

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 13 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659704

研究課題名（和文）蛍光レポーターシステムを用いた iPS 細胞からの軟骨分化誘導法の検討

研究課題名（英文）Establishment of chondrocyte induction from iPS cells using a fluorescent reporter system.

研究代表者

齋藤 琢 (SAITO TAKU)

東京大学・医学部附属病院・特任准教授

研究者番号：30456107

研究成果の概要（和文）：

Col2a1, Prx1 などのプロモーターを用いた蛍光レポーター iPS 細胞を樹立し、レチノイン酸や BMP などを用いた分化誘導法にて蛍光発色し、かつ軟骨マーカーを高発現することを確認した。この細胞を用いて様々な誘導因子の検討を行い、BMP のほか、インスリン、TGF-beta、Notch シグナル阻害剤、Wnt シグナル阻害剤でも強力に蛍光発色することを見出した。現在はそれらの最適な組み合わせについて検討している。

研究成果の概要（英文）：

We established fluorescent reporter iPS cells using Col2a1- and Prx1-promoter, and confirmed the fluorescent signal by stimulation of retinoic acid or BMP. We used the iPS cells to screen various factors for chondrogenic differentiation, and identified insulin, TGF-beta, inhibitor of the Notch signaling and the Wnt signaling. We are researching the optimal combination of these factors to induce chondrocyte from iPS cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：骨・軟骨代謝学

1. 研究開始当初の背景

軟骨は四肢の関節のなめらかな運動を支えるほか、顔面で鼻や耳の形状を支持する上でも重要な役割を果たしており、軟骨が変性したり欠損することに起因する疾患は数多く存在する。その代表的なものが変形性関節症であり、申請者らが実施している国内最大のコホート研究 (ROAD study) によると膝痛に苦しむ患者数は国内で 780 万人に達する (*Osteoarthritis Cartilage* 17:1137, 2009, *Ann Rheum Dis* 68:1401, 2009, *J Bone Miner Metab* 27:620, 2009)。その治療法としては効果に乏しい対症療法か人工関節置換術などの手術療法しかないが、日本国内での年間的人工関節置換術はわずか 7 万件弱にとどまっており、人工関節置換術が変形性関節症の

最後の治療手段であれども決して標準的な治療に成り得ていない現状が浮かび上がる。膝痛で困っている患者の圧倒的多数が人工関節置換術を敬遠しており、その理由としては人工関節置換術自体の侵襲が大きいこと、術後は 90 度までしか膝が曲がらないといった可動域制限があること、大きな人工物で関節全体を置換してしまうため一旦感染すると関節機能が完全に全廃してしまう危険があることなどが挙げられる。そのような患者に対して行える本質的な治療法はいまだに存在しないが、社会の高齢化が急速に進むことによって今後さらに患者数は増えることは確実であり、社会的にも喫緊の課題である。

その解決方法として、細胞を用いた再生医

療研究が古くから行われてきた。関節軟骨の部分欠損に対しては、自家軟骨細胞を体外で培養増幅して欠損部に戻すという治療法が報告されて以来 (*N Engl J Med* 331:889, 1994) 多くの変法が報告されてきた。しかし自家軟骨細胞には細胞の増殖能に限界があることと、そもそも変形性関節症では正常な関節軟骨が多くは残されていないことなどから、初報から 20 年近く経過した現在でも自家軟骨細胞を用いた再生医療を変形性関節症に応用することは不可能のままであり、現在でもその対象疾患は部分的な関節軟骨欠損のみに限られている。また骨髄由来・滑膜由来の間葉系幹細胞を用いた軟骨再生も報告され、現在も改良が試みられているが、これらはいずれも軟骨欠損部に間葉系幹細胞を分化誘導せずには充填するだけであり、その後の軟骨細胞への分化誘導については *in vivo* の局所環境の要素に依るため、欠損部が関節全域に及ぶ変形性関節症への応用は期待できない。間葉系幹細胞を *in vitro* で用いて軟骨再生を行うにしても、間葉系幹細胞は *in vitro* で多分化能を保ったまま培養増幅することには限界があり、また骨髄や滑膜から採取できる細胞数も当然限りがあることから、変形性関節症の治療に必要な細胞数を確保することは到底不可能である。一見すると軟骨再生は進捗が著しく、変形性関節症の克服も近いと理解されがちであるが、このように現行のセルソースで対応できるのは部分的な関節軟骨欠損のみであり、変形性関節症への応用には新たなセルソースが必要である。また部分的な関節軟骨欠損で手術を要する症例は全国でも数百にとどまるが、変形性関節症の症例数は万~十万単位であることから、変形性関節症に対応しうるような新たなセルソースとそれを用いた革新的な技術の登場が渴望される。

