

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24390354

研究課題名(和文)軟骨細胞増殖/分化を制御する新たなメカニズムの同定と解析

研究課題名(英文) Analysis of regulatory mechanisms controlling proliferation and differentiation of chondrocytes

研究代表者

妻木 範行 (Tsumaki, Noriyuki)

京都大学・iPS細胞研究所・教授

研究者番号：50303938

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：軟骨細胞の分化を調節する因子としてCyp26b1に着目した。Cyp26b1を軟骨だけで欠くコンディショナルノックアウトマウスを作ったところ、このマウスの軟骨細胞の分化に異常を認め、軟骨の形成が障害されてマウスの四肢が短くなった。このような短縮がおきたしくみとして、レチノイン酸の役割を解析した。また、軟骨分化に異常を来す疾患であるFGFR3軟骨形成異常症とII型コラーゲン異常症から疾患iPS細胞モデルを作り、病態を解析した。

研究成果の概要(英文)：We analyzed function of Cyp26b1 in chondrocytes by using conditional knockout mice which lack Cyp26b1 in chondrocyte-specific manner. The mice showed abnormal chondrocyte differentiation and cartilage formation, and short limbs. We also created iPS cell model from the disease in which chondrocyte differentiation is abnormal, and analyzed their pathology.

研究分野：骨軟骨代謝学

キーワード：chondrocyte Cyp26b1 iPS cells collagen differentiation

1. 研究開始当初の背景

加齢とともに関節軟骨の変性は進行し、高齢化社会の進行とともに、変形性関節症の患者数は急増している。しかし軟骨細胞は高度に分化した細胞で、損傷部位の自然修復は期待できず、根治的な治療方法は無い。変性した軟骨を回復させて関節機能の回復を目指すためにも、軟骨形成/分化の制御メカニズムを分子レベルで解明することは必要である。軟骨組織ではコラーゲンとプロテオグリカンからなる細胞外マトリックスの中に軟骨細胞が散在している。我々もこれまで、軟骨細胞に働く種々のシグナルが、軟骨細胞の分化やマトリックス遺伝子の発現制御に作用し、結果として軟骨の形態や機能に及ぼす影響を分子レベルで解明してきた。

そして、これらの基盤研究成果を、軟骨欠損治療方法の開発に応用するために、移植に供せるような、大量の高品質な硝子軟骨細胞を作ることを行った。これまで皮膚などの分化した細胞を他の細胞系譜に trans differentiation させることは困難とされてきた。そんな中、iPS 細胞が作られ、皮膚線維芽細胞に4つの reprogramming factor を導入することで万能細胞様細胞に細胞リプログラミングすることが可能になることが示された。皮膚線維芽細胞は、軟骨細胞と同じく未分化間葉系細胞由来である。そこで我々は、2つのリプログラミング因子(c-MycとKlf4)と1つの軟骨因子(SOX9)を導入することにより、皮膚線維芽細胞を軟骨細胞に直接、変換しうることを発見した。この直接誘導過程では多能性幹細胞の状態を経ないことを明らかにした。このように、細胞リプログラミング技術を用いることで、患者本人の皮膚線維芽細胞などから再生医療に使う移植用細胞を作りうるようになった。

しかし現状では、軟骨細胞への誘導効率も低く、また軟骨細胞を脱分化させずに硝子軟骨の形質を維持させる培養条件も明らかではない。また、軟骨細胞は肥大化・変性する傾向があり、これを抑制する方法は確立されておらず、課題は多い。

2. 研究の目的

研究の全体構想は、軟骨細胞増殖/分化の制御メカニズムを分子レベルで明らかにし、そこで得た知見をもとに、病的に変性・破壊された軟骨を修復する方法を開発することにある。その中で本研究の目的は、1) 硝子軟骨細胞の形質を維持させる新たな因子を探索する、2) 同定した因子の軟骨細胞増殖/分化に対する機能について、遺伝子改変マウスを用いて解析する、そして、1) 2) で得た知見をもとに、3) ヒト軟骨培養に至適な培養条件を探索する、の3つである。再生医療において硝子軟骨の供給元として、幹細胞からの分化誘導と皮膚線維芽細胞からの直接誘導がある。しかし、誘導した軟骨細胞の数を増やすこと、細胞を肥大化変性させずに

維持すること、脱分化させずに硝子軟骨様の表現型を維持させること、は難しい。これらの課題を解決して、高品質の軟骨細胞を誘導/維持する方法の開発に、本申請研究計画の成果が貢献することを目指す。

