

4種類の低分子化合物のみを用いて 無血清培地下で多能性幹細胞から骨芽細胞を作製

1. 発表者：

菅家康介（かんげこうすけ、東京大学大学院医学系研究科医学博士課程外科学専攻 4年）

鄭 雄一（てい ゆういち、東京大学大学院工学系研究科バイオエンジニアリング専攻、医学系研究科兼任 教授）

大庭伸介（おおば しんすけ、東京大学大学院工学系研究科バイオエンジニアリング専攻 特任准教授）

2. 発表のポイント：

◆多能性幹細胞（マウスのES細胞、マウスのiPS細胞、ヒトのiPS細胞）から中胚葉を経由し、骨芽細胞を効率に作製する方法を開発した。

◆本法では、既存の手法と異なり細胞の培養に組成が不明なものを用いる必要がなく、誘導因子として4種類の低分子化合物のみを用いる。

◆本法は、骨形成メカニズムの解明、骨形成性薬剤のスクリーニング、骨系統疾患の病態解明、骨再生医療に役立つものと期待される。

3. 発表概要：

これまで、多能性幹細胞（注1）から目的細胞や組織を作製するために広く用いられてきた手法には、①正確な組成が不明なもの（例 ウシ胎仔血清）を細胞の培養に使用すること、②多能性幹細胞が目的としない組織への分化を誘導しかねない胚様体（注2）を形成すること、③誘導因子に遺伝子導入や組換えタンパク質を用いること、などによる安全性やコストに関する懸念が存在します。多能性幹細胞を用いて各種組織を作製する手法は、全て既知の成分を用い、目的としない組織への分化を抑え、さらに経済的かつ安定な低分子化合物を用いた方法が理想的です。

東京大学大学院医学系研究科外科学専攻医学博士課程の菅家康介氏、同大学院工学系研究科バイオエンジニアリング専攻の大庭伸介特任准教授、鄭雄一教授らは、細胞の培養に組成が不明なものを用いることなく、4種類の低分子化合物（注3）のみを誘導因子として用いることにより、多能性幹細胞から中胚葉（注4）を経由して効率的に骨芽細胞（注5）を作製する方法を開発しました（図1）。この方法では、経済的かつ安定な低分子化合物をはじめとして既知の成分のみを用い、さらに目的としない組織への分化を抑えるため、既存の手法の問題点が解決されると考えられます。

本法は、骨形成メカニズムの解明、骨形成性薬剤のスクリーニング、骨系統疾患の病態解明、骨再生医療の足掛かりになると期待されます。

4. 発表内容：

生体より採取できる骨芽細胞の数には限界があり、骨の発生や再生を研究する上での技術的制約となっていました。この点において、あらゆる組織に分化できる能力と無限の増殖能をもつ多能性幹細胞は組織発生研究において有望なツールであるといわれています。多能性幹細胞の目的細胞・組織への分化にこれまで広く用いられてきた手法には、①動物由来血清及びフィーダー細胞（注6）等の正確な組成が不明なものを細胞の培養に用いること、②多能性幹細胞

が目的としない組織への分化を誘導しかねない胚様体を形成すること、③誘導因子に遺伝子導入や組換えタンパク質を用いること、などによる安全性やコストに関する懸念が存在します。多能性幹細胞を用いた組織誘導においては、全て既知の成分を用いて、目的としない組織への分化を抑え、さらに経済的かつ安定な低分子化合物を用いた方法が理想的です。

四肢や体幹の骨格形成は、外側中胚葉もしくは沿軸中胚葉の細胞が骨格前駆細胞へと分化し、骨芽細胞や軟骨細胞へ分化するという一連の流れで起こります。これまで大庭伸介特任准教授らの研究グループは、Wnt/ β カテニンシグナル（注 7）が中胚葉への分化を誘導するメカニズムや、ヘッジホッグ（hedgehog-Hh）シグナル（注 8）の骨格形成における役割と骨再生における有用性に関して報告してきました（注 9）。そこで、これらの情報伝達物質（シグナル）を活性化することで、中胚葉由来の骨格形成を模倣した形で多能性幹細胞から骨芽細胞への分化が達成できるのではないかという仮説を立て、分化誘導法の開発に取り組みました。その結果、細胞の培養に組成が不明なものを用いることなく、4種類の低分子化合物（GSK3 阻害剤、Hh シグナル阻害剤、Hh シグナル活性化剤、ヘリオキサンチン誘導体）のみを誘導因子として用いることにより、多能性幹細胞から中胚葉を経由して効率的に骨芽細胞を誘導する方法を開発しました（図 1）。

