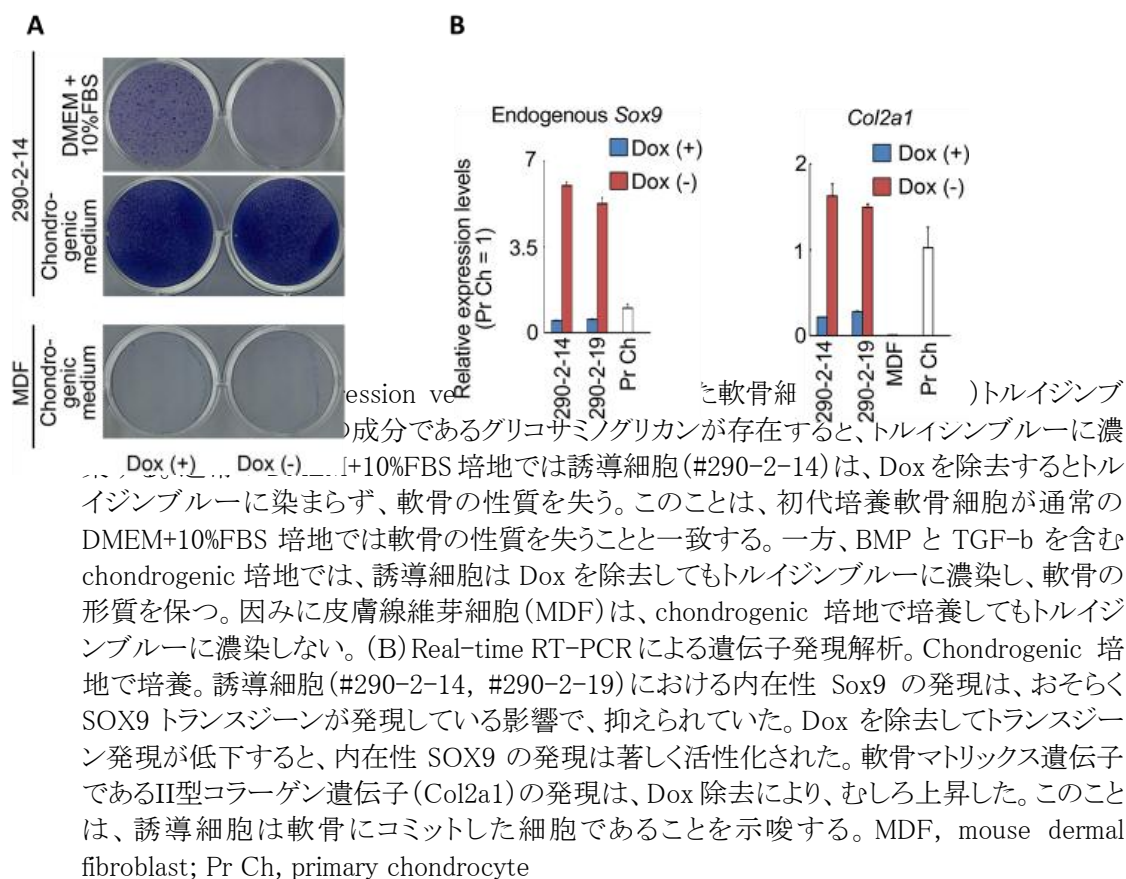


図1. Dox-inducible expression vector system を用い、Dox 存在下に培養して誘導した軟骨細胞様細胞ライン(#290-2-14 と#290-2-19)。(A)Dox を除去すると、誘導軟骨細胞様細胞の cMYC, KLF4, SOX9 発現は著明に低下した。Real-time RT-PCR による解析。(B)Dox を除去すると、誘導軟骨細胞様細胞(#290-2-6, #290-2-14, #290-2-19)の増殖能は低下した。

Doxycyclin-inducible lentiviral vector の作製は順調に進んだ。rt-TA の導入はレトロウイルスベクターを用い、ついで TRE (tetracycline responsible element)-cMYC, TRE-KLF4, TRE-SOX9 の導入にはレンチウイルスベクターを用いた。これらのウイルスベクターを、Col11a2-EGFP-Puro トランスジェニックマウスから用意した皮膚線維芽細胞(MDF)に導入し、Doxycyclin (Dox)存在下に培養した。遺伝子導入後、3日目よりGFP陽性となる細胞が出現したので、ピューロマイシンを添加して、軟骨細胞様細胞になった細胞をセレクションした。生き残った細胞はコロニーを作り、それらをピックアップして、軟骨細胞様細胞ラインを樹立した。これら誘導軟骨細胞様細胞は、Dox 存在下では cMYC, KLF4, SOX9 トランスジーンを発現していたが、Dox を除去することで著明に低下した(図1A)。細胞増殖を調べると、Dox を除去した培地では、誘導細胞の増殖が低下した(図1B)。これは、Dox 存在下では cMYC, KLF4 トランスジーン発現が持続発現し、細胞の増殖を促進していることが考えられる。次に、誘導細胞の c-MYC, KLF4, SOX9 トランスジーン発現が低下しても、軟骨の形質を保つか否かを調べた。これらの細胞は、BMP や TGF β を含む chondrogenic medium 中で培養し Dox を添加しておく、多角形の形をし、GFP を発現する。この誘導細胞は、Col11a2-EGFP-Puro トランスジェニックマウスの MDF から作製したので、GFP の発現は Col11a2 の発現を意味し、さらには軟骨形質を持つことを意味する。培地から Dox を除去しても、誘導細胞の形は多角形のままで、GFP は発現し続けた(図2)。そして、軟骨の形質をトルイジンブルー染色で検討した(図3A)。この誘導細胞は、Dox を除去しても、トルイジンブルーに紫色に濃染する異染性を示した。トルイジンブルーの異染性は、グリコサミノグリカンの存在を意味する。グリコサミノグリカンは軟骨に豊富に存在するマトリックスであり、この結果は、誘導軟骨細胞様細胞は、Dox を除去してトランスジーンを発現を著減させても、chondrogenic medium 中で培養する環境においては、軟骨の形質を保つことを意味する。

さらに遺伝子発現を検討すると、Dox 除去によって SOX9 トランスジーン の発現が抑制される (図 1A) と共に、内在性の Sox9 の発現が著明に上昇していた (図 3B, 左グラフ)。軟骨細胞マーカーである II 型コラーゲン遺伝子やアグリカン遺伝子の mRNA 発現は、Dox を除去することでむしろ上昇していた (図 3B, 右グラフ)。c-MYC と KLF4 は皮膚線維芽細胞を軟骨細胞様細胞へ変換するときには、未分化方向に戻す役割を担っているが、軟骨にコミットした後はむしろ軟骨分化を抑制すると考えられる。Dox を除去することで c-MYC と KLF4 トランスジーン 発現が低下し、結果的に軟骨分化がより進んだため、軟骨細胞マーカーの発現が上昇したと考えた。このことから誘導細胞では軟骨への細胞リプログラミングが起きており、軟骨形質が獲得されていると考えた。このことと、細胞誘導によってマーカー遺伝子プロモーター領域の DNA メチル化が変化していたことから、細胞リプログラミングが起こっていると考えた。これらの成果を J Clin Invest, 2011 の中で発表した。



成分であるグリコサミングリカンが存在すると、トルイジンブルーに濃染し、Dox (+) ... Dox (-) ... +10%FBS 培地では誘導細胞 (#290-2-14) は、Dox を除去するとトルイジンブルーに染まらず、軟骨の性質を失う。このことは、初代培養軟骨細胞が通常の DMEM+10%FBS 培地では軟骨の性質を失うことと一致する。一方、BMP と TGF- β を含む chondrogenic 培地では、誘導細胞は Dox を除去してもトルイジンブルーに濃染し、軟骨の形質を保つ。因みに皮膚線維芽細胞 (MDF) は、chondrogenic 培地で培養してもトルイジンブルーに濃染しない。(B) Real-time RT-PCR による遺伝子発現解析。Chondrogenic 培地で培養。誘導細胞 (#290-2-14, #290-2-19) における内在性 Sox9 の発現は、おそらく SOX9 トランスジーンが発現している影響で、抑えられていた。Dox を除去してトランスジーン発現が低下すると、内在性 SOX9 の発現は著しく活性化された。軟骨マトリックス遺伝子である II 型コラーゲン遺伝子 (Col2a1) の発現は、Dox 除去により、むしろ上昇した。このことは、誘導細胞は軟骨にコミットした細胞であることを示唆する。MDF, mouse dermal fibroblast; Pr Ch, primary chondrocyte

