

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 4 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K12038

研究課題名(和文) 非遺伝子導入型ダイレクトリプログラミングによるヒト再生医療用細胞の誘導

研究課題名(英文) Direct reprogramming to desired cell types applicable for regenerative medicine in a transgene-free manner

研究代表者

武田 行正 (Takeda, Yukimasa)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：40735552

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、再生医療で使用される移植用細胞の腫瘍化リスクを下げるため、外来遺伝子の導入を行わず、低分子化合物のみを用いて、種々の細胞の誘導を試みた。その結果、採取しやすいヒト皮膚由来線維芽細胞から、神経幹細胞、心筋細胞、肝細胞、インスリン産生細胞への部分的な誘導が確認された。特に褐色脂肪細胞では、無血清培地を用いて、簡便かつ効率的に誘導することに成功した。褐色脂肪細胞は、脂肪を燃焼し熱を産生することによって、肥満や生活習慣病の予防に重要な役割をしている。そのため、この低分子化合物誘導褐色脂肪細胞は、新規なヒト細胞モデルとして、今後、創薬研究や臨床研究に応用されることが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、細胞のさまざまな機能を制御する低分子化合物を用いて、採取しやすい皮膚由来の線維芽細胞から、再生医療に必要な別の移植用細胞へ誘導を試みた。その結果、不完全ではあるが、線維芽細胞から神経幹細胞、心筋細胞、肝細胞、インスリン産生細胞への部分的な誘導が確認されたことは一定の進歩である。特に、肥満や生活習慣病の予防に重要な細胞である褐色脂肪細胞は、ヒト体内からの単離が難しく、その発生メカニズムや活性化を促進する因子の多くが未だ不明である。そのため、本研究により効率的に誘導される褐色脂肪細胞は、有望なヒト細胞モデルとして、今後、創薬研究や臨床研究に応用されることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Direct cell fate conversion into cells applicable for regenerative medicine generally requires virus vector-mediated expression of multiple transcription factors. Such exogenous gene induction unexpectedly might disrupt genomic integrity and proper cell functions, which might lead to tumor formation. The direct conversion in a chemical compound-based manner is an ideal approach to further reduce the risk for tumorigenesis. In this research, neural stem cells, cardiomyocytes, hepatocytes, insulin-producing cells, were at least partially converted from human dermal fibroblasts. In particular, we succeeded to efficiently and conveniently produce brown adipocytes in a serum-free medium. Human brown adipocytes contribute to prevention of obesity and cardiometabolic diseases by actively consuming fatty acids for heat production. The chemical compound-induced brown adipocytes, ciBAs, could be a promising cell model applicable for basic research, drug development, and clinical uses.

研究分野：再生医療、分子生物学

キーワード：ダイレクトリプログラミング 再生医療 低分子化合物 シグナル伝達経路 神経幹細胞 インスリン産生細胞 褐色脂肪細胞

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

移植以外に有効な治療法のない種々の疾患・損傷に対し、これまで主として人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) から分化した細胞の利用が期待されている。しかし、その初期化には、およそ半年以上の期間がかかりコストも高いため、自家 (自身) の iPS 細胞を治療に用いることは困難である。そのため現在では、免疫拒絶反応を減少させることを目的に、患者とヒト白血球型抗原 (HLA: Human Leukocyte Antigen) の型が同じ iPS 細胞を治療に用いようとしているが、約 30%において免疫拒絶反応が起こる可能性が指摘されている。このことは、可能であれば自家の細胞を使用することの必要性を示しており、患者自身の細胞を迅速に治療に用いることのできる技術の開発は意義が大きい。

また iPS 細胞の作製には、複数の外来遺伝子の導入が必要であり、これによって生じる予期しないリスクが存在する。さらに、目的の細胞へ分化後、未分化の細胞が残留することによる腫瘍化のリスクが存在する。このような安全性の問題は、長期間にわたり体内へ残存する移植治療を将来的に多くの患者へ実施する上で障害になると考えられる。このような背景から、臨床応用により適した細胞移植治療のために、患者自身の細胞を用いてより安全な細胞が短期間に調製される必要がある。

