

ヒト軟骨前駆細胞を使用した創薬 Screening 技術の開発

岡山大学学術研究院医歯薬学域
組織機能修復学分野
高尾 知佳

研究背景：

関節軟骨の変性・破壊変化の代表格である変形性関節症（Osteoarthritis, OA）は、患者数が極めて多いにも関わらず（国内 780 万人）、疾患そのものの進行を抑制する薬はなく、対症療法としての鎮痛薬の投与が治療の主軸である。病状の悪化に伴っては、金属製の人工関節に入れ替える人工関節置換術が行われるが、耐用年数（15-20 年）の使用制限、感染、血栓症に続発する肺塞栓、脱臼などのリスクがある。これらを踏まえた社会的要求に即して、軟骨破壊抑制薬、あるいは軟骨組織再生薬が切望される状況ではあるが、遅々として開発が進んでいない。この理由の一つに、「ヒト」の関節軟骨組織（硝子軟骨組織）を模倣したハイスループット性の高いスクリーニングシステムが存在しないことが一つの原因であると考えられる。我々は、ヒト多能性幹細胞より、安定的・大量にヒト軟骨前駆細胞を産生することに成功した（特許 PCT PCT/JP2020/035517、Nature Biomedical Engineering, 2021、STAR protocol, 2022）。同方法で誘導したヒト軟骨前駆細胞は、継代し液体窒素ストックが可能であり、同細胞源からは安定的に 100% 純度の成熟化した軟骨細胞・硝子軟骨組織体を形成することが可能である。さらに、継代・ストックした細胞源の品質（＝最終的な軟骨組織形成能力）を、特定の膜表面抗原の有無により管理する方法も開発した。これら開発により、「ヒト」の硝子軟骨組織を大量に、安定的に調整する準備が整った。

研究目的：

この準備状況を踏まえて、本研究では、ヒト軟骨前駆細胞を細胞源とした軟骨関連疾患に対する創薬スクリーニング方法を開発することを目指した。

研究方法：

1：in vitro 病態モデルの構築：

関節軟骨に繰り返し加わる過剰な力学的ストレスが軟骨変性の開始・進行を引き起こす重要な因子である。これまでの in vivo での知見では、メカニカルストレスから軟骨変性に至る中間段階で、ヘミチャンネル（Cx43, Panx1）の開口による細胞内 ATP の細胞外への流出、引き続きプリン受容体（P2X7, P2Y2）の活性化による細胞内 Ca²⁺濃度の上昇についての知見が多い。我々は、P2X7 受容体の下流にて Runx2 の発現が上昇すること、OA 病態時に Runx2 が軟骨変性を促進することを見出した。さらに、我々はこれまで硝子軟骨組織体をより関節軟骨組織モデルにするため、ある化合物 X を添加することにより胎児期の四肢形成に重要な GDF5（interzone マーカー）を発現する細胞を誘導することに成功した。これらの事前研究成果より、ヒト軟骨前駆細胞より作製したヒト関節様組織体に、RUNX2 を薬剤誘導性に過剰発現させ OA の分子病態を模倣することを目指した。

- ① piggy-back システムを用いた Doxycycline（DOX）誘導性の RUNX2 過剰発現モデル（GFP も発現）を、GDF5 の発現が tdTomato で可視化できるレポーターヒト iPS 細胞株（414C2 細胞株）に導入した。これらの細胞を側板中胚葉経路のヒト軟骨前駆細胞へ誘導し、DOX 添加による RUNX2 の発現を GFP の発現や免疫染色で確認した。
- ② これらの細胞を用いて、3 次元軟骨組織体を誘導し、さらに化合物 X を添加することで関節軟骨様組織体を誘導した。この際、関節軟骨様組織体であることを、RNAseq や免疫不全マウスへの移植で確認した。関節軟骨様組織体を、DOX を濃度依存的に添加し、RUNX2 の発現および関節軟骨マーカーである PRG4 の発現を qPCR で検出し、さらに Safranin O 染色を確認した。
- ③ また、軟骨変性を誘導する IL1b の添加による OA モデル作製もバックアッププランとして実施した。

2 : Screening アッセイ系の構築 :

組織体軟骨変性の程度を、簡便/正確に定量化するシステムの開発が必要である。我々は変性コラーゲンに特異的ペプチド Collagen Hybridizing Peptide (CHP)を用いることを検討した。CHP には 5-FAM の蛍光色素が標識されているため、同プローブを組織体に添加すると、変性コラーゲンの発現を蛍光顕微鏡 (KEYENCE) で、変性コラーゲンの組織内含有量を In Cell analyzer 6000 (GE ヘルスケア)により定量可能である。