本法は、①多能性維持培養期、②中胚葉誘導期、③骨芽細胞誘導期、④成熟骨芽細胞誘導期の4つの段階に大別されます。①多能性維持培養期においては、無血清・無フィーダーでマウス ES 細胞・マウス iPS 細胞の多能状態を維持できる、MEK 阻害剤（PD0325901）及び GSK3 阻害剤（CHIR99021- CHIR）を用いた培養法（注 10；2i 培養法）を用いました。次に、②中胚葉誘導期において、高濃度の CHIR を用いた Wnt/ β カテニンシグナルの活性化及びサイクロパミン（Cyclopamine）を用いた Hh シグナルを阻害しました。これにより、中胚葉関連遺伝子の発現上昇、多能性関連遺伝子及び外胚葉関連遺伝子の発現低下を認めました。つまり、誘導された細胞は、多能性を失い、骨芽細胞の由来となる中胚葉細胞へと分化したと示唆されます。③骨芽細胞誘導期においては、Hh シグナルの活性化剤 SAG と、本研究グループが骨の成熟を誘導することを見出したヘリオキサンチン誘導体 TH（注 11）を用いました。これによって、骨芽細胞関連遺伝子の発現が初代骨芽細胞に匹敵するレベルまで誘導されました。また、従来型の方法と比べると、本法では目的としない系統（内胚葉・外胚葉）への誘導が効率的に抑えられることも判明しました。④成熟骨芽細胞誘導期では、全ての誘導因子を除いた条件下で培養しました。これによって、成熟骨芽細胞関連遺伝子の発現上昇が誘導されました。本法に従ってマウス ES 細胞・マウス iPS 細胞を培養することで、骨芽細胞関連遺伝子・タンパク質の高効率な発現（図 2）のみならず、骨芽細胞の機能的特徴である基質の石灰化が誘導されることも確認しました。

骨芽細胞分化に必須な因子である *Runx2* 遺伝子（注 12）を欠失したマウス ES 細胞を本法に従って培養すると、*Runx2* 遺伝子を欠失したマウスと同様に、骨芽細胞の前駆細胞は少量形成されるものの、成熟した骨芽細胞は形成されないことが分かりました。このことは、本法が発生過程における骨芽細胞の分化と類似した経路をたどるものであり、遺伝子を改変した多能性幹細胞へ本法を応用することで、骨形成メカニズムの解明に貢献できることを示唆しています。

ヒト iPS 細胞を本法に従って培養した場合、マウス ES 細胞・iPS 細胞の場合とは異なる多能性維持培養法を用いる必要があるものの、骨芽細胞関連遺伝子・タンパク質の発現と石灰化を誘導できることを確認しました。しかしながら、マウス ES 細胞・iPS 細胞に比べると、ヒト iPS 細胞の骨芽細胞への誘導効率は劣ることから、分化誘導法のさらなる改善が必要です。

本法は、骨形成メカニズムの解明、骨形成性薬剤のスクリーニング、骨系統疾患の病態解明に役立つことが期待されます。今回の知見をもとに、分化誘導法のさらなる改良や適切な担体の選定を行うことで、多能性幹細胞を用いた新しい骨再生医療へも貢献できるよう研究を続けます。

5. 発表雑誌：

雑誌名：Stem Cell Reports（オンライン版：5月22日）

論文タイトル：Stepwise differentiation of pluripotent stem cells into osteoblasts using four small molecules under serum-free and feeder-free conditions.

著者：Kosuke Kanke, Hideki Masaki, Taku Saito, Yuske Komiyama, Hironori Hojo, Hiromitsu Nakauchi, Alexander C. Lichtler, Tsuyoshi Takato, Ung-il Chung, and Shinsuke Ohba

DOI 番号：10.1016/j.stemcr.2014.04.016

6. 問い合わせ先：

東京大学大学院工学系研究科バイオエンジニアリング専攻 特任准教授

大庭 伸介

電話：03-5841-1427

FAX：03-5841-1428

E mail：ohba@bioeng.t.u-tokyo.ac.jp

7. 用語解説：

（注1）多能性幹細胞

体内のあらゆる組織に分化できる能力（多能性）と無限の増殖能を持つ幹細胞の総称。胚盤胞期の内部細胞塊より作られる胚性幹細胞（ES細胞）、体細胞を初期化することで多能性が獲得される人工多能性幹細胞（iPS細胞）が挙げられる。