2. 研究の目的

近年、線維芽細胞などの体細胞にウイルスベクターを用いて複数の転写因子を過剰発現させることにより、iPS 細胞のような多能性の状態を経ずに神経細胞、神経幹細胞、心筋細胞、肝細胞といった再生医療用細胞へダイレクトリプログラミングすることが可能であると報告されている。この手法により、患者自身の細胞を用いて比較的短期間に目的の細胞が誘導可能であるが、誘導効率が低い場合が多く、また外来遺伝子の導入によって予期しないゲノム DNA の変異や挿入が起こる可能性がある。そのため細胞の機能が阻害されることや腫瘍化のリスクが高まることなどから、実際にヒトでの臨床試験が行われた事例はほとんどない。

本研究の目的は、このような安全性を損ねる遺伝子の導入を避け、低分子化合物のみを用いて臨床応用可能な細胞を迅速かつ簡便に直接誘導することである。神経幹細胞、心筋細胞、肝細胞そして膵β細胞はいずれも今後の再生医療になくってはならない細胞であるが、ヒト成人由来の線維芽細胞から例分子化合物のみで遺伝子の導入を経ずに直接誘導された事例は報告されていない。また本研究では、シグナル伝達経路やヒストンの修飾酵素などターゲットの明確な低分子化合物を用いるため、その直接誘導のメカニズムについて、科学的知見が得られる可能性が高い。

3. 研究の方法

本研究では、遺伝子の導入を行わず、シグナル伝達経路やヒストン修飾を制御する低分子化合物を組み合わせることにより、ヒト成人皮膚由来線維芽細胞から最も必要性の高い再生医療用細胞 (神経幹細胞、心筋細胞、肝細胞、膵β細胞) の直接誘導を目指す (I)。そして、将来的なヒトへの臨床応用に向けて、低分子化合物誘導性細胞 (ciCells: chemical compound-induced Cells) の遺伝子発現および機能解析 (II)、直接誘導メカニズムの解明 (III)、マウスへの移植実験 (IV) を以下 4 つの項目に従い実施する。

I 低分子化合物による再生医療用細胞のダイレクトリプログラミング

低分子化合物の候補として、我々の研究室で報告した線維芽細胞から神経細胞への直接誘導を可能とする化合物に加え、それぞれ神経幹細胞、心筋細胞、肝細胞、膵β細胞の機能および分化に重要であると報告されている種々のシグナル伝達経路の阻害剤および活性化剤、ヒストン修飾酵素の阻害剤などを候補とする (表 1)。まず神経細胞の誘導に使用した化合物の組み合わせを基本として、さらに表 1 の他の化合物を一つずつ添加しその効果を検討していくことで、それぞれの細胞へダイレクトリプログラミングを検討する。さらにこれら低分子化合物の組み合わせを、それぞれの細胞に重要なサイトカインを含む複数の分化誘導培地へ添加し、濃度と

培養時間を変化させながら、目的の細胞に特徴的な形態変化と特異的な遺伝子の発現について解析する。最終的に、年齢や性別の異なる複数のヒト線維芽細胞株に対し、最も効率よく各細胞へ誘導する低分子化合物の組み合わせと培養条件について決定する。

II 低分子化合物誘導性細胞における遺伝子発現解析および機能解析

各低分子化合物誘導性細胞の候補について、それぞれの細胞に特異的な遺伝子の発現とその機能を表2のように解析し、iPS細胞から分化させた各細胞あるいはヒトの初代培養細胞と比較する。その結果、生体内の細胞に最も近いと考えられる低分子化合物誘導性細胞に対し、さらにその遺伝子発現をRNA-Seq解析によって網羅的に解析する。

III 低分子化合物による直接誘導メカニズムの解明

各細胞の直接誘導に必要な低分子化合物がそれぞれ制御するシグナル伝達経路およびヒストンの修飾酵素について、主要な転写因子の発現活性化に与える影響をエピジェネティクスの観点から解析し、直接誘導メカニズムの一端を解明する。