3. 研究の方法

遺伝子改変マウスモデルと Cre/loxP システムを用いたリニージェネレーションにより、軟骨細胞分化過程を解析し、それにかかわる因子の機能を調べる。

細胞リプログラミング技術を使い、軟骨ダイレクトリプログラミングの機序の解析と、軟骨細胞分化の分子メカニズム、軟骨疾患の病態を調べる。

4. 研究成果

軟骨細胞脱分化過程の詳細な解析を行った。Col11a2-EGFP トランスジェニックマウス由来軟骨細胞培養のタイムラプス撮影と、Col11a2-Cre; Rosa26-stopflaxed-YFP マウス由来軟骨細胞培養のリニージェネレーションを行い、軟骨細胞培養後に出現する線維芽細胞様細胞が脱分化した軟骨細胞であり、培養開始時に元々存在する少量の線維芽細胞が優位に増殖したものではないことを示した。この結果を、Minegishi Y, et al., *Osteoarthritis Cartilage* 2013; 21: 1968-1975. に報告した。また、XI型コラーゲン遺伝子のプロモーター・エンハンサー配列の活性は、軟骨細胞で認められ、脱分化すると認められなくなることを明らかにした。この知見は、XI型コラーゲン遺伝子のプロモーター・エンハンサー配列の活性は、ヒト皮膚線維芽細胞をダイレクト・リプログラミングによって軟骨細胞へ変換するときのレポーターとして使用したときに役立った。このダイレクトリプログラミングは、細胞にc-MYC, KLF4, SOX9を導入することで起こすことが出来、Ootani H, et al., *PLoS One* 2013; 8: e77365. に報告した。さらに、Col11a2-CreER; Cyp26b1 cKO マウスを作製、解析し、内軟骨性骨化におけるCyp26b1とレチノイン酸シグナルの機能を解析した(BBRC, 2014)。FGFR3軟骨異形成症の疾患特異的iPS細胞モデルを作り、病態解析と創薬研究を行った(Nature, 2014)。II型コラーゲン異常症について、iPS細胞とダイレクト・リプログラミングを用いて疾患モデル研究を行った(Hum Mol Genet, 2014)。これらの結果により、軟骨細胞の分化と増殖を制御する分子機序の理解が深まり、今後の硝子軟骨の形質を維持する手法の開発に向けて有用な知見の蓄積につながったと考える。

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 12 件)

Minegishi Y, Hosokawa K, Tsumaki N., Time-lapse observation of the dedifferentiation process in mouse chondrocytes using chondrocyte-specific reporters, Osteoarthritis Cartilage, 査読有、21 巻、2013、1968-1975
Hidetatsu Outani, Minoru Okada, Akihiro Yamashita, Kanako Nakagawa, Hideki Yoshikawa, and Noriyuki Tsumaki
Direct Induction of Chondrogenic Cells from Human Dermal Fibroblast Culture by Defined Factors, PlosOne, 査読有、8 巻、2013
妻木範行、iPS 細胞で整形外科治療はどう変わるか、臨床整形外科、査読無、49 巻、2014、63-71
妻木範行、リプログラム細胞を用いた軟骨再生への展望、整形・災害外科、査読無、56 巻、2013、573-584
Okada M, Ikegawa S, Morioka M, Yamashita A, Saito A, Sawai H, Murotsuki J, Ohashi H, Okamoto T, Nishimura G, Imaizumi K, Tsumaki N., Modeling type II collagenopathy skeletal dysplasia by directed conversion and induced pluripotent stem cells., Hum Mol Genet, 査読有、2014、299-313
Yamashita A, Morioka M, Kishi H, Kimura T, Yahara Y, Okada M, Fujita K, Sawai H, Ikegawa S, Tsumaki N., Statin treatment rescues FGFR3 skeletal dysplasia phenotypes., Nature, 査読有、513 巻、2014、507-11
Tam WL, Dorien FO, Hiramatsu K, Tsumaki N., Luyten FP, Roberts SJ, Sox9 reprogrammed dermal fibroblasts undergo hypertrophic differentiation in vitro and trigger endochondral ossification in vivo, Cell Reprogram, 査読有、16 巻、2014、29-39
Seki S, Tsumaki N., Motomura H, Nogami M, Kawaguchi Y, Hori T, Suzuki K, Yahara Y, Higashimoto M, Oya T, Ikegawa S, Kimura T., Cartilage intermediate layer protein promotes lumbar disc degeneration., Biochem Biophys Res Commun, 査読有、446 巻、2014、876-881
Minegishi Y, Sakai Y, Yahara Y, Akiyama H, Yoshikawa H, Hosokawa K, Tsumaki N., Cyp26b1 within the growth plate regulates bone growth in juvenile mice, Biochem Biophys Res Commun, 査読有、454 巻、2014、12-18
Tsumaki N., Okada, M., and Yamashita, A, iPS cell technologies and cartilage regeneration, Bone, 査読有、70 巻、2015、