2) ゲノムに挿入されないベクターを用いる、一過性発現による細胞の誘導

上記の Dox-inducible system を用いて誘導した軟骨細胞様細胞の解析の結果により、軟骨細胞様細胞が誘導された後は、トランスジーン の持続発現は必要ではなく、chondrogenic 培地で培養すれば軟骨細胞の形質が保たれることが判明した。このことから、移植可能な安全な誘導軟骨細胞様細胞を誘導するために、cMYC, KLF4, SOX9 を一過性に発現させて軟骨細胞様細胞を誘導することを目指した。

エピソーマルベクターでは軟骨細胞様細胞の誘導が困難で中止した。トランスジーン の発現量または発現期間が不十分と思われた。

3-5. 軟骨前駆細胞の誘導過程の解析

• Col1a2-bgeo; Nanog-EGFP マウスの作製、細胞誘導(妻木グループ)

①研究のねらい: 再生医療においては、移植に用いる疾患臓器の細胞を安全な状態で得ることが一つの目標である。iPS 細胞の開発により、患者自身の皮膚線維芽細胞をフルリプログラミングして iPS 細胞を作り、その後目的の細胞タイプに分化させて移植することが可能になりつつある。この過程における危険性として、iPS 細胞を分化させたときに、未分化な細胞が残っていると、移植した時に奇形腫を作ってしまうことがある。それに対してダイレクト・リプログラミングにより皮膚線維芽細胞から目的の細胞を直接誘導した場合には、iPS 細胞の状態を経っていないので、移植した時の奇形腫形成の危険性を無くせる。本研究で行っている軟骨細胞様細胞の誘導にはリプログラミング因子である、c-Myc と Klf4 を用いているため、安全性を議論するためには、誘導過程において多能性の状態を経ているかどうかを確認する必要がある。

②研究実施方法: 誘導過程にある細胞から継時的に RNA を抽出し、多能性や発生初期のマーカー遺伝子の発現を観察する。次に、個々の細胞が多能性を経ているか否かを検討するために、Nanog-EGFP トランスジェニックマウス(京大 CiRA、山中先生より供与)の MDF に、c-Myc, Klf4, SOX9 を導入してタイムラプス撮影し、Nanog-EGFP が発現するか否かを観察する。ポジティブコントロールとして同 MDF に c-Myc, Klf4, Sox2, Oct3/4 を導入して iPS 細胞を誘導し、Nanog-GFP が発現することを確認しておく。また、皮膚線維芽細胞が線維芽細胞の形質を失い、軟骨の形質を獲得する経緯を推測するために、誘導過程にある細胞から継時的に RNA を抽出し、線維芽細胞および軟骨細胞マーカーの発現を解析する。

③当初の研究計画(全体研究計画書)に対する現在の研究進捗状況(§ 2. と関連します)と得られた成果:

軟骨細胞様細胞の誘導過程では多能性の状態を経ないことを示し、BBRC, 2011 に報告した。マウス皮膚線維芽細胞(MDF)に、c-Myc, Klf4, SOX9 を導入後、継時的に細胞ライセートを回収して RNA を抽出して RT-PCR を行ったところ、多能性や発生初期のマーカー遺伝子は発現しなかった(図1)。このことから、皮膚線維芽細胞から軟骨細胞様細胞を直接誘導する過程では、多能性や未分化の状態を経ないことが示唆された。

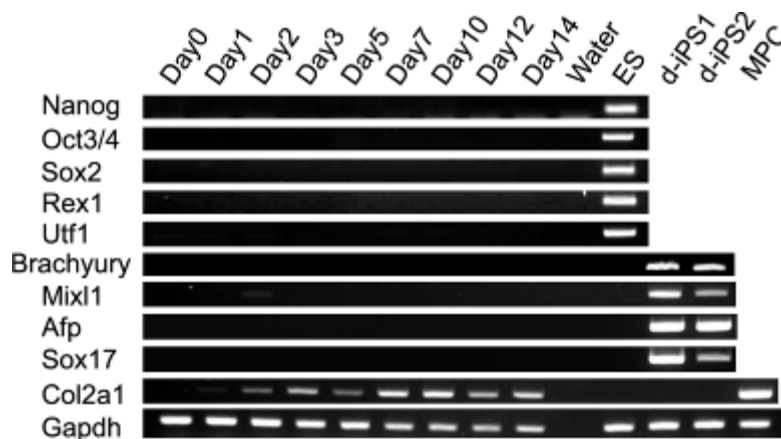


図1. マウス皮膚線維芽細胞(MDF)に、c-Myc, Klf4, SOX9 を導入後、継時的に細胞ライセートを回収して RNA を抽出して RT-PCR を行った。ES はES細胞。d-iPS1, 2 は初期分化させた iPS 細胞。初期発生マーカーのポジティブコントロール。MPCは mouse primary chondrocyte で、軟骨細胞マーカーのポジティブコントロール。

次に、軟骨細胞様細胞の直接誘導過程において、個々の細胞のレベルにおいても多能性の状態を経ていないことを確認するために、Nanog-EGFP トランスジェニックマウスの MDF から細胞を誘導した。Nanog-EGFP は Nanog ローカスにEGFPを挿入した BAC トランスジーンを持つマウスで、多能性細胞で EGFP を発現する (Okita et al., *Nature*, 448: 313-7, 2007)。Nanog-EGFP MDF に、c-Myc, Klf4, SOX9 を導入後、継時的に観察したところ、軟骨細胞様細胞が誘導されてきたが、GFP の発現は認めなかった。

一方、ポジティブコントロールとして同 MDF に c-Myc, Klf4, Sox2, Oct3/4 を導入して iPS 細胞を誘導したところ、iPS 細胞の出現に一致して、GFP の蛍光を認めた。よって、MDF に c-Myc, Klf4, SOX9 を導入して軟骨細胞様細胞を誘導する過程では、多能性の状態を経ていないと考えた。このことから、直接誘導軟骨細胞様細胞は、理論的に奇形腫を作らないと考えられる。

実際、マウス皮膚線維芽細胞に c-Myc, Klf4, SOX9 を導入して得られた直接誘導軟骨細胞様細胞をマウスの皮下に移植したところ、均一な軟骨組織が出来て、奇形腫は出来なかった。ただし、誘導した細胞のラインによっては、奇形腫以外の腫瘍を作る細胞ラインもあった。腫瘍は、線維芽細胞マーカーである I 型コラーゲンを発現しており、線維芽細胞様の腫瘍であることが示唆され、軟骨細胞様へのリプログラミングが不十分な細胞がそのような腫瘍を作ると考えた。この軟骨細胞様細胞を誘導するための c-Myc, Klf4, SOX9 の導入はレトロウイルスを用いて行われ、中でも c-Myc, Klf4 トランスジーンを持続発現が、この腫瘍の発生に関連すると考えられた。再生医療に応用できるような移植可能な安全な直接誘導軟骨細胞様細胞を作れるように、ゲノムにインテグレートされないベクターを用いて一過性発現で直接誘導できるような技術を開発する必要がある。また、皮膚線維芽細胞が軟骨形質を獲得する経緯を継時的に調べるために、皮膚線維芽細胞に c-Myc, Klf4, SOX9 を導入後、継時的に細胞ライセートを回収して RNA を抽出して、皮膚線維芽細胞と軟骨細胞のマーカー遺伝子の発現を RT-PCR を用いて解析した。c-Myc, Klf4, SOX9 を導入後2日後に線維芽細胞マーカーであるI型コラーゲン遺伝子 (Col1a1, Col1a2) の発現が低下した。そして、軟骨細胞マーカーであるII型コラーゲン遺伝子 (Col2a1) の発現はそれに遅れて5日目以降に発現が上昇し始めた。iPS 細胞の誘導過程においては、c-Myc, Klf4, Sox2, Oct3/4 のうち、c-Myc, Klf4 が線維芽細胞の性質を消去することに係っているという報告がなされている。最初に線維芽細胞の形質が消えた後に軟骨細胞の形質が現れたという本結果は、まず c-Myc, Klf4 が線維芽細胞を部分リプログラムして epigenetic status をある程度未分化な状態にし、そこで SOX9 が働いて軟骨細胞系譜へコミットさせているという考えをサポートする。これらの成果を BBRC, 2011 の中で発表した。

•Dox による再リプログラミングによる細胞誘導系の確立(妻木グループ) (早期に開始終了)

- ①研究のねらい: 「2. 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」で作製した Doxycyclin-inducible 誘導軟骨細胞様細胞は、Dox を除去し、変性培地で培養すると、脱分化して軟骨の形質を失う。これは培養初代軟骨細胞と同じである。そこで再び Dox を投与すると、c-Myc, Klf4, SOX9 トランスジーンが再発現し、軟骨細胞様細胞に誘導できると、軟骨細胞誘導の簡便な系ができ、実験を行いやすくなる。
- ②研究実施方法: Doxycyclin-inducible 誘導軟骨細胞様細胞を Dox を除去して培養した後に、Dox を再投与して、軟骨への再誘導が起こるかを観察する。
- ③当初の研究計画 (全体研究計画書) に対する現在の研究進捗状況 (§ 2. と関連します) と得られた成果: Dox 再投与によって、軟骨細胞への再誘導が起こった。即ち、Col1a2-EGFP の発現が再び起こり、アルシアンブルーの染色性が回復した。また、細胞の形は多角形を取り戻した。予定より早期に行えた。