IV 疾患モデルマウスへ移植した低分子化合物誘導性細胞の生着および機能の検証

直接誘導に成功した各低分子化合物誘導性細胞を疾患モデルマウスへ移植し、生着とその組織機能の回復を検証する。また、生着した細胞はヒトに特異的な抗体を用いて免疫組織学的に検出することで確認する。

4. 研究成果

(1) 各種細胞の直接誘導に向けた低分子化合物および分化誘導培地の条件検討

研究実施計画に則り、ヒト線維芽細胞から低分子化合物により、各種細胞へのダイレクトリプログラミングを検討した。数種類の異なるヒト線維芽細胞を用い、それぞれの細胞に特異的な低分子化合物の候補を複数組み合わせ、サイトカインを含む分化誘導培地へ添加し、濃度と培養時間を変化させながら、線維芽細胞を培養した。化合物の候補としては、線維芽細胞から神経細胞へ直接誘導を行う際に使用した6種類の化合物に加え、それぞれ神経幹細胞、心筋細胞、肝細胞、膵β細胞の機能および分化に重要であると報告されているもの、あるいはその可能性のあるものを使用した。これらはシグナル伝達経路の阻害剤および活性化剤、ヒストン修飾酵素の阻害剤などである。それぞれの化合物の組み合わせについて数週間培養した線維芽細胞に対し、目的の細胞に特徴的な形態変化と特異的な遺伝子の発現についてそれぞれ解析を行った。

表1. 各再生医療用細胞の直接誘導に重要な低分子化合物の候補 (一部)

Name	Functional annotation
神経細胞および褐色脂肪細胞 (報告済み)	
CHIR99021	WNT signaling activator
PD0325901	MAPK signaling inhibitor
LDN193189	BMP signaling inhibitor
Dorsomorphin	BMP signaling inhibitor
SB431542	TGFβ signaling inhibitor
Pifithrin-α	P53 inhibitor
Forskolin	cAMP inducer
神経幹細胞	
Hg-Ag 1.5	Sonic hedgehog pathway agonist
Thiazovivin	Rock inhibitor
RG108	DNA methyltransferase inhibitor
Parnate	Lysine-specific demethylase 1 inhibitor
FGF2 (cytokine)	Fibroblast growth factor 2
心筋細胞	
KY02111	WNT signaling inhibitor
RepSox	TGFβ signaling inhibitor
Rolipram	Phosphodiesterase inhibitor
Y-27632	Rock inhibitor
VEGF (cytokine)	Vascular endothelial growth factor
肝細胞	
Dexamethasone	Glucocorticoid receptor (GR) agonist
A83-01	TGFβ signaling inhibitor
Trichostatin A	Histone deacetylase inhibitor
IDE-1	Definitive endoderm inducer
HGF (cytokine)	Hepatic growth factor
膵β細胞	
Nicotinamide	Component of NAD
Bay k8644	Calcium channel agonist
Retinoic acid	Retinoic acid receptor (RAR) agonist
DAPT	γ-secretase inhibitor
Exendin-4 (cytokine)	GLP-1 agonist

表2. 各再生医療用細胞において特異的に発現する遺伝子と機能解析の内容

特異的な遺伝子	機能解析の内容
神経幹細胞	
<i>Sox2</i> , <i>Nestin</i>	種々のニューロンおよびグリア細胞への分化
<i>Sox1</i> , <i>Pax6</i> など	ニューロンの電気生理学的解析
心筋細胞	
<i>Tnnt2</i> , <i>Actinin</i>	拍動率、拍動周期の測定
<i>Nkx2.5</i> , <i>Mef2c</i> など	自発的な細胞内カルシウムイオン濃度の可視化
肝細胞	
<i>Hnf4α</i> , <i>Albumin</i>	グリコーゲンの蓄積、アルブミンの分泌
<i>Foxa2</i> , <i>Afp</i> など	尿素代謝、胆汁酸合成など
膵β細胞	
<i>Insulin</i> , <i>Pdx1</i>	インシュリン分泌量の測定
<i>MafA</i> , <i>Glis3</i> など	インシュリン分泌のグルコース応答性