（注2）胚様体

多能性幹細胞を非接着性に培養することで形成される細胞塊であり、外胚葉、中胚葉、内胚葉の三胚葉に類似した細胞集団が形成される。

（注3）低分子化合物

数百から数千の分子量を持つ化合物を指し、現在の医薬品の多くは低分子化合物である。低分子化合物の中には、細胞内のシグナルを活性化もしくは阻害する作用を持つものが存在する。

（注4）中胚葉

発生の初期過程において形成される細胞集団の一つであり、体腔や循環系、内骨格や筋肉、真皮などのもととなる。

（注5）骨芽細胞

骨基質の形成を担う細胞。骨の形成様式には頭蓋骨の形成などに代表される①膜性骨化と、長管骨の形成に代表される②軟骨内骨化が存在する。前者では外胚葉細胞を起源とする神経堤より、後者では中胚葉細胞を起源とする未分化間葉細胞から骨芽細胞が発生する。

(注 6) フィーダー細胞

細胞を培養する際に、細胞の生存や分化を助けるために用いられる細胞。多能性幹細胞の培養の場合は、マウス胎仔から採取された線維芽細胞を用いる。

(注 7) Wnt/ β カテニンシグナル

Wnt は細胞から分泌されるタンパク質ファミリーの一つで、からだの各器官の発生や維持、がんに関わることが知られている。マウスやヒトでは 19 種類の Wnt が見つまっている。Wnt/ β カテニンシグナルは Wnt の刺激に応答して活性化される経路の一つで、古典的 (canonical) 経路とも呼ばれる。Wnt 刺激がない細胞において、 β カテニンは分解複合体に取り込まれて分解を受ける。Wnt が細胞膜状の受容体に結合すると、グリコーゲン合成酵素キナーゼ 3 (GSK3) の抑制を介して分解複合体の形成が抑制され、細胞内に β カテニンが蓄積する。蓄積した β カテニンは細胞核の中に移行し、Tcf/Lef 転写因子と協調して標的遺伝子の転写を活性化する。

(注 8) ヘッジホッグシグナル

細胞の運命決定や器官形成および個体発生において重要な役割を果たす情報伝達物質であり、ヒトやマウスでは、ソニックヘッジホッグ、デザートヘッジホッグおよびインディアンヘッジホッグの 3 つが存在する。胎生期の骨形成に必須の情報伝達 (シグナル) 経路であり、骨分化の初期に重要であることが分かっている。

(注 9)

- Ohba S, Kawaguchi H, Kugimiya F, Ogasawara T, Kawamura N, Saito T, Ikeda T, Fujii K, Miyajima T, Kuramochi A, Miyashita T, Oda H, Nakamura K, Takato T, Chung UI: Patched1 haploinsufficiency increases adult bone mass and modulates Gli3 repressor activity. *Dev Cell* 14:689-99, 2008
- Hojo H, Ohba S, Yano F, Saito T, Ikeda T, Nakajima K, Komiyama Y, Nakagata N, Suzuki K, Takato T, Kawaguchi H, Chung UI: Gli1 protein participates in the hedgehog-mediated specification of the osteoblast lineage during endochondral ossification. *J Biol Chem* 287:17860-69, 2012
- Hojo H, Ohba S, Taniguchi K, Shirai M, Yano F, Saito T, Ikeda T, Nakajima K, Komiyama Y, Nakagata N, Suzuki K, Mishina Y, Yamada M, Konno T, Takato T, Kawaguchi H, Kambara H, Chung UI: Hedgehog-Gli activators direct osteo-chondrogenic function of bone morphogenetic protein toward osteogenesis in the perichondrium. *J Biol Chem* 288:9924-9932, 2013 (2013/4/1 東京大学大学院工学系研究科プレスリリース参照)
- Maeda Y, Hojo H, Shimohata N, Choi S, Yamamoto K, Takato T, Chung UI, Ohba S: Bone healing by sterilizable calcium phosphate tetrapods eluting osteogenic molecules. *Biomaterials* 34(22):5530-5537, 2013 (2013/5/2 東京大学大学院工学系研究科プレスリリース参照)
- Zhang X, Peterson KA, Liu XS, McMahon AP, Ohba S: Gene regulatory networks mediating canonical Wnt signal directed control of pluripotency and differentiation in embryo stem cells. *Stem Cells* 31:2667-2679, 2013 (2013/3/15 東京大学大学院工学系研究科プレスリリース参照)