3-6. 作製効率を上げる技術開発の基礎: 軟骨細胞分化制御機構の解析

皮膚線維芽細胞などから軟骨細胞様細胞を誘導する効率を上げるためには、誘導に使う因子の軟骨における機能、誘導後の細胞の安定性を保つこと、誘導を促進する化合物の探索などの研究を合わせて行うことが効果的である。これに関して、以下の3つの新たな展開と成果があった。1) 誘導に使う軟骨因子 SOX9 の軟骨細胞における新たな機能を発見した (Ikegami et al., Development, 2012 に報告)。2) 軟骨細胞の肥大化に係る因子として SIK3 を同定した。SIK3 を抑制することで硝子軟骨細胞の状態を保てることを発見した (Sasagawa et al., Development, 2012 に報告)。それぞれについて内容を説明する。

1) 軟骨因子 SOX9 の軟骨細胞における新たな機能: Sox9 は分化した軟骨細胞において、軟骨細胞の生存に必須である (Ikegami et al., Development, 2012 に報告)。

ヒト及びマウスの genetics の研究により、SOX9 は軟骨の形成に必須の遺伝子であることが報告されている。それゆえ、本研究において軟骨細胞を誘導する時に導入する因子の候補として SOX9 を考えた。もっとも、SOX9 は軟骨以外にも、腎臓、脂肪、膵臓など多様な組織において、未分化なステージに一過性に発現する。ただし、軟骨細胞リニエージにおいて SOX9 は、未分化間葉系細胞に発現を開始し、間葉系細胞が凝集した後に軟骨細胞に分化した後も発現し続ける。分化後の細胞にも発現し続けることが、他のタイプの細胞には無い、軟骨細胞における SOX9 の特徴である。未分化間葉系細胞で SOX9 を欠失させると、軟骨細胞が出来ないことから、SOX9 の軟骨細胞形成における重要性が報告された。しかし、軟骨細胞に分化してからも SOX9 は発現し続け、分化した軟骨細胞で SOX9 が何をしているかはわかっていなかった。これを明らかにするために、我々は軟骨細胞リニエージにおいて、軟骨細胞に分化した後に SOX9 を欠失する conditional knockout (cKO) マウスを作製した。軟骨細胞に分化した後に loxP サイトで組み換えを起こすように、Col11a2 遺伝子のプロモーター/エンハンサーを組み合わせた、11Prom-Cre (軟骨分化後、遅れて Cre を発現) マウスを作製した。このマウスと Sox9 flox マウスを交配して cKO マウスを作製した。交配後 13.5 日目において、コントロールマウス胎仔では、SOX9 は軟骨細胞特異的に発現したが、cKO マウスでは分化した軟骨細胞において SOX9 の発現が失われていた。SOX9 の発現が失われた部分では、細胞数が減少し、TUNEL 陽性になっていた。このことから、分化した軟骨細胞において SOX9 は軟骨細胞の生存に必須であることが判明した。Sox9 が軟骨細胞の生存を支持するメカニズムを調べたところ、Sox9 は PI3kinase のサブユニットである Pik3ca 遺伝子プロモーターに結合してその転写を促進し、Akt のリン酸化を促進していることが分かった。Sox9 cKO に PTEN flox マウスを交配させて PTEN も欠失させたところ、軟骨細胞のアポトーシスが改善した。PTEN の欠失は Akt を恒常的にリン酸化する作用がある。このことから、SOX9 は分化した軟骨細胞において、PI3K-Akt 経路を通じて軟骨細胞を生存させていると結論した (図1)。

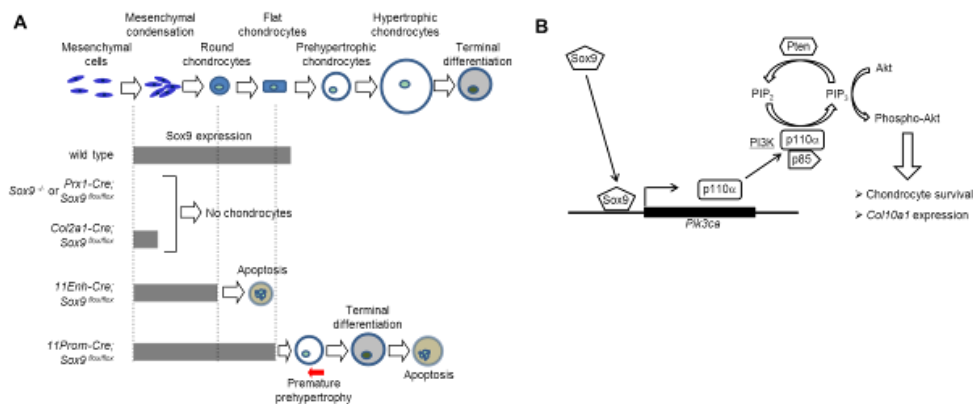


図1. 軟骨細胞分化における Sox9 の機能。(A) 軟骨細胞の各分化段階において Sox9 を欠失させたときの表現型。(B) 軟骨細胞生存における Sox9-Pi3k-Akt 経路の作用。

2) 軟骨細胞の肥大化に係る因子として Salt-inducible kinase 3 (SIK3) を同定した。SIK3 を抑制することで硝子軟骨細胞の状態を保つことが出来る (Sasagawa et al., Development, 2012 に報告)。

軟骨の再生医療において、移植する軟骨細胞は、間葉系幹細胞、ES 細胞、iPS 細胞、直接誘導軟骨細胞様細胞が候補として考えられる。いずれの細胞を用意しても、培養中あるいは移植後に、軟骨細胞は分化が進んで肥大化し、やがてアポトーシスに陥って変性する傾向がある。ゆえに移植した細胞は早期に失われてしまう。そこで、誘導した軟骨細胞において、肥大化するステップをコントロールすることが重要である。これまで、軟骨細胞の肥大化は、HDAC4 - MEF2C によってコントロールされていることが明らかにされていた。しかし、その上流で HDAC4 が軟骨細胞においてどのように制御されているかは不明であった。Salt-inducible kinase は AMPK ファミリーに属するキナーゼで、SIK1, 2, 3 があるが、SIK3 の生体での機能は不詳であった。SIK3 knockout mouse を作製したところ、骨格に重度の異常があることがわかり、詳しく調べたところ、軟骨細胞の肥大化のステップが障害されていることが判明した。HDAC4 が軟骨細胞の肥大化をコントロールすることが知られているので、SIK3 と HDAC4 の関係を生化学的に調べた。SIK3 は HDAC4 と相互作用し、SIK3 は細胞質に局在して、HDAC4 を細胞質にアンカーする働きあると考えた。HDAC4 は核内と核外を移行し、核内では転写因子 MEF2C などによる転写を抑制して、軟骨細胞の肥大化を抑制することが知られている。SIK3 は HDAC4 を細胞質に留め置くことで、核内の HDAC4 を少なくし、HDAC4 による MEF2C の作用抑制を解き放つことで軟骨細胞の肥大化を進めると考えた。よって、SIK3 は再生医療において、軟骨細胞の肥大化を抑制して、軟骨細胞の形質を保つためのターゲット分子になりうる。実際、SIK3 ノックアウトマウスでは、関節軟骨が著名に肥厚していた。即ち、SIK3 のインヒビターを見つけることが出来れば、誘導軟骨細胞から安定した軟骨を作ることに役立つ可能性がある。SIK3 を使った軟骨再生治療薬の探索を特許出願した。

§ 4 成果発表等

(1)原著論文発表 (国内(和文)誌 0件、国際(欧文)誌 20件)