48-54

Peter Karagiannis, Noriyuki Tsumaki, Cell reprogramming for skeletal dysplasia drug repositioning, Cell Cycle, 査読有、13(24)巻、2014、3791-3792
Yamashita, A., Morioka, M., Yahara, Y., Okada, M., Kobayashi, T., Kuriyama, S., Matsuda, S., and Tsumaki, N. Generation of Scaffold less Hyaline Cartilaginous Tissue from Human iPSCs., Stem cell reports, 査読有、4 巻

〔学会発表〕(計 13 件)

妻木範行、iPS 細胞とダイレクト・リプログラミングを用いた軟骨疾患研究、日本炎症・再生学会、2013/7/2~2013/7/3、京都
妻木範行、軟骨細胞リプログラミングと軟骨再生、第 44 回広島整形外科先端医学セミナー、2013/10/30、広島
王谷英達、岡田稔、山下晃弘、吉川秀樹、妻木範行、ヒト皮膚線維芽細胞からの軟骨細胞様細胞誘導、第 27 回日本軟骨代謝学会、2014/2/28-3/1、京都
妻木範行、iPS 細胞とダイレクト・リプログラミングを用いた軟骨疾患研究、第 13 回日本再生医療学会、2014/3/4-6、京都
A. Yamashita, M. Morioka, Y. Yahara, M. Okada, N. Tsumaki, DERIVATION OF TRANSPLANTABLE CARTILAGE FROM HUMAN INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS, 2014 OARSI, 2014/4/24-4/27 Paris, France,
妻木範行、iPS 細胞技術を使った軟骨再生、第 35 回日本炎症・再生医学会、2014/7/2-7/4、沖縄県名護市
岡田稔、妻木範行、型コラーゲン病モデルの解析、BMP 研究会、2014/7/28、大阪市
Noriyuki Tsumaki,
Cartilage Regeneration with iPS Cell Technologies, The 5th Tissue Engineering Symposium, 2014/8/18-20, Sydney, Australia
Takeshi Kimura, Noriyuki Tsumaki
Immunogenicity of Chondrocytes Derived From Human Induced Pluripotent Cellst, The 5th Tissue Engineering Symposium, 2014/8/18-20, Sydney, Australia
Yasuhiro Yahara, Noriyuki Tsumaki
Lineage Tracing of Articular Chondrocytes During Osteoarthritis Development, The 5th Tissue Engineering Symposium, 2014/8/18-20, Sydney, Australia,
妻木範行、細胞リプログラミング技術を使った軟骨疾患研究、第 29 回日本整形外科学会基礎学術集会、2014/10/9-10、鹿

児島市
Noriyuki Tsumaki, 「 Conversion of fibroblasts into chondrocytes by cell reprogramming technologies」
「 Application of cell reprogramming technologies to research of cartilage diseases」, Asian Cartilage Repair Society, 2014/12/7, Seoul, Korea
Noriyuki Tsumaki,
Application of iPSC technology to cartilage regeneration and disease modelling, Croucher Foundation Advanced Study Institute (ASI):
“ Stem Cells: Biology & Applications ”,
2015/1/5-1/7, Hong Kong

〔図書〕(計 3 件)

小田直純、妻木範行、北陸館、BIO Clinica、2015、4
Noriyuki Tsumaki, Springer, A tissue regeneration Approach to Bone and Cartilage Repair, 2014, 13
妻木範行、金原出版、整形・災害外科、2015, 5

〔産業財産権〕

出願状況(計 3 件)

名称: プテロシン誘導体を含む軟骨欠損、軟骨変性、および/または軟骨菲薄疾患治療剤
発明者: 妻木範行/竹森洋/淵野裕之/川原信夫
権利者: 国立大学法人京都大学/独立行政法人 医薬基盤研究所
種類:
番号: 特願 2013-135040
出願年月日: 2013/6/27
国内外の別: 国内
名称: FGFR3 病の予防剤および治療剤ならびにそのスクリーニング方法
発明者: 妻木範行/山下晃弘
権利者: 国立大学法人京都大学
種類:
番号: 特願 2013-249221
出願年月日: 2013/12/2
国内外の別: 国内
名称: 新規軟骨細胞誘導方法
発明者: 妻木範行
権利者: 国立大学法人京都大学
種類:
番号: 特願 2015-030168
出願年月日: 2015/2/19
国内外の別: 国内

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

ヒト iPS 細胞から硝子軟骨の作製～関節軟骨

損傷の再生治療法開発へ向けて～

<http://www.cira.kyoto-u.ac.jp/j/newslist/news/150227-105807.html>

スタチンが軟骨無形成症の病態を回復 -疾患特異的 iPS 細胞モデルによるドラッグ・リポジショニングの可能性
~<http://www.cira.kyoto-u.ac.jp/j/research/finding/140918-084300.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

妻木 範行 (TSUMAKI Noriyuki)
京都大学 iPS 細胞研究所・教授
研究者番号: 50303938