

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. 研究実施の概要

関節軟骨は各骨の端を覆い、滑らかな関節運動を担っている。関節軟骨の損傷・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おり、移植用の軟骨細胞を供給する方法の開発が求められている。iPS細胞の開発により、例えば比較的入手しやすい皮膚線維芽細胞を一旦、iPS細胞にした後に軟骨細胞に再分化させることにより、患者自身の軟骨細胞を供給することが可能となった。一方、別のアプローチとして、iPS細胞を経ずに、線維芽細胞を軟骨細胞に直接変換することが考えられる。我々は、iPS細胞技術を応用して、iPS細胞を作るためのリプログラミング因子の一部と軟骨因子をマウス皮膚線維芽細胞に同時に導入することにより、軟骨細胞を直接誘導できるのではないかと考えて実験を行った。その結果、iPS細胞を作るのに必要な4つのリプログラミング因子(c-Myc, Klf4, Oct3/4, SOX2)のうち2つ(c-Myc, Klf4)と一つの軟骨因子(Sox2)をマウス皮膚線維芽細胞に導入することにより、軟骨細胞様細胞を誘導できることを発見した。誘導した細胞をマウスの皮下に移植すると、正常の関節軟骨を構成する硝子軟骨のような組織を作った。このことから、マウス皮膚線維芽細胞に3つの因子(c-Myc, Klf4, Sox9)を導入することにより、軟骨細胞様細胞が誘導でき、この方法で細胞を誘導することにより、軟骨再生治療において移植細胞の供給源の一つの候補になり得ると考えた。

この研究を進めて平成25年度は、ヒト皮膚線維外細胞においても、同様の3つの因子(c-MYC, KLF4, SOX9)を導入することにより、軟骨細胞様細胞を誘導できることを示した。ヒトの直接誘導した軟骨細胞様細胞を免疫不全マウスの皮下に移植すると、硝子軟骨様の組織を作った。また、免疫不全マウスの関節軟骨に欠損を作り、ヒトの直接誘導した軟骨細胞様細胞を移植すると生着して軟骨組織を作った。ヒト細胞でも皮膚線維芽細胞から軟骨細胞様細胞を直接誘導できることを示せたことは、この技術を臨床応用することに向けて一歩進んだと考える。しかし、現状の方法では、細胞を誘導するために c-MYC を使い、ウイルスベクターを用いているため腫瘍化をはじめとする懸念を伴っている。今後、安全な誘導細胞を作るために、これらの課題を克服する技術開発が必要である。また、直接誘導の応用として、誘導細胞の移植以外に、変性した軟骨細胞を体の中のその場で正常な軟骨細胞に変化させる、生体内ダイレクト・リプログラミングが考えられ、今後このための研究開発を行いたい。

また、皮膚線維芽細胞を軟骨細胞に効率よく変換させる他の因子の探索を行っている。軟骨細胞特異的に GFP が光るマウスを作製し、このマウスの皮膚線維芽細胞を培養して、種々の因子を導入し、GFP が光るか観察した。もし適切な因子が導入されることにより、皮膚線維芽細胞が軟骨細胞の性質を獲得すれば、GFP が光る仕組みである。この観察の結果、いくつかの因子を得ることが出来た。今後、これらの因子が本当に線維芽細胞を軟骨細胞に変化させることに貢献するのか、確認の実験を行う予定である。

今後、ヒトの線維芽細胞を軟骨細胞へと安全に効率よく変換する方法を開発することにより、細胞移植あるいは生体内ダイレクト・リプログラミングによる軟骨再生治療の実現に近づきうると考える。

### § 3. 成果発表等

#### (3-1) 原著論文発表

1. 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)
2. Minegishi Y, Hosokawa K, Tsumaki N., Time-lapse observation of the dedifferentiation process in mouse chondrocytes using chondrocyte-specific reporters. *Osteoarthritis Cartilage*, 2013; **21**: 1968-1975. (doi:10.1016/j.joca.2013.09.004)
3. Tam WL, Dorien FO, Hiramatsu K, Tsumaki N, Luyten FP, Roberts SJ., Sox9 reprogrammed dermal fibroblasts undergo hypertrophic differentiation in vitro and trigger endochondral ossification in vivo. *Cell Reprogram*, 2014; **16**: 29-39. (doi:10.1089/cell.2013.0060)
4. Seki S, Tsumaki N, Motomura H, Nogami M, Kawaguchi Y, Hori T, Suzuki K, Yahara Y, Higashimoto M, Oya T, Ikegawa S, Kimura T., Cartilage intermediate layer protein promotes lumbar disc degeneration. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014. (doi:10.1016/j.bbrc.2014.03.025) (in press)

#### (3-2) 知財出願

- ①特許出願件数 (国内3件)
- ②CREST 研究期間累積件数 (国内4件)