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, S.I., 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. 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. (DOI:10.1016/j.bbrc.2011.06.194)
4. 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. (DOI:10.1007/s00774-010-0248-2)
5. 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. (DOI:10.1242/dev.057802)
6. 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. (DOI:10.1038/ncomms1242)
7. 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. (DOI:10.1242/dev.072652)
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. (DOI:10.1002/jbmr.477)
9. Uebi, T., Itoh, Y., Hatano, O., Kumagai, A., Sanosaka, M., Sasaki, T., Sasagawa, S., Doi, J., Tatsumi, K., Mitamura, K., Morii, E., Aozasa, K., Kawamura, T., Okumura, M., Nakae, J., Takikawa, H., Fukusato, T., Koura, M., Nish, M., Hamsten, A., Silveira, A., Bertorello, A. M., Kitagawa, K., Nagaoka, Y., Kawahara, H., Tomonaga, T., Naka, T., Ikegawa, S., Tsumaki, N., Matsuda, J. and Takemori, H.: Involvement of SIK3 in glucose and lipid homeostasis in mice. *PLoS ONE*, 7: e37803, 2012. (10.1371/journal.pone.0037803)
10. Miura, K., Namba, N., Fujiwara, M., Ohata, Y., Ishida, H., Kitaoka, T., Kubota, T., Hirai, H., Higuchi, C., Tsumaki, N., Yoshikawa, H., Sakai, N., Michigami, T. and Ozono, K.: An Overgrowth Disorder Associated with Excessive Production of cGMP Due to a Gain-of-Function Mutation of the Natriuretic Peptide Receptor 2 Gene. *PLoS ONE*, 7: e42180, 2012. (DOI:10.1371/journal.pone.0042180)
11. Nishimura, R., Wakabayashi, M., Hata, K., Matsubara, T., Honma, S., Wakisaka, S., Kiyonari, H., Shioi, G., Yamaguchi, A., Tsumaki, N., Akiyama, H. and Yoneda, T.: Osterix regulates calcification and degradation of chondrogenic matrices through matrix metalloproteinase 13 (MMP13) expression in association with transcription factor Runx2 during endochondral ossification. *J. Biol. Chem.*, 287: 33179–90, 2012. (DOI:10.1074/jbc.M111.337063)
12. Outani, H., Okada, M., Yamashita, A., Nakagawa, K., Yoshikawa, H., and Tsumaki, N. Direct

- induction of chondrogenic cells from human dermal fibroblast culture by defined factors. *PLoS One*, 8: e77365, 2013. (doi:10.1371/journal.pone.0077365)
13. Minegishi, Y., Hosokawa, K., and Tsumaki, N. Time-lapse observation of the dedifferentiation process in mouse chondrocytes using chondrocyte-specific reporters. *Osteoarthritis Cartilage*, 21: 1968-1975, 2013. (doi:10.1016/j.joca.2013.09.004)
 14. Tam, W.L., Dorien, F.O., Hiramatsu, K., Tsumaki, N., Luyten, F.P., and Roberts, S.J. Sox9 reprogrammed dermal fibroblasts undergo hypertrophic differentiation in vitro and trigger endochondral ossification in vivo. *Cell Reprogram*, 16: 29-39, 2014. (doi:10.1089/cell.2013.0060)
 15. Seki, S., Tsumaki, N., Motomura, H., Nogami, M., Kawaguchi, Y., Hori, T., Suzuki, K., Yahara, Y., Higashimoto, M., Oya, T., Ikegawa, S., and Kimura, T. Cartilage intermediate layer protein promotes lumbar disc degeneration. *Biochem Biophys Res Commun*, 446:876-81, 2014. (doi:10.1016/j.bbrc.2014.03.025)
 16. Yamashita, A., Morioka, M., Kishi, H., Kimura, T., Yahara, Y., Okada, M., Fujita, K., Sawai, H., Ikegawa, S., and Tsumaki, N. Statin treatment rescues FGFR3 skeletal dysplasia phenotypes. *Nature* 513:507-511, 2014. (doi:10.1038/nature13775)
 17. Tsumaki, N., Okada, M., and Yamashita, A. iPS cell technologies and cartilage regeneration. *Bone*. 70:48-54, 2014 (doi:10.1016/j.bone.2014.07.011)
 18. Minegishi, Y., Sakai, Y., Yahara, Y., Akiyama, H., Yoshikawa, H., Hosokawa, K. and Tsumaki, N. Cyp26b1 within the growth plate regulates bone growth in juvenile mice. *Biochem Biophys Res Commun* 454:12-18, 2014 (doi:10.1016/j.bbrc.2014.10.001)
 19. Okada, M., Ikegawa, S., Morioka, M., Yamashita, A., Saito, A., Sawai, H., Murotsuki, J., Ohashi, H., Okamoto, T., Nishimura, G., Imaizumi, K. and Tsumaki, N. Modeling type II collagenopathy skeletal dysplasia by directed conversion and induced pluripotent stem cells. *Hum Mol Genet* 24: 299-313, 2015. (doi:10.1093/hmg/ddu444)
 20. Yamashita, A., Morioka, M., Yahara, Y., Okada, M., Kobayashi, T., Kuriyama, S., Matsuda, S. and Tsumaki, N. Generation of scaffoldless hyaline cartilaginous tissue from human iPS cells. *Stem Cell Reports* 2015; in press. (doi:10.1016/j.stemcr.2015.01.016)

(2)その他の著作物(総説、書籍など)

1. 妻木範行:整形外科専門医テキスト 第1章. 基礎科学 II. 成長軟骨の基礎知識、p19-30、2010.6.10、南江堂
2. 妻木範行:特集 軟骨代謝研究の最前線 Topics: 軟骨特異的遺伝子改変マウスを用いた軟骨分化の解析. CLINICAL CALCIUM 2011年6月号(Vol.21 No.6) P43(839)~48(844)
3. 妻木範行:特集 骨・カルシウムUPDATE II. 骨代謝研究UPDATE: 軟骨細胞の分化制御. CLINICAL CALCIUM 2011年12月号(Vol.21 No.12) P113(1863)~120(1870)
4. 妻木範行:ダイレクト・リプログラミングによる軟骨組織の作製. 医学の歩み 次世代 iPS 医療 2011年 第239巻・第14号 1332-1337
5. 妻木範行:整形外科と細胞リプログラミング. メディカルレビュー社 Locomotive Pain Frontier Vol 1, No 1, 44-45, 2012
6. 妻木範行:NEW エッセンシャル整形外科、第1章 ① 骨 p1-18、2012年5月10日、医歯薬出版株式会社
7. 妻木範行:整形外科と細胞リプログラミング. メディカルレビュー社 Locomotive Pain Frontier Vol 1, No 1, 44-45, 2012
8. 妻木範行:「視座」整形外科医、基礎研究、生き物。医学書院 臨床整形外科、Vol.47, No.5, 2012
9. 妻木範行:特集1. 骨代謝研究におけるエピゲノムの最先端:真皮線維芽培養細胞から軟骨

- 細胞様細胞へのダイレクト・リプログラミング。CLINICAL CALCIUM, Vol22, No.5, 659-667, 2012
10. 岡田稔、妻木範行:再生医療叢書6、骨格系。多能性幹細胞を使った軟骨再生。日本再生医療学会[監修]、脇谷滋之・鄭雄一[編集] 2011.11.30、朝倉書店 52-64 ページ
 11. 妻木範行:iPS 細胞を経ない皮膚細胞から軟骨細胞への誘導。リウマチ病セミナーXXIII [2012]、七川勲次 監修、永井書店 147-154 ページ、2012.12.25 初版
 12. 妻木範行:軟骨細胞の分化制御機構と軟骨再生。ニューサイエンス社。細胞 The CELL. Vol.45 No.1, 9-13, 2013.
 13. 妻木範行:軟骨細胞の分化制御機構と軟骨再生。細胞 The CELL. ニューサイエンス社。Vol.45 No.1, 9-13, 2013.
 14. 妻木範行:第7章:関節軟骨の修復と再生。標準整形外科 第12版、松野丈夫・中村利孝 総編集、医学書院 73-7 頁 2014.2.15
 15. 妻木範行:皮膚細胞からの軟骨細胞誘導法。最新の骨粗鬆学:骨粗鬆症の最新知見 日本臨床社 日本臨床71巻(増刊号2) 197-201 頁 2013.4.20 初版第1刷発行
 16. 妻木範行:iPS 細胞技術がもたらす新たな軟骨疾患研究・治療。再生医療の最新の進歩 岡野光夫・松浦勝久監修 最新医学 最新医学社 610-619 頁 2014 年 第 69 巻/3 月増刊号
 17. 山下晃弘、妻木範行:iPS 細胞由来軟骨細胞を用いた再生治療開発。Pharma Medica, Vol.31 No.4 2013 29-32 頁
 18. 藤田香里、妻木範行:再生医療からみた老化制御 ～幹細胞老化と老化組織との関係性から～。Clin Calcium. 23(1):65-73. 2013 (doi: CliCa13016573.)
 19. 妻木範行:Lecture iPS 細胞で整形外科治療はどう変わるか。臨床整形外科 Vol. 49, No. 1, 63-71 頁 2014 年
 20. 妻木範行:細胞リプログラミングによる軟骨再生 Clinical Calcium Nov;23(11):1641-8 頁 2013 doi: CliCa131116411648.
 21. 妻木範行:リプログラム軟骨細胞を用いた軟骨再生への展望。整形・災害外科 56巻 5号 573-584 頁、2013 年
 22. 妻木範行:第 4 回 iPS 細胞を使う:軟骨の研究へ。整形外科 64 巻 10 号, 1106-1110, 2013
 23. 妻木範行、山下晃弘:第6節 軟骨再生技術。239-248 頁。骨研究最前線 株式会社エヌ・ティール・エス 2013.10.14 初版第一刷発行
 24. 妻木範行:骨・軟骨の再生。実験医学増刊「骨代謝 つくり、壊し、変える -そのメカニズムと最新治療」田中栄 編。32(7):177-184, 2014
 25. 妻木範行:真皮線維芽細胞から軟骨細胞への直接リプログラミング。細胞 The Cell. 46(5),16-19, 2014
 26. Karagiannis P, Tsumaki N. Cell reprogramming for skeletal dysplasia drug repositioning. *Cell Cycle* 2014; 13: 3791-3792., 2014
 27. Tsumaki N, Okada M, Yamashita A. iPS cell technologies and cartilage regeneration. *Bone* 2015; 70: 48-54., 2015
 28. Tsumaki N.: Chapter 6 Cartilage Regeneration Using Induced Pluripotent Stem Cell Technologies, In A Tissue Regeneration Approach to Bone and Cartilage Repair, 2015, Hala Zreiqat, Vicki Rosen, Colin Dunstan (eds.) Springer International Publishing Switzerland

