

「人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) 作製・制御等の医療基盤技術」
平成 21 年度採択研究代表者

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テッドリプログラミング技術の開発

§ 1. 研究実施の概要

再生医療における一つの目標は、皮下線維芽細胞などの体細胞を別のタイプの組織の細胞に変換することである。iPS 細胞の開発により、4つのリプログラミング因子を導入することで皮膚細胞を一旦多能性幹細胞にフルリプログラミングした後に、任意の疾患臓器の細胞に再分化させることが可能になりつつある。この手法での課題は奇形腫の発生を防ぐことである。別のアプローチとして、皮膚細胞を、iPS 細胞を経ずに直接、他の組織細胞に変化させることが考えられる。運動障害を生じる関節軟骨損傷は治癒せず、再生医療による治療方法の開発が期待されている。我々はリプログラミング因子と軟骨発生に重要な働きをする因子を組み合わせることで、マウス皮膚細胞から直接、軟骨細胞様細胞を誘導できないかを検討した。結果、2つのリプログラミング因子と1つの軟骨因子の組み合わせで軟骨細胞様細胞を誘導できることが判明した。誘導した細胞は軟骨マーカー遺伝子を発現する一方、線維芽細胞マーカー遺伝子の発現を認めなかった。今後、軟骨細胞様細胞の誘導の効率を上げるための技術開発と、ヒト細胞を用いて安全な軟骨細胞様細胞を誘導することを目指す。

§ 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、独立准教授)

② 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

§ 3. 研究実施内容

研究目的

皮膚や皮下脂肪など入手が比較的容易な組織の体細胞を、別の組織の細胞や前駆細胞に変換する技術の開発は、再生医療の目標の一つである。患者本人から採取した真皮細胞などを、神経細胞、心筋細胞、膵β細胞、軟骨細胞といった疾患治療において重要な細胞に変換できれば、これらを患者の病巣に戻すことにより疾患臓器／組織の機能回復をはかることができる。iPS細胞の誕生は、成人体細胞を一旦多能性幹細胞に細胞リプログラムし、その後望まれる組織の細胞に再分化させることで、このことを普遍的に実現可能にした。しかし、iPS細胞などの多能性幹細胞を目的の組織の細胞に分化させることは、現状ではいくつかの組織において難しい。多段階の誘導ステップを経ても、全く均一な特定の組織細胞に分化させることは困難で、誘導した細胞を移植した場合に奇形腫の発生の危険性は残る。

成人体細胞を多能性幹細胞の段階を経ずに直接、別の組織の組織幹細胞や前駆細胞にリプログラムすることは普遍的に可能になるであろうか。体細胞を別の組織系譜の細胞に変換できる例が幾つか報告されているが、これらは特異な例と考えられ一般的にはかなり起こりにくいことと認識されている。これまでに、発生の過程において未分化細胞が各組織系譜にコミットする時に重要な役割を果たす転写因子が明らかにされてきた。骨格に関連する各種細胞や皮下の線維芽細胞は中胚葉の間葉系細胞に由来し、骨芽細胞への分化には Runx2 等が、脂肪細胞への分化には Ppr γ 等が、筋細胞への分化には Myo-D 等が、そして軟骨細胞への分化には Sox5, Sox6, Sox9 等が key regulator として働いている。しかし、例えば真皮線維芽細胞にこれらの因子を導入しても、これら転写因子のターゲット遺伝子の発現が限定的に上昇することはあるが、他組織の細胞に変換されることはない。元の真皮線維芽細胞の形質が安定なことが理由の一つであろう。iPS細胞の開発により、体細胞を多能性幹細胞の状態にまで「フルリプログラミング」する手段が提供された。真皮線維芽細胞のフルリプログラミングは、4つのリプログラミング因子セット(Klf4, c-Myc, Oct3/4, Sox2)を導入することで成し遂げられる。

関節軟骨は四肢や脊椎の関節の滑動面を構成する組織であり、加齢による軟骨変性や外傷に

よる軟骨損傷はやがて変形性関節症を発症させる。本邦では700万人以上が変形性関節症に罹患し、運動時疼痛によって日常生活、社会生活が制限されている。高齢化社会の進行により今後変形性関節症患者数は増加する。しかし関節軟骨は修復能に極めて乏しく、変性摩耗あるいは欠損した関節軟骨を直す根治的治療方法は存在しない。再生医療において軟骨細胞の供給方法を開発することが強く望まれている。多能性幹細胞や間葉系幹細胞から軟骨細胞を誘導する研究が行なわれているが、質や量の点で実用のレベルにはない。

我々は、皮膚培養細胞培養に、幾つかのリプログラミング因子と軟骨特異的因子を同時に導入することで、軟骨系譜の細胞を誘導しようとの仮説を立て、検証を行った。

方法と結論

まず、マウス細胞で検討した。軟骨系譜細胞の特徴を獲得した細胞を選別するために、軟骨特異的コラーゲン遺伝子の転写制御領域を利用した。軟骨コラーゲン遺伝子の軟骨特異的転写制御領域にレポーター遺伝子である beta-geo 遺伝子 (beta-ガラクトシダーゼとネオマイシン耐性遺伝子の融合タンパクをコードする遺伝子) を結合したトランスジーンを作製した。このトランスジーンコンストラクトをマウス受精卵の前核にマイクロインジェクションし、トランスジェニックマウスを作製し、トランスジェニックマウスラインを樹立した。このトランスジェニックマウスの胎仔を X-gal で染色したところ、四肢及び肋骨の軟骨原基が特異的に青色に染色され、軟骨特異的に beta-geo が発現していることを確認した。このトランスジェニックマウスの皮膚及び軟骨から細胞を培養し、G418 存在下に培養した。皮膚細胞は低濃度の G418 存在下で死滅したのに対し、軟骨細胞は高濃度の G418 存在下でも生存した。野生型マウスから採取して培養した軟骨細胞は低濃度の G418 存在下で死滅した。

皮膚培養細胞に導入する因子として、リプログラミング因子と軟骨因子をリストアップした。また、未知の因子を探索する目的に、軟骨ライブラリーを作製した。これらの因子とライブラリーをレトロウイルスベクターに組み込んだ。トランスジェニックマウスから調整した皮膚細胞培養にこれらのレトロウイルスを種々の組み合わせで導入し、G418 存在下に培養した。生存した細胞の培養を続け、解析した。結果、2つのリプログラミング因子と1つの軟骨因子の組み合わせで軟骨細胞様細胞を誘導できることが判明した。誘導した細胞は軟骨マーカー遺伝子を発現する一方、線維芽細胞マーカー遺伝子の発現を認めなかった。今後、軟骨細胞様細胞の誘導の効率を上げるための技術開発と、ヒト細胞を用いて安全な軟骨細胞様細胞を誘導することを目指す。