

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670662

研究課題名(和文) 二次元培養下での脱分化軟骨細胞の再分化促進因子 / 低分子化合物の網羅的探索

研究課題名(英文) Screening of small compounds and factors to re-differentiate dedifferentiated chondrocytes in 2D culture

研究代表者

藤田 香里 (FUJITA, KAORI)

京都大学・iPS細胞研究所・特定研究員

研究者番号：10633092

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：脱分化した軟骨細胞を再分化させる低分子化合物のスクリーニングを行った。当初、化合物処理から4日後でスクリーニングを行っていたが、5日目で再処理を行い10日目に評価を行う系に変更し、最終的に1つの候補化合物を同定した。さらに、この化合物による再分化能を軟骨細胞マーカー遺伝子発現の有無や、化合物の濃度依存性に着いても検討し、確かな候補であることを確認している。現在、再分化誘導の詳細なメカニズム等について研究を進めている。siRNAライブラリーを用いた再分化因子の探索については、siRNAの二度の導入で著しく細胞の損傷が見られるため中止し、shRNAライブラリーを用いた系に変更し実験を続けている。

研究成果の概要(英文)：We performed a small molecular weight compounds screen to identify compounds which re-differentiate dedifferentiated chondrocytes in monolayer-culture. A compound library consists of over 18,200 compounds introduced into the chondrogenic cell line (290-2-14), which were directly converted from dermal fibroblasts of Col11a2-Egfp-Ires-Puro transgenic mice by inducible expression of c-Myc, Klf4 and Sox9 with doxycycline (Dox). We identified one candidate compound and analyzed its ability to re-differentiate dedifferentiated chondrocytes. Treatment of dedifferentiated chondrocytes with the candidate compound dose-dependently up-regulates chondrogenic marker genes (Col2a1 and Col11a2). Now, we have analyzed the detail molecular mechanisms for re-differentiation ability of the candidate compound.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：低分子化合物 軟骨細胞 脱分化 再分化

1. 研究開始当初の背景

関節軟骨は修復能に乏しく、一度損傷を受けると極めて治りにくい。そのため関節軟骨は、外傷、関節リウマチなどの関節炎、加齢による退行などにより損傷されると年月と共に変性が進行する。さらに、大きな損傷部位が生じた場合の治療は難しい。現在、再生医療における軟骨修復方法としては、1) 自家軟骨細胞移植 (ACI)、2) 間葉系幹細胞移植後の軟骨分化への誘導、の大きく分けて2通りがあるが、特に1) の ACI では①元来の軟骨細胞の増殖能の低さに加え、スキャホールドを用いた三次元培養を行うため、得られる細胞数が限られる、②細胞数を賄うために二次元培養に移行すると脱分化する、③ donor の年齢が上がるとさらに十分な量の細胞が得られない (Fujita K, 2009)、の問題がある。本当に臨床に使える硝子軟骨細胞を得るためには、これらの課題を克服しなければならない。そのためにも、本申請研究において、脱分化を阻止、あるいは脱分化から還元する因子を同定し、その制御メカニズムを分子レベルで解明する。そしてこれらの研究で得る知見を元に、脱分化ヒト軟骨細胞を元に戻す、あるいは脱分化を抑制する至適培養条件を探索し、軟骨疾患の治療方法の開発につなげたい。

参考文献

Fujita K. et al.: *Nat Cell Biol* 2009; 11: 1135-1142.

2. 研究の目的

研究の全体構想は、軟骨再生医療の際に現在問題となっている、二次元培養過程で生じる脱分化の分子制御メカニズムを明らかにし、さらに脱分化した細胞を硝子軟骨細胞に戻す、あるいは脱分化抑制の方法を開発することにある。その中で本研究の目的は、1) 二次元培養により脱分化した軟骨細胞を硝子軟骨細胞に戻す因子を探索し分子メカニ

ズムを明らかにする、2) 二次元培養により脱分化した軟骨細胞を硝子軟骨細胞に戻す低分子化合物を探索する、そして、1) 2) で得た知見を元に、3) 脱分化軟骨細胞を元に戻す、あるいは脱分化を抑制する至適培養条件を二次元培養下で開発する、の3つである。本申請研究計画の成果が、再生医療の際の軟骨細胞の脱分化阻止、再分化に貢献することを目指す。

