

論文の内容の要旨

論文題目: 低分子化合物と無血清培地を用いた多能性幹細胞からの骨芽細胞分化誘導法の開発

氏名: 菅家 康介

マウス胚性幹細胞 (マウス ES 細胞)、マウス人工多能性幹細胞 (マウス iPS 細胞)、ヒト人工多能性幹細胞 (ヒト iPS 細胞)などの多能性幹細胞は、成体を構成する全ての細胞に分化できる能力 (多能性)と自己複製能を持つとされ、組織分化・発生研究、治療用薬剤のスクリーニング、希少疾患の病態解明、幹細胞を用いた再生医療において有望な細胞源である。特に、骨格組織の分化・発生の理解において、プロテオーム、転写ネットワーク及びエピゲノムに関する大規模データを利用してしようという試みが盛んに行われている。しかし、骨芽細胞分化の初期段階にある細胞集団を生体から単離することが困難であるなどの技術的制約が存在する。多能性幹細胞から生体を反映した形で骨芽細胞を分化させるプロトコルを開発すれば、技術的制約を一部解決することができる可能性を持つ。

これまでに、多能性幹細胞から骨芽細胞へ分化させる方法がいくつか報告されている。しかしながら、これらの多くは、血清やフィーダー細胞を使用しており、シグナル因子の組換えタンパク質や遺伝子導入法と胚様体形成を組み合わせることで分化を誘導している。さらに、これら過去の手法が生理的な分化過程を模倣しているかは不明であり、誘導効率に関しても低いかもしくは調査されていない。組織発生研究のみならず多能性幹細胞を用いた再生医療を目指す際の技術的要件として、血清やフィーダー細胞などに含まれている未知の成分を極力排除することが求められる。また、従来から用いられてきた遺伝子導入による分化誘導の効率は、ベクターの遺伝子導入効率に大きく依存するため、発生学研究のツールとしては用いにくい。組換えタンパク質に関しては、多能性幹細胞の組織誘導において一般的に用いられているが、分解あるいは翻訳後修飾による生理活性の低下の問題

があり、取り扱いや保存法に注意を要することや高コストであるといった問題点が存在する。これらの問題を解決するため、本研究では細胞内シグナル調節活性を有する数種の低分子化合物を用いた、多能性幹細胞から無血清培地で中胚葉及び骨芽細胞を段階的に誘導するプロトコールの開発を目標とした。

中胚葉由来の骨格形成において、外側中胚葉もしくは沿軸中胚葉に由来する骨格前駆細胞が、骨芽細胞や軟骨細胞へ分化することが知られている。古典的 Wnt シグナルは、多能性幹細胞の中胚葉への運命決定において骨芽細胞分化のプロセスにおいて、Hedgehog シグナル (以下 Hh)は、骨格系前駆細胞から骨芽前駆細胞への運命決定機構に關与する重要な役割を担っていることが知られている。これら各種細胞内シグナルを中胚葉分化、骨芽細胞分化にそれぞれ適切 (十分)な状態に調整することにより、多能性幹細胞から中胚葉、骨芽細胞へと段階的に誘導できるのではないかと考えた。

本誘導法は各分化段階に応じて3段階に分けられる。具体的には、①2008年にYingらによって報告された、mitogen-activated protein kinase (MEK)阻害薬 PD0325901 及び glycogen synthase kinase 3 (GSK3)阻害薬 CHIR99021 (CHIR)の2つの阻害薬 (以下 2i)を用いた多能性維持、②高濃度 CHIR と Hh シグナル阻害薬 cyclopamine (Cyc)の同時曝露による、中胚葉誘導及び神経外胚葉分化阻害、③Hh の活性化薬剤 Smoothed Agonist (SAG)と骨芽細胞誘導性薬剤ヘリオキサンチン誘導體 (TH)の同時曝露による骨芽細胞分化誘導、により構成される。マウス ES 細胞において、中胚葉誘導及び骨芽細胞誘導における各種化合物の条件の最適化を行った結果、2iにて多能性を維持したのちに、5日間の30 μ M CHIR と 5 μ M Cyc の同時曝露後、14日間の1 μ M SAG と 1 μ M TH の同時曝露によって、低分子化合物と無血清培地、無フィーダー環境下で、中胚葉を介し、骨芽細胞に段階的に誘導することができることが分かった。

マウス ES 細胞を用いた検証において、多能性マーカー遺伝子の経時的な発現減少、中胚葉誘導期における中胚葉マーカー遺伝子の発現上昇、骨芽細胞誘導期における骨芽細胞マ