(注 10) 2i 培養

従来、ウシ胎仔血清含む培地中でフィーダー細胞と共に培養するか、白血病阻止因子 (leukemia inhibitory factor-LIF) や骨形成性タンパク質 (bone morphogenetic protein-BMP) を含む培地で培養しなければ、マウス ES 細胞の多能性を保つことができないとされていた。2008 年に南カリフォルニア大学の Qi-Long Ying 准教授、ケンブリッジ大学ウェルカム・トラスト幹細胞研究センター

の Austin Smith 教授らは、二種類の低分子化合物を用いることで、無血清培地中でフィーダー細胞を用いることなくマウス ES 細胞の多能性を維持して培養できることを報告した。二種類の化合物がそれぞれ、GSK3 (CHIR99021)、MEK (PD 0325901) という細胞内情報伝達因子の選択的阻害剤 (inhibitor) であることから、2i 培養と呼ばれる。CHIR99021 は Wnt/ β カテニン経路に抑制的に働く GSK3 を抑制することでこの経路を活性化する。

(注 11)

- Ohba S, Nakajima K, Komiyama Y, Kugimiya F, Igawa K, Itaka K, Moro T, Nakamura K, Kawaguchi H, Takato T, Chung UI: A novel osteogenic helioxanthin-derivative acts in a BMP-dependent manner. *Biochem Biophys Res Commun* 357:854-860, 2007
- Nakajima K, Komiyama Y, Hojo H, Ohba S, Yano F, Nishikawa N, Ihara S, Aburatani H, Takato T, Chung UI: Enhancement of bone formation ex vivo and in vivo by a helioxanthin-derivative. *Biochem Biophys Res Commun* 395:502-508, 2010

