
総 説

低分子化合物を用いた再生医療用細胞の ダイレクトリプログラミング

戴 平, 武田 行正

京都府立医科大学大学院医学研究科細胞再生医学

Direct Reprogramming by Small Molecules for Regenerative Medicine

Ping Dai and Yukimasa Takeda

Department of Cellular Regenerative Medicine,

Kyoto Prefectural University of Medicine Graduate School of Medical Science

抄 録

近年、遺伝子の導入を避け、低分子化合物のみを用いて、体細胞から再生医療用細胞をダイレクトリプログラミング（直接誘導）する試みが報告され始めている。患者本人の線維芽細胞から、低分子化合物を用いて腫瘍化のリスクがより低いと想定される細胞をダイレクトリプログラミングすることにより、神経損傷、神経変性疾患、心筋梗塞、肝硬変、糖尿病などの治療のため、自家細胞移植への利用が期待されている。現在までに低分子化合物を用いて、神経細胞、神経幹細胞、褐色脂肪細胞、心筋細胞といった分化細胞の他に、内胚葉前駆細胞、肝前駆細胞、間葉系幹細胞などの体性幹細胞が直接誘導されている。臨床応用のためには、マウス胎児線維芽細胞からだけでなく、ヒト成人由来線維芽細胞からこれらの細胞が再現性よく誘導されることが重要である。低分子化合物を用いたダイレクトリプログラミングの技術は、細胞移植治療のための細胞のリソースとしてだけでなく、創薬やオーダーメイド医療への利用を含め、今後の再生医療における主流の一つとなる可能性がある。

キーワード：ダイレクトリプログラミング、再生医療、細胞移植治療、低分子化合物、シグナル伝達経路

Abstract

The direct lineage reprogramming from one somatic cell type into another can be performed by using a combination of chemical compounds without the use of transgenes. Induced pluripotent stem cells (iPSCs) provide an essential cell source for transplantation therapy, while the direct reprogramming rapidly prepares different cell types by bypassing the pluripotent state. These reprogramming techniques generally require forced expression of multiple transcription factors, which has raised safety concerns such as genetic integration of exogenous genes, genomic instability, and a consequent risk for tumorigenesis. Chemical

平成29年11月23日受付 平成29年12月15日受理

*連絡先 戴 平 〒602-8566 京都市上京区河原町通広小路上ル梶井町465番地
dping@koto.kpu-m.ac.jp

compound-based direct reprogramming is a promising approach to reduce the risk for tumor formation after transplantation. Accumulating evidence suggests that the combination of chemical compounds and a specific culture medium can convert dermal fibroblasts into desired cell types such as neurons, neural stem cells, brown adipocytes, cardiomyocytes, and somatic progenitor cells. These cells converted from each patient-derived fibroblast can be applied for their own transplantation therapy to avoid immune rejection. This review covers recent progress on chemical compound-based direct reprogramming in each specific cell type and includes discussion of future prospects for the clinical applications.

Key Words: Direct reprogramming, Regenerative medicine, Cell transplantation therapy, Chemical compounds, Cellular signaling pathways

はじめに

移植以外有効な治療法のない種々の疾患・損傷に対し、主として人工多能性幹細胞 (iPS細胞) から分化した細胞の利用が期待されている。iPS細胞は、ほぼすべての細胞に分化可能であり、適切に分化した細胞は、生体内の細胞と比較して遺伝子発現が近く機能的にも遜色がないことが知られている。しかし、個々の患者の体細胞から臨床応用可能なiPS細胞を作製するには、少なくとも数ヶ月以上の期間がかかり、自身のiPS細胞を治療に用いることは現実的に困難である¹⁾。そのため現在では、免疫拒絶反応をなくすことを目的に、患者とヒト白血球型抗原 (HLA: Human Leukocyte Antigen) の型が同一のiPS細胞を移植のため準備している。しかし、約30%の場合において免疫拒絶反応が生じる可能性が指摘されており²⁾、これは、他家 (他人) のiPS細胞由来の細胞を移植した際、拒絶反応を注意深く観察する必要があることに加え、可能であれば自家 (自身) の細胞を使用することが望ましいことを示唆している。また、iPS細胞へのリプログラミング (初期化) の際、外来遺伝子の導入が必要であり、腫瘍化のリスクが増加する可能性がある。このような背景から、臨床応用により適した細胞移植治療のためには、患者自身の細胞を用いて腫瘍化のリスクの低い細胞が短期間に調製されることが望ましい。

近年、線維芽細胞にウイルスベクターを用いて複数の転写因子を同時に過剰発現させることにより、iPS細胞のような多能性の状態を経ず、

特定の細胞に直接誘導可能であることが相次いで報告されている。この手法により、患者自身の細胞を用いて短期間に目的細胞を誘導することが可能であるが、一般的に多数の遺伝子を共発現させる必要があるため誘導効率が低いという問題が存在する。また、外来遺伝子の導入により、予期しないゲノムDNAの変異や挿入が起こる可能性は避けられず、腫瘍化のリスクが高まる恐れがある。

このような安全性を損ねる遺伝子の導入を避けるため、種々のシグナル伝達経路やヒストン/DNA修飾酵素の活性を制御する低分子化合物を用いて、腫瘍化のリスクがより低いと想定される細胞を直接誘導する試みが広がっている (図1)。神経幹細胞、心筋細胞、肝細胞、膵β細胞といった細胞は、いずれも今後の再生医療になくしてはならない細胞であるが、特にヒト成人の体細胞から遺伝子の導入を経ずに直接誘導する手法はまだ確立されていない。個々の患者から迅速にこれらの細胞を誘導することができれば、移植治療だけでなく、創薬やオーダーメイド医療にも利用可能であると考えられる。本稿では、再生医療に重要な細胞種における低分子化合物を用いたダイレクトリプログラミングについて概説する。

