

令和 2 年 6 月 30 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K01365

研究課題名(和文)ケミカルダイレクトリプログラミングによるヒト網膜色素上皮細胞の直接誘導法の開発

研究課題名(英文)Development of chemical compound-based direct reprogramming method for human retinal pigment epithelial cells

研究代表者

倉橋 敏裕 (Kurahashi, Toshihiro)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：00596570

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：低分子化合物を用いて、ヒト線維芽細胞からヒト網膜色素上皮(RPE)細胞を直接誘導する手法の開発を目指した。これまでに、ある種の化合物を組み合わせることでヒト線維芽細胞を処理することにより、線維芽細胞特異的な遺伝子発現を減少させ、形態的に上皮様細胞へ誘導する低分子化合物の組み合わせを見出した。さらに、効率的に細胞の分化程度を評価するために、RPE特異的遺伝子のプロモーター領域をヒト線維芽細胞に組み込んだレポーター細胞を作製した。レポーター細胞を用いて、各種化合物によるRPE細胞の分化誘導法確立を目指したが、現在までのところRPE特異的遺伝子の発現を誘導する有効な手法は確立できていない。

研究成果の学術的意義や社会的意義

研究期間以内にケミカルダイレクトリプログラミングによるRPE細胞の分化誘導法の確立はできなかった。一方で、ヒト線維芽細胞の間葉系細胞マーカー遺伝子の発現を減少させる低分子化合物の組み合わせに関して興味深い知見を得た。こうした遺伝子発現変化は間葉系細胞から上皮系細胞への運命転換である Mesenchymal-to-epithelial transition (MET)に重要なステップであり、このMETは細胞のリプログラミングにおいて重要であることがこれまでに示されてきている。したがって、本研究によって得られた低分子化合物に関する知見は、引き続き行う細胞リプログラミングの研究に有益であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Recent studies have demonstrated it is possible to change the cell fate by using only chemical compounds. We aimed to develop a method for directly inducing human retinal pigment epithelium (RPE) cells from human fibroblasts using chemical compounds. We found a combination of chemical compounds that decrease fibroblast-specific gene expression and induce epithelial-like morphology in human fibroblast. In order to evaluate the degree of cell differentiation efficiently, we generated a reporter cell in which the promoter region of RPE-specific gene was incorporated into human fibroblasts. Using the reporter cells, we tried to establish a method for inducing RPE cell differentiation by various compounds, but so far, a method for inducing the expression of RPE-specific genes has not been established.

研究分野：再生医学

キーワード：細胞再生医学 ケミカルダイレクトリプログラミング

^ 1 . 研究開始当初の背景

高齢化社会を迎えた先進国諸国では、人生100年時代という言葉も散見されるようになって久しい。そうした状況に伴い、加齢に当たって罹患率が上昇する疾患の患者数が今後ますます増加することが予想されており、その対策・治療法の確立が求められている。そのような疾患のひとつに加齢黄斑変性があるが、その患者数は先進国諸国で近年増加しており、欧米では成人の失明原因の第1位であり、日本でも4位となっている。

加齢黄斑変性は加齢にともない網膜上の黄斑に障害をきたす疾患であるが、神経組織の一種である網膜は一度損傷・変性すると回復は困難であるため、根治的治療法として細胞移植治療が期待されている。そのような中、iPS細胞から

分化誘導された網膜色素上皮 (RPE) 細胞が、世界初の iPS 細胞の臨床応用として加齢黄斑変性の治療に用いられた。術後の経過が順調 (視力維持) であることから、網膜変性疾患の治療として再生医療が有望であることが示された。

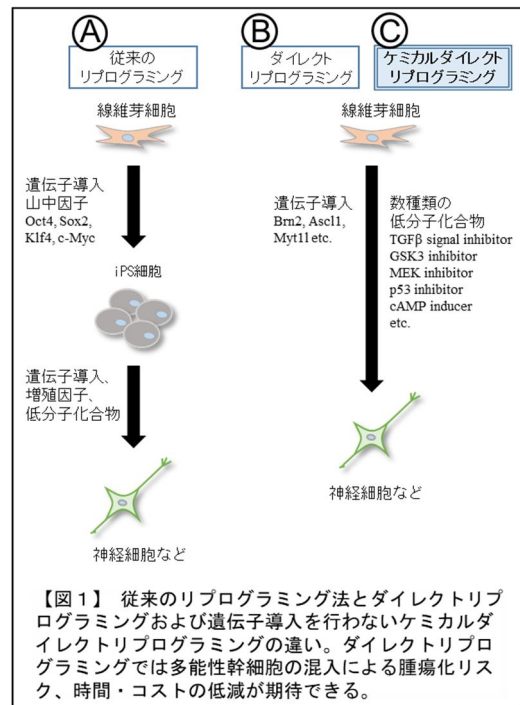
一方で、ES/iPS 細胞を臨床応用に用いる場合は、遺伝子導入によるゲノムへのダメージ、腫瘍発生や感染の危険性、多能性幹細胞の混入による腫瘍化の危険性、ES 細胞に関しては拒絶反応や生命倫理的な問題、目的細胞腫の作製に多大な時間・コストを要する等の問題点が懸念されるため、適材適所・多種多様なアプローチ・研究が必要と考えられる。

