

# 低分子化合物を用いたヒトiPS細胞の軟骨細胞への分化誘導法

東京大学医学部附属病院 骨軟骨再生医療講座 河田 学

## 要 約

ヒトiPS細胞(hiPSCs)の軟骨細胞への分化誘導法は、多種類のサイトカインを組み合わせた比較的複雑なプロトコルの報告例が主である。低分子化合物のみを用いた簡便なhiPSCsの分化誘導法を確立することは、再生医療研究にとって有用である。種々の検討の結果、Wnt/ $\beta$ カテニンシグナルの活性化剤及びレチノイン酸受容体(RAR)作動薬の組み合わせがhiPSCsの軟骨分化に有用であることが明らかとなった。投与期間や濃度・タイミングを最適化した所、hiPSCsの分化誘導後1-2日目(D1-2)で中内胚葉マーカーの、D2-4で中胚葉マーカーの、D4以降で軟骨分化マーカーの上昇が見られた。D9において、既報のサイトカインを用いた14日間の分化誘導法と比較しても良好な軟骨分化マーカーの上昇が見られ、一方で未分化細胞や他系統の分化マーカーは有意に低発現もしくは同等であった。D9のFACSではSOX9陽性細胞率97.0%、OCT4/NANOG陽性細胞率0.0%と良好な分化誘導効率を認めた。この分化誘導細胞をSCIDマウスの膝関節・皮下組織に移植した所、ヒト組織特異的抗体陽性の硝子軟骨組織の生着を認め、腫瘍形成を生じた個体は無かった。各分化段階のATAC-seqでは、各段階に特徴的なマーカー遺伝子のエンハンサー領域の活性化が見られた。更にはRAR及び $\beta$ カテニンのChIP-seqを各段階で実施した所、SOX9等の各分化段階の代表的な転写因子群のエンハンサー領域にピークを認め、中には両ChIP-seqで共通したピーク領域も見られた。以上のように、2種類の低分子化合物の組み合わせで、簡便で高効率なhiPSCsの軟骨細胞への分化誘導が可能であった。RA及びWnt/ $\beta$ カテニンシグナルは各分化段階のマーカー遺伝子のエンハンサー領域に作用し、一部は協調しながら分化の制御に直接的に関与していることが示された。

## 緒 言

関節軟骨は血流に乏しくまた細胞密度も疎な組織であり、ヒトにおいては一度損傷すると殆んど再生しないため、再生医療のニーズが非常に大きい組織である。その対象となり得る主な軟骨疾患としては、高齢者の膝関節や股関節を始めとした変形性関節症、外傷による関節軟骨欠損、小児の骨格形成異常、小耳症、口唇口蓋裂による鼻変形、離断性骨軟骨炎、外傷性関節軟骨損傷などが知られている。なかでも変形性膝関節症の患者数は日本だけでも有病者数が2,530万人、そして有症状者数が780万人と極めて多い疾患であるものの<sup>(1)</sup>、変性・欠損した軟骨組織を正常に戻すような再生治療は未だ確立されておらず、新たな治療法の開発が待たれる状況である。ES細胞(Embryonic stem cells)及びiPS細胞(Induced pluripotent stem cells)などの多能性幹細胞は、培養増幅の制限が無く、細胞量がほぼ無制限に得られるという利点がある。また一般に、多能性

幹細胞の分化誘導は実際の生体の発生過程を模倣したものと考えられ、分化誘導した組織は再生能力が非常に高い胎児の組織に近いものとみなすことができる。以上のことから、多能性幹細胞は特に変形性関節症などの変性疾患における再生医療にとって、非常に有用なセルソースとなるポテンシャルを有している。多能性幹細胞の軟骨細胞への分化誘導法はいくつか報告されているが<sup>(2-4)</sup>、多種類のリコンビナントタンパク質や化合物を組み合わせた比較的複雑なプロトコルのものが主である。リコンビナントタンパク質は、一般に非常に高額であり、またロットによるばらつきが排除できない等、実際の臨床応用を考えた場合に無視できない問題点がいくつか存在する。一方で低分子化合物は扱いも容易であり、そしてより安価に安定的に大量に製造可能である。また他系統の細胞への誘導においてリコンビナントタンパク質を用いた誘導法よりも短期間で効率の良い分化誘導が可能となることが報告されている<sup>(5)</sup>。し

たがって、低分子化合物のみを用いた簡便なヒト多能性幹細胞の軟骨分化誘導法を確立することは、軟骨再生医療および軟骨分化過程の基礎的研究にとって極めて有用である。

以上のことから、我々はヒト多能性幹細胞の中でもヒトES細胞と違って倫理的問題もないヒトiPS細胞を用いて、低分子化合物のみを用いた簡便な軟骨分化誘導法を確立し、またその分化誘導メカニズムの詳細な解析を行うことを目的として研究を行った。

