

令和元年6月24日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19749

研究課題名(和文)安全性と効率性の高い新規軟骨細胞ダイレクトリプログラミング法の開発

研究課題名(英文) Novel strategy of direct reprogramming into chondrocyte

研究代表者

波多 賢二 (Hata, Kenji)

大阪大学・歯学研究科・准教授

研究者番号：80444496

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：特定の転写因子の組合せを遺伝子導入することによりiPS細胞を経由せず皮膚線維芽細胞を特定の細胞へと直接分化誘導させるダイレクトリプログラミング法は、次世代の医療技術の一つとして期待されている。本研究では、軟骨組織を蛍光ラベルしたレポーターマウスを用いたスクリーニングシステムを開発し、軟骨細胞のダイレクトリプログラミングを可能にする転写因子セットの候補を4つ選別した。4つの転写因子セットを皮膚線維芽細胞に導入すると、型コラーゲン、アグリカンの発現が顕著に増加することを見出した。今後は、本研究をさらに進展させ、効率の良い軟骨再生治療の確立を目指す。

研究成果の学術的意義や社会的意義

軟骨組織をはじめとする様々な臓器の再生においてiPS細胞を用いた再生医療が注目されている。しかしながら、iPS細胞を用いた場合、低い軟骨細胞分化誘導能など様々な問題点が指摘されている。これらの問題点を解決する手法として期待されているのが、特定の転写因子の組合せを遺伝子導入し、皮膚線維芽細胞からiPS細胞を経ずに目的の細胞へと直接分化誘導させるダイレクトリプログラミングである。本研究で発見した軟骨細胞のダイレクトリプログラミング因子の候補遺伝子に関する研究をさらに進展させることにより、効率の良い軟骨再生治療の確立を目指していきたい。

研究成果の概要(英文)：Direct reprogramming is a promising strategy for cartilage regeneration. We have established the cloning strategy to identify direct reprogramming factors of chondrocyte using reporter mice in which chondrocytes were fluorescently labelled with Venus gene. We have identified four transcription factors including Sox9. Forced expression of four transcription factors into dermal fibroblasts isolated from reporter mice induced Venus positive chondrogenic cells. Also, these sets of transcription factors dramatically increased Col2a1, Col11a2 and Aggrecan mRNA expression. These results suggest that our strategy of direct reprogramming may contribute to the development of regenerative medicine of cartilage.

研究分野：口腔生化学

キーワード：軟骨細胞 ダイレクトリプログラミング

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

軟骨組織は鼻や耳の形を保ったり、関節のなめらかな運動を維持したりするために重要な組織である。したがって、口唇口蓋裂といった先天性疾患、また変形性関節症など老化に伴う軟骨疾患により軟骨組織に欠損や変形が起きると、日常生活に著しい不自由を生じる原因となる。しかし、血管に乏しい軟骨組織は自然治癒力が極端に低いため、軟骨組織の再生を可能にする治療法の確立が強く望まれている。

近年、軟骨組織をはじめとする様々な臓器の再生において注目されているのがダイレクトリプログラミングである。ダイレクトリプログラミングは、iPS細胞を用いる手法と比較して移植後の腫瘍発生の危険性が低い、短時間で作成可能、生体内局所でのリプログラミングが可能など多くの利点を有しており、様々な臓器においてその開発が望まれている。例えば、Iedaらは α MHC遺伝子プロモーターを用いた心筋細胞特異的 GFP発現マウスを用いた解析から心筋細胞のダイレクトリプログラミング因子の同定と、心筋細胞の再生に成功している(Ieda M et al Cell 2010)。したがって、軟骨細胞のダイレクトリプログラミング法が樹立されれば、軟骨組織の再生医療分野のみならず軟骨疾患モデルおよび創薬研究など、将来の革新的医療を担う新しい技術へと研究を進展させることが可能であり、その波及効果は非常に高い。