(3)国際学会発表及び主要な国内学会発表

① 招待講演 (国内会議 27 件、国際会議 9 件)

1. Tsumaki N, BMP signals and transcriptional factors in cartilage formation, 26th Naito Conference, 2009.11.4(水)～11.7(土), Awaji, Japan
2. 妻木範行, 軟骨コラーゲン遺伝子転写制御と軟骨発生・再生, 第 52 回未来医療セミナー, 2010.3.30 大阪
3. 妻木範行, 軟骨コラーゲン遺伝子転写制御と軟骨形成、宮崎大学大学院セミナー、2010.6.28

宮崎

4. Tsumaki N, Directed induction of chondrogenic cells from mouse adult dermal fibroblast culture by defined factors, CiRA, Kyoto University, Nov 30, 2010, Kyoto
5. Tsumaki N, Directed induction of hyaline chondrogenic cells from mouse adult dermal fibroblast culture by defined factors, Korean Society of Osteoporosis, Seoul, Korea, 2011.4.30-5.1
6. 妻木範行, 軟骨転写制御と軟骨細胞リプログラミング、第 29 回日本骨代謝学会学術集会、大阪、2011.7.28-30
7. 妻木範行, 軟骨転写制御と軟骨細胞リプログラミング、第 9 回日本再生歯科医学会学術大会大阪、2011.9.10
8. 岡本 美奈、村井 純子、今井 祐記、池上 大督、神谷 宣広、加藤 茂明、三品 裕司、吉川 秀樹、妻木 範行、骨形成と骨吸収における BMP シグナルの役割、第 14 回 骨発生・再生研究会、東京、2011.11.12
9. 妻木範行、骨系統疾患の病態解明に向けた取り組み～iPS 細胞技術を用いた軟骨疾患細胞モデル～、第 4 回胎児骨系統疾患フォーラム、東京、2011.11.13
10. 妻木範行、Directed induction of chondrogenic cells from mouse dermal fibroblast culture, 1st Bio-Rheumatology International Congress(BRIC2011) Tokyo、東京、2011.11.14-16
11. 妻木範行、iPS 細胞を経ずに皮膚細胞から軟骨細胞への誘導、第23回 中之島リウマチセミナー、大阪、2011.12.18
12. 妻木範行、皮膚細胞から軟骨を誘導する試み、Takeda Young Forum 2011、東京、2012.1.21
13. 妻木範行、Direct induction of chondrogenic cells from a mouse dermal fibroblast culture、第 6 回グローバル COE 国際シンポジウム、東京、2012.1.23-24
14. 妻木範行、軟骨細胞分化制御と細胞リプログラミング、第 5 回 京大病院 iPS 細胞・再生医学研究会、京都、2012.2.3
15. 妻木範行、皮膚から軟骨細胞を誘導する試み、香川大学整形外科同門会、香川、2012.2.4
16. 妻木範行、皮膚細胞培養から軟骨を作るしくみ、京都府立医科大学研究開発センター第 17 回学術講演会、京都、2012.3.12
17. 妻木範行、細胞リプログラミングによる、軟骨疾患治療と再生、iPS 細胞産学合同研究会、京都、2012.3.29
18. 妻木範行 iPS 細胞技術がもたらす新たな軟骨再建—細胞変換の可能性—、兵庫県整形外科医会、神戸、2012.4.7
19. Tsumaki N, Regulation of differentiation and cell reprogramming of chondrocytes, Cold Spring Harbor Asia Conference, Bone and Cartilage, Suzhou Dushu, China, 2012.6.11-15
20. Tsumaki N, Generation of induced chondrogenic cells directly from dermal fibroblast culture by defined factors, Internatinal Conference on Bone Morphogenetic Protein, Lake Tahoe, CA, USA, 2012.6.19-23
21. 妻木範行、皮膚線維芽細胞から軟骨細胞様細胞へのダイレクト・リプログラミング、第 33 回日本炎症・再生医学会、博多、2012.7.5-6
22. 妻木範行、軟骨細胞分化制御機構の解析と軟骨細胞誘導、広島大学セミナー、2012.7.3
23. 妻木範行、カレントコンセプト: 軟骨細胞リプログラミングによる関節軟骨疾患の治療戦略、第 30 回日本骨代謝学会、東京、2012.7.19-21
24. 妻木範行、Meet the Expert: 軟骨マトリックス転写活性を指標にした、細胞リプログラミングによる軟骨細胞誘導、第 30 回日本骨代謝学会、東京、2012.7.19-21
25. 妻木範行、細胞リプログラミングと軟骨疾患の再生、第2回細胞再生医療研究会、神戸、2012.7.29
26. 妻木範行、軟骨細胞分化制御と細胞リプログラミング、第7回岡山骨・関節セミナー、岡山市、2012.9.20
27. 妻木範行、再生医療の最前線～軟骨疾患をターゲットとして～、藤田保健衛生大学 大176 回医学セミナー、2012.10.3
28. 妻木範行、軟骨細胞分化制御と再生医療における軟骨細胞ソースの開発、骨代謝セミナー、

- 東京、2012.12.21
29. 妻木範行、細胞のタイプを変える ― いくつになっても走れるのか? ―、富田林高校 出前授業、富田林市 2013.2.1
 30. Tsumaki N、Directed reprogramming of dermal fibroblasts into chondrogenic cells、阿蘇国際ミーティング、阿蘇市、2013.5.16-18
 31. 妻木範行、軟骨細胞リプログラミングと軟骨再生、第 44 回広島整形外科先端医学セミナー、広島市、2013.10.30
 32. 妻木範行、軟骨細胞リプログラミングとその軟骨再生への応用、第27回日本軟骨代謝学会、京都市、2014.2.28-3.1
 33. Tsumaki N、Cell reprogramming to chondrocytes and its application to regenerative medicine, KU Leuven Seminar, Leuven, Belgium, 2014.4.28
 34. 妻木範行、軟骨コラーゲンから始まる軟骨疾患研究、第 32 回日本骨代謝学会学術集会、大阪市、2014.7.24-7.26
 35. Tsumaki N、Cartilage Regeneration with iPS Cell Technologies, The 5th Tissue Engineering Symposium, Sydney, Australia, 2014.8.18-20
 36. Tsumaki N、Panel-Stem Cells in Sports Medicine, Rothman Institute's Stem Cells & Biologics in Sports Medicine Summit, Philadelphia, USA, 2014.9.10
- ② 口頭発表 (国内会議 49 件、国際会議 13 件)
1. 妻木範行、XI 型コラーゲン遺伝子転写活性と軟骨分化/再生, The 8th Annual Meeting of Japan Conference on Bone and Joint Diseases, 2010.1.23 東京
 2. Hiramatsu, K, Nakagawa, K, Outani, H, Yoshikawa, H, Tsumaki, N., Directed Induction of Chondrogenic Cells from Dermal Fibroblast Culture by Defined Factors, 56th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society, Mar 6-9, 2010, New Orleans, Louisiana, USA.
 3. 妻木範行、皮膚細胞培養から直接、軟骨前駆細胞を誘導する試み, 第 9 回日本再生医療学会 シンポジウム2「幹細胞研究の最先端」, 2010.3.18-19 広島
 4. 妻木範行、軟骨コラーゲン転写制御と軟骨代謝、第 28 回日本骨代謝学会 カレントコンセプト「Cartilage metabolism の最先端」, 2010.7.21. 東京
 5. 妻木範行、Take Home 1st Massage: 軟骨の最先端のその向こうへ、第 11 回運動器科学研究会、2010.9.10. 軽井沢
 6. 平松久仁彦、吉川秀樹、妻木範行、遺伝子導入による皮膚培養細胞からの軟骨前駆細胞の直接誘導. 第 23 回軟骨代謝学会 2010.4.2-3. 鹿児島)
 7. 池上大督、秋山治彦、鈴木聡、中村孝志、仲野徹、吉川秀樹、妻木範行、軟骨細胞分化における Sox9 に役割の解析. 第 23 回軟骨代謝学会 2010.4.2-3. 鹿児島
 8. 池上大督、秋山治彦、鈴木聡、仲野徹、吉川秀樹、妻木範行、成熟軟骨細胞における SOX9 の役割の解析. 第 5 回 Skeletal Research Meeting 2010.5 京都
 9. 平松久仁彦、笹川覚、王谷英達、中川加奈子、吉川秀樹、妻木範行、皮膚細胞培養からの軟骨細胞様細胞の誘導の試み. 第 11 回運動器科学研究会、2010.9.10. 軽井沢
 10. 池上大督、秋山治彦、鈴木聡、中村孝志、仲野徹、吉川秀樹、妻木範行、成熟軟骨細胞における Sox9 の役割の解析. 第 11 回運動器科学研究会、2010.9.10. 軽井沢
 11. 池上大督、秋山治彦、鈴木聡、中村孝志、仲野徹、吉川秀樹、妻木範行、成熟軟骨細胞における SOX9 の役割. Orthopedic Research Club 2010.10 かずさ
 12. 平松久仁彦、笹川覚、王谷英達、中川加奈子、吉川秀樹、妻木範行、皮膚細胞培養からの軟骨細胞様細胞の誘導の試み. 第 25 回日本整形外科学会基礎学術集会 シンポジウム 2010.10.15-16. 京都
 13. 妻木範行、組織幹細胞/前駆細胞を誘導するディレクテッドリプログラミング技術の開発. CREST&さがけ 合同シンポジウム 2011.1.14. 東京
 14. 王谷英達、岡田稔、平松久仁彦、吉川秀樹、妻木範行、Pluripotent stem cell state を経ない軟骨細胞誘導、第7回 Skeltal research meeting、京都、2011.5.28.