神経細胞

高齢化とともにアルツハイマー病やパーキンソン病といった神経変性疾患の患者は年々増加しているが、これらの患者から病態の解明や創薬研究のため十分な量の神経細胞を得ることは

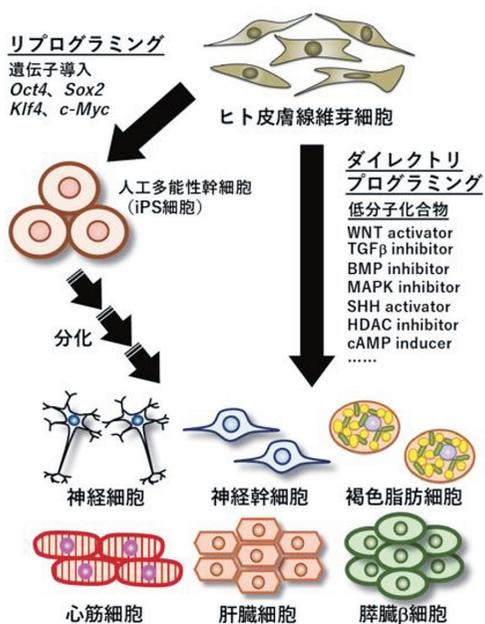


図1 低分子化合物を用いたダイレクトリプログラミングによる再生医療用細胞の誘導

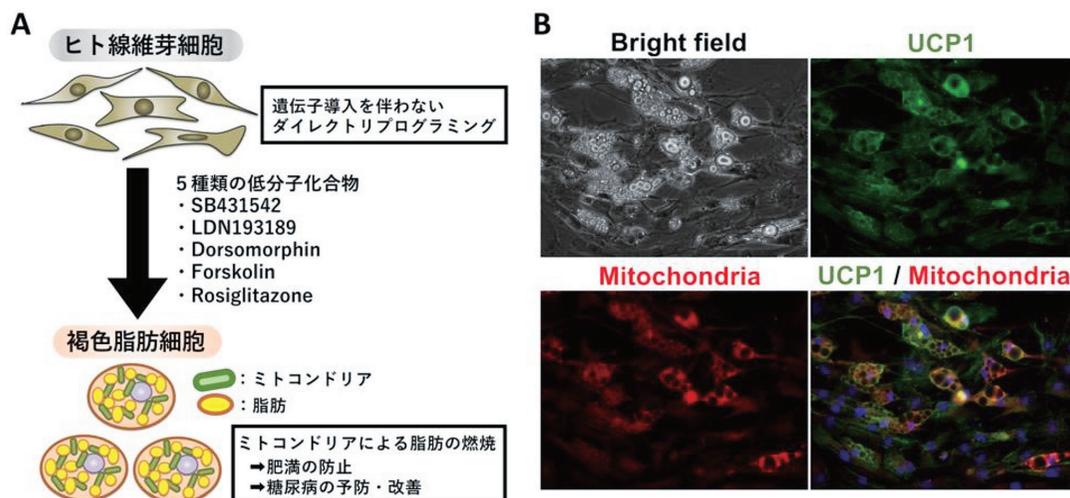


図2 A:低分子化合物によるヒト線維芽細胞から低分子化合物誘導性褐色脂肪細胞ciBAsへのダイレクトリプログラミング, B: 免疫染色によるciBAsのUCP1の発現と細胞内ミトコンドリアの増加の様子

表1 低分子化合物による神経細胞および神経幹細胞のダイレクトリプログラミング^{4,6-11)}

標的細胞	元細胞	低分子化合物および 成長因子	発表 年	参照 文献
Neuron	Human dermal fibroblasts	CHIR99021, PD0325901, LDN193189, SB431542, Pifithrin- α , and Forskolin	2015	4
Neuron	MEFs	Forskolin, ISX9, CHIR99021, and I-BET151	2015	6
Neuron	Human foreskin fibroblasts Human dermal fibroblasts	VCRFSGY: VPA, CHIR99021, RepSox, Forskolin, SP600125, GO6983, and Y-27632	2015	7
Neural progenitor cells	MEFs Human urinary cells	VPA, CHIR99021, and RepSox	2014	8
Neural stem cells	MEFs Mouse tail-tip fibroblasts	VPA, BIX01294, RG108, PD0325901, CHIR99021, Vitamin C, and A83-01	2016	9
Neural stem cells	MEFs	A83-01, Thiazovivin, Purmophamine, and VPA	2016	10
Neural stem cells	MEFs	CHIR99021, LDN193189, A83-01, RG108, Pamate, SMER28, Retinoic acid, Hh-Ag1.5, and bFGF	2016	11

困難であるため、これまで精力的に他の細胞からヒト神経細胞の誘導が試みられてきた。2010年に Vierbuchen らは、マウス胎児線維芽細胞 (MEF) に3種類の神経細胞特異的な転写因子 Brn2, Ascl1, Myt1 (BAM) を共発現させることによって、神経細胞へ直接誘導することに初めて成功した³⁾。その後、多くのグループがマウスだけでなくヒトの線維芽細胞を用いて、BAMと各神経細胞サブタイプに特異的な転写因子を組み合わせることによって、ドーパミンニューロンや運動ニューロンなどを直接誘導することに成功している。

2015年3月、我々の研究室は世界に先駆け、遺伝子の導入を行わず低分子化合物のみを用いて、ヒト線維芽細胞から神経細胞を直接誘導することに成功した (表1)⁴⁾⁵⁾。この神経細胞を、CiN細胞 (CiNCs: Chemical compound-induced Neuronal Cells) と名付け、年齢や性別の異なる複数のヒト皮膚由来線維芽細胞から、いずれも約80%以上の高効率で誘導が可能であることを報告した。また2~3週間という比較的短期間

での誘導が可能のため、自家の線維芽細胞を用いた細胞移植治療が可能であると期待されている。特に、脊椎損傷はその失った神経細胞を移植によって補填するために効果的な期間が、受傷後数週間以内の亜急性期に限られており、現在このCiN細胞を用いて霊長類の脊椎損傷モデルへの効果を検証している。