(2) 神経幹細胞のダイレクトリプログラミング

その結果、神経幹細胞への誘導では、幹細胞の特徴の一つであるように、線維芽細胞と比べより小さな細胞体となっていることに気づいた。さらに、この細胞について、遺伝子の発現をリアルタイム PCR により解析したところ、神経幹細胞に特異的な遺伝子である *Sox2* や *Nestin* といった遺伝子の発現が活性化していることが明らかとなった。次に、免疫染色を行ったところ、神経幹細胞のマーカータンパク質である *Nestin* の染色が明確に観察されており、これらの結果から、線維芽細胞から神経幹細胞へ少なくとも部分的な誘導が進んでいることが明らかとなった。

(3) 心筋細胞と肝細胞のダイレクトリプログラミング

心筋細胞と肝細胞への誘導では、様々な化合物の組み合わせを検討する中で、部分的な誘導が進んでいることが確認された。これらの細胞では、血清の存在が誘導を阻害している可能性が示唆されたため、無血清培地を新たに作製し、これらの細胞の誘導を試みた。無血清培地によるこれらの細胞への誘導では、低分子化合物やサイトカインがそれぞれの細胞に対し、血清存在下とは異なる応答を示した。特に、 $TGF\beta$ シグナル経路の阻害剤が重要であったが、無血清培地では $TGF\beta$ 経路を活性化するサイトカインが存在しないため、既に抑制されていた。そのため、 $TGF\beta$ 阻害剤が無血清培地では必要なく、これにより線維芽細胞からこれらの細胞への誘導に有利に働くことが推測された。神経幹細胞を含むこれらの細胞への誘導は、未だ不完全であるが、さらに研究を進めることで改善が期待できるため、特許の出願が可能かどうか検討中である。

(4) インスリン産生細胞のダイレクトリプログラミング

膵 beta 細胞への誘導では、これまで報告されている有力な化合物を組み合わせ、試行錯誤の結果、4種類の化合物を組み合わせることにより、線維芽細胞から、インスリンを分泌する細胞 *ciIPCs* (chemical compound-induced Insulin Producing Cells) を誘導することに成功した。4種類の化合物を加えて14日目に、図1のような上皮細胞様の形態が生じ、ELISAの結果、少ないもののインスリンを分泌していることが判明した。ここからさらに、培地中のFBSを除いて誘導することで、インスリンの分泌量が約20倍~40倍と大きく増加することが判明した(図2)。さらに、*ciIPC*の誘導中、高濃度のインスリン(120 $\mu\text{g/ml}$)を添加することで、インスリンの分泌量が約3倍程度増加した(図2)。これらインスリンの分泌増加における、FBS除去と高濃度インスリンの効果はそれぞれ独立していた。しかし、報告されている*iPS*細胞由来 β 細胞と比較すると、インスリンの分泌量は概算で最大8倍程度の差があり、*ciIPC*の分泌量は、相対的に低い可能性がある。線維芽細胞の他に、再生医療によく利用されている脂肪組織由来間葉系幹細胞(*AdMSC*)からも、インスリン産生細胞の誘導を検討した。その結果、*AdMSC*でも、4種類の化合物によりインスリンの分泌が確認された(図3)。さらに線維芽細胞由来の*ciIPC*と同様に、FBS除去および高濃度インスリンの添加によるインスリン分泌量の増加が確認された。

