2版

様　式　C－19、F－19－1、Z－19　(共通)

科研費
KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 30 年　6 月　1 日現在

機関番号：１１３０１

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：１６H０６６４３

研究課題名（和文）ヒトiPS細胞に低酸素培養を応用した三次元骨様組織の作製およびその骨組織再生効果

研究課題名（英文）Investigation of human iPS cell derived 3D bone like tissue using hypoxic culture

研究代表者

大川　博子（Okawa, Hiroko）

東北大学・大学院歯学研究科・非常勤講師

研究者番号：００７８１２９６

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　2,300,000円

研究成果の概要（和文）：広範囲に骨欠損が生じた症例において，iPS細胞は、歯槽骨の再生医療に用いる幹細胞源として期待が寄せられている。iPS細胞を臨床応用へ展開するためには、ヒトiPS細胞の骨芽細胞分化誘導条件をさらに検討する必要がある。本研究で，我々は低酸素培養がiPS細胞の骨芽細胞分化を促進することを見出した。本研究成果が，自己由来細胞であるiPS細胞を用いた新たな骨増生技術の確立へと発展していくことが期待される。

研究成果の概要（英文）：Induced pluripotent stem cells (iPS cells) are expected as a stem cell source to be used for regenerative medicine of severe alveolar bone loss. In order to develop iPS cells into clinical application, it is necessary to investigate method of osteogenic differentiation of human iPS cells. In this study, we found that hypoxic culture promotes osteogenic differentiation of iPS cells. It is expected that the results of this research will develop into the establishment of new bone augmentation using iPS cells.

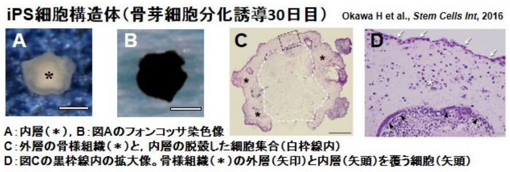
研究分野：歯科補綴学

キーワード：再生歯学　iPS細胞

１．研究開始当初の背景

外傷や腫瘍の摘出，重度の顎堤吸収によって生じる広範囲に欠損した症例では，歯槽骨の欠損を補うために骨移植や骨補填材を用いた顎骨再建／再生が行われているが，欠損が広範囲に及ぶ場合はその治療効果は十分でなく，移植骨採取における侵襲性や他家動物由来の骨補填材の使用等の問題もある。これに対して，個々の患者から作製したiPS細胞は，歯槽骨の再生医療に用いる幹細胞源として期待が寄せられている。

広範囲の歯槽骨再生技術として臨床応用へと展開するためには，三次元的な構造体を移植材とする技術をiPS細胞に応用する技術が必要となる。申請者はこれまでの実験で，マウスiPS細胞から三次元の構造体を作製し，試験管内で石灰化した骨様組織にまで分化誘導することに成功している（下図）[1)]。この構造体は内層が石灰化したコア（芯）を骨芽細胞および細胞外基質からなる外層が覆った複合構造を有している。また，この構造体を生体内に移植すると，外層の骨芽細胞が成熟した皮質骨に分化後，構造体を支えていたコアが皮質骨に置換することで，垂直的な骨増生を得ることができた。本技術を臨床応用へ展開するためには，ヒトiPS細胞でも構造体が作製可能か検討する必要がある。



ただし，小型動物である「マウスの iPS細胞とでは，動物種が大きく異なるため，分化誘導に要する条件は大きく異なる。申請者は，これまで小分子化合物のライブラリースクリーニングによって，骨形成を促進する候補化合物を検出している。ヒトiPS細胞にもBMPなどの既存の骨形成因子として作用する生理活性物質を応用して骨芽細胞分化誘導する戦略は有望であるが，生理活性物質のみで再生医療に応用できるほど効率の良い分化誘導方法はまだ報告されていない。したがって，強力な分化誘導作用をもつ技術の開発が必要となる。

近年，低酸素培養法は，細胞の増殖や分化に影響を及ぼすことが報告されている。申請者らの研究グループはこれまでに体内の酸素濃度を模した実験結果を行い，低酸素環境下での培養がマウスiPS細胞の骨芽細胞分化を促進することを明らかにしている[2)]。また，マウスiPS細胞構造体のコア部分は，低酸素状態のために石灰化が促進することも明らかにしている[1)]。

これら知見から申請者は，「骨芽細胞分化制御に有利に働く低酸素環境下で培養することで，ヒトiPS細胞の骨芽細胞分化を促進することが可能である」と考えた。

1) Okawa H et al., Scaffold-free fabrication of osteoinductive cellular constructs using mouse gingiva- derived induced pluripotent stem cells: ***Stem Cells Int,*** ID 6240794, 2016.
2) Manokawinchoke I et al., Hypoxia enhances osteogenic differentiation in retinoic acid-treated murine induced pluripotent stem cells: ***Tissue Eng Regen Med***,.Volume 13, Issue 5, pp 547-553, 2016.