我々の発表から数ヶ月後、2つのグループによって、それぞれマウスおよびヒトの線維芽細胞から、低分子化合物を用いた神経細胞の直接誘導が報告された⁶⁾⁷⁾。これらの神経細胞はいずれも、グルタミン産生ニューロン (興奮性ニューロン) と GABA産生ニューロン (抑制性ニューロン) が混在している状態であり、他の神経細胞サブタイプは生じていなかった。また、家族性アルツハイマー病患者の皮膚由来線維芽細胞から、低分子化合物のみで直接誘導された神経細胞は、アルツハイマー病の原因物質であるアミロイド β たんぱく質 (A β 42) が異常な蓄積を示していた。このことより、低分子化合物によるダイレクトリプログラミングが、神経

表2 低分子化合物による褐色脂肪細胞および心筋細胞のダイレクトリプログラミング¹⁴⁻¹⁷⁾

標的細胞	元細胞	低分子化合物	発表年	参考文献
Brown adipocyte	C2C12 cells	Bexarotene	2017	14
Brown adipocyte	Human dermal fibroblasts	SB431542, LDN193189, Forskolin, Dporsomorphin, and Rosiglitazone	2017	15
Cardio myocyte	MEFs	CHIR99021, RepSox, Forskolin, VPA, Parnate, and TTNPB	2015	16
Cardio myocyte	Human foreskin fibroblasts Human fetal lung fibroblasts	CHIR99021, A83-01, BIX01294, AS8351, SC1, Y-27632, OAC2, SU16F, and JNJ10198409	2016	17

細胞における病態モデルの構築においても有用である可能性が示された。

神経幹細胞

神経幹細胞は、2014年にChengらによってMEF細胞から、低酸素状態下(5% O₂下)に3種類の低分子化合物(VPA, CHIR99021, RepSox)を添加することによって誘導された(表1)⁸⁾。低酸素状態は、iPS細胞のリプログラミング時にもその効率を大きく上げることが知られている。その後、さらにMEF細胞を用いたいくつかの報告を経て、2016年にカリフォルニア大学のSheng Dingらのグループが、8種類の低分子化合物とbFGFを用いた効率的な神経幹細胞の誘導に成功している¹¹⁾。この低分子化合物誘導性神経幹細胞は、生体内の神経幹細胞と同じようにニューロン、アストロサイト、およびオリゴデンドロサイトへの分化能を有していた。特に、bFGFにより活性化されるMAPKシグナル経路とHh-Ag1.5により活性化されるSonic hedgehogシグナル経路のそれぞれ下流に位置する転写因子、Elk1とGli2の両方が神経幹細胞に最も重要な転写因子であるSox2のプロモーター領域に結合しており、これが直接誘導メカニズムの一端であることが示された。これらの報告はいずれもMEF細胞を用いたものであり、臨床応用のためにはこれらの低分子化合物の組み合

わせを参照し、ヒト線維芽細胞から神経幹細胞を直接誘導することが重要である。

褐色脂肪細胞

褐色脂肪細胞は、脂肪を蓄えるための細胞ではなく脂肪を燃焼し熱を産生する脂肪細胞として知られ、肥満防止や糖尿病の予防に重要な役割を果たしている。2009年にカリフォルニア大学の梶村らは、MEF細胞にPRDM16とC/EBP- β を共発現させることにより褐色脂肪細胞が直接誘導されることを初めて報告した¹²⁾。また最近、本学免疫学教室の岸田らは、ヒト皮膚線維芽細胞へC/EBP- β とC-MYCを共発現させることにより、機能的な褐色脂肪細胞を直接誘導可能なことを報告している¹³⁾。

Sheng Dingらのグループは、褐色脂肪細胞の祖先細胞に近いマウス筋芽細胞株(C2C12)を用いて低分子化合物のスクリーニングを行い、褐色脂肪細胞を誘導する化合物としてRetinoid X receptor (RXR)のアゴニストBexaroteneを同定した(表2)¹⁴⁾。Bexaroteneをマウスに経口投与すると、体内の褐色脂肪細胞の総量が上昇し、特に皮下白色脂肪組織(subcutaneous WAT)において褐色脂肪細胞が現れる、いわゆる褐色化(Browning)の現象が起こっていた。そして、体内の褐色脂肪細胞の増加により、高脂肪食による体重増加が抑制されたり、グルコース

およびインシュリン耐性などが増加することが判明した。

我々の研究室では最近、脂肪細胞用培地に5種類の低分子化合物SB431542, LDN193189, Dorsomorphin, Forskolin, Rosiglitazoneを添加し、ヒト線維芽細胞を3~4週間培養することで、褐色脂肪細胞を直接誘導する方法を開発した(図2)¹⁵⁾。この低分子化合物誘導性褐色脂肪細胞ciBA (chemical compound-induced brown adipocyte)は、年齢や性別の異なる複数のヒト皮膚由来線維芽細胞から直接誘導が可能であった。ciBAは、生体内の褐色脂肪細胞と同じく β アドレナリン受容体の刺激を受けて熱産生遺伝子である*Ucp1* (Uncoupling protein 1) 遺伝子の発現が上昇し、またミトコンドリアの増加に伴う酸素消費量の増加が確認された。このダイレクトリプログラミングには、TGF β シグナル経路およびBMPシグナル経路の阻害と同時に、cAMP-PKA経路および核内受容体であるPPAR γ の活性化が重要であると考えられる。遺伝子の導入を行わずに誘導されるこのciBAは、安全性が高いことが想定され、今後ヒトへの臨床応用を考える上で大きなメリットとなる。また、褐色脂肪細胞が体内で作られる仕組みの解明や、エネルギー消費亢進型の抗肥満薬の開発、オーダーメイド医療などへの利用が期待される。

