

令和 3 年 6 月 19 日現在

機関番号：24303

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22690

研究課題名(和文)ケミカルダイレクトリプログラミングを活用した骨軟骨再生技術の創生

研究課題名(英文)Regeneration of bone and cartilage tissues by means of chemical direct reprogramming

研究代表者

松田 修(Osam, Mazda)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：00271164

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、骨粗鬆症性骨折後の癒合不全や骨腫瘍摘出後の骨欠損に対する再生医療を目的とした骨芽細胞の直接誘導技術を報告した。さらに遺伝子を導入しなくても1種類の化合物を添加して培養するだけで、ヒト線維芽細胞から骨芽細胞を高い効率で誘導することにも成功した。もし骨芽細胞に加えて軟骨細胞様細胞も誘導できれば、変形性関節症などの軟骨疾患に対する再生医療に新しい選択肢を提供しうると期待できる。そこで本研究では、骨芽細胞誘導法を向上させるとともに、軟骨細胞へのケミカル・ダイレクト・コンバージョン法の最適化と得られた細胞のキャラクタリゼーション、コンバージョンのメカニズムの解析等を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

化合物を添加して体細胞をコンヴァートさせるケミカル・ダイレクト・コンバージョンでは、導入された遺伝子や染色体に挿入されたウイルスベクター配列によって細胞が移植後に腫瘍化するという危険性がないので、遺伝子導入によって誘導する方法に比してより安全性の高い移植用の細胞を提供できる可能性がある。骨芽細胞と軟骨細胞様細胞を誘導できることによって、骨と軟骨の両方にダメージがある変形性関節症や関節リウマチの患者に、自家骨芽細胞と自家軟骨細胞を大量に作って両方の移植を行うなどの新しい治療法にも応用しうることが考えられ、骨軟骨疾患の再生医療の新しい選択肢として将来的に寄与することが期待できる。

研究成果の概要(英文)：We previously reported direct conversion of fibroblasts into osteoblasts aiming at regenerative therapy for various bone diseases including osteoporotic bone fractures and bone defect after surgical resection of bone tumors. We also succeeded in directly converting fibroblasts into osteoblasts by culturing the cells with a small molecular compound. If fibroblasts can also be induced into chondrocyte-like cells at a high rate by a similar procedure, it may offer a novel therapeutic option for cartilage diseases such as osteoarthritis in the future. Then we have tried to improve the direct conversion of fibroblasts into osteoblasts. We have also developed and improved the technologies of converting fibroblasts into chondrocyte-like cells, characterized the induced cells and analyzed the mechanisms of conversion.

研究分野：再生医学

キーワード：ダイレクト・コンヴァージョン ダイレクト・リプログラミング 再生医療 骨芽細胞 軟骨細胞

1. 研究開始当初の背景

高齢化が進行する中、骨軟骨疾患の治療の重要性が増している。変形性関節症や関節リウマチは患者の QOL と ADL を著しく阻害する疾患であり、従来の治療法に加えて効果的な再生医療が望まれる。

変形性関節症に対する再生医療として、脂肪組織や骨髄由来の間葉系幹細胞 (MSC) を移植する方法があり、これまでに一定の成果が得られている。しかしながら、患者によっては脂肪や骨髄からの MSC の採取は侵襲が大きく、また十分な細胞数が得られない例もある。

我々は、線維芽細胞から骨芽細胞を直接誘導する技術を報告した。すなわち、ヒト線維芽細胞に Runx2、Osterix、Oct4、L-Myc の 4 遺伝子をレトロウイルス・ベクターにて導入することで、線維芽細胞の 90% 以上を高い骨基質形成能を有する骨芽細胞にコンヴァートできる (ダイレクト・リプログラミング、またはダイレクト・コンヴァージョン)。しかしこの方法では、染色体上のランダムな位置に組み込まれたウイルスベクター配列によつての癌遺伝子が活性化され、移植後に細胞が腫瘍化するというリスクから逃れることは困難である。そこで我々は、遺伝子を導入しなくても化合物を添加して培養するだけで、ヒト線維芽細胞から骨芽細胞を誘導することを目指した。その結果、1 種類の化合物を添加して培養することで、線維芽細胞から骨芽細胞を誘導することに成功した (ケミカル・ダイレクト・コンヴァージョン)。