(注 12) *Runx2* 遺伝子

骨芽細胞分化に決定的な役割を示す遺伝子であり、*Runx2* 欠損マウスは、完全に骨を欠如する。

8. 添付資料：

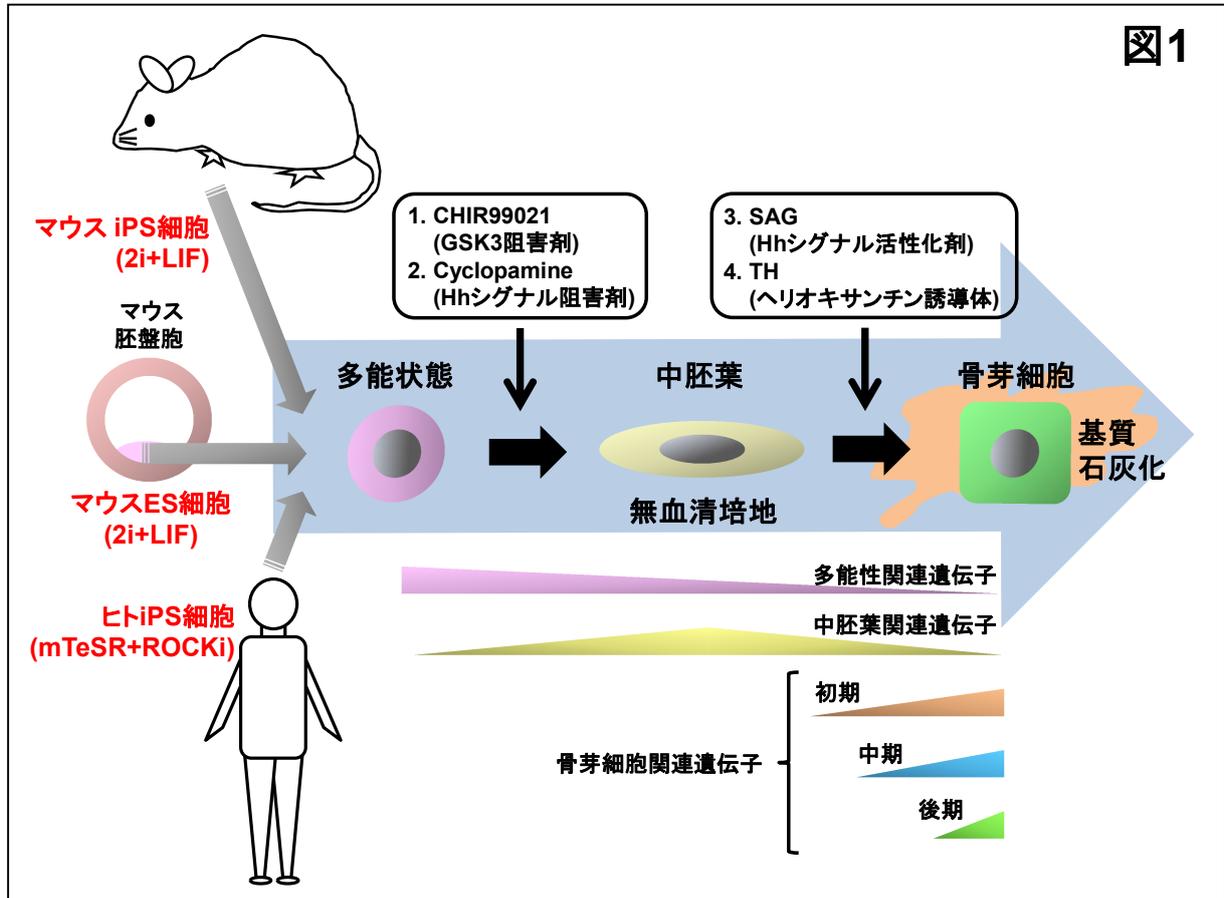
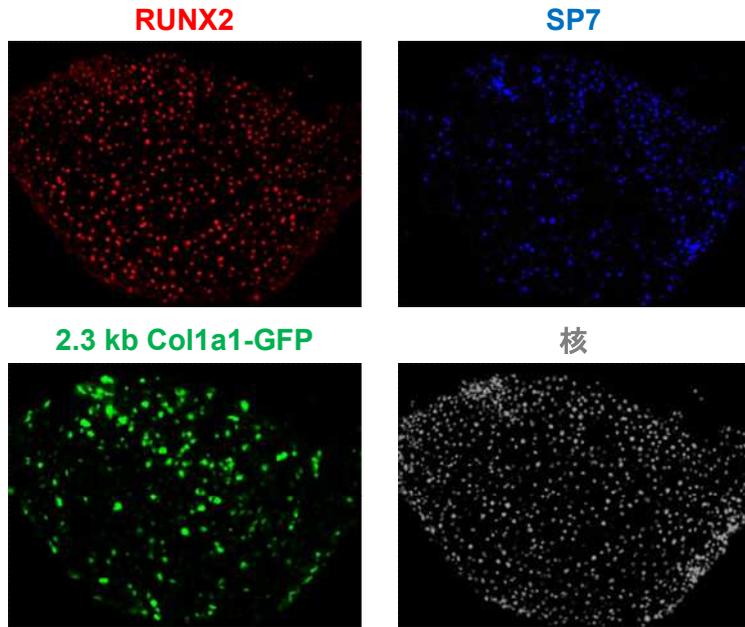


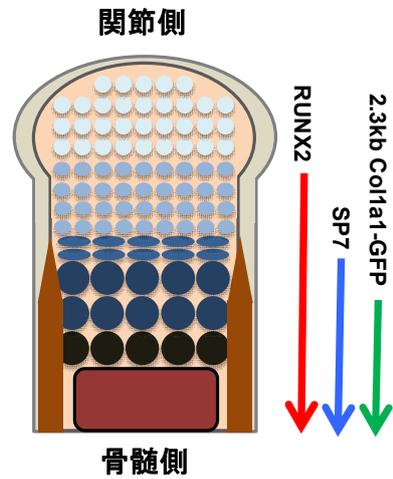
図 1: 多能性幹細胞を用いた骨芽細胞の誘導法

図2

細胞免疫染色 (誘導19日目)



(参考) 軟骨内骨化における骨芽細胞マーカーの発現



骨芽細胞マーカーの高発現

図 2: マウス ES 細胞で誘導される骨芽細胞マーカーの発現

添付した図は、下記の URL (パスワード ohba201305) からご覧いただけます。

URL : http://www.t.u-tokyo.ac.jp/pdf/2014/ohba_cell_20140515.pdf