心 筋 細 胞

心筋細胞の移植治療は、心筋梗塞などで失った細胞を補って心機能を回復させるために重要である。2009年に、現慶應義塾大学循環器内科の家田らによって、マウス心筋線維芽細胞に3種類の転写因子Gata4, Mef2c, Tbx5を共発現させることで心筋細胞が直接誘導されることが報告された¹⁸⁾。その後、マウスだけでなくヒトの心筋および皮膚由来線維芽細胞からも心筋細胞がダイレクトリプログラミングされている。また、誘導効率を上げるため他の転写因子やmicroRNA, 成長因子などの組み合わせが報告されており、特に低分子化合物に関しては、CHIR99021 (WNTシグナル経路の活性化剤), SB431542 (TGF β シグナル経路の阻害剤),

Forskolin (cAMP-PKA経路の活性化剤), Y-27632 (Rho-associated kinaseの阻害剤)などが、心筋細胞の誘導効率を上昇させることに重要であると報告されている。

臨床応用のためには、遺伝子の導入による腫瘍化リスクの増大は可能な限り避けるべきであることから、低分子化合物のみによる心筋細胞の直接誘導が期待されている。2015年にFuらは、すでに報告されていた低分子化合物の組み合わせによるiPS細胞のリプログラミングを試みていた時、MEF細胞から偶然自発的に収縮する細胞を発見した(表3)¹⁶⁾。このダイレクトリプログラミングでは、計6つの低分子化合物のうちCHIR99021によるWNTシグナル経路の活性化、RepSoxによるTGF β シグナル経路の阻害、ForskolinによるcAMP-PKA経路の活性化が特に重要であった。その後、2016年にSheng Dingらのグループによって、ヒト皮膚線維芽細胞から低分子化合物による心筋細胞の直接誘導が報告されている¹⁷⁾。しかしその成熟化には、多能性幹細胞から分化した心筋細胞の培養上清が必須であり、この成熟化のステップなしには心筋細胞に特異的な遺伝子の発現が観察されていない。このような培養条件は、不明確な液性因子を必要としており、またコストや労力の面でも臨床応用のため心筋細胞を大量に調製するには向かず、そのプロトコールおよび低分子化合物の組み合わせには改良の余地があるものと考えられる。

肝細胞および膵臓 β 細胞

種々の肝臓疾患のうち、肝硬変や肝癌のような慢性肝不全の治療・根治には、肝臓移植以外に有効な治療法がないため、これまで種々の方法で肝細胞の誘導が試みられてきた。2011年に、九州大学生体防御医学研究所の鈴木らにより、MEF細胞に肝細胞特異的な転写因子であるHnf4aとFoxa 1-3のいずれかを共発現させることによって、肝細胞のダイレクトリプログラミングが初めて報告された¹⁹⁾。しかし、同様に外来遺伝子の導入によって感染や腫瘍化のリスクが高まるという懸念から、導入する遺伝子の数

表3 低分子化合物による体性幹細胞および多能性幹細胞のダイレクトリプログラミング²⁸⁻³⁴⁾

標的細胞	元細胞	低分子化合物	発表年	参考文献
Endoderm progenitor cells	Human gastrointestinal epithelial cells	Bix01294, RG108, Bay k 8644, and SB431542	2016	28
Endoderm progenitor cells	MEFs	RepSox, Forskolin, Y-27632, CHIR99021, TTNPB, bFGF, BMP4, and Activin A	2017	29
Chemically induced liver progenitors (CLiPs)	Rodent primary hepatocytes	Y-27632, A83-01, and CHIR99021	2017	30
Mesenchymal stem cell	Human dermal fibroblast	SP600125, SB202190, GO6983, Y-27632, PD0325901, CHIR99021	2017	31
Induced pluripotent stem cells	MEFs	VC6TF : VPA, CHIR99021, E-616452, Tranyleypromine, and Forskolin (1st step) VC6TFZ : VC6TF and DZNep (2nd step)	2013	32
Induced pluripotent stem cells	MEFs	VC6TFAE : VPA, CHIR99021, E-616452, Tranyleypromine, Forskolin, AM580, and EPZ004777 (1st step) VC6TFZASD : VC6TFZA and SGC0946, 5-Aza-dC (2nd step)	2015	33
Induced pluripotent stem cells	Mouse neural stem cells	VC6TFE5 : VPA, CHIR99021, E-616452, Tranyleypromine, Forskolin, EPZ004777, and Ch55 (1st step) VC6TFE5Z : VC6TFE5 and DZNep (2nd step)	2016	34
Induced pluripotent stem cells	Mouse small intestinal epithelial cells	VC6TFA : VPA, CHIR99021, E-616452, Tranyleypromine, Forskolin, and AM580 (1st step) VC6TFZ : VC6TF and DZNep (2nd step)	2016	34

を減らす、あるいはそれにとって代わる試みがなされている。最近、2つの異なるグループから一因子の遺伝子導入 (Hnf4a あるいは Foxa1-3のいずれか) と低分子化合物の組み合わせによって MEF 細胞から肝細胞が直接誘導されている²⁰⁾²¹⁾。現在のところ、低分子化合物のみで肝細胞が直接誘導された報告はないが、これらの報告によ

れば MEF 細胞から肝細胞の誘導に必要な2つの転写因子 (Hnf4a と Foxa) の効果が、それぞれ低分子化合物によって置き換わることが示されているため、近い将来に成功する可能性がある。