15. 王谷英達、岡田稔、平松久仁彦、吉川秀樹、妻木範行、DIRECTED INDUCTION OF CHONDROGENIC CELLS FROM MURINE DERMAL FIBROBLAST CULTURE WITHOUT GOING THROUGH A PLURIPOTENT STEM CELL STATE、第9回 国際幹細胞学会、トロント、2011.6.16.
16. 妻木範行、マウス真線維芽細胞培養から直接誘導した軟骨細胞様細胞と腫瘍形成能について、文部科学省「再生医療の実現化プロジェクト」第4回夏のワークショップ、大阪、2011.7.7.
17. 三浦弘司、難波範行、藤原誠、北岡太一、大幡泰久、平井治彦、大園恵一、樋口周久、妻木範行、吉川秀樹、道上敏美、ナトリウム利尿ペプチド受容体Bの機能獲得型変異はヒトおよびマウスにおいて成長促進と低骨密度をもたらす、第29回日本骨代謝学会学術集会、大阪、2011.7.28-30.
18. 平松久仁彦、笹川覚、王谷英達、中川加奈子、吉川秀樹、妻木範行、皮膚細胞からの軟骨細胞誘導、第29回日本骨代謝学会学術集会、大阪、2011.7.28-30.
19. 岡本美奈、村井純子、今井祐記、池上大督、神谷宣広、加藤茂明、三品裕司、吉川秀樹、妻木範行、破骨細胞における BMPRI1A シグナルは骨形成を調節する—破骨細胞特異的に Bmpr1A を欠失させたコンディショナルノックアウトマウスの解析—、第18回 BMP 研究会、大阪、2011.7.31.
20. 峯岸芳樹、坂井靖夫、細川互、吉川秀樹、妻木範行、内軟骨性骨化における Cyp26b1 の役割の解析、第12回 運動器科学研究会、高知、2011.9.3.
21. 妻木範行、軟骨細胞リプログラミングと軟骨マトリックス遺伝子発現、日本整形外科学会基礎学術集会、群馬、2011.10.20-21.
22. 峯岸芳樹、坂井靖夫、細川互、妻木範行、内軟骨性骨化におけるレチノイン酸の役割の解析、第20回日本形成外科学会基礎学術集会、東京、2011.10.6-7.
23. 峯岸芳樹、坂井靖夫、細川互、吉川秀樹、妻木範行、内軟骨性骨化における Cyp26b1 の役割の解析、第41回骨・カルシウム代謝研究会、京都、2011.10.14.
24. 峯岸芳樹、坂井靖夫、細川互、吉川秀樹、妻木範行、レチノイン酸が内軟骨性骨化に及ぼす機能の検討、第3回 Orthopedic Research Club 千葉、かずさアカデミアパーク、2011.10.22.
25. 王谷英達、岡田稔、平松久仁彦、吉川秀樹、妻木範行、皮膚線維芽細胞から軟骨細胞を誘導する過程の解析、第3回 Orthopedic Research Club、千葉、2011.10.22.
26. 峯岸芳樹、坂井靖夫、細川互、吉川秀樹、妻木範行、内軟骨性骨化における Cyp26b1 遺伝子の役割、第25回日本軟骨代謝学会、愛知、2012.3.9-10.
27. Tsumaki N, Regulation of differentiation and cell reprogramming of chondrocytes, Cold Spring Harbor Asia Conference, Bone and Cartilage, Suzhou Dushu, China, 2012.6.11-15.
28. Tsumaki N, Generation of induced chondrogenic cells directly from dermal fibroblast culture by defined factors, International Conference on Bone Morphogenetic Protein, Lake Tahoe, CA, USA, 2012.6.19-23.
29. 妻木範行、皮膚細胞培養から軟骨を作る試み、第54回日本老年医学会、東京、2012.6.28-30.
30. 峯岸芳樹、吉川秀樹、妻木範行、軟骨細胞増殖・分化に及ぼす Cyp26b1 遺伝子の機能の解析、第30回日本骨代謝学会、東京、2012.7.19-21.
31. 妻木範行、再生医療の最前線—軟骨疾患をターゲットとして—、第46回日本小児内分泌学会学術集会、大阪、2012.9.27-29.
32. 妻木範行、細胞リプログラミング技術による軟骨疾患治療、日本整形外科学会 基礎学術集会 シンポジウム、名古屋市、2012.10.26-27.
33. 妻木範行、細胞リプログラミングによる軟骨疾患治療と再生、第40回日本関節病学会、鹿児島市、2012.11.8-9.
34. 岡田稔、妻木範行、細胞リプログラミング技術を用いた II 型コラーゲン病疾患モデルの解析、第9回 Skeletal Research Meeting、京都市、2012.11.10.
35. 妻木範行、細胞リプログラミング技術を用いた軟骨疾患モデリング、第5回胎児骨系統疾患フォーラム、仙台市、2012.12.2.