なお本稿は、原著論文「Kawata M, et al. Simple and Robust Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells toward Chondrocytes by Two Small-Molecule Compounds. Stem Cell Reports. 2019;13(3):530-44.」<sup>(6)</sup>の内容を元に、総説として記載を行った。

## 方 法

本研究においてヒトiPS細胞は、pMXsレトロウイルスベクターを用いて新生児表皮線維芽細胞にヒトOCT4, SOX2, KLF4, MYCの4遺伝子を導入し樹立した1クローン、および同意を得たボランティアより採取した成人末梢血にセンダイウイルスベクターを用いてヒトOCT4, SOX2, KLF4, MYCの4遺伝子を導入することで樹立した2クローン、の計3クロンの細胞株を用いて、実験の再現性を確認した。全ての動物実験は「動物の保護及び管理に関する法律」、「実験動物の飼養及び保管等に関する基準(総理府告示)」、「東京大学医学部動物実験指針」に従って行った。

またその他以下に記載する各実験は、全て前述の原著論文<sup>(6)</sup>の記載内容に基づいて行った。

## 結 果

一般的に軟骨細胞は、未分化な状態から中内胚葉→中胚葉を経由して分化誘導される<sup>(2,4)</sup>。この最初のステップである中内胚葉への分化誘導においては、Wnt/ $\beta$ カテニンシグナルの活性化が有用である<sup>(7)</sup>。そしてCHIR99021は、グリコーゲン合成酵素キナーゼ3を阻害することでこのWnt/ $\beta$ カテニンシグナルを活性化させる化合物として良く知られている。マウスES細胞の骨芽細胞への分化誘導研究においても用いられていることから<sup>(8)</sup>、ヒトiPS細胞の軟骨細胞への分化誘導においても有用であると考えられ

た。

一方でレチノイン酸(RA)は、体節形成や内臓・神経系を始めとした様々な組織の発生に関与しており、レチノイド及びRAは膵内分泌細胞、視細胞、中間中胚葉、神経細胞等の、様々な細胞系統への多能性幹細胞への分化誘導研究にも用いられてきている。レチノイド及びRAは軟骨細胞などにおいて軟骨分化を抑制したり、肥大分化を誘発するとの報告がある一方で、例えばRA合成酵素が欠損したマウス胎仔においては骨格形成やその後の軟骨形成・軟骨性骨化等が全く見られなくなるなど<sup>(9)</sup>、RAは骨格形成過程において必須のモルフォゲンであることも知られている<sup>(10)</sup>。以上の知見から、レチノイド及びRAは適切な投与期間・濃度・タイミング等により、ある一定の条件下においては多能性幹細胞の軟骨細胞への分化誘導にとって有用となるかもしれないと仮説を立てた。

これらWnt/ $\beta$ カテニンシグナルの活性化剤であるCHIR99021、及びレチノイン酸受容体(RAR)作動薬であるTTNPBという2種類の低分子化合物の組み合わせに注目し、それらの投与期間や濃度・タイミングの最適化を行った。最適化の過程の詳細については本稿では割愛するが、結果としてはCHIR99021を最初の2日間10  $\mu$  Mの濃度で投与し、TTNPBは分化誘導直後より100 nMの濃度で持続的に投与するプロトコルが最も軟骨分化マーカーを上昇させることが明らかとなった。

続いて各分化マーカーの発現推移を解析した所、多能性幹細胞からの分化誘導開始後1 - 2日目で中内胚葉マーカー(T, MIXL1)の、2 - 4日目で中胚葉マーカー(TBX6, MEOX1, HAND1)の一過性の上昇が見られた後に、5日目頃から軟骨分化マーカー(SOX9, SOX5, SOX6, COL2A1, COL11A2, ACAN)の上昇が見られた。本誘導法9日目における細胞サンプルを、既報のサイトカインを用いた約2週間の軟骨分化誘導プロトコル<sup>(2,3)</sup>により誘導した細胞サンプルと発現比較を行った所、より良好な軟骨分化マーカーの上昇が見られ、一方で未分化細胞マーカーや他系統の分化マーカーは有意に低発現もしくは同等以下の発現量であった。

同じく分化誘導開始9日目の細胞を用いて行ったフローサイトメトリーでは、SOX9陽性細胞率は平均97.0%、未分化マーカーであるOCT4/NANOG陽性細胞の残存はなしと良好な分化誘導効率を認め