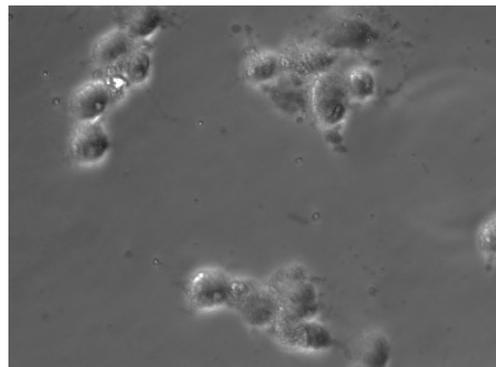


図1 低分子化合物誘導性インスリン産生細胞

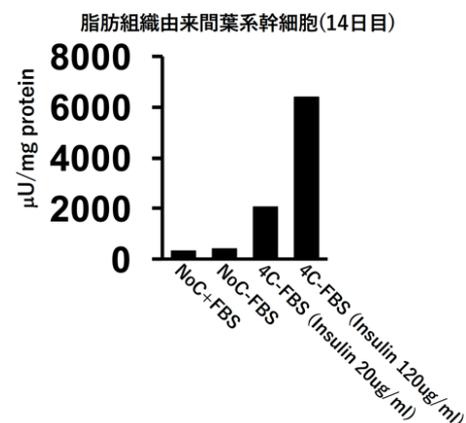


図2 インスリン分泌に関する FBS 除去と高濃度インスリンの効果

本研究により、低分子化合物のみで、線維芽細胞からインスリンを分泌するインスリン産生細胞を誘導する条件を同定したことは大きな進歩である。しかし、FBS 除去や高濃度のインスリンの添加といった、インスリンの分泌量を大きく改善する画期的な誘導条件が判明したものの、iPS 細胞由来β細胞と比較して分泌量は依然として十分ではないと考えられる。またこの細胞は、生体内の膵β細胞と同等であるとの証明は難しく、インスリン産生細胞として、特許の出願を行う予定である。今後、さらに高いインスリンの分泌能を有する ciIPC を誘導するため、引き続き誘導条件と低分子化合物の最適化を検討することが課題である。最終的に、再生医療や創薬に利用可能な ciIPC が、患者自身の線維芽細胞や間葉系幹細胞から迅速に誘導することができれば、将来的な臨床応用にとって大きなメリットとなる。

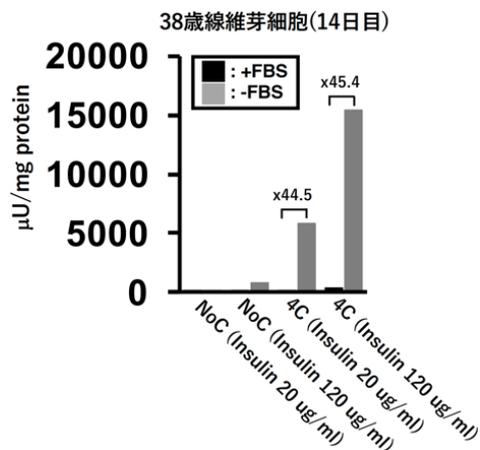


図3 脂肪組織由来間葉系幹細胞 AdMSC を用いた ciIPC の誘導

(5) 褐色脂肪細胞のダイレクトリプログラミング

また、当初計画していた細胞とは別に、線維芽細胞から褐色脂肪細胞 ciBA (chemical compound-induced Brown Adipocytes)の誘導に成功した。褐色脂肪細胞の誘導は、これまで遺伝子の導入でしか報告されておらず、低分子化合物のみで簡便かつ効率的に誘導できることの意義は大きい。さらにこれを、創薬研究や臨床研究に応用するため、安全性を損ねる血清を使用しない、無血清培地の開発を行なった。同時に、無血清培地における低分子化合物の最適化も行い、効率的かつ簡便に ciBA を誘導可能なプロトコルを確立した。この ciBA では、褐色脂肪細胞に特徴的なミトコンドリアの増加、熱産生に最も重要な脱共役タンパク質 UCP1 の発現活性化、そして酸素消費量の増加が確認された(図4)。鎖骨付近や胸回りに散在するヒト褐色脂肪細胞は単離が難しいため、本研究で開発した線維芽細胞から誘導される ciBA は、今後ヒト褐色脂肪細胞モデルとして基礎研究、創薬研究、臨床研究などに応用されることが期待される。

