

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H03058

研究課題名（和文）AIを用いたTGFRファミリー・シグナルのディファレンシャル制御による骨軟骨再生

研究課題名（英文）Differential regulation of TGFR family signaling and bone and cartilage tissue regeneration

研究代表者

松田 修（Mazda, Osam）

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） 13,400,000円

研究成果の概要（和文）：骨疾患の再生治療には、移植に適した自家骨芽細胞を体細胞から誘導する技術が望まれるが、さらに骨芽細胞と軟骨細胞の両者を誘導し移植できればより望ましい。我々は以前、ヒト線維芽細胞から骨芽細胞を誘導する技術（ダイレクト・リプログラミング（DC））を確立した（PNAS）。さらにTGFR阻害剤を添加して培養し、骨芽細胞に誘導することにも成功した（ケミカルDC）。そこで本研究では、ヒト線維芽細胞から骨芽細胞と軟骨細胞様細胞の両方を誘導するケミカルDCの樹立を目的とした。その結果、各細胞のフェノタイプを誘導できる特定の化合物の組み合わせと培養条件を見出すことに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で見出した軟骨細胞様細胞の誘導法は、我々が樹立した骨芽細胞の誘導法と同様に、侵襲なく採取し拡大培養が可能な線維芽細胞から、効率が高く迅速で低コストなリプログラミングを可能とするもの考えられる。とりわけ、外来遺伝子の導入を必要とせず、外来遺伝子のインテグレーションにともなう細胞の癌化の危険性がないことなどから、安全性が高いと考えられることが重要なアドヴァンテージである。したがって、変形性関節症や関節リウマチ等に対する骨・軟骨再生医療への応用が期待できる。さらに学術的にも、骨芽細胞と軟骨細胞の発生・分化、病態発症の理解や創薬につながる重要な研究成果を生み出すものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：For regenerative medicine of bone diseases, a technology that enables induction of osteoblasts from autologous fibroblasts is needed, while it may be more favorable if both osteoblasts and chondrocytes can be induced. We previously established a technology to induce osteoblasts from human fibroblasts (direct reprogramming). We also succeeded in inducing osteoblasts by culturing fibroblasts with a TGFR inhibitor (chemical direct reprogramming). In this study, we aimed at devising a novel chemical direct reprogramming procedure to induce both osteoblasts and chondrocyte-like cells. As results, we found a novel combination of chemical compounds and culture conditions that enable induction of these two phenotypes.

研究分野：再生医学

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

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

運動器疾患の再生治療の目的で、移植に適した骨芽細胞、軟骨細胞等を作成する技術が望まれる。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て、ヒト線維芽細胞から骨芽細胞を誘導する技術(ダイレクト・リプログラミング)を確立した。すなわち、Runx2、Osterix、Oct4、L-Mycの4遺伝子を導入することで、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変えられる(PNAS, 2015他)。その後、遺伝子を導入しなくても1種類の小分子化合物、TGFR阻害剤を添加して培養するだけで、ヒト線維芽細胞を骨芽細胞に誘導することに成功した(ケミカル・ダイレクト・リプログラミング)(Sci Rep, 2018)。本技術を用いれば、外来遺伝子を導入する必要がなく、移植後に癌化するリスクが極めて低いと考えられ、効果的で安全な新規骨再生医療を実現できると期待される。しかしながら、TGFR阻害剤によりケミカル・ダイレクト・リプログラミングが起こるメカニズムは不明である。

一方で、変形性関節症や関節リウマチでは骨と軟骨の両方にダメージがある患者も多いので、骨芽細胞と軟骨細胞を同時に作って両者の移植ができれば大きなベネフィットを得られると期待される。しかし骨芽細胞とは異なり、軟骨細胞の分化にはTGF- β シグナルが促進的かつ必須に働くことがよく知られている。

2. 研究の目的

本研究では、TGFR阻害剤および/または他の小分子化合物を探索し、線維芽細胞から骨芽細胞のみならず、軟骨細胞様の細胞を誘導できるケミカル・ダイレクト・リプログラミング技術も樹立することにより、骨軟骨再生医療のための新しい移植用骨芽細胞と軟骨細胞を患者自身またはアロのドナーの体細胞から同時に調整する手法を編み出すことを目的とした。さらにそのフェノタイプ転換のメカニズムを解析することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) AIによるALK5抑制性化合物の探索。

ALK5とRepsoxの立体構造(PDB:1VJY)を元に、既存のALK5 inhibitorsに対して母核構造の置換と官能基の付加を行った。すなわち置換・付加が可能な場所を選定し、約4万ほどのフラグメント(部品)の中から適したものを結合させる作業を自動的に実施し、1,061化合物を作製した。得られた化合物を用いて、改めてALK5に対するDocking Simulationを実施した