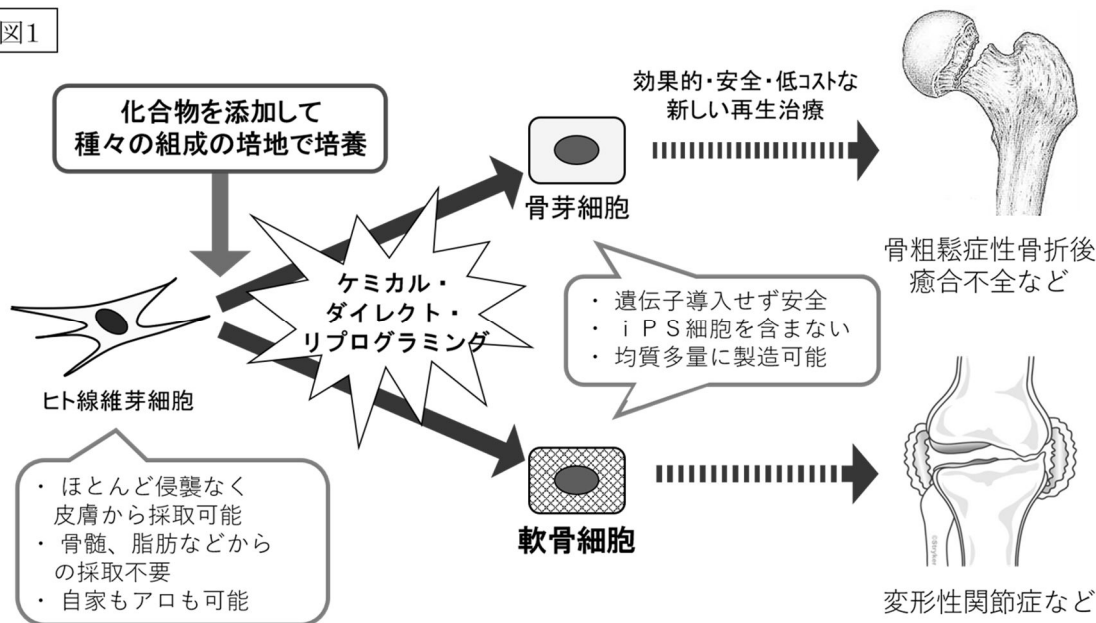
この方法では、レトロウイルス・ベクターの染色体挿入による腫瘍化や導入した遺伝子によるさまざまな問題が回避できるので、移植用の細胞の調整方法としては理想的である。しかし導入効率の向上等、実用化に向けたさらなる改善が必要である。一方で、もし類似の方法で骨芽細胞だけでなく軟骨細胞様細胞も誘導できるならば、変形性関節症などの軟骨疾患に対する再生医療に新しい選択肢を提供しうると期待できる (図 1)。たとえば変形性関節症や関節リウマチでは骨と軟骨双方にダメージを負っているケースも多いので、線維芽細胞から骨芽細胞と軟骨細胞の両方を誘導して移植できれば、骨軟骨疾患に対して効果的な新規再生療法となりうると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、骨芽細胞へのケミカル・ダイレクト・コンヴァージョンを向上させる手法を確立するとともに、軟骨細胞様細胞へのケミカル・ダイレクト・コンヴァージョン法を樹立することを目的とした。遺伝子導入を行うことなく、小分子化合物を添加して培養することで、線維芽細胞に軟骨細胞様のフェノタイプを直接誘導する新規方法を探索し、化合物の添加や培養条件等の最適化を試みた。得られた軟骨細胞様細胞のキャラクタリゼーションを行い、またケミカル・ダイレクト・コンヴァージョンのメカニズムの解析を行った。

本研究の成果は、全国に 80 万といわれる関節リウマチ患者ならびに 1,000 万人ともいわれる変形性関節症の患者などに新しい治療の選択肢を提供し、ADL と QOL を高めることに貢献できる可能性が考えられる。

図1



3. 研究の方法

ヒト線維芽細胞から骨芽細胞へのケミカル・ダイレクト・コンバージョンを向上するために、すでに我々が見出している化合物に加えて添加する別の小分子化合物の探索を行い、ALP 染色、Alizarin Red S 染色や定量 RT-PCR 等で解析した。また軟骨細胞へのケミカル・ダイレクト・コンバージョンについて、種々の小分子化合物を用いるとともに、組成の異なる種々の培地を用いて検討した。さまざまなドナー由来のヒト線維芽細胞に、これらの小分子化合物を添加し、種々の期間培養後に、軟骨細胞関連遺伝子群の mRNA 発現を定量的 RT-PCR で測定した。また軟骨基質の産生を、Alcian Blue 染色で可視化した。ケミカル・ダイレクト・コンバージョンの効率と誘導に要する期間、誘導された軟骨細胞様のフェノタイプを指標として、最適な培養法（培地の組成、化合物の種類と組み合わせ等）を探索した。