軟骨細胞においては、Hiramatsuらは軟骨細胞分化に必須の転写因子 Sox9、Klf2 および c-Myc の3つを使用する方法を報告している。しかし、c-Mycを使用する方法は腫瘍化の問題点が指摘されており、臨床への応用は不可能である。そのため、c-Mycを用いることなく皮膚線維芽細胞から軟骨細胞への分化誘導を可能にする、安全性の高い転写因子の新たな組合せの開発が望まれている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、皮膚線維芽細胞から軟骨細胞への分化誘導を可能にするために、c-Mycを含まない特定の転写因子の組合せ、すなわちダイレクトリプログラミング因子を選別し、軟骨組織再生へと応用することである。

3. 研究の方法

生理的条件下の軟骨細胞に特異的に発現する遺伝子のスクリーニング

申請者が過去の樹立した、 α 1(I)型コラーゲン遺伝子のプロモーターを用いて改良型 GFP である Venus 遺伝子を軟骨細胞特異的に発現させたトランスジェニックマウス (Col2a1-Venus-Tg)を用いて実験を行った (Yoshida M. Nature Commun 2015)。軟骨組織形成が活発な胎生期 12.5 日齢 Col2a1-Venus-Tg マウスより FACS を用いて軟骨細胞回収し、遺伝子プロファイリングを行うことにより軟骨細胞特異的な転写因子を選別した。

軟骨細胞ダイレクトリプログラミング因子の絞り込み

軟骨細胞において高発現している上位 20 個の転写因子をリストアップし、過去の文献に

よる選定 (KO マウスの報告など) やファミリー遺伝子の重複による絞り込みを行い、ダイレクトリプログラミング因子の候補遺伝子を絞り込む。選別された転写因子を様々な組み合わせで *Col2a1*-Venus-Tg より採取された初代培養皮膚線維芽細胞に遺伝子導入し、型コラーゲンの発現および Venus 遺伝子の発現を指標に転写因子の組合せを絞り込んでいく。

4. 研究成果

1. レポーターマウスを用いた軟骨細胞特異的転写因子の検索

胎生期 12.5 日齢 *Col2a1*-Venus-Tg マウスから採取した Venus 遺伝子陽性軟骨細胞の RNA と Venus 遺伝子陰性細胞の RNA を用いてマイクロアレイ解析を行った。Venus 陰性の細胞群と比較して Venus 陽性の軟骨細胞で高発現している上位 20 個の転写因子をリストアップした。過去の文献により遺伝子欠損マウスで骨格形成に異常が生じる遺伝子を選別し、さらにファミリー遺伝子として重複している遺伝子を削除した結果、11 個の遺伝子をダイレクトリプログラミング因子の候補転写因子としてスクリーニングした。

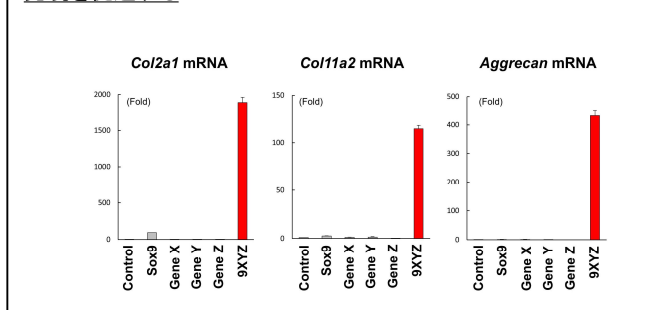
2. 軟骨細胞ダイレクトリプログラミング因子の絞り込み

Col2a1-Venus-Tg マウスから初代培養皮膚線維芽細胞を採取し、上記 11 個の転写因子をレンチウイルスシステムにより遺伝子導入した。*Col2a1*-Venus-皮膚線維芽細胞に 11 個すべての転写因子を遺伝子導入したところ、Venus 遺伝子が発現し緑色蛍光を認める細胞の出現が観察された。この結果に一致して、11 個の遺伝子を全て導入すると *Col2a1* およびアグリカンなどの軟骨細胞分化のマーカー遺伝子の発現誘導が認められた。

11 個の遺伝子をさらに絞り込むために、11 個の転写因子から 1 つずつ遺伝子を減らすことにより 10 種類の転写因子を遺伝子導入する組み合わせ (11 通り) を用いて同様の検討を行った結果、4 種類の遺伝子 (*Sox9* の他 3 種類) を単独で減らすと *Col2a1*、*Col11a2* および *Aggrecan* 遺伝子の発現が顕著に減少することを見出した。