(2) 細胞培養、フェノタイプ解析

ヒト真皮由来線維芽細胞(HDFs)を、種々の化合物の組み合わせを添加した種々の培地中で培養後、骨芽細胞様のフェノタイプをALP活性、骨基質産生量、骨芽細胞特異的遺伝子のmRNA発現、軟骨細胞様フェノタイプを軟骨基質産生量、軟骨細胞特異的遺伝子のmRNA発現で評価した。またRNA Seq解析を行い、骨芽細胞、軟骨細胞、線維芽細胞等との同源性等を解析した。

(3) ケミカル・ダイレクト・コンバージョンのメカニズム解析

上記のフェノタイプ転換の機構を解析する目的で、種々のシグナル伝達分子(Sma1, Sma2等)のノックアウト線維芽細胞をCRISPR/Cas9システムで作成した。これらを用いて上記と同様の培養を行い、各シグナル伝達分子の寄与を評価した。

4. 研究成果

(1) ALK5抑制性化合物。

Docking Scoreにおいて、ALK5に対して既存のALK5 inhibitorsよりも強い結合力を示す可能性があると示唆される化合物を複数見出した。上位40化合物の構造をFig.1に示す。これらの多くは公的データベース上未登録であり新規化合物であると考えられる。

(2) ケミカル・ダイレクト・コンバージョンとその分子機構

HDFsを、種々の化合物の組み合わせの添加と種々の培地中および培養条件下での培養を行った検討の結果、特定の化合物を添加した培養後、骨芽細胞用の条件で培養することによって、骨基質の産生能、ALP活性、骨芽細胞特異的遺伝子発現を誘導することができた。さらにHDFsを種々の化合物と培養条件で培養し、軟骨基質の産生能と軟骨細胞特異的遺伝子発現を示す軟骨細胞様細胞を誘導できることがわかった(Fig. 2)。

(3) 本研究の結果、骨芽細胞を誘導できる化合物の組み合わせと培養条件に加えて、軟骨細胞様細胞を誘導できる化合物の組み合わせと培養条件を見出した。線維芽細胞から軟骨細胞への誘導は他のフェノタイプの細胞を経ていると考えられたが、iPS細胞は経由していないと考えられた。この方法を用いれば、患者自身またはアロのドナーの皮膚組織等から、ほとんど侵襲なく採取し大量培養できる線維芽細胞より、高機能な移植用の骨芽細胞と軟骨細胞の両方を、それぞれ多数作出することが可能となろう。本法は効率が高く迅速で低コストなリプログラミングを可能とし、骨・軟骨再生医療への応用が期待できる。さらに骨芽細胞と軟骨細胞の発生・分化、病態発症の理解や創薬につながる重要な知見をもたらすものと考えられる。