ACI における十分量の硝子軟骨細胞を得るためだけでなく、再生医療において間葉系幹細胞や iPS 細胞などからの分化誘導した軟骨細胞の数を増やすこと、脱分化させずに硝子軟骨様の表現型を維持させること、は難しく、克服されていない。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が期待される。

現在、軟骨再生医療において以下の3つの問題が克服されていない。1) 硝子軟骨細胞の増殖能が低く、特に現在行われている三次元培養では大きな損傷を補えるだけの細胞数を得られない、2) 細胞数を増やすまで三次元培養を行う、あるいは増殖促進のために二次元培養を行うと、軟骨細胞が脱分化し、移植に必要な軟骨細胞としての表現型を維持出来ず、3) 一度脱分化すると元の軟骨細胞に戻れない。これまでに、細胞シートや三次元培養のためのスキャホールドの開発を中心に、特に脱分化をなるべく起こさないような培養条件や低分子化合物の探索が行われてきており、一定の成果がある。しかし、細胞シートや三次元培養では、得られる細胞数が限られること、探索された培養条件や低分子化合物がどういう機序により効果を発揮するかというメカニズムについて不明であることが多い。これらの状況を一度に解決する方法の開発として、本申請研究計画では、1) 軟骨細胞増殖が促進しやすい二次元培養下で培養後、得られた脱分化型細胞を二次元培養下で軟骨細胞に

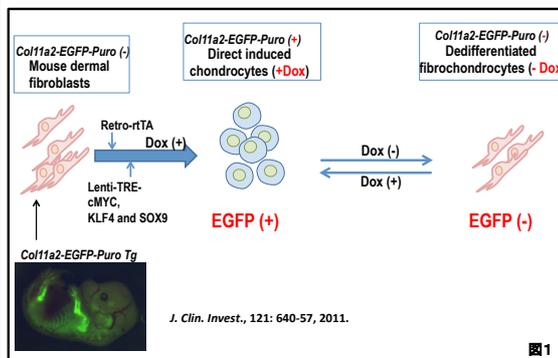
再分化させる、2) 二次元培養下でも軟骨細胞の表現型を維持したまま、細胞増殖を可能にする分子メカニズムを siRNA ライブラリースクリーニングから明らかにする。また同時に、低分子化合物スクリーニングを行い、実際の至適二次元培養条件の開発に繋げる。このように、分子メカニズムとそれに符合する低分子化合物を、網羅的にかつ同時に明らかにする研究は、例がない。また、これまでの研究では細胞シートや三次元スキャホールドの使用など、一般的な細胞培養の二次元培養と比較すると簡便ではない。最終的な目標として、一般的な二次元細胞培養下で、上述の問題点を解決する方法を探索する。

3. 研究の方法

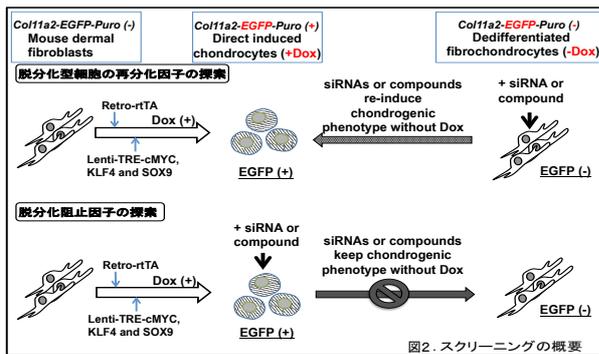
(1) siRNA ライブラリースクリーニングによる二次元細胞培養条件下での脱分化型軟骨細胞の再分化促進因子と脱分化抑制因子の探索

スクリーニングに用いる細胞は既に作製している。具体的には、以下のように作製した。XI 型コラーゲン $\alpha 2$ 鎖遺伝子 (*Col11a2*) のプロモーター・エンハンサーは硝子軟骨特異的発現をもたらす。EGFP 遺伝子とピューロマイシン耐性遺伝子を IRES 配列でつないだレポーターを、*Col11a2* プロモーター・エンハンサー配列に結合したトランスジーンコンストラクト (*Col11a2-EGFP-Puro*) を持ったトランスジェニックマウスを作製した。このマウスは四肢や肋骨の軟骨原基特異的に EGFP を発現している。この *Col11a2-EGFP-Puro* トランスジェニックマウスの皮膚線維芽細胞に、我々が同定した皮膚線維芽細胞からダイレクトリプログラミングを起こして軟骨細胞様細胞に誘導出来る 3 因子、c-Myc, Klf4, SOX9 を Doxycycline (Dox) 存在下で発現できるように導入した。この細胞 (290-2-14) は、Dox 存在下では導入した 3 因子が発現し、軟骨細胞様になり、