一方、先天的にインスリンがほとんど分泌できない1型糖尿病の患者にとって、その症状の軽減および根治のためには、膵臓移植あるいは

膵島の移植が有効な治療法である。また、2型糖尿病の患者は国内外で今後さらに増加し、医療費高騰の原因となることが予測されるが、インスリンを分泌する膵β細胞の移植は有効な治療法となり得る。そのため、膵β細胞の再生医療に果たす役割はまた大きく、様々な細胞種から誘導が試みられている。β細胞に特異的な転写因子であるPdx1, Ngn3, MafAの組み合わせを基本とし、膵臓α細胞、膵腺房細胞(Acinar cell)、膵管腺細胞(Ductal cell)、小腸腺窩細胞(Intestinal crypt cell)、および肝細胞といったいずれも発生学的に系統の近い内胚葉に属する細胞から直接誘導が報告されている。また、マウスおよびヒトの線維芽細胞に4つのリプログラミング因子(Oct4, Sox2, Klf4とc-MycあるいはP53 shRNA)を一時的に発現させ、中間体を経た複雑な工程のもとβ細胞が誘導されている²²⁾²³⁾。このような研究背景から、遺伝子導入によらず低分子化合物を用いて、線維芽細胞からβ細胞を直接誘導することは挑戦的な試みである。

骨芽細胞および軟骨細胞

本学免疫学教室の山本らは、レトロウイルスを用いてヒト歯肉線維芽細胞へRunx2, Osterix, Oct4, L-Myc (RXOL)を共発現させることにより、約80%の効率で骨芽細胞を直接誘導した²⁴⁾。また軟骨細胞では、マウスおよびヒトの線維芽細胞からc-Myc, Klf4, Sox9の転写因子の組み合わせによるダイレクトリプログラミングが報告されている²⁵⁾²⁶⁾。これらの細胞は、遺伝子の導入を経ず間葉系幹細胞から分化誘導培地によって分化可能であるが、間葉系幹細胞はドナーの年齢や細胞の継代数とともに増殖率が低下し、特に骨芽細胞への分化能が減少することが知られており²⁷⁾、移植治療のため十分の数の細胞を準備できない可能性がある。線維芽細胞から、遺伝子の導入を経ず直接誘導が行われた例は報告されていないが、線維芽細胞は比較的採取しやすく増殖可能なことから、低分子化合物を用いた直接誘導が可能になれば、その臨床応用に有用であると考えられる。

体性幹細胞および多能性幹細胞

近年、胃から採取した胃上皮細胞(GECs: Gastric epithelial cells)から、胃上皮下筋線維芽細胞(GSEMFs: Gastric subepithelial myofibroblasts)を臓器特異的なフィーダー細胞とし、4種類の低分子化合物を用いて内胚葉前駆細胞(EndoPCs: Endoderm progenitor cells)への部分的なリプログラミングに成功したことが報告されている(表3)²⁸⁾。この内胚葉前駆細胞は増殖可能であることに加え、肝細胞、膵臓内分泌細胞、小腸上皮細胞に分化可能であることから、今後の再生医療の戦略の一つとして重要であろう。また、国立がん研究センターの勝田らは、マウスの初代肝細胞を3種類の低分子化合物、CHIR99021, A83-01, Y-27632を添加して培養することで、生体外で増殖可能な肝前駆細胞CLiPs (Chemically-induced Liver Progenitors)に誘導されることを報告した³⁰⁾。CLiPsは、増殖可能かつもとの肝細胞または胆管上皮細胞の両方へ分化する能力を持っていた。特徴として、CLiPsを四塩化炭素による慢性肝炎モデルマウスへ移植したところ、75~90%という高い効率で肝臓に生着し、機能的な幹細胞として肝臓を構築した。今後、低分子化合物を用いてヒトの初代肝細胞からこのような増殖可能なCLiPsへリプログラミングするというアプローチが重要であるが、この3種類の低分子化合物ではCLiPsへの変化は観察されておらず、マウスの初代肝細胞とは異なる条件や化合物が必要であると予想される³⁵⁾。

造血幹細胞は、免疫や血球細胞の供給といった機能性の高さのため、線維芽細胞、内皮細胞、血球系細胞などの細胞から遺伝子の導入によるダイレクトリプログラミングが精力的に進められてきた³⁶⁾³⁷⁾。しかし、その生着や分化能の維持には骨芽細胞や血管内皮細胞からなる造血幹細胞ニッチと呼ばれる微少環境が重要であることが知られており、これはダイレクトリプログラミングによる造血幹細胞の誘導効率を上げるためにも必要である³⁸⁾³⁹⁾。他の細胞と同様に、遺伝子の導入によらず、低分子化合物のみで造血幹

細胞の直接誘導に成功すれば、より簡便で安全性の高い細胞移植治療の実現が期待される。

2013年に、MEF細胞から低分子化合物のみで、iPS細胞と同等の分化能を持つ低分子化合物誘導性多能性幹細胞 CiPSCs (Chemically-induced pluripotent stem cells) がリプログラミングされた (表3)³²⁾。この研究グループは以前、低分子化合物 VC6T (VPA, CHIR99021, RepSox, Parnate) の組み合わせによって、Oct4の遺伝子導入のみでリプログラミング可能であることを報告していた。Oct4の発現の効果が Forskolin によって代替可能であることが判明したことから、VC6Tの組み合わせに Forskolin を加えた VC6TFによって CiPSCsへのリプログラミングに成功した。

2015年に同じ研究グループによって、この低分子化合物によるリプログラミングが、胚外内胚葉細胞 (XEN: extraembryonic endoderm) 様の細胞を中間体としていることが報告された³³⁾。このXEN様細胞は、多能性に重要な転写因子である Sall4 と Lin28a を発現しており、これらの豊富な発現が iPS細胞への完全なリプログラミングを促進しているものと推測される。このような中間体は、転写因子によるリプログラミングでは観察されていないため、低分子化合物による特異的な分子機構の存在が示唆された。また、いくつかの化合物を検討し加えることによって、以前の報告より約1,000倍の効率で CiPSCs を誘導している。さらに最近、MEFからのみでなくマウスの神経幹細胞や小腸上皮細胞からも、ほぼ同様な化合物の組み合わせによって CiPSCs へリプログラミングされており、細胞種間で同様な低分子化合物によるリプログラミングの分子機構が存在していることが提案されている³⁴⁾。今後、これらの低分子化合物の組み合わせが参