一カー遺伝子の発現上昇を認めた。14日間の骨芽細胞分化誘導の後、さらに4日間SAG及びTHを除いた環境で培養することで、*Bglap*を発現する成熟骨芽細胞をすることが可能であった。骨芽細胞マーカー遺伝子である*Runx2*、*Sp7*、*Colla1*、*Ibsp*及び*Bglap*の遺伝子発現レベルは、*in vitro*培養環境における初代骨芽細胞と同等ないし、それよりも高い遺伝子発現であった。さらに、2005年にKawaguchiらによって報告された方法に比べると、骨芽細胞マーカー遺伝子の発現がより高レベルで誘導されることが確認された。骨芽細胞分化誘導後の骨芽細胞マーカータンパク質(*RUNX2*、*SP7*及び2.3kb-*Colla1*)の発現割合は、それぞれ、 $78 \pm 3\%$ 、 $66 \pm 5\%$ 、 $45 \pm 1\%$ であり、本誘導法により高効率で骨芽細胞が誘導されることが示された。さらに、Day 19及びDay 23における石灰化を評価する染色により、一様に石灰化した細胞塊を認めた。つまり、本誘導法によって誘導された細胞は、骨芽細胞関連遺伝子・タンパク質の発現及び基質の石灰化という骨芽細胞の2つの生理的特徴を持つことが確認された。

本誘導法が骨芽細胞分化の生理的な過程を反映しているかを確認するために、骨形成に必須の転写因子である*Runx2*を欠失させたマウスES細胞に本誘導法を用いた。すると、野生型細胞と異なり、*Runx2*欠失ES細胞では骨芽細胞誘導後に*Sp7*及び*Bglap*の発現上昇を認めず、*Ibsp*のみわずかな発現を認めた。これは、*Runx2*ノックアウトマウスの表現型に類似した遺伝子発現パターンであった。これらの結果と、誘導期間内の遺伝子変化の挙動から、本誘導法は、骨芽細胞分化の生理的な過程を少なくとも部分的に反映している可能性が示唆された。

マウスES細胞と同様に、iPS細胞も多能性及び自己複製能を持つ。そこで、マウスiPS細胞において骨芽細胞分化誘導が可能かを検証したところ、多能性期(Day 0)、中胚葉期(Day 5)、骨芽細胞期(Day 19)、成熟骨芽細胞期(Day 23)の遺伝子変化において、多能性マーカー遺伝子の経時的な発現減少、中胚葉マーカー遺伝子の中胚葉期における発現上昇、骨芽細胞マーカー遺伝子の骨芽細胞期もしくは成熟骨芽細胞期における発現上昇を認めた。

骨芽細胞分化誘導後の骨芽細胞マーカータンパク質の発現、石灰化も同様に確認された。

ヒト iPS 細胞からの骨芽細胞誘導法を確立することは、骨関連疾患の病態解明及び骨の再生医療の進歩への足掛かりとなることから、ヒト iPS 細胞においても骨芽細胞分化誘導可能性を検証した。ヒト iPS 細胞において、2i 培養法は多能性維持に寄与しないため、一般的に用いられる mTeSR1 培地と足場として Matrigel®を用いた維持培養法に変更し、マウス ES 細胞同様の誘導法で誘導した。多能性期 (Day 0)、中胚葉期 (Day 5)、骨芽細胞期 (Day 19)、成熟骨芽細胞期 (Day 23)の遺伝子変化の検証の結果、多能性マーカー遺伝子の経時的な発現減少、中胚葉マーカー遺伝子の中胚葉期における発現上昇、骨芽細胞マーカー遺伝子の骨芽細胞期もしくは成熟骨芽細胞期における発現上昇を認めた。骨芽細胞分化誘導後の骨芽細胞マーカータンパク質である RUNX2 及び SP7 の発現、石灰化も同様に確認された。

本研究で開発した骨芽細胞誘導法は、①低分子化合物のみを誘導因子として用いた誘導法であること、②無フィーダー、無血清の培養環境であること、③マウス ES 細胞、マウス iPS 細胞及びヒト iPS 細胞に応用可能な誘導法であること、④生理的な骨芽細胞の分化を一部模倣した誘導法であること、といった新規性と利点を有する。本研究は、骨の発生学、骨関連疾患の病態解明及び治療、さらには骨の再生医療の進歩への足掛かりとなる一つの方法を提案するものである。