た。この分化誘導細胞を免疫不全マウスの膝関節及び皮下組織に移植した所、ヒト組織特異的抗体陽性の硝子軟骨様組織の生着を認め、一方で腫瘍形成を生じた個体は無かった。

マイクロアレイ解析において、分化誘導開始9日目において有意な発現上昇がみられた遺伝子群でGene Ontology解析を行った所、骨格や軟骨形成に関わるtermが最上位に抽出された。オープンクロマチン領域を網羅的に解析する手法であるATAC-seq (Assay for Transposase-Accessible Chromatin Sequencing)を本誘導法の各分化段階の細胞を用いて行った所、分化誘導開始2日目においてはT, MIXL1遺伝子の、2-4日目ではMEOX1遺伝子の、そして5日目以降ではSOX9遺伝子の等、各分化段階に特徴的なマーカー遺伝子のエンハンサー領域の活性化が見られた。更にはRAR及び $\beta$ カテニンのChIP-seq(Chromatin immunoprecipitation sequencing)を各分化段階で実施した所、T, MIXL1, SOX9を始めとした各分化段階の代表的な転写因子群のエンハンサー領域にピークを認め、その中には両ChIP-seqで共通したピーク領域も見られた。

## 考 察

CHIR99021及びTTNPBという2種類の低分子化合物の組み合わせにより、簡便かつ高効率なヒトiPS細胞の軟骨細胞への分化誘導が可能であった。またRA及びWnt/ $\beta$ カテニンシグナルは、各分化段階のマーカー遺伝子のエンハンサー領域に作用し、一部は協調しながら分化の制御に直接的に関与していることが示された。

本誘導法は再生医療は勿論、軟骨分化過程の基礎的研究や軟骨疾患に対する創薬研究のためのツールとしても応用し得る、非常に有望な手法であると考えられた。

## 参考文献

1. Yoshimura N, Muraki S, Oka H, et al. Prevalence of knee osteoarthritis, lumbar spondylosis, and osteoporosis in Japanese men and women: the research on osteoarthritis/osteoporosis against disability study. *J Bone Miner Metab.* 2009;27(5):620-8.
2. Yamashita A, Morioka M, Yahara Y, et al. Generation of scaffoldless hyaline cartilaginous tissue from human iPSCs. *Stem Cell Reports.* 2015;4(3):404-18.
3. Oldershaw RA, Baxter MA, Lowe ET, et al. Directed differentiation of human embryonic stem cells toward chondrocytes. *Nat Biotechnol.* 2010;28(11):1187-94.
4. Craft AM, Rockel JS, Nartiss Y, et al. Generation of articular chondrocytes from human pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol.* 2015;33(6):638-45.
5. Araoka T, Mae S, Kurose Y, et al. Efficient and rapid induction of human iPSCs/ESCs into nephrogenic intermediate mesoderm using small molecule-based differentiation methods. *PLoS One.* 2014;9(1):e84881.
6. Kawata M, Mori D, Kanke K, et al. Simple and Robust Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells toward Chondrocytes by Two Small-Molecule Compounds. *Stem Cell Reports.* 2019;13(3):530-44.
7. Bakre MM, Hoi A, Mong JC, et al. Generation of multipotential mesendodermal progenitors from mouse embryonic stem cells via sustained Wnt pathway activation. *J Biol Chem.* 2007;282(43):31703-12.
- 8) Kanke K, Masaki H, Saito T, et al. Stepwise differentiation of pluripotent stem cells into osteoblasts using four small molecules under serum-free and feeder-free conditions. *Stem Cell Reports.* 2014;2(6):751-60.
- 9) Niederreither K, Subbarayan V, Dolle P, et al. Embryonic retinoic acid synthesis is essential for early mouse post-implantation development. *Nat Genet.* 1999;21(4):444-8.
10. Benazet JD, Zeller R. Vertebrate limb development: moving from classical morphogen gradients to an integrated 4-dimensional patterning system. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2009;1(4):a001339.

**Abstract**

Our research showed that chondrocytes are robustly induced from human pluripotent stem cells (hPSCs) by simple combination of two compounds, a glycogen synthase kinase 3 inhibitor, and a retinoic acid receptor (RAR) agonist, within 5 to 9 days. Under the optimized induction protocol using these two compounds, expression of mesendoderm markers was upregulated from day 1 to 2, and expression levels of mesoderm markers were elevated from day 2 to 4. Then, chondrogenic markers were upregulated after about day 5. FACS analysis of differentiated cells at 9 days under the present protocol showed that 97.0% of cells were positive for SOX9 while NANOG- or OCT4-positive cells were not totally detected. Particles prepared from hPSC-derived differentiated cells formed hyaline cartilaginous tissues when transplanted into knee joints and subcutaneous spaces of mice, and no signs of teratoma or other tumor formations were seen. ATAC-seq of sequential samples under the present protocol demonstrated that enhancer regions of key marker genes for mesendoderm, mesoderm, and chondrocyte were activated at each differentiation stage. Finally, ChIP-seq analysis for RAR and  $\beta$ -catenin detected peak regions in the enhancer regions of the key marker genes for the respective stages, and some of which were common between the signals.