2006 年に開発された iPS 細胞は、身体のあらゆる細胞・組織に分化誘導しうるだけでなく、上述のような量的な制約もない。また、iPS 細胞は各種セルソースからリプログラミング技術により作出できるため、さまざまな HLA タイプから iPS 細胞を作製し、GMP 体制で品質を管理することにより、免疫拒絶のない、安全で確実な同種細胞移植が可能となる。そのため、従来の自家細胞移植では不可避の患者からの細胞採取という侵襲が回避できるため、iPS 細胞は軟骨再生医療においても画期的なセルソースとして期待されている。

2. 研究の目的

本研究は iPS 細胞からの効率的な軟骨分化誘導法を確立することを目標に、間葉系分化時と軟骨分化時に異なる蛍光を発する二段階蛍光レポーター iPS 細胞を作成し、初期の間葉系分化およびそれに続く軟骨分化を誘導しうる因子を検討する。

3. 研究の方法

Col2a1-GFP トランスジェニックマウスから iPS 細胞を樹立するとともに、未分化間葉系マーカーである Prx1 プロモーターに赤色蛍光 DsRED の cDNA を接合したレポータートランスジーンを pMXpuro ベクターに搭載し、PlatE 細胞を用いてレトロウイルスベクター化する。そして Col2a1-GFP-iPS 細胞に Prx1-DsRED のトランスジーンを安定導入し、間葉系分化時に赤色、軟骨分化時に緑色に発色するレポーター iPS 細胞を樹立する。樹立した iPS 細胞が ES 細胞に近いことをマーカー遺伝子の発現によって確認するとともに、3 胚葉分化能を持つことをテラトーマ形成実験によって確認する。そして既存の様々な低分子化合物について蛍光を指標とした迅速かつハイスループットなスクリーニングをおこない、間葉系・軟骨分化誘導に有用な因子の絞り込みを行い、さらにその最適な組み合わせについて検討を行う。

4. 研究成果

軟骨細胞の蛍光インジケーターマウスである Col2a1-GFP トランスジェニックマウスの E12.5 の胎児から線維芽細胞を採取し、山中 4 因子を導入して Col2a1-GFP-iPS 細胞を 50 クローンほど樹立した。ES マーカー遺伝子として、Nanog, Fgf4, Esg1, Eras, Ecat1, Gdf3, Slc2a3, Cripto, Dax1, Znf296, Rex1 の発現を調べ、ES 細胞とほぼ同程度の発現を示すクローンを絞りこむとともに、Klf4, Sox2, Myc, Oct4 のトランスジーンが良好にサイレンシングされていることを確認し、これらの条件がもっとも ES 細胞に近いと思われる 2 クローンを選定した。これらの多分化能を確認するために、免疫不全マウスの精巣上体に細胞を移植してテラトーマ形成実験を行い、*in vivo* で三胚葉の組織に分化することを組織学的に確認した。