① まずは変性コラーゲン発現を確認するため、変形性膝関節症患者の膝関節軟骨と正常膝関節軟骨の組織標本を用いて、検証した。

② さらに研究方法 1 で作製した関節軟骨組織体及び OA モデル軟骨組織体の組織標本でも同様に検証した。

さらに関節軟骨組織の主要マトリクス成分である Lubricin (PRG4)の 3' 非翻訳領域に tdTomato をノックインする (PRG4 reporter 株の樹立) PRG4 の発現を tdTomato で可視化できるヒト iPS 細胞株を樹立する。関節軟骨様組織体を誘導し、PRG4 の tdTomato 可視化可能か KEYENCE にて検出する。

研究成果 :

ExpLBM を用いた OA モデルの作製

GDF5-tdTomato レポーター iPS 細胞株へ DOX 誘導性 RUNX2 過剰発現システムを導入し、側板中胚葉経路のヒト軟骨前駆細胞へ誘導した。DOX 添加により、RUNX2 の発現を qPCR と、GFP の発現、さらに RUNX2 の蛍光免疫染色で確認した。結果として、すべてにおいて RUNX2 の過剰発現を確認することが出来た。

これらの細胞を関節軟骨様組織体に誘導し、RNAseq により関節軟骨で発現する遺伝子発現を確認し、またこれらの組織体を免疫不全マウスの皮下に移植して長期間永久軟骨であることを確認した。その後、濃度依存的に DOX を添加し、その際の RUNX2 と関節軟骨マーカーである PRG4、硝子軟骨細胞マーカーである COL2A1 の発現を qPCR で検証した。その結果 RUNX2 の発現は qPCR レベルで濃度依存的に上昇していたが、PRG4 の発現抑制は有意に減少しなかった。そのため、現段階で RUNX2 過剰発現モデルは OA モデルとして使用することは難しいと考えられた。

そこでレスキューモデルとして軟骨変性を誘導する IL1b の添加を同方法で施行した。結果として IL1b 添加群において、関節軟骨マーカーである PRG4、硝子軟骨細胞マーカーである COL2A1 の発現を qPCR で確認した。結果として、IL1b 添加群はコントロール群と比べて PRG4 や COL2A1 の発現を有意に抑制することが明らかとなった。さらに Safranin O 染色コントロール群と比較して、IL1b 添加群で染色性が落ちていることが確認できた。したがって IL1b 添加は OA モデル作製には適していると考えられた。

OA モデルにおける変性コラーゲンの検出

次に、組織体軟骨変性の程度を確認するため、変性コラーゲンの発現検出を試みた。OA 患者の膝関節軟骨と正常膝関節軟骨の組織標本を用いて、変性コラーゲン F-CHP の発現を検証した。さらに研究方法 1 で作製した関節軟骨組織体の組織標本でも同様に検証した。結果として、正常関節軟骨に対して、OA 患者の関節軟骨の深層部で変性コラーゲンの検出を確認できた。このことから、この手法で変性コラーゲンを検出できることが分かった。そこで、IL1b 添加非添加群における変性コラーゲンを検出すると、IL1b 添加群で蛍光強度の高い部分が認められた。この結果から、組織切片での変性コラーゲンの検証は可能であることが分かった。現在、固定をしない組織体の状態でも検出が可能か検討している。

また関節軟骨マーカーである PRG4-tdTomato 細胞株を樹立した。しかしながら今回、ヘテロ株のみしか作製することが出来ず、この細胞を用いた PRG4 の可視化は実現しなかった。しかしながら、免疫染色では PRG4 の発現は検出できること、RNAseq や qPCR でも検出できるため、PRG4-tdTomato 細胞のホモ株を作製しないといけないと考えられるため、引き続き実験を進めている。

考察 :

本研究で提案したヒト iPS 細胞由来軟骨前駆細胞を用いた関節軟骨組織体を用いた RUNX2 過剰発現による OA モデルの作製には現段階では良い結果は得られなかった。既報の軟骨細胞への IL1b 添加による軟骨変性については、ヒト iPS 細胞由来軟骨前駆細胞を用いた関節軟骨組織体でも IL1b 添加により軟骨変性を認めたため、関節軟骨組織体自体は関節軟骨モデルとして利用可能であることが期待できる結果であった。まずはこのモデルを用いた創薬スクリーニングシステムを作製することが可能かについて検証を行っていきたいと考えている。

また OA は遺伝的要因だけでなく、環境要因も踏まえた複雑な疾患であると考えられることから、環境要因を含めた OA モデル作製が必要であると考えられた。今後はこの結果を踏まえた創薬スクリーニングに用いることのできる OA モデルの作製検証を行っていきたいと考えている。

謝辞

この度はアステラス病態代謝研究会からいただきました研究助成により、本研究を進めることが出来ました。ご支援に心より深謝申し上げます。