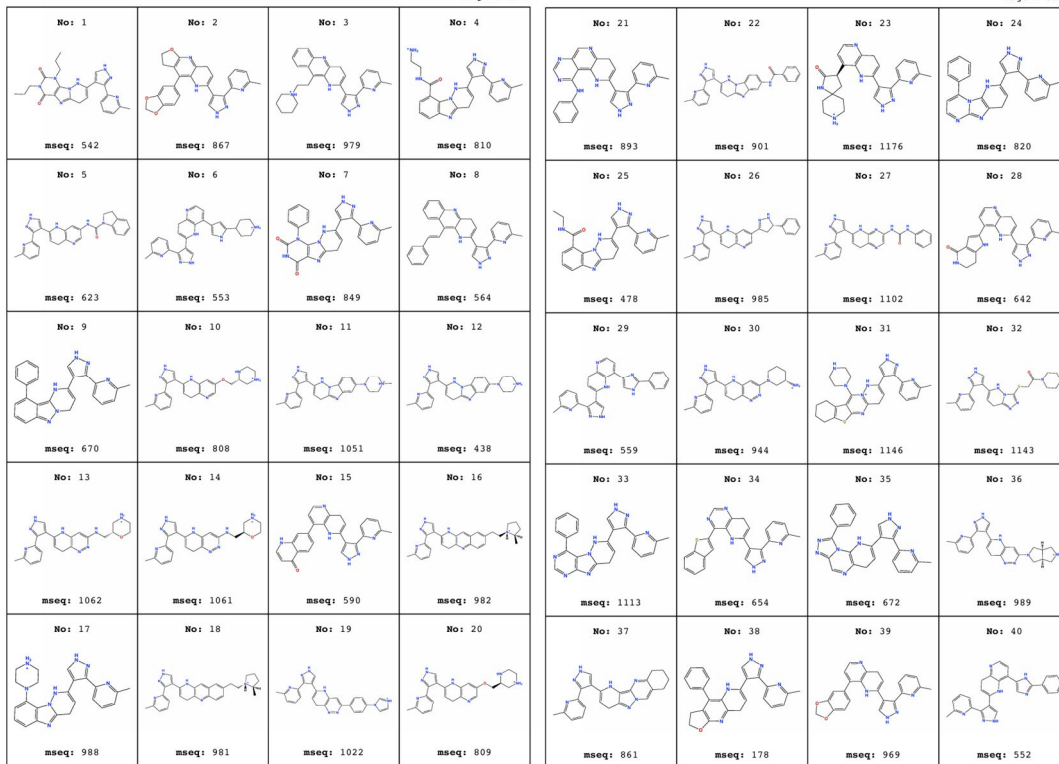
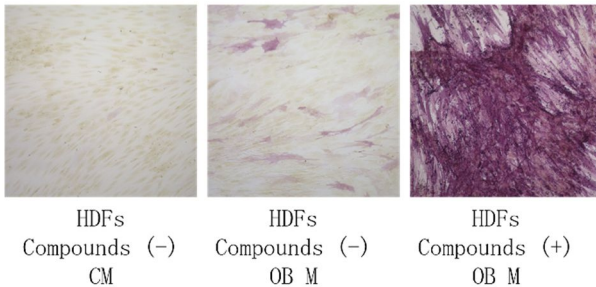
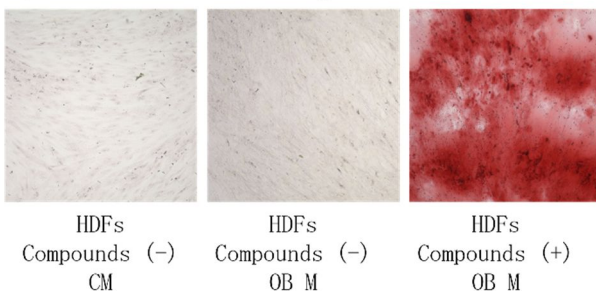


Fig. 1 Small molecular compounds that may bind to ALK5 more efficiently than original ALK5 inhibitors as predicted by docking simulation in silico.