この方法で得られた軟骨細胞様細胞をキャラクタライズするために、RNA 発現解析、軟骨特異的たんぱく質の発現を免疫染色等で解析し、軟骨細胞との比較を行った。

ケミカル・ダイレクト・コンバージョンのメカニズムを解析する目的で、シグナル伝達パスウェイの検討等を行った。

4. 研究成果

骨芽細胞へのケミカル・ダイレクト・コンバージョンの向上を目指した結果、1 分子種の新たな化合物を追加で添加することで、これまでの方法に比べてより強力にかつ短期間で、ヒト線維芽細胞に骨芽細胞のフェノタイプを誘導できることが確認された（図 2A）。またこの新規の方法では、我々が検討した異なるドナー由来のすべてのヒト線維芽細胞を効率良く骨芽細胞の性質を誘導できることが確認された。また線維芽細胞のみならず、MSC から骨芽細胞への分化誘導を行う際にも、その誘導効率を向上させることも判明した。

ヒト線維芽細胞から軟骨細胞様細胞へのケミカル・ダイレクト・コンバージョンについては、特定の小分子化合物を添加して培養後 Alcian blue 染色と定量的 RT-PCR 解析に供することにより、ヒト線維芽細胞に軟骨細胞様のフェノタイプを誘導しうることを見出した（図 2B、C）。本ケミカル・ダイレクト・コンバージョンで得られた軟骨細胞様細胞のキャラクターについてさまざまな知見を得た。またその化合物を用いた培養方法の最適化を試み培地の組成について知見を得ることが出来た。さらに本ケミカル・ダイレクト・コンバージョンのメカニズムの解析を行った。

本研究成果より、ヒト線維芽細胞に骨芽細胞のみならず軟骨細胞様細胞のフェノタイプを、小分子化合物を加えた培養によって誘導し得ることを見出し、その基礎的な情報を得た。本研究成果は、骨・軟骨疾患に対する新規再生医療の基盤技術に寄与する可能性が考えられる。

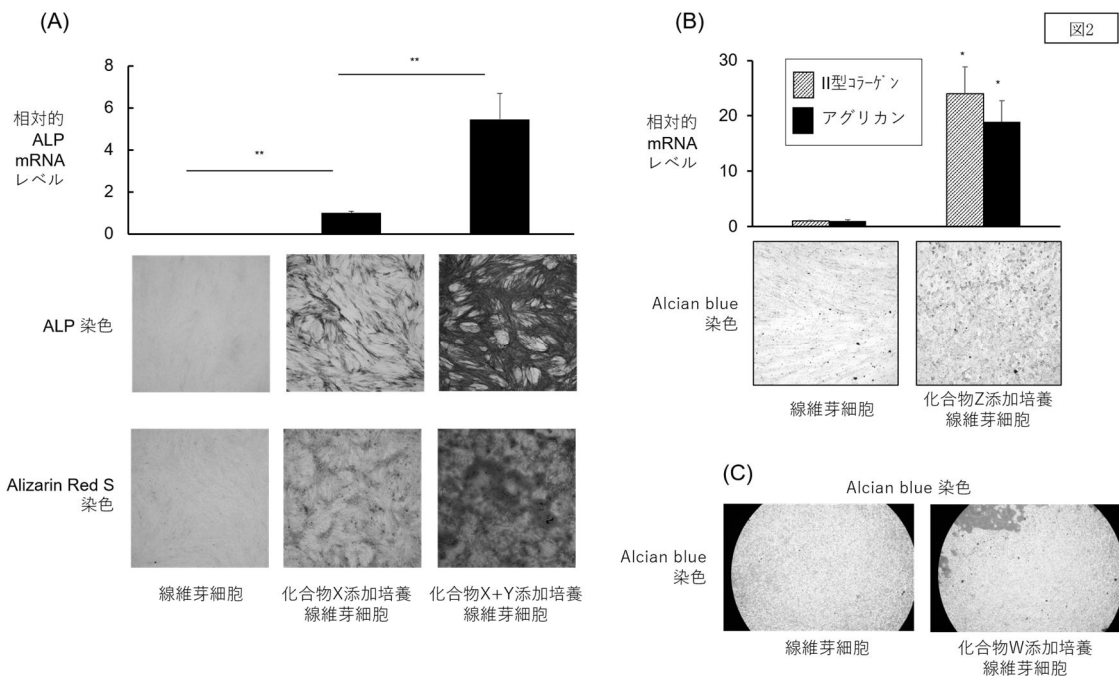


図2

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
研究分担者	山本 健太 (Yamamoto kenta) (00636160)	京都府立医科大学・医学部附属病院・専攻医 (24303)	
研究分担者	岸田 綱郎 (Kishida Tsunao) (00370205)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授 (24303)	
研究分担者	新井 祐志 (Arai Yuji) (50347449)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授 (24303)	

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