

科学研究費助成事業（基盤研究（S））公表用資料
〔平成29年度研究進捗評価用〕

平成26年度採択分
平成29年3月24日現在

**低分子オステオリプログラミングとそのゲノム基盤の解明に基づく
新規骨再生技術の創生**

Development of a novel strategy for bone regeneration with small molecule-mediated osteo-reprogramming and understanding of genomic mechanisms underlying the process

課題番号：26221311

高戸 毅 (TAKATO TSUYOSHI)

東京大学・医学部附属病院・教授



研究の概要

低分子化合物による骨芽細胞へのダイレクトリプログラミング法を「低分子オステオリプログラミング」として新たに提唱する。ゲノム・エピゲノムのレベルでリプログラミングメカニズムを理解するとともに、骨再生用担体と組み合わせることで新しい骨再生医療戦略へとつなげることを目指す。

研究分野：外科系歯学

キーワード：口腔外科学一般、骨再生

1. 研究開始当初の背景

体細胞から様々な組織の細胞を創り出す「ダイレクトリプログラミング」が次々と報告され、体性幹細胞・iPS細胞に代わる新しい再生医療戦略として注目を集めている。また、分化と初期化におけるエピジェネティクスの重要性とその動態が明らかにされつつある。

骨再生の分野においては、遺伝子導入や組換えタンパク質を用いた体細胞から骨芽細胞へのダイレクトリプログラミングに関する報告が存在する。しかしながら、安全性やコストの面で懸念が残る。低分子化合物のみを用いた骨芽細胞へのダイレクトリプログラミングは、そうした問題点の解決策の一つと考えられる。

2. 研究の目的

申請者らが見出してきた骨形成性低分子化合物群に関する知識を集約させ、低分子化合物による骨芽細胞へのダイレクトリプログラミング法を「低分子オステオリプログラミング」として新たに提唱し、新しい骨再生医療戦略へとつなげることが目的である。低分子化合物のみを用いた骨芽細胞へのダイレクトリプログラミング法の開発と生体内への応用のための適切な担体の選択と検証・再生メカニズムの解明までを包括的に行うことで、安全かつ効率的な低分子オステオリプログラミングによる骨再生医療のための基盤技術を開発する。さらに、ゲノムワイド大規模解析によるリプログラミングメカ

ニズムの探求を通じて、これまでとは異なる切り口から骨芽細胞分化過程のエピジェネティックな理解へとつなげることを目指す。

3. 研究の方法

① 低分子オステオリプログラミング法の開発

線維芽細胞のオステオリプログラミングを誘導する低分子化合物の組み合わせとその処理条件を同定する。骨形成性シグナル経路調節剤と、エピゲノム調節剤の併用の可能性についても検証する。マウス細胞における最適化の後に、ヒト細胞においてリプログラミングプロトコルを検証する。

② 低分子オステオリプログラミング法のエピジェネティックメカニズムの解析

ヒト線維芽細胞の低分子オステオリプログラミング過程におけるエピゲノム状態と遺伝子発現の変化をゲノムワイドで追跡し、その分子基盤と作製した細胞の性状をエピジェネティクスの観点から明らかにする。

③ 低分子オステオリプログラミングによる骨再生効果と再生メカニズムの検証

低分子オステオリプログラミングにより作製した線維芽細胞由来骨芽細胞による骨再生効果とその再生メカニズムを各種モデル動物において検証する。

4. これまでの成果

① 低分子オステオリプログラミング法の開発

線維芽細胞から骨芽細胞への低分子オス

テオリプログラミングを段階的に誘導するために、有望な低分子化合物の組合せと処理条件を明らかにしつつある。また、候補化合物の作用機序について、インビボ動物モデルを用いた検証に加えて、標的分子のインシリコスクリーニングを行い、数種の候補分子を得た。

② 低分子オステオリプログラミング法のエピジェネティックメカニズムの解析

マウス骨格系細胞を用いて、エピゲノム解析のためのクロマチン免疫沈降シーケンス法の実験条件を最適化するとともに、ゲノムワイドデータを取得した。これらはポジティブコントロールデータとして、オステオリプログラミングにおけるエピゲノムデータとの比較解析に用いられる。

③ 低分子オステオリプログラミングによる骨再生効果と再生メカニズムの検証

骨分化モデル系を用いた基礎検討により、適切な担体中で骨分化を誘導することで三次元骨組織様オルガノイドを構築する条件を見出した。

5. 今後の計画

① 低分子オステオリプログラミング法の開発

これまでに得られた結果をもとに、低分子化合物の種類と処理条件に関する検討を引き続き行い、低分子オステオリプログラミング法の確立を目指す。また、リプログラミングの効率化のヒントを得るため、低分子化合物の作用メカニズムに関する検討も行う。

② 低分子オステオリプログラミング法のエピジェネティックメカニズムの解析

①で低分子オステオリプログラミング法が確立された後に、クロマチン免疫沈降とバイオインフォマティクス解析を駆使して、エピジェネティクスの観点からリプログラミングメカニズムに関する検討を行う。

③ 低分子オステオリプログラミングによる骨再生効果と再生メカニズムの検証

研究代表者らが豊富な基礎データを有する担体を用いた三次元骨組織作製を視野に入れて、低分子オステオリプログラミングで作製した骨芽細胞の播種・培養条件の検討を行い、細胞の生着と骨芽細胞としての機能維持を検証する。三次元骨組織を作製後、マウスあるいはイヌの骨欠損モデルに移植し、放射線学的解析と組織学的解析を行い、骨再生効果とそのメカニズムを検証する。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む) 原著論文

- ① Takato T: Tissue Engineering in Bone: The Contention of a Hundred Schools of Thought. *Artif Organs* 40(4):331-333, 2016

- ② Kanno Y, Nakatsuka T, Saijo H, Fujihara Y, Hikita A, Chung UI, Takato T, Hoshi K: Computed tomographic evaluation of novel custom-made artificial bones, “CT-bone”, applied for maxillofacial reconstruction. *Regenerative Therapy* 5:1-8, 2016

- ③ Kashiwagi M, Hojo H, Kitaura Y, Maeda Y, Aini H, Takato T, Chung UI, Ohba S: Local administration of a hedgehog agonist accelerates fracture healing in a mouse model. *Biochem Biophys Res Commun* 479(4):772-778, 2016

- ④ Kitaura Y, Hojo H, Komiyama Y, Takato T, Chung UI, Ohba S: Gli1 haploinsufficiency leads to decreased bone mass with an uncoupling of bone metabolism in adult mice. *PLoS ONE* 9(10):e109597, 2014

国際学会発表

- ① Kanke K, Masaki H, Saito T, Komiyama Y, Hojo H, Lichtler A, Nakauchi H, Takato T, Chung UI, Ohba S: Stepwise differentiation of pluripotent stem cells into osteoblasts using four small molecules under serum-free and feeder-free conditions. International Society for Stem Cell Research 12th Annual Meeting, June 18-21, 2014, Vancouver, British Columbia, Canada

- ② Kitaura Y, Hojo H, Komiyama Y, Takato T, Chung UI, Ohba S: Gli1 haploinsufficiency disrupts postnatal bone homeostasis under physiological and pathological conditions. 2014 annual meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, September 12-15, 2014, Houston, TX

ホームページ等

<http://plaza.umin.ac.jp/~oralsurg/>