

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テッ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
- ・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

- ・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. 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

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。軟骨損傷・変性を治癒させる薬は無く、再生医療による治療が期待されている。移植する軟骨細胞を用意する方法の開発や、あるいは変性した軟骨を健康な軟骨に再生する技術が望まれている。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。本研究のねらいは、ダイレクト・リプログラミングによって、移植用の軟骨細胞を供給すること、あるいは、変性した軟骨を生体内で健康な軟骨に変換する生体内ダイレクト・リプログラミングを起こす方法を開発することである。

これまでの研究の概要、

これまでに、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。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

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 トランスジーンを発現を低下させるマウス誘導軟骨細胞様細胞を作製した。この細胞は Dox 存在下で軟骨細胞様細胞が誘導され、その後に Dox を除去して変性を起こす培養条件で培養すると、線維軟骨細胞様細胞になる。そして再び Dox を投与すると、線維軟骨細胞様細胞は軟骨細胞様細胞へと再リプログラミングされる。この細胞には軟骨レポーターとして Col11a2-EGFP-Ires-Puro トランスジーンを挿入しており、軟骨形質を獲得すると GFP の蛍光を発し、ピューロマイシン耐性となった。

・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

上述の Dox-inducible システムを用いて作った軟骨細胞様細胞を用いて、その再リプログラミング過程を利用して、軟骨ダイレクト・リプログラミングを起こしうる新しい因子の探索と、化合物の探索を行うことを考えた。Doxを除去して線維軟骨細胞様細胞にしたあと、GFPの蛍光を出さない最低の Dox 濃度を決定した。この Dox 濃度の培養条件化で、cDNA ライブラリー投与と、化合物ライブラリー投与の実験を始めた。今後の見通しとして、ライブラリースクリーニングを完了させ、Col11a2-EGFP の蛍光を強めるような因子と化合物について、その再現性の確認、機能解析を行って行く。化合物については、変形性関節症などの変性した関節軟骨に対して、関節腔内注射を行うことによって生体内ダイレクト・リプログラミングを起こすことをめざしたい。また、昨年度に行った SIK3 の軟骨分化における機能解析の延長として、エネルギー代謝における SIK3 機能の解析を行った⁽¹⁾。それから、Natriuretic Peptide Receptor 2 と Osterix による軟骨細胞分化の制御機構を解析した^(2,3)。

・ヒト皮膚線維芽細胞培養から軟骨細胞様細胞の誘導

これまで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。これまでの検討から、レンチウイルスベクターを用いて c-MYC, KLF4, SOX9 をヒト線維芽細胞に導入しても、軟骨細胞様細胞にダイレクト・リプログラミングされなかった。そこで、レトロウイルスベクターを効率よく導入する方法を採用し、そのために、レトロウイルス受容体を高発現する手段を用いた。これにより、ヒト軟骨細胞様細胞を誘導できるかについて、さらに条件を検討した。

また、成長軟骨の疾患として骨系統疾患がある。骨系統疾患では骨の成長が障害され、骨が短く、変形する。重症例で肋軟骨の障害がある場合は、呼吸困難になり致死になりうる。骨系統疾患の原因遺伝子は発見されているが、その機序には不明の点が多い。患者の軟骨を採取することが非常に難しく調べていることが殆どできていないその原因の一つである。そこで、患者の皮膚線維芽細胞をダイレクト・リプログラミングして軟骨細胞様細胞を誘導した。患者線維芽細胞由来の直接誘導軟骨細胞様細胞は、コントロール線維芽細胞由来の直接誘導軟骨細胞様細胞と比べて、遺伝子発現や細胞分化に異常を示した。患者軟骨細胞で報告されているような、形態異常の特徴も再現した。今後の見通しとして、患者由来誘導軟骨細胞様細胞を用いて病態を調べ、治療薬の探索に用いることが可能になると考える。

・疾患モデル動物を用いた軟骨修復

これまでに、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。直接誘導した軟骨細胞様細胞をペレットカルチャーして軟骨の欠損部に移植し、細胞の生着と欠損軟骨の修復を組織学的に評価した。また、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う。iPS 細胞に種々の増殖因子を順次加えて、発生過程を追うようにして、中内胚葉、中胚葉、間葉系細胞へと分化させた。そしてそれを3次元培養することで、軟骨細胞へ分化させることを行った。今後の見通しとして、種々の成熟段階の誘導軟骨細胞を移植し、どの成熟段階の細胞を移植するのが最も良い修復をもたらすかを検討することで、軟骨細胞移植方法を開発できると考える。

§3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

1. 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)
2. 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)
3. 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)

(3-2) 知財出願

- ① CREST 研究期間累積件数(国内 1件)