36. 峯岸芳樹、軟骨細胞増殖・分化における Cyp26b1 遺伝子の機能解明、第 7 回 Bone Research Seminar 東京、2013.2.15
37. Tsumaki N、Chondrocyte differentiation and direct conversion to chondrogenic cells、IBMS、神戸市、2013.5.28-6.1.
38. 妻木範行、iPS 細胞とダイレクト・リプログラミングを用いた軟骨疾患研究、日本炎症・再生学会、京都市、2013.7.2.-2013.7.3.
39. Okada M、Directed conversion and iPS cell technologies allow for pathophysiological recapitulation of type II collagenopathy、Bone Biology Forum、Fuji、Shizuoka、2013.7.23-7.24
40. Tsumaki N、Hiramatsu K、Outani H、Okada K、Yamashita A、Yoshikawa H、Directed induction of hyaline chondrogenic cells from dermal fibroblast culture by defined factors、ICRS、Izmir、2013.9.15-9.18.
41. 岡田稔、細胞リプログラミング技術を用いた II 型コラーゲン病疾患モデリング、第 4 回 Orthopedic Research Club、木更津市かずさ、2013.11.9-10.
42. 箭原康人、軟骨細胞分化における SIK3 の機能、第 4 回 Orthopedic Research Club 木更津市かずさ、2013.11.9.-11.10.
43. 妻木範行、細胞リプログラミング技術を用いた軟骨疾患モデリング、疾患特異的 iPS 細胞を利用した病態解明・創薬開発、東京、2013.11.25.
44. 王谷英達、岡田稔、山下晃弘、吉川秀樹、妻木範行、ヒト皮膚線維芽細胞からの軟骨細胞様細胞誘導、第 27 回日本軟骨代謝学会、京都市、2014.2.28.-3.1.
45. 妻木範行、iPS 細胞とダイレクト・リプログラミングを用いた軟骨疾患研究、第 13 回日本再生医療学会 シンポジウム、東京都、2014.3.4-6.
46. Yamashita A、Morioka M、Yahara Y、Okada M、Tsumaki N、DERIVATION OF TRANSPLANTABLE CARTILAGE FROM HUMAN INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS、2014 OARSI、Paris、France、2014.4.24-4.27
47. 妻木範行、細胞リプログラミング技術を用いた軟骨再生、第 46 回日本結合組織学会学術大会・第 61 回マトリックス研究会大会 合同学術集会、愛知県名古屋市、2014.6.6
48. 妻木範行、iPS 細胞技術を使った軟骨再生第 35 回日本炎症・再生医学会沖縄県名護市、2014.7.2-7.4
49. 山下晃弘、ヒト iPS 細胞から軟骨細胞への分化誘導、第 32 回日本骨代謝学会学術集会、大阪市、2014.7.24-7.26
50. 岡田稔、妻木範行、II 型コラーゲン病モデルの解析、BMP 研究会、大阪市、2014.7.28
51. Kimura T、Immunogenicity of Chondrocytes Derived From Human Induced Pluripotent Cellst、The 5th Tissue Engineering Symposium、Sydney、Australia、2014.8.18-20
52. Yahara Y、Lineage-Tracing of Articular Chondrocytes During Osteoarthritis Development、Sydney、Australia、2014.8.18-20
53. 妻木範行、iPS 細胞技術を用いた新しい軟骨疾患研究、第 4 回北大 Orthopedic Research Seminar、札幌市、2014.9.29
54. 妻木範行、第 29 回日本整形外科学会基礎学術集会、鹿児島市、2014/10/9-10
55. 妻木範行、iPS 細胞技術を使った軟骨疾患治療方法の開発、東京医科歯科大学 大学院特別講義、東京都、2014.10.31
56. Tsumaki T、Application of iPS cell technologies to cartilage regeneration、4th CUHK International Symposium on Stem Cell Biology and Regenerative Medicine、Hong Kong、2014.11.17-11.18
57. 妻木範行、細胞変換技術と軟骨疾患研究、東海大学大学 医学会講演会、神奈川県伊勢原市、2014.12.4
58. Tsumaki N、「Conversion of fibroblasts into chondrocytes by cell reprogramming technologies」 「Application of cell reprogramming technologies to research of cartilage diseases」、Asian Cartilage Repair Society、Seoul、Korea、2014.12.7
59. Tsumaki T、Application of iPSC technology to cartilage regeneration and disease

modeling, Croucher Foundation Advanced Study Institute (ASI): “Stem Cells: Biology & Applications” Hong Kong, 2015.1.5-1.7

60. 妻木範行, iPS cell technologies and cartilage diseases, CDB-CiRA Exchange Seminar, 神戸市, 2015.1.22
61. 妻木範行, 軟骨疾患 iPS 細胞モデルの開発、第 17 回ヒューマンサイエンス総合研究ワークショップ、東京都、2015.2.24-25
62. 妻木範行, 細胞リプログラミング技術の軟骨疾患研究の応用、第 14 回日本再生医療学会総会、東京都、2015.3.19-3.21

② ポスター発表 (国内会議 2 件、国際会議 6 件)

1. Ikegami D, Akiyama H, Kaneko K, Okamoto M, Nakamura T, Yoshikawa H, Tsumaki N, Sox9 is Essential for Survival and Hypertrophy of Mature Chondrocytes, 56th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society, Mar 6-9, 2010, New Orleans, Louisiana, USA
2. Hiramatsu K, Sasagawa S, Outani H, Nakagawa K, Yoshikawa H, Tsumaki N. Directed induction of hyaline chondrogenic cells from mouse adult dermal fibroblast culture by defined factors. Gordon Research Conference on Cartilage Biology & Pathology, Mar 6, 2011, Ventura, CA, USA
3. Minegishi Y, Sakai Y, Hosokawa K, Yoshikawa H, Tsumaki N; Roles of Cyp26b1 in endochondral bone formation, Cold Spring Harbor Asia Conference, Bone and Cartilage, Suzhou Dushu, China, 2013. 6.11-15
4. Yahara Y, Matsui Y, Higashimoto M, Suzuki K, Tsumaki N, Kimura T; Sp1 family of transcription factors differentially regulates the transcription of $\alpha 2$ type XI collagen gene in various human osteosarcoma-derived osteoblastic cells, Cold Spring Harbor Asia Conference, Bone and Cartilage, Suzhou Dushu, China, 2013. 6.11-15,
5. Okada M, Tsumaki N; Chondrogenic differentiation of human induced pluripotent stem cells, International Society for Stem Cell Research 10th annual meeting, Yokohama, 2013. 6.13-16
6. 山下晃弘、妻木範行、致死性骨異形成症由来 iPS 細胞における異常な軟骨分化、日本炎症・再生学会、京都市、2014.7.2-3
7. Yamashita Y, Statin treatment rescues FGFR3 skeletal dysplasia phenotypes, 18th Takeda Science Foundation Symposium on Bioscience, Osaka, 2015.1.17
8. 山下晃弘、ヒト iPS 細胞から硝子軟骨組織への分化誘導法の確立、第 28 回日本軟骨代謝学会、東京都、2015/3/5-3/7

(4)受賞・報道等

①受賞

1. CiRA 賞、妻木範行、平成26年1月6日
2. 日本骨代謝学会学術賞、妻木範行、平成26年7月

②マスコミ(新聞・TV等)報道(プレス発表をした場合にはその概要もお書き下さい。)

1. 平成 22 年 3 月 19 日 読売新聞、毎日新聞 日本再生医療学会での発表を受けて毎日新聞、読売新聞などに、皮膚から軟骨細胞様細胞を誘導した成果が報道された。
2. 平成 23 年 1 月 11 日 朝日新聞、産経新聞などに、皮膚から誘導した軟骨細胞様細胞を解析した成果が報道された。Journal of Clinical Investigation での発表にもとづく。
3. プレス実施 2013年10月15日 京都大学 iPS 細胞研究所

http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/news_data/h/h1/news6/2013_1/131017_1.htm

Outani H, Okada M, Yamashita A, Nakagawa K, Yoshikawa H, Tsumaki N. Direct induction of chondrogenic cells from human dermal fibroblast culture by defined factors. PLoS One 2013; 8: e77365. (doi: 10.1371/journal.pone.0077365)

- ・日本経済新聞 2013/10/17 ヒトの皮膚から軟骨細胞 京大、iPS細胞経由せず
- ・京都新聞 2013/10/17 ヒト皮膚から「軟骨細胞」iPSを経ず直接作製 期間短縮、治療に利点

- ・中日新聞 2013/10/17 「皮膚から軟骨細胞-iPS を使わずより早く」
- ・産経新聞 2013/10/17 ヒトの皮膚から直接軟骨細胞
- ・読売新聞 2013/10/17 iPS 介さず軟骨細胞作製 京大チーム 皮膚から、期間半減
- ・日刊工業新聞 2013/10/18 京大、ヒトの皮膚から軟骨を短期に作製—iPS 経ずに直接
- ・朝日新聞 2013/10/18 京大、関節症治療に期待
- ・日経産業新聞 2013/10/18 人の皮膚細胞で軟骨細胞を作製、京大、iPS 細胞使わず
- ・科学新聞 2013/11/1 ヒトの皮膚細胞から軟骨様細胞を直接作製
- ・科学新聞 2013/11/22 ヒトの皮膚細胞から軟骨様細胞 京大 iPS 研など直接変換成功

4. プレス実施 2014年9月16日 京都大学 iPS 細胞研究所

Okada, M., Ikegawa, S., Morioka, M., Yamashita, A., Saito, A., Sawai, H., Murotsuki, J., Ohashi, H., Okamoto, T., Nishimura, G., *et al.* (2014). Modeling type II collagenopathy skeletal dysplasia by directed conversion and induced pluripotent stem cells. *Hum Mol Genet.*

低身長の難病患者からiPS、京大、解明・治療に道

(2014/09/17 日本経済新聞 朝刊 42 ページ)

京大、iPS細胞で骨疾患モデル確立

(2014/09/17 日刊工業新聞Newsウェブ21 25 ページ)

低身長難病、iPS作製、京大、患者皮膚から、解明に光

(2014/09/17 日経産業新聞 10 ページ)

5. プレス実施 2014年9月16日 京都大学 iPS 細胞研究所

Yamashita, A., Morioka, M., Kishi, H., Kimura, T., Yahara, Y., Okada, M., Fujita, K., Sawai, H., Ikegawa, S., and Tsumaki, N. (2014). Statin treatment rescues FGFR3 skeletal dysplasia phenotypes. *Nature* 513, 507–511.