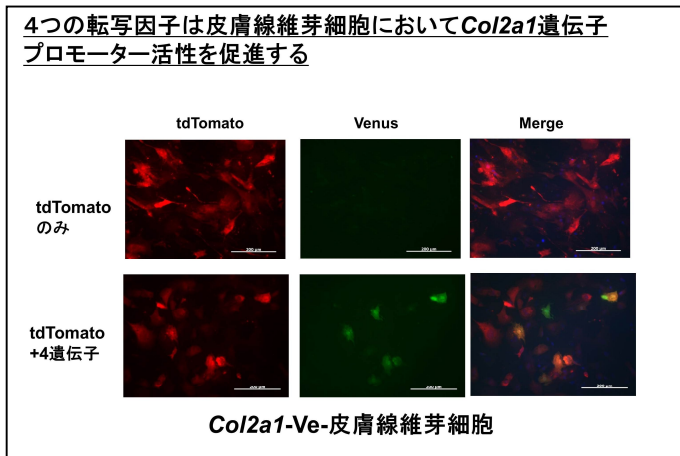
そこで、この 4 種類の遺伝子のみを *Col2a1*-Venus-皮膚線維芽細胞に遺伝子導入したところ、*Col2a1*、*Col11a2* および *Aggrecan* の発現が著明に促進された。また、この軟骨細胞分化遺伝子の発現誘導作用は、4 つの転写因子のうち 1 つでも欠けると減弱した。また、4 つの転写因子による *Col2a1* 遺伝子の発現誘導は、ヒトの皮膚線維芽細胞においても観察されたが、その誘導作用はマウスの皮膚線維芽細胞に比較して弱かった。

4つの転写因子は皮膚線維芽細胞において軟骨細胞遺伝子の発現を促進する



次に FACS 解析により軟骨細胞の分化誘導効率を計測を行った。遺伝子導入効率のマーカーとして赤色蛍光遺伝子である tdTomato と 4 遺伝子を同時に遺伝子導入し、赤色蛍光

を示す細胞を遺伝子導入効率として、緑色蛍光を示す細胞を軟骨細胞分化誘導効率の指標として計測した。その結果、tdTomato 陽性の遺伝子導入された細胞が 40.9%、Venus 遺伝子を発現した細胞が 1.9%であった。したがって、4 遺伝子による軟骨細胞分化誘導効率は約 2.5%と推察された。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1. 波多 賢二 「軟骨細胞の分化機構に関する最新のトピック 転写因子による軟骨細胞分化の制御機構」THE BONE Vol.33 No.1 73-77 2019 査読無し
2. 波多 賢二 「内軟骨性骨化を制御する転写因子の同定とその分子メカニズムの解明」整形外科 2017年 Vol68 No.11 p1174 査読無し

〔学会発表〕(計 5 件)

1. 波多 賢二 「骨格形成を制御する遺伝子発現ネットワークの解明」「骨とCaクラスター」ミニリポート 2019/3/23 徳島
2. 波多 賢二 「軟骨細胞分化における高次遺伝子発現制御機構の解明」第60回 歯科基礎医学会 アップデートシンポジウム「生命情報ビッグデータから病態解明へ 次世代シークエン্সデータをいかに生かすか？」2018/9/6 九州大学 百年講堂
3. 波多 賢二、村上 智彦、高畑 佳史、西村 理行．転写制御と骨格系疾患の分子機構．第60回 歯科基礎医学会 日本学術会議シンポジウム「口腔と全身のネットワーク - 骨・軟骨生物学の新基軸 - 」2018/9/7 九州大学 百年講堂
4. 波多 賢二、高畑 佳史、村上 智彦、西村 理行
「転写因子による内軟骨性骨化の制御」先端歯学スクールシンポジウム 第59回 歯科基礎医学会学術大会 2017/9/17 松本
5. 波多 賢二 日本骨代謝学会 / 歯科基礎医学会 学会合同シンポジウム 硬組織研究のルネッサンス～骨・軟骨・歯のルーツを探る 「軟骨細胞に関するトピックス」2017/7/28 福岡

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織：

(1)研究分担者：該当なし

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者：該当なし

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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、研究者個人に帰属されます。