次に、これらの細胞から、定型的な手法によって胚様体を形成し、レチノイン酸存在下で中胚葉分化させ、その後に様々な化合物やサイトカインを添加することによって軟骨分化誘導能を検討した。BMP-2 やインスリン、TGF-beta など、既知の軟骨誘導性のサイトカインについてはいずれも良好な GFP の発光を認めた。またこれらの発光は 2 型コラーゲン、9 型コラーゲン、11 型コラーゲン、Sox9, Sox5, Sox6 などの軟骨分化マーカーの発現上昇を伴っていたことから、実際の軟骨分化を反映していると考えられた。他には Notch シグナルや Wnt シグナルの阻害剤が良好な発色をもたらすことも確認した。

さらに未分化間葉系マーカーである Prx1 プロ

モーターに赤色蛍光DsREDのcDNAを接合したレポータートランスジーンをレトロウイルスベクター化し、樹立したCol2a1-GFP-iPS細胞にPrx1-DsREDのトランスジーンを安定導入し、間葉系分化時に赤色、軟骨分化時に緑色に発色するレポーターiPS細胞を樹立した。この細胞について定型的な手法によって胚様体を形成し、レチノイン酸存在下で中胚葉分化させ、その後にBMPなどを用いて軟骨分化させたところ、赤色蛍光陰性・緑色蛍光陰性の上体から、赤色蛍光陽性・緑色蛍光陰性のフェーズを経て、赤色蛍光陰性・緑色蛍光陽性の状態に至ることを確認した。これはそれぞれのレポーターが独立して適切に作動することを意味する。

現在低分子化合物ライブラリーなどを用いて両フェーズの最適な分化誘導法を研究開発している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

- 1) Hojo H, Saito T, et al. Hedgehog-Gli activators direct osteo-chondrogenic function of bone morphogenetic protein toward osteogenesis in the perichondrium. *J Biol Chem*. E-pub 2013. 査読有
- 2) Hosaka Y, Saito T (equally contributed), et al. Notch signaling in chondrocytes modulates endochondral ossification and osteoarthritis development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 110:1875-80, 2013. 査読有
- 3) Yano F, Saito T (equally contributed), et al. β -catenin Regulates PTH/PTHrP Receptor Signals and Chondrocyte Hypertrophy through Binding to Its Intracellular C-terminal Region. *Arthritis Rheum* 65:429-35, 2013. 査読有
- 4) Yano F, Saito T, et al. A novel disease-modifying osteoarthritis drug targeting Runx1. *Ann Rheum Dis*. 72:748-53, 2013. 査読有
- 5) Hojo H, Saito T, et al. Gli1 Protein Participates in Hedgehog-mediated Specification of Osteoblast Lineage during Endochondral Ossification. *J Biol Chem*. 287:17860-9, 2012. 査読有
- 6) Itoh S, Saito T, et al. GSK-3 α and GSK-3 β proteins are involved in early stages of

chondrocyte differentiation with functional redundancy through RelA protein phosphorylation. *J Biol Chem*. 287:29227-36, 2012. 査読有

- 7) Hirata M, Saito T, et al. C/EBP β and RUNX2 cooperate to degrade cartilage with MMP-13 as the target and HIF-2 α as the inducer in chondrocytes. *Hum Mol Genet*. 21:1111-23, 2012. 査読有
- 8) Fukai A, Saito T, et al. Lack of a chondroprotective effect of cyclooxygenase 2 inhibition in a surgically induced model of osteoarthritis in mice. *Arthritis Rheum*. 64:198-203, 2012. 査読有

[学会発表] (計 2 件)

- 1) 齋藤琢 軟骨分化モニタリングのための Col2a1-EGFP-iPS 細胞の樹立 第 12 回日本再生医療学会総会 2013. 3. 23 横浜
- 2) 齋藤琢 変形性関節症の分子メカニズムの解明 第 12 回日本再生医療学会総会 2013. 3. 22 横浜

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

[その他]

ホームページ等
<http://www.u-tokyo-ortho.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齋藤 琢 (SAITO TAKU)

東京大学・医学部附属病院・特任准教授

研究者番号：30456107

(2)研究分担者

緒方 直史 (OGATA NAOSHI)
東京大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：10361495

森崎 裕 (MORIZAKI YUTAKA)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：30508099

(3)連携研究者

なし