２．研究の目的

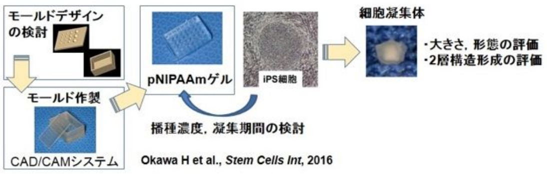
本研究では，低酸素培養下でヒトiPS細胞の骨芽細胞分化を強力に促進する分化誘導方法による，広範囲な骨欠損に対する新規歯槽骨再生技術の開発を目的とする。

新たな骨再生材料を開発するため，研究期間内に以下の項目を明らかにする。

- 申請者がこれまでに確立しているマウスiPS 細胞構造体の作製技術が，ヒト iPS細胞でも再現可能か否かを明らかにする。
- 低酸素培養が，iPS細胞の骨芽細胞分化に及ぼす影響を明らかにする。
- 低酸素培養下における最適な骨芽細胞への分化誘導条件が，ヒトiPS細胞による三次元骨様構造体の形成に及ぼす影響を明らかにする。
- 同定した分化誘導方法によって作製した石灰化iPS細胞構造体を用いて，その骨再生作用を明らかにする。

３．研究の方法

(1) pNIPAAmゲルを用いたiPS細胞構造体の作製モデルの確立



温度応答性高分子pNIPAAmゲルによるiPS 細胞構造体の作製システムを確立するため,三次元プリンタを用いて移植に適した iPS 細胞構造体のモールドデザインを検討する。検討には，申請者らがこれまでに確立した方法（Okawa et al., ***Stem Cells Int***, 2016）を用いる。造形したモールドから作製したpNIPAAmゲルから，iPS細胞構造体の大きさおよび形態が及ぼす変化を考慮した至適細胞濃度および凝集期間の検討を行う。

(2)低酸素培養が iPS 細胞の骨芽細胞分化に及ぼす影響

低酸素条件を誘導する方法は，低酸素培養器を利用する方法および,塩化コバルト（$CoCl_2$）や Deferrioxamine（DFX）を培地中に添加して化学的に低酸素状態に誘導する方法を用いる。酸素濃度は 1%～10%に調節する。

低酸素培養下で iPS 細胞を骨芽細胞に分化誘導後し，以下を検討する。ALP 活性（ALP 染色）および基質の石灰化（フォンコッサ染色，アリザリンレッド染色），骨芽細胞分化特異的遺伝子発現(リアルタイム RT-PCR 染色)，細胞毒性（WST-1 法），細胞死（死プロテアーゼ発光検出法），カルシウム濃度測定(MXB 法)，元素分析解析(EDX 分析），電子線回折分析（TEM）

(3)同定された低酸素培養下での分化誘導法および pNIPAAm ゲルを用いた培養システムの確立

初年度の実験結果から，iPS 細胞の骨芽細胞の分化を促進させる作用を有する低酸素培養の至適条件の検討を行う。さらに，iPS 細胞構造体の三次元培養システムの検討を行い，iPS 細胞構造体が，試験管内において成熟した石灰化基質を形成する至適濃度および分化誘導期間の検討を行う。

上記の結果から，温度応答性高分子 pNIPAAm ゲルを用いて iPS 細胞構造体を作製し，骨芽細胞分化誘導培地で低酸素条件下のもと 4～8 週間培養する。分化誘導した iPS 細胞構造体を，(2)と同様の分析方法で，骨芽細胞分化に促進的に作用するか否かを評価する。

(4)iPS 細胞構造体が骨組織再生に及ぼす影響の検討

(3)で確立した骨芽細胞へ分化誘導させた iPS 細胞構造体を，細胞移植実験用免疫不全マウス背皮下に移植し，2～8 週間後に新生骨の形成の有無および移植細胞の動向を観察する。さらに細胞移植実験用免疫不全ラットの頭蓋骨欠損部位にも移植し，移植後 2～8 週にて頭蓋骨を摘出する。摘出した頭蓋骨から組織切片を作製し，HE 染色または免疫染色等の手法で骨再生を組織学的に評価する。立体的な骨の形成状態は，マイクロ CT を用いて定量的に解析する。

４．研究成果

(1)ヒト iPS 細胞の骨芽細胞凝集体への分化誘導

ヒト iPS 細胞を浮遊培養しながら中胚葉分化誘導培地中で胚様体形成を行ったのちに，骨芽細胞へ分化誘導した結果，三次元的な iPS 細胞凝集体を得ることができた。

(2)ヒト iPS 細胞由来骨芽細胞凝集体の解析

ヒト iPS 細胞凝集体の組織学的観察の結果，ヒト iPS 細胞凝集体の内部に石灰化物を認めた。

(3)DFX がヒト iPS 細胞凝集体の石灰化に及ぼす影響

低酸素環境模倣化合物 DFX を用いて骨芽細胞分化誘導を行ったヒト iPS 細胞由来細胞塊では，オステオカルシンの発現を認め，内部の石灰化が促進された。

以上の結果から，中胚葉分化誘導培地中で iPS 細胞から胚様体を作製し，骨芽細胞へ分化誘導することで，骨様組織を有する iPS 細胞凝集体を得られることが示された。また，骨芽細胞分化誘導時に DFX を添加し，低酸素環境にすることで iPS 細胞塊の石灰化が促進した。

５．主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 0 件）

〔学会発表〕（計 1 件）

①<u>大川　博子</u>
iPS 細胞研究は歯科補綴学にどのように生かされるのか？
日本補綴歯科学会　第 126 回学術大会・総会　2017 年

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

特記事項なし

○取得状況（計 0 件）

特記事項なし

〔その他〕

特記事項なし

６．研究組織

(1)研究代表者

大川　博子（OKAWA, Hiroko）
東北大学・大学院歯学研究科・非常勤講師
　研究者番号：00781296

(2)研究分担者

特記事項なし

(3)連携研究者

特記事項なし

(4)研究協力者

江草　宏（EGUSA Hiroshi）
東北大学・大学院歯学研究科・教授
　研究者番号：30379098