照され、ヒトの体細胞から CiPSCs へリプログラミングされることが期待される。しかし、マウスとヒトの iPS細胞間では、いくつかの性質や多能性維持の分子機構が異なっていることが知られており⁴⁰⁾、マウスの場合とは異なった低分子化合物の組み合わせが必要である可能性が高い。

終わりに

低分子化合物を用いたダイレクトリプログラミングの研究はマウス胎児線維芽細胞を用いて報告されていることが多く、臨床応用のためには、年齢や性別によらないヒト成人由来線維芽細胞から目的の細胞が直接誘導されなければならない。また、再現性や汎用性の観点から、同じ研究グループからの報告だけでなく、独立した研究グループから同様な実験に基づいた再現の報告が必要である。低分子化合物を用いたダイレクトリプログラミングは、安全性の他に簡便性や再現性に優れていると考えられ、世界中のどの研究室や病院であっても同様に目的の細胞を誘導できることが期待される。個々の患者から短期間に上記のような細胞を誘導することができれば、移植治療の他に、創薬やオーダーメイド医療などに応用可能であると考えられる。今後、低分子化合物による新規な細胞種への直接誘導法の開発とともに、臨床応用を進めるため基礎研究を発展させていくことが課題である。

謝 辞

本稿を書き終えるにあたり、これまで私たちの研究室の設立ならびに研究活動に多大なご協力をいただいた皆様に御礼申し上げます。

開示すべき潜在的利益相反状態はない。

文 献

1) D' Antonio M, Woodruff G, Nathanson JL, D'Antonio-Chronowska A, Arias A, Matsui H, Williams R, Herrera C, Reyna SM, Yeo GW, Goldstein LSB, Panopoulos AD, Frazer KA. High-Throughput and

Cost-Effective Characterization of Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Reports* 2017; 8: 1101-1111.

2) Ozaki M, Iwanami A, Nagoshi N, Kohyama J, Itakura G, Iwai H, Nishimura S, Nishiyama Y, Kawabata S,

- Sugai K, Iida T, Matsubayashi K, Isoda M, Kashiwagi R, Toyama Y, Matsumoto M, Okano H, Nakamura M. Evaluation of the immunogenicity of human iPS cell-derived neural stem/progenitor cells in vitro. *Stem Cell Res* 2017; 19: 128-138.
- 3) Vierbuchen T, Ostermeier A, Pang ZP pd., Kokubu Y, Sudhof TC, Wernig M. Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature* 2010; 463: 1035-1041.
 - 4) Dai P, Harada Y, Takamatsu T. Highly efficient direct conversion of human fibroblasts to neuronal cells by chemical compounds. *J Clin Biochem Nutr* 2015; 56: 166-170.
 - 5) Toyokuni S. Chemical conversion of human fibroblasts into neuronal cells : dawn of future clinical trials. *J Clin Biochem Nutr* 2015; 56: 5086.
 - 6) Li X, Zuo X, Jing J, Ma Y, Wang J, Liu D, Zhu J, Du X, Xiong L, Du Y, Xu J, Xiao X, Wang J, Chai Z, Zhao Y, Deng H. Small-Molecule-Driven Direct Reprogramming of Mouse Fibroblasts into Functional Neurons. *Cell Stem Cell* 2015; 17: 195-203.
 - 7) Hu W, Qiu B, Guan W, Wang Q, Wang M, Li W, Gao L, Shen L, Huang Y, Xie G, Zhao H, Jin Y, Tang B, Yu Y, Zhao J, Pei G. Direct Conversion of Normal and Alzheimer's Disease Human Fibroblasts into Neuronal Cells by Small Molecules. *Cell Stem Cell* 2015; 17: 204-212.
 - 8) Cheng L, Hu W, Qiu B, Zhao J, Yu Y, Guan W, Wang M, Yang W, Pei G. Generation of neural progenitor cells by chemical cocktails and hypoxia. *Cell Res* 2014; 24: 665-679.
 - 9) Han Y, Lim Y, Duffield MD, Li H, Liu J, Pavathuparambil N, Manaph A, Yang M, Keating DJ, Zhou X. Direct Reprogramming of Mouse Fibroblasts to Neural Stem Cells by Small Molecules. *Stem Cells Int* 2016; 2016: 4304916.
 - 10) Zheng J, Choi KA, Kang PJ, Hyeon S, Kwon S, Moon JH, Hwang I, Kim YI, Kim YS, Yoon BS, Park G, Lee J, Hong S, You S. A combination of small molecules directly reprograms mouse fibroblasts into neural stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2016; 476: 42-48.
 - 11) Zhang M, Lin YH, Sun YJ, Zhu S, Zheng J, Liu K, Cao N, Li K, Huang Y, Ding S. Pharmacological reprogramming of fibroblasts into neural stem cells by signaling-directed transcriptional activation. *Cell Stem Cell* 2016; 18: 653-667.
 - 12) Kajimura S, Seale P, Kubota K, Lunsford E, Frangioni JV., Gygi SP, Spiegelman BM. Initiation of myoblast to brown fat switch by a PRDM16-C/EBP- β transcriptional complex. *Nature* 2009; 460: 1154-1158.
 - 13) Kishida T, Ejima A, Yamamoto K, Tanaka S, Yamamoto T, Mazda O. Reprogrammed Functional Brown Adipocytes Ameliorate Insulin Resistance and Dyslipidemia in Diet-Induced Obesity and Type 2 Diabetes. *Stem Cell Reports* 5: 569-581, 2015.
 - 14) Nie B, Nie T, Hui X, Gu P, Mao L, Li K, Yuan R, Zheng J, Wang H, Li K, Tang S, Zhang Y, Xu T, Xu A, Wu D, Ding S. Brown Adipogenic Reprogramming Induced by a Small Molecule. *Cell Rep* 2017; 18: 624-635.
 - 15) Takeda Y, Harada Y, Yoshikawa T, Dai P. Direct conversion of human fibroblasts to brown adipocytes by small chemical compounds. *Sci Rep* 2017; 7: 4304.
 - 16) Fu Y, Huang C, Xu X, Gu H, Ye Y, Jiang C, Qiu Z, Xie X. Direct reprogramming of mouse fibroblasts into cardiomyocytes with chemical cocktails. *Cell Res* 2015; 25: 1013-1024.
 - 17) Cao N, Huang Y, Zheng J, Spencer CI, Zhang Y, Fu J-D, Nie B, Xie M, Zhang M, Wang H, Ma T, Xu T, Shi G, Srivastava D, Ding S. Conversion of human fibroblasts into functional cardiomyocytes by small molecules. *Science* 2016; 352: 1216-1220.
 - 18) Ieda M, Fu JD, Delgado-Olguin P, Vedantham V, Hayashi Y, Bruneau BG, Srivastava D. Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors. *Cell* 2010; 142: 375-386.
 - 19) Sekiya S, Suzuki A. Direct conversion of mouse fibroblasts to hepatocyte-like cells by defined factors. *Nature* 2011; 475: 390-393.
 - 20) Lim KT, Lee SC, Gao Y, Kim KP, Song G, An SY, Adachi K, Jang YJ, Kim J, Oh KJ, Kwak TH, Hwang SI, You JS, Ko K, Koo SH, Sharma AD, Kim JH, Hui L, Cantz T, Scholer HR, Han DW. Small Molecules Facilitate Single Factor-Mediated Hepatic Reprogramming. *Cell Rep* 2016; 15: 814-829.
 - 21) Guo R, Tang W, Yuan Q, Hui L, Wang X, Xie X. Chemical Cocktails Enable Hepatic Reprogramming of Mouse Fibroblasts with a Single Transcription Factor. *Stem Cell Reports* 9: 499-512, 2017.
 - 22) Li K, Zhu S, Russ HA, Xu S, Xu T, Zhang Y, Ma T, Hebrok M, Ding S. Small molecules facilitate the reprogramming of mouse fibroblasts into pancreatic lineages. *Cell Stem Cell* 2014; 14: 228-236.
 - 23) Zhu S, Russ HA, Wang X, Zhang M, Ma T, Xu T, Tang S, Hebrok M, Ding S. Human pancreatic beta-like cells converted from fibroblasts. *Nat Commun* 2016; 7: 1-13.