その結果、軟骨特異的に機能する *Col11a2* のプロモーター・エンハンサーにより EGFP が発現する。一方、Dox 非存在下では、3 因子が機能せず、脱分化が促進し、EGFP の発現も消滅する (図 1)。予め Dox 非存在下で 5 日



間培養し、脱分化させた 290-2-14 細胞を細胞イメージング用の 96 well プレートに播種する。さらに、既に iPS 細胞研究所が保有するゲノムワイドのマウス転写産物 (約 20,000) をターゲットとした siRNA ライブラリー (Thermo Fisher 製) をリバーストランスフェクション法により、1 well につき 1 標的遺伝子をノックダウンする siRNA が入るように導入する。4 日間の培養後、細胞を固定後ヘキスト染色し、ヘキスト染色による核の数 (=細胞数) と EGFP 発現細胞数を細胞イメージング解析装置 (ArrayScan) により解析する。Well 全体の細胞数に対する EGFP 発現細胞数をパーセントで表し、高パーセントの well に対応する標的遺伝子を候補因子とする。脱分化抑制因子の探索の場合は、Dox 存在下で培養した 290-2-14 細胞を細胞イメージング用の 96 well プレートに播種する。siRNA 導入と同時に Dox 非存在培地に換え、4 日間培養後、前述と同様に細胞イメージング解析装置で解析する。コントロール siRNA 導入細胞では、Dox 非存在下なので EGFP は消失する。siRNA 導入細胞の中で、EGFP が消失しないものが候補因子となる。候補因子選定後は、マウス/ヒト primary 軟骨細胞を用いて同様の結果が得られるかを検討する。



(2) 低分子化合物ライブラリースクリーニングによる二次元細胞培養条件下での脱分化型軟骨細胞の再分化促進因子と脱分化抑制因子の探索

使用細胞、スクリーニング系は前述の siRNA ライブラリースクリーニングと同様である。iPS 細胞研究所では、既存薬が約 5,000、キナーゼ阻害薬と分子相互作用阻害薬が約 20,000、さらに天然物由来の機能未知化合物が約 20,000 の低分子化合物ライブラリーを所有しており、それを使用する。その後さらに、濃度依存性、細胞毒性等を解析する。

4. 研究成果

脱分化した軟骨細胞を硝子軟骨細胞に戻す低分子化合物の 1 次スクリーニングを行うための実験系の構築を行った。播種細胞数、固定の有無、細胞イメージング解析装置の解析アルゴリズムの設定等を行い、その後 1 次スクリーニングを行った。しかしながら、当初予定していた化合物処理後 4 日で解析するには、再分化するには短いことが判明し、4 日目でもう一度化合物を添加し、10 日目に解析する方法に変更した。低分子化合物の内訳は、既存薬が 2560、バイオ活性を有する化合物が 2560、天然物由来が 1920、化学構造不明の化合物が 11200 で、計 18240 の化合物をスクリーニングした。17 化合物が候補化合物として 1 次スクリーニングを通過した。さらに 2 次スクリーニング、濃度依存性試験により、1 候補化合物が最終的に残った。実際、脱分化軟骨細胞にこの化合物を処

理すると軟骨細胞マーカー遺伝子である *Col2a1* や *Col11a2* の発現が濃度依存的に上昇することも確認している。現在、再分化機構の詳細な解析を行っている。

siRNA ライブラリーを用いたスクリーニングでは、上記の化合物スクリーニングで再分化には 10 日前後の日数が必要であることが分かっていたため、siRNA を初日と 5 日目に導入することとしたが、2 回目の導入後、細胞の著しい損傷が見られたため断念した。現在、shRNA ライブラリーによるスクリーニングに変更し実験を行っている。

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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[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

6. 研究組織

(1)研究代表者

藤田 香里 (FUJITA, Kaori)

京都大学・iPS細胞研究所・特定研究員

研究者番号：10633092

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

妻木 範行 (TSUMAKI, Noriyuki)

京都大学・iPS細胞研究所・教授

研究者番号：50303938

太田 章 (OHTA, Akira)

京都大学・iPS細胞研究所・教授

研究者番号：00168931