A) ALP staining on D14



B) Alizarin Red S staining on D21



C) Alcian blue staining on D14

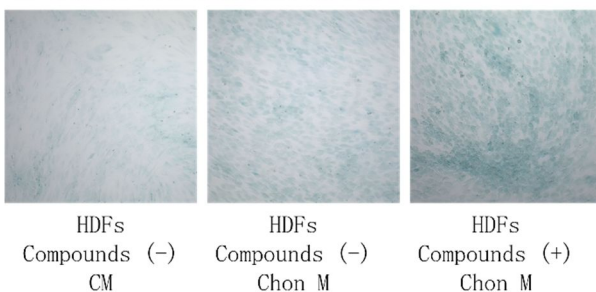


Fig 2

Induction of Osteoblast-like cells and chondrocyte-like cells from fibroblasts. A and B) Human dermal fibroblasts (HDFs) were cultured in complete medium (CM) in the presence or absence of specific combination of chemical compounds. Thereafter, the non-treated cells were cultured in CM or osteogenic medium (OB M), while the chemical compounds-treated cells were cultured in OB M. Fourteen or 21 days later as indicated, cells were subjected to ALP staining (A) or Alizarin Red S staining (B), to visualize ALP activities (purple) and bone matrix production (red), respectively. C) HDFs were cultured in CM in the presence or absence of specific combination of chemical compounds. The non-treated cells were cultured in CM or chondrogenic medium (Chon M), while the chemical compounds-treated cells were cultured in Chon M. Fourteen days later, cells were subjected to Alcian blue staining to visualize cartilage matrix production (light blue). Optical magnification was x100.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Shimomura Seiji, Inoue Hiroaki, Arai Yuji, Nakagawa Shuji, Fujii Yuta, Kishida Tsunao, Shin-Ya Masaharu, Ichimaru Shohei, Tsuchida Shinji, Mazda Osam, Kubo Toshikazu	4. 巻 26
2. 論文標題 Hypoxia promotes differentiation of pure cartilage from human induced pluripotent stem cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular Medicine Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/mmr.2022.12745	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 Sawai Seiji, Sowa Yoshihiro, Kishida Tsunao, Inokawa Hitoshi, Inafuku Naoki, Tsuchida Shinji, Oda Ryo, Fujiwara Hiroyoshi, Mazda Osam, Yoshimura Kotaro, Takahashi Kenji	4. 巻 -
2. 論文標題 Micronized cellular adipose matrix (MCAM) promotes the therapeutic effect of an artificial nerve conduit in peripheral nerve gap injury	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Plastic and Reconstructive Surgery	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/PRS.0000000000010136	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 Adachi Tetsuya, Miyamoto Nao, Imamura Hayata, Yamamoto Toshiro, Marin Elia, Zhu Wenliang, Kobara Miyuki, Sowa Yoshihiro, Tahara Yoshiro, Kanamura Narisato, Akiyoshi Kazunari, Mazda Osam, Nishimura Ichiro, Pezzotti Giuseppe	4. 巻 23
2. 論文標題 Three-Dimensional Culture of Cartilage Tissue on Nanogel-Cross-Linked Porous Freeze-Dried Gel Scaffold for Regenerative Cartilage Therapy: A Vibrational Spectroscopy Evaluation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 8099 ~ 8099
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms23158099	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 該当する
1. 著者名 Sowa Yoshihiro, Inafuku Naoki, Kishida Tsunao, Mori Masanori, Mazda Osam, Yoshimura Kotaro	4. 巻 -
2. 論文標題 Prophylactic application of human adipose tissue-derived products to prevent radiation disorders	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Plastic and Reconstructive Surgery	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/PRS.0000000000010132	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 Sawai Seiji, Kishida Tsunao, Kotani Shin-ichiro, Tsuchida Shinji, Oda Ryo, Fujiwara Hiroyoshi, Takahashi Kenji, Mazda Osam, Sowa Yoshihiro	4. 巻 2021
2. 論文標題 ALK5 i II Accelerates Induction of Adipose-Derived Stem Cells toward Schwann Cells through a Non-Smad Signaling Pathway	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Stem Cells International	6. 最初と最後の頁 1~11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2021/8307797	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 Sowa Yoshihiro, Kishida Tsunao, Louis Fiona, Sawai Seiji, Seki Makoto, Numajiri Toshiaki, Takahashi Kenji, Mazda Osam	4. 巻 10
2. 論文標題 Direct Conversion of Human Fibroblasts into Adipocytes Using a Novel Small Molecular Compound: Implications for Regenerative Therapy for Adipose Tissue Defects	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 605 ~ 605
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells10030605	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 Nakai Kei, Yamamoto Kenta, Kishida Tsunao, Kotani Shin-ichiro, Sato Yoshiki, Horiguchi Satoshi, Yamanobe Hironaka, Adachi Tetsuya, Boschetto Francesco, Marin Elia, Zhu Wenliang, Akiyoshi Kazunari, Yamamoto Toshiro, Kanamura Narisato, Pezzotti Giuseppe, Mazda Osam	4. 巻 9
2. 論文標題 Osteogenic Response to Polysaccharide Nanogel Sheets of Human Fibroblasts After Conversion Into Functional Osteoblasts by Direct Phenotypic Cell Reprogramming	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Bioengineering and Biotechnology	6. 最初と最後の頁 713932 ~ 713932
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fbioe.2021.713932	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 Kamada Yoichiro, Toyama Shogo, Arai Yuji, Inoue Hiroaki, Nakagawa Shuji, Fujii Yuta, Kaihara Kenta, Kishida Tsunao, Mazda Osam, Takahashi Kenji	4. 巻 42
2. 論文標題 Treadmill running prevents atrophy differently in fast- versus slow-twitch muscles in a rat model of rheumatoid arthritis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Muscle Research and Cell Motility	6. 最初と最後の頁 429 ~ 441
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10974-021-09610-0	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 Shimomura Seiji, Inoue Hiroaki, Arai Yuji, Nakagawa Shuji, Fujii Yuta, Kishida Tsunao, Shin-Ya Masaharu, Ichimaru Shohei, Tsuchida Shinji, Mazda Osam, Takahashi Kenji	4. 巻 71
2. 論文標題 Mechanical stimulation of chondrocytes regulates HIF-1 under hypoxic conditions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Tissue and Cell	6. 最初と最後の頁 101574 ~ 101574
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tice.2021.101574	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	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	山本 健太 (Yamamoto Kenta) (00636160)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教 (24303)	
研究分担者	菅波 晃子 (Akiko Suganuma) (10527922)	千葉大学・大学院医学研究院・助教 (12501)	
研究分担者	高橋 謙治 (Takahashi Kenji) (30347447)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授 (24303)	
研究分担者	田村 裕 (Yutaka Tamura) (50263174)	千葉大学・大学院医学研究院・准教授 (12501)	

6. 研究組織（つづき）

	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	PEZZOTTI G. (Pezzotti Giuseppe) (70262962)	京都工芸繊維大学・材料化学系・教授 (14303)	
研究分担者	秋吉 一成 (Akiyoshi Kazunari) (90201285)	京都大学・医学研究科・研究員 (14301)	

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