- 24) Yamamoto K, Kishida T, Sato Y, Nishioka K, Ejima A, Fujiwara H, Kubo T, Yamamoto T, Kanamura N, Mazda O. Direct conversion of human fibroblasts into functional osteoblasts by defined factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2015; 112: 6152-6157.
- 25) Hiramatsu K, Sasagawa S, Outani H, Nakagawa K, Yoshikawa H, Tsumaki N. Generation of hyaline cartilaginous tissue from mouse adult dermal fibroblast culture by defined factors. *J Clin Invest* 2011; 121: 640-657.
- 26) Outani H, Okada M, Yamashita A, Nakagawa K, Yoshikawa H, Tsumaki N. Direct Induction of Chondrogenic Cells from Human Dermal Fibroblast Culture by Defined Factors. *PLoS One* 2013; 8: 4-15.
- 27) Kim MJ, Kim CW, Choi YS, Kim MH, Park CJ, Suh Y. Age-related alterations in mesenchymal stem cells related to shift in differentiation from osteogenic to adipogenic potential: Implication to age-associated bone diseases and defects. *Mech Ageing Dev* 2012; 133: 215-225.
- 28) Wang Y, Qin J, Wang S, Zhang W, Duan J, Zhang J, Wang X, Yan F, Chang M, Liu X, Feng B, Liu J, Pei X. Conversion of Human Gastric Epithelial Cells to Multipotent Endodermal Progenitors using Defined Small Molecules. *Cell Stem Cell* 2016; 19: 449-461.
- 29) Cao S, Yu S, Chen Y, Wang X, Zhou C, Liu Y, Kuang J, Liu H, Li D, Ye J, Qing Y, Chu S, Wu L, Guo L, Li Y, Shu X, Chen J, Liu J, Pei D. Chemical reprogramming of mouse embryonic and adult fibroblast into endoderm lineage. *J Biol Chem* 2017; 292: 19122-19132.
- 30) Katsuda T, Kawamata M, Hagiwara K, Takahashi R, Yamamoto Y, Camargo FD, Ochiya T. Conversion of Terminally Committed Hepatocytes to Culturable Bipotent Progenitor Cells with Regenerative Capacity. *Cell Stem Cell* 2017; 20: 41-55.
- 31) Lai PL, Lin H, Chen SF, Yang SC, Hung KH, Chang CF, Chang HY, Lu FL, Lee YH, Liu YC, Huang HC, Lu J. Efficient Generation of Chemically Induced Mesenchymal Stem Cells from Human Dermal Fibroblasts. *Sci Rep* 2017; 7: 44534.
- 32) Hou P, Li Y, Zhang X, Liu C, Guan J, Li H, Zhao T, Ye J, Yang W, Liu K, Ge J, Xu J, Zhang Q, Zhao Y, Deng H. Pluripotent Stem Cells Induced from Mouse Somatic Cells by Small-Molecule Compounds. *Science* 2013; 341: 651-654.
- 33) Zhao Y, Zhao T, Guan J, Zhang X, Fu Y, Ye J, Zhu J, Meng G, Ge J, Yang S, Cheng L, Du Y, Zhao C, Wang T, Su L, Yang W, Deng H. A XEN-like State Bridges Somatic Cells to Pluripotency during Chemical Reprogramming. *Cell* 2015; 163: 1678-1691.
- 34) Ye J, Ge J, Zhang X, Cheng L, Zhang Z, He S, Wang Y, Lin H, Yang W, Liu J, Zhao Y, Deng H. Pluripotent stem cells induced from mouse neural stem cells and small intestinal epithelial cells by small molecule compounds. *Cell Res* 2016; 26: 34-45.
- 35) Katsuda T, Ochiya T. Biological and clinical insights offered by chemically induced liver progenitors (CLiPs). *Stem Cell Investig* 2017; 4: 68.
- 36) Pereira CF, Chang B, Qiu J, Niu X, Papatsenko D, Hendry CE, Clark NR, Nomura-Kitabayashi A, Kovacic JC, Ma'Ayan A, Schaniel C, Lemischka IR, Moore K. Induction of a hemogenic program in mouse fibroblasts. *Cell Stem Cell* 2013; 13: 205-218.
- 37) Slukvin II. Generating human hematopoietic stem cells in vitro -exploring endothelial to hematopoietic transition as a portal for stemness acquisition. *FEBS Lett* 2016; 590: 4126-4143.
- 38) Sandler VM, Lis R, Liu Y, Kedem A, James D, Elemento O, Butler JM, Scandura JM, Rafii S. Reprogramming human endothelial cells to haematopoietic cells requires vascular induction. *Nature* 2014; 511: 312-318.
- 39) Zhang J, Niu C, Ye L, Huang H, He X, Tong WG, Ross J, Haug J, Johnson T, Feng JQ, Harris S, Wiedemann LM, Mishina Y, Li L. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature* 2003; 425: 836-841.
- 40) Gafni O, Weinberger L, Mansour AA, Manor YS, Chomsky E, Ben-Yosef D, Kalma Y, Viukov S, Maza I, Zviran A, Rais Y, Shipony Z, Mukamel Z, Krupalnik V, Zerbib M, Geula S, Caspi I, Schneir D, Shwartz T, Gilad S, Amann-Zalcenstein D, Benjamin S, Amit I, Tanay A, Massarwa R, Novershtern N, Hanna JH. Corrigendum: Derivation of novel human ground state naive pluripotent stem cells. *Nature* 2013; 504: 282-286.