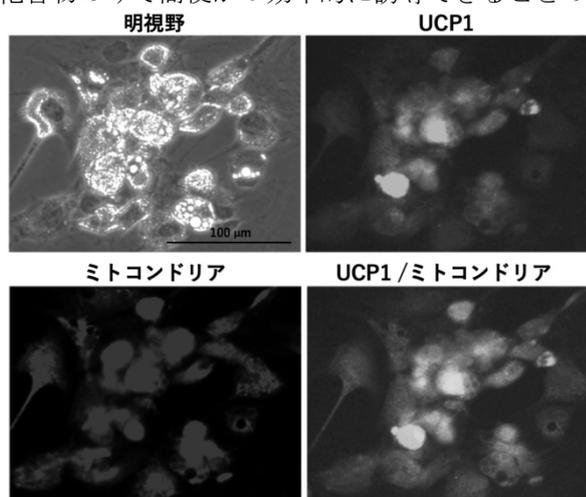


図4 ciBA におけるミトコンドリアの染色と脱共役タンパク質 UCP1 の発現

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Takeda Y., Yoshikawa T., and Dai P.	4. 巻 11
2. 論文標題 Transcriptome analysis reveals brown adipogenic reprogramming in chemical compound-induced brown adipocytes converted from human dermal fibroblasts	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci. Rep.	6. 最初と最後の頁 5061
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-84611-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Takeda Y. and Dai P.	4. 巻 10
2. 論文標題 A developed serum-free medium and optimized chemical cocktail for direct conversion of human dermal fibroblasts into brown adipocytes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sci. Rep.	6. 最初と最後の頁 3775
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-60769-x.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Takeda Y., Kang H.S., and Jetten A.M.	4. 巻 1966
2. 論文標題 Analysis of the Transcriptional Activity of Retinoic Acid-Related Orphan Receptors (RORs) and Inhibition by Inverse Agonists.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Methods Mol. Biol.	6. 最初と最後の頁 193-202
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-1-4939-9195-2_15.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Takeda Y., Harada Y., Yoshikawa T., and Dai P.	4. 巻 38
2. 論文標題 Chemical compound-based direct reprogramming for future clinical applications.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biosci. Rep.	6. 最初と最後の頁 BSR20171650
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1042/BSR20171650.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 戴平、武田行正	4. 巻 127
2. 論文標題 低分子化合物を用いた再生医療用細胞のダイレクトリプログラミング	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 京都府立医科大学雑誌	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Jetten A.M., Takeda Y., and Kang H.S.	4. 巻 8
2. 論文標題 Retinoic acid-related Orphan Receptor (ROR): connecting sterol metabolism to regulation of the immune system and autoimmune disease.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Curr. Opin. Toxicol.	6. 最初と最後の頁 66-80
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-10202-7.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 武田行正
2. 発表標題 ケミカルダイレクトリプログラミングによる新規ヒト心筋細胞誘導法の開発
3. 学会等名 第2回先進医薬研究報告会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takeda Y., Harada Y., and Dai P.
2. 発表標題 Small molecule-based direct reprogramming from human dermal fibroblasts into brown adipocytes.
3. 学会等名 5th TERMIS World Congress (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 武田行正、原田義規、戴平
2. 発表標題 シグナル伝達経路制御によるヒト線維芽細胞から褐色脂肪細胞へのダイレクトリプログラミング
3. 学会等名 第17回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 武田行正、戴平	4. 発行年 2021年
2. 出版社 株式会社ニューサイエンス社	5. 総ページ数 62
3. 書名 Medical Science Digest	

1. 著者名 武田行正、戴平	4. 発行年 2020年
2. 出版社 株式会社エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 316
3. 書名 ダイレクトリプログラミング-再生医療の新展開 第2編第6章	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>京都府立医科大学ホームページにプレスリリース記事が掲載 【論文掲載】皮膚線維芽細胞から低分子化合物・無血清培地でヒト褐色脂肪細胞を誘導～簡便かつ短期間で作製 https://www.kpu-m.ac.jp/doc/news/2020/20200303.html</p> <p>2020年3月5日付 日刊工業新聞に紹介記事が掲載 2020年3月30日付 日本経済新聞に紹介記事が掲載</p>
--

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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------