新聞記事

- ・読売新聞 2014/9/18 iPS で薬効確認 京大研 2 年以内に治験へ
- ・京都新聞 2014/9/18 高脂血症薬「スタチン」軟骨の病に有効確認 京大 iPS 使い再現
- ・朝日新聞 2014/9/18 iPS で薬効果発見 治療薬研究の先駆け期待
- ・朝日新聞 2014/9/18 有望な薬 細胞レベルで判断 iPS で効果発見 開発費・時間節約へ期待
- ・産経新聞 2014/9/18 軟骨の病気に高脂血症薬 iPS 細胞で効果発見
- ・毎日新聞 2014/9/18 iPS で再現 薬効確認 京大研「1、2 年後に治験」
- ・中日新聞 2014/9/18 低身長症、既存薬で改善 京大、iPS 使い体外で確認
- ・日本経済新聞 2014/9/18 低身長の難病 iPS で実験 高脂血症薬、効果か
- ・日刊工業新聞 News ウェブ 2014/9/18 コレステロール低下薬「スタチン」、軟骨無形成症に効果—京大などマウスで実証

テレビ放映

- ・2014/09/18-(NHK 総合[クローズアップ現代]). 難病に新薬を iPS で変わる「常識」
- ・2014/09/18-(テレビ朝日[報道ステーション]). iPS で難病の“薬効”確認・2 年以内に臨床試験へ
- ・2014/09/18-毎日放送(MBS).iPS 細胞で薬の効果確認 骨の難病に別の病気の治療薬
- ・2015/02/27-日本テレビ ニュース「ヒト i P S 細胞から関節軟骨組織作製に成功」

Web のみ

●NHK NEWSWEB

<http://www3.nhk.or.jp/news/html/20140918/t10014681211000.html>

iPS細胞使い治療薬の候補の物質特定

●中日新聞 WEB

<http://www.chunichi.co.jp/article/front/list/CK2014091802000065.html>

低身長症、既存薬で改善 京大、iPS 使い体外で確認

6. プレス実施 2014年2月19日 京都大学 iPS 細胞研究所

ヒトiPS細胞から硝子軟骨の作製～関節軟骨損傷の再生治療法開発へ向けて～妻木範行、山下晃弘、京都大学

Yamashita A, Morioka M, Yahara Y, Okada M, Kobayashi T, Kuriyama S, Matsuda S, Tsumaki N. Generation of scaffoldless hyaline cartilaginous tissue from human iPS cells. *Stem Cell Reports* 2015.

- ・京都新聞 2015-2/27 iPS から軟骨組織 京大、4 年内臨床 プタの膝関節に定着 質高く 根治期待
- ・日本経済新聞 2015/2/27 iPS で軟骨作製 京大 膝・肘など関節治療に道

- ・朝日新聞 2015/2/27 iPS から 関節の軟骨 4 年で臨床研究目指す
- ・毎日新聞 2015/2/27 iPS細胞:関節軟骨、京大成功 19年めど臨床手術
- ・産経新聞 2015/2/27 iPSから軟骨組織 京大、4年後にも臨床研究
- ・日刊工業新聞Newsウェブ 2015/2/27 京大、ヒトiPSで硝子軟骨作製ー4年後めどに変形性膝関節症患者へ移植再生治療

③その他

1. 平成 23 年 1 月 15 日、文部科学省 iPS 細胞等研究ネットワーク第2回合同シンポジウムで皮膚から軟骨細胞様細胞を誘導した成果を講演。
2. 平成 24 年 1 月 21 日 Takeda Young Forum 2011, 医学を志す君たちへ、で皮膚細胞から軟骨を誘導する試みについて講演した。同日の内容が、朝日新聞2012年3月21日 再生医療が描く未来 ～進展する iPS 細胞研究から見えてきた今後の医療～ として、記載された。

(5)成果展開事例

①実用化に向けての展開

- ・ JST 再生医療実現拠点ネットワークプログラム、疾患・組織別実用化拠点(拠点B)「iPS細胞由来軟骨細胞を用いた軟骨疾患再生治療法の開発拠点」へ展開した。

②社会還元的な展開活動

- ・ 妻木範行、皮膚細胞から軟骨を誘導する試み、文部科学省 iPS 細胞等研究ネットワーク第 2 回合同シンポジウム、東京、2011/1/15 及び; 妻木範行、皮膚細胞から軟骨を誘導する試み、Takeda Young Forum 2011、東京、2012/1/21 にて得られた成果を発表した。

§ 5 研究期間中の活動

(1) 主なワークショップ、シンポジウム、アウトリーチ等の活動

年月日	名称	場所	参加人数	概要
平成 23 年 1 月 15 日	文部科学省 iPS 細胞等研究ネットワーク第 2 回合同シンポジウム	東京	1000 人	一般公開での講演
平成 24 年 1 月 21 日	Takeda Young Forum 2011	東京	700 人	一般公開での講演
平成 24 年 7 月 7 日	CiRA カフェ	京都大学	30 人	一般公開での講演

§ 6 最後に

研究計画の目標は、皮膚線維芽細胞を、iPS 細胞を経ることなく直接、軟骨細胞に変換する方法を開発することでした。そしてこの技術を、関節軟骨に欠損を持つ患者さんの治療に役立てるようにする事が将来的な目標です。それまでの発生学の研究の成果により、発生過程において未分化間葉系細胞が軟骨細胞に分化する時に働く因子が同定されてきました。しかしながら、皮膚線維芽細胞にそれらの因子を導入しても良質な軟骨細胞にはなりません。皮膚線維芽細胞などの分化した体細胞は安定で、軟骨因子を導入するとある程度の軟骨マーカーを発現するものの、線維芽細胞の性質が残存するためです。そんな中、iPS 細胞が2006年に開発され、線維芽細胞に4つのリプログラミング因子を導入すると線維芽細胞の性質が消去され、未分化な状態にリプログラムできる事がわかりました。そこで我々は、線維芽細胞に4つのリプログラミング因子のうちの一部と軟骨因子を同時に導入すると、軟骨細胞になる細胞もできるのではないかという仮説を立てて、実験を行いました。その結果、2つのリプログラミング因子(c-Myc, Klf4)と一つの軟骨因子(Sox9)を導入することで、皮膚線維芽細胞培養から軟骨細胞を誘導できることを発見しました。まずマウス細胞で示し、次いでヒト細胞でこのことを示しました。またマウス細胞の誘導過程では、多能性の状態を経ないことをタイムラプス撮影で観察し、皮膚線維芽細胞から軟骨細胞へのダイレクト・リプログラミングが起きていることを示しました。本成果は、関節軟骨欠損に対する細胞移植治療における新たな細胞ソースを提供することにつながり得ると考えます。また、成長軟骨の疾患である骨系統疾患の中の軟骨形成異常症の患者さんの皮膚細胞を軟骨細胞へダイレクト・リプログラムすることで、疾患モデル研究を行えると考えます。実際、我々は軟骨形成異常症の一つであるII型コラーゲン異常症の患者さんの皮膚線維芽細胞を軟骨細胞へダイレクト・リプログラミングし、疾患細胞モデル研究を行いました。今後、このモデル研究を用いて、II型コラーゲン異常症の治療薬のスクリーニングを行いたいと考えます。

一方、HLA ホモドナーから作られる iPS 細胞ストックの設立構想が始まり、関節軟骨欠損に対する細胞移植治療の細胞ソースとしてストック iPS 細胞を軟骨細胞へ分化誘導させて使うことが、近い将来に臨床で実現する可能性が高まりました。そこで我々は軟骨ダイレクト・リプログラミング研究で得られる知見を使って、iPS 細胞を軟骨細胞へ分化誘導するプロトコルを開発しました。この研究はストック iPS 細胞由来軟骨を関節軟骨欠損部に移植する臨床研究の開始を目標に今後展開します。また、骨系統疾患の一つである FGFR3 軟骨異形成症患者さんの皮膚線維芽細胞から iPS 細胞を作製し、本プロトコルを用いて軟骨細胞へ分化誘導し、iPS 細胞疾患モデル研究を行いました。そして、スタチンが FGFR3 軟骨異形成症 iPS 細胞疾患モデルとマウス疾患モデルの病態を回復させることを発見しました。今後、有効性と安全性の検証に必要な実験を行います。Drug repositioning の例として治験の是非の判断を目標にします。

当チームはチーム数が少なく(2チーム)、役割分担が明確だったため、情報・成果の共有が容易で代表者としてのプロジェクト運営は円滑だったと考えます。途中で代表者のチームが大阪大学から京都大学に異動しましたが、両大学のご理解により研究の中断は無く、規模が拡大して成果を出せたと考えます。研究室としても落ち着き、CREST に参加できて本当によかったと思っています。