著者プロフィール



戴 平 Ping Dai

所属・職：京都府立医科大学医学研究科細胞再生医学・研究教授

略 歴：1994年3月 東京農工大学大学院農学研究科博士課程生物生産学 修了
 1994年4月 理化学研究所分子遺伝学研究室 共同研究員
 1996年10月 理化学研究所 基礎科学特別研究員
 1999年10月 科学技術振興事業団戦略的創造研究推進事業 研究員
 2004年4月 京都府立医科大学医学研究科細胞分子機能病理学 助教
 2009年6月 京都府立医科大学医学研究科細胞分子機能病理学 講師
 2015年4月 京都府立医科大学医学研究科細胞再生医学 講師
 2015年7月 京都府立医科大学医学研究科細胞再生医学 准教授
 2016年4月～現職

専門分野：分子生物学，再生医学

- 主な業績：1. Takeda Y, Harada Y, Yoshikawa T, Dai P. Direct conversion of human fibroblasts to brown adipocytes by small chemical compounds. *Sci Rep* 2017; 7:4304.
2. Dai P, Harada Y, Takamatsu T. Highly efficient direct conversion of human fibroblasts to neuronal cells by chemical compounds. *J Clin Biochem Nutr* 2015; 56: 166-170.
3. Dai P, Harada Y, Miyachi H, Tanaka H, Kitano S, Adachi T, Suzuki T, Hino H, Takamatsu T. Combining TGF- β signal inhibition and connexin43 silencing for iPSC induction from mouse cardiomyocytes. *Sci Rep* 2014; 4:7323.
4. Hatakeyama T, Dai P, Harada Y, Hino H, Tsukahara F, Maru Y, Otsuji E, Takamatsu T. Connexin43 functions as a novel interacting partner of heat shock cognate protein 70. *Sci Rep* 2013; 3:2719.
5. Suzuki T, Dai P, Hatakeyama T, Harada Y, Tanaka H, Yoshimura N, Takamatsu T. TGF- β signaling regulates pancreatic β -cell proliferation through control of cell cycle regulator p27 expression. *Acta Histochem Cytochem* 2013; 46:51-58.
6. Asazuma-Nakamura Y, Dai P, Harada Y, Jiang Y, Hamaoka K, Takamatsu T. Cx43 contributes to TGF- β signaling to regulate differentiation of cardiac fibroblasts into myofibroblasts. *Exp Cell Res* 2009; 315:1190-1199.
7. Dai P, Nakagami T, Tanaka H, Hitomi T, Takamatsu, T. Cx43 mediates TGF- β signaling through competitive Smads binding to microtubules. *Mol Biol Cell* 2007; 18:2264-2273.
8. Dai P, Akimaru H, Ishii S. A hedgehog-responsive region in the *Drosophila* wing disc is defined by Debra-mediated ubiquitination and lysosomal degradation of Ci. *Dev Cell* 2003; 4:917-928.
9. Dai P, Shinagawa T, Nomura T, Harada J, Kaul SC, Wadhwa R, Khan MM, Akimaru H, Sasaki H, Colmenares C, Ishii S. Ski is involved in transcriptional regulation by the repressor and full-length form of Gli3. *Genes Dev* 2002; 16:2843-2848.
10. Dai P, Akimaru H, Tanaka Y, Maekawa T, Nakafuku M, Ishii S. Sonic hedgehog-induced activation of Gli1 promoter mediated by GLI3. *J Biol Chem* 1999; 274:8143-8152.
11. Akimaru H, Chen Y, Dai P, Hou DX, Nonaka M, Smolik SM, Armstrong S, Goodman R, Ishii S. *Drosophila* CBP is a co-activator of *cubitus interruptus* in hedgehog signalling. *Nature* 1997; 386:735-738.
12. Dai P, Akimaru H, Tanaka Y, Hou DX, Yasukawa T, Kanei-Ishii C, Takahashi T, Ishii S. CBP as a transcriptional coactivator of c-Myb. *Genes Dev* 1996; 10:528-540.