



Title	Generation of hyaline cartilaginous tissue from mouse adult dermal fibroblast culture by defined factors
Author(s)	平松, 久仁彦
Citation	大阪大学, 2011, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/58228">https://hdl.handle.net/11094/58228</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"&gt;https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> >大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

【105】	
氏 名	平 松 久 仁 彦
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 2 4 4 2 7 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 23 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科外科系臨床医学専攻
学 位 論 文 名	Generation of hyaline cartilaginous tissue from mouse adult dermal fibroblast culture by defined factors (遺伝子導入による皮膚線維芽培養細胞からの硝子軟骨様組織の誘導)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 吉川 秀樹 (副査) 教 授 金田 安史 教 授 仲野 徹

論 文 内 容 の 要 旨

〔 目 的 〕

関 節 軟 骨 は 自 己 修 復 能 が 乏 し く、皮 膚 から 軟 骨 細 胞 を 誘 導 で き れ ば、関 節 軟 骨 疾 患 に お け る 再 生 治 療 の 細 胞 ソ ー ス に な り 得 る。今 回 我 々 は、皮 膚 細 胞 培 養 に 遺 伝 子 導 入 を 行 い、直 接、軟 骨 細 胞 様 細 胞 を 誘 導 す る こ と を 試 み た。

〔 方 法 〕

XI型コラーゲン $\alpha 2$ 鎖遺伝子(*Col11a2* promoter/enhancer)に $\beta$ -galactosidaseとネオマイシン耐性の融合遺伝子( $\beta geo$ )を接続したコンストラクト(*Col11a2- $\beta geo$* )を作成し、*Col11a2- $\beta geo$* トランスジェニックマウスを作製した。このトランスジェニックマウスから採取した皮膚線維芽細胞(MDFs)にレトロウイルスを用いて遺伝子を導入した。

## 〔 成 績 〕

*Col11a2-βgeo*トランスジェニックマウスは軟骨特異的にLacZ活性を示した。このトランスジェニックマウスから採取したMDFsは300 μg/mlのG418存在下で死滅するが、初代軟骨細胞は900 μg/mlのG418存在下で生存した。従って、トランスジェニックマウス由来MDFsに遺伝子を導入した後に軟骨細胞様の表現型を獲得した細胞を、G418に対する耐性によって選択できると考えた。このMDFsにレトロウイルスを用いて種々の軟骨因子とリプログラミング因子を組み合わせで導入した結果、c-Myc, Klf4, SOX9の組み合わせがG418耐性細胞を誘導するのに必要十分であるとわかった。我々はG418耐性細胞の中から軟骨細胞様の多角形の細胞からなるコロニーをピックアップし、ライン化した。Real-time RT-PCRの解析にてこれらの誘導細胞ラインは軟骨マーカーであるⅡ型コラーゲンやアグリカン遺伝子を発現していたが、線維芽細胞のマーカー遺伝子であるⅠ型コラーゲン $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ 遺伝子は発現していなかった。Bisulfite sequencing法にて*Col1a1*遺伝子プロモーターは高度にメチル化されていた。次に誘導細胞をヌードマウスの皮下に移植したところ、長期の経過(16週)でも均一な軟骨組織を形成した。一部のラインの細胞は腫瘍化した。生体に軟骨組織を作ることから、誘導した細胞は軟骨前駆細胞に相当すると考えた

## 〔 総 括 〕

我々はマウス皮膚線維芽細胞培養にc-Myc, Klf4, SOX9の3因子を導入することにより軟骨前駆細胞を誘導できることを見出した。誘導した細胞はマウスの皮下に異所性に軟骨組織を作った。本手法は再生医療において、患者自身の軟骨細胞を誘導する方法の一つにつながる可能性があると考える。

## 論文審査の結果の要旨

変形性関節症は関節軟骨が変性し消失する疾患であり、我が国でも多くの患者が罹患している。関節軟骨は自己修復能が乏しく、根治は困難である。従って自己の組織を利用して軟骨組織を誘導して治療に利用することは非常に有用な手法と考えられ、現在まで間葉系幹細胞や、iPS細胞の利用など、様々な方法が試みられているが決定的な手法は見出されていない。

今回申請者らは、XI型コラーゲン $\alpha 2$  鎖遺伝子(*Col11a2*) promoter/enhancerに $\beta$ -galactosidaseとネオマイシン耐性の融合遺伝子 (*βgeo*) を接続したコンストラクト(*Col11a2-βgeo*)を作成し、*Col11a2-βgeo*トランスジェニックマウスを作製した。このトランスジェニックマウスから採取した皮膚線維芽細胞は低濃度のG418存在下で死滅するが、軟骨細胞は高濃度のG418でも生存が可能である。このトランスジェニックマウスから採取した皮膚線維芽細胞にレトロウイルスを用いて遺伝子 (c-Myc, Klf4, Sox9) を導入しG418で選択することにより、軟骨細胞様の表現型をもつ細胞を取り出してライン化した。この細胞は、親株である皮膚線維芽細胞とは遺伝子発現・epigeneticな修飾においても異なる表現型を示しており、またヌードマウスの皮下に注射することにより均一な硝子軟骨様組織を形成した。一部のラインの細胞は腫瘍化した、その他のラインの細胞は長期 (12 or 16週) 経過しても腫瘍化しなかった。一部のラインの細胞が腫瘍化するという問題点が残存しているが、本手法は再生医療において患者自身の細胞から硝子軟骨様組織を誘導することができ、将来変形性関節症の治療に使用できる可能性がある。

本論文は今後の医学の発展に寄与しており、博士 (医学) の学位授与に値する。