近年、そうした ES/iPS 細胞の臨床応用における問題点を克服する目的で、ある種の体細胞から他の種類の体細胞を、多能性幹細胞を経ることなく直接誘導する手法 (ダイレクトリプログラミング法と呼ばれる)【図1B】の研究・開発がなされており、これまでにいくつかの方法が報告されている。しかし、それらのダイレクトリプログラミング法はいずれも外部からの遺伝子導入を伴うもので、ゲノムへの予期せぬ損傷などの問題が依然のこる。そこで、所属研究室では、遺伝子導入を用いた既存のダイレクトリプログラミング法の問題点も克服する目的で、低分子化合物のみを用いてヒト線維芽細胞から神経様細胞を直接誘導 (ケミカルダイレクトリプログラミングと呼ぶ)【図1C】することを試み、成功・報告してきた [Dai et al., *J Clin Biochem Nutr*, 2015,]。その後、他のグループからも同様の報告が相次いだ [Li et al., *Cell Stem Cell*, 2015. Hu et al., *Cell Stem Cell*, 2015,]。以下、本法により誘導した神経様細胞を CiN 細胞 (chemical compound-induced neuronal like cell) と略す。

2 . 研究の目的

低分子化合物を用いた直接誘導法は、既存のダイレクトリプログラミングの問題点の克服だけでなく、例えば、in vivo でのリプログラミング薬の開発へつながるなど、将来性のある手法であると考えた。

そこで、本研究では、ケミカルダイレクトリプログラミング法の将来性、網膜変性疾患治療に対する社会的要求度、ES/iPS 細胞を用いた先行研究による情報の豊富さ、臨床応用への技術的基盤が比較的整っている点等に着目し、ケミカルダイレクトリプログラ



ミングにより網膜色素上皮 (RPE) 細胞を直接誘導する手法の開発を目指した。

3. 研究の方法

先行研究である CiN 細胞への分化誘導は間葉系の線維芽細胞から外胚葉系の神経細胞への細胞運命転換である。したがって、神経細胞同様に外胚葉系である RPE 細胞への運命転換も可能ではないかと考えた。

そこで、主には CiN 細胞の分化誘導で用いた 6 種類の化合物による誘導条件 (SB431542: TGFβシグナル阻害剤、CHIR99021: Wnt シグナル活性化剤、PD0325901: MEK 阻害剤、LDN193189: BMP シグナル阻害剤、Pifithrin-α: p53 阻害剤、Forskolin: cAMP シグナル誘導剤) と、これまでに ES 細胞や iPS 細胞を用いて RPE 細胞へ分化誘導している誘導条件等を参考にして、分化誘導条件の選定をおこなった。

分化誘導条件の選定を行うにあたっては、RPE 細胞の分化程度を効率よく評価するために、RPE 細胞特異的レポーター細胞を作製した。具体的には、すでに遺伝子導入によるダイレクトリプログラミング法を用いた RPE 細胞分化誘導系において実績のある [Zhang et al., *Protein Cell*, 2014,] Best1 遺伝子のプロモーター (0.6 kb) の下流に GFP を接続したレポーターをヒト線維芽細胞に導入した。

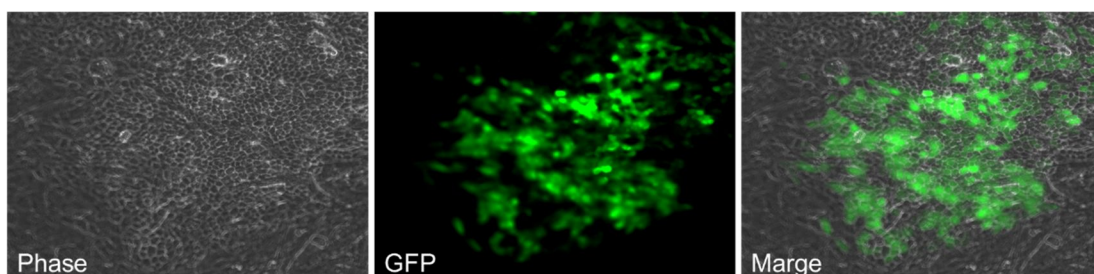
4. 研究成果

CiN 細胞誘導に用いた化合物の組み合わせ・培養条件を改変することにより、ヒト線維芽細胞が形態的に上皮様細胞の形態に変化することを観察した。また、間葉系マーカーであるフィブロネクチン (FN) や Snail といった遺伝子の発現が減少していることが確認できた。

そうした予備実験での化合物の組み合わせと iPS/ES 細胞から RPE 細胞を分化誘導した過去の報告を参考にして化合物・培養条件の検討をおこなった。その際に、本研究で作製した RPE 細胞特異的レポーター細胞を用いた。

これまでに、様々な条件を検討したが、レポーターが有意に発現するような誘導条件を確立するに至っていない。

作製したレポーターコンストラクトが機能するかどうかを確かめる目的で、primary の RPE 細胞および iPS 細胞へも導入し、RPE 細胞分化誘導系にてレポーターの発現を確認した。その結果、primary RPE 細胞においても、その形態がはっきりと成熟 RPE 細胞となるような細胞でのみレポーターの発現が確認できた【図 2】。このことと、過去の知見を考えると、Best1 遺伝子は、少なくとも培養細胞系においては分化過程の後半に発現誘導されると考えられた。したがって、RPE 細胞への分化程度・方向をより誘導初期で評価するためには、形態変化よりも先に RPE 細胞方向への分化程度が評価できるような、分化初期に発現する遺伝子をレポーターとして使用すべきであると考えられた。



【図2】本研究で作製したBest1::GFPレポーターはPrimary RPE細胞において、形態的に成熟した細胞でのみ発現が確認された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携 研究者	戴 平 (Dai Ping) (20291924)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授 (24303)	