

平成 30 年 5 月 25 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H06762

研究課題名(和文) 多能性幹細胞の多段階骨芽細胞分化誘導を用いた顎顔面骨治癒を促進する細胞集団の同定

研究課題名(英文) Identification of cell population accelerating craniofacial fracture using multiple differentiation method with pluripotent stem cell

研究代表者

菅家 康介 (Kanke, Kosuke)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：90779810

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)：頭蓋顎顔面骨骨折治癒において、どのような細胞が作用し、骨形成にどのように働くのかを解析するために、多能性幹細胞からの骨誘導法をツールとして用いた探索研究として遂行された。Dermo1, Runx2, Sp7及びBglapが、それぞれ、Day 9、Day 19、Day 23で発現が多いことが確認され、Runx2, Sp7などの転写因子に関しては、プライマリーの骨芽細胞と同等の発現を認めた。また、2.3kbCol1a1GFPの高発現や骨芽細胞関連タンパク発現も高い割合で認めている。顎顔面骨折においてどの細胞が寄与するかは現在調査中である。

研究成果の概要(英文)：This study designed which cell population contributes to bone healing in craniofacial fracture with osteoblast induction using pluripotent stem cell. During induction, genes of Dermo1, Runx2, Sp7 and Bglap highly expressed at day 9, day Day 19 and Day 23, respectively. Genes of Runx2 and Sp7 were expressed at the same levels of these of primary osteoblasts. 2.3kb Col1a1 was highly expressed as well. We are researching how these populations contribute to craniofacial bone fracture healing.

研究分野：外科系歯学

キーワード：多能性幹細胞 骨芽細胞

## 1. 研究開始当初の背景

正常な骨組織は、恒常的な骨形成・骨吸収のバランス調節によって骨リモデリング（骨改造）が行われ、維持されている。骨リモデリング現象は、長管骨のみならず、膜性骨である頭蓋顎顔面骨においても同様に見られるとされ、炎症・外傷により破壊された骨組織において、新生骨の形成・維持に重要な役割を果たす。

骨形成は主に骨芽細胞により行われているが、様々なシグナル分子と転写因子によって、この過程が空間的・時間的に制御されていることが判明してきた。特に、軟骨内骨化における骨芽細胞分化では骨格系前駆細胞を発端とし、様々なシグナルが連続的にはたらくことで、骨芽細胞分化・成熟といった過程が精密に制御される。骨折における骨形成のメカニズムは、発生学的な骨形成のメカニズムと類似しており、骨折部位に骨髄間葉系幹細胞等の前駆細胞が遊走し、骨などの周囲組織がシグナル分子やサイトカインを分泌し、骨芽細胞へと分化誘導し、骨形成がなされるものと考えられている。頭蓋骨欠損モデルにおいて、骨髄間葉系細胞の細胞分画の中でも幼弱な細胞が、成熟した細胞よりも骨治癒に積極的に働き、骨治癒に貢献するという報告がなされている (Park D et al. Cell Stem Cell, 2012)。しかし、この研究においては骨形成に寄与する細胞集団の同定、特性評価は行っていない。同定・特性評価には、目的とする細胞を生体から十分量採取することが困難であるという、技術的な制約が存在し、これまでの手法では解決することが難しい。申請者らは、多能性幹細胞から低分子化合物のみを用い、無血清、無フィーダー細胞下で効率的に骨芽細胞に分化する方法を開発した (Kanke et al. Stem Cell Reports, 2014)。

この誘導法は、生体内における骨芽細胞分化の過程を忠実に再現する方法であるとともに、骨格系前駆細胞、前骨芽細胞、骨芽細胞、骨細胞など、各ステージの細胞が豊富に存在するフェイズを持ち、一度の培養で十分な量の細胞が採取可能であるという利点を持つ。つまり、前述の先行研究と手法は異なるが、これらの細胞を骨欠損部位に移植することで、骨欠損部位の骨形成に有効な細胞源の同定と特性評価が可能となる。

## 2. 研究の目的

研究期間内に、申請者らが開発した多能性幹細胞の骨芽細胞分化誘導系を用い、多能性幹細胞から各段階の骨系統細胞（中胚葉細胞、骨格系前駆細胞、前骨芽細胞、骨芽細胞、成熟骨芽細胞）を誘導し、これらの細胞がどのよ

うな細胞特性を持つかをそれぞれ解析する。さらに、これら細胞集団を頭蓋骨骨折モデルに移植した際、骨形成にどのように働くのかを解析する。これにより、頭蓋顎顔面骨骨折治癒に最も促進的に働く骨系統細胞を同定するとともに、骨折治癒の背景にある骨形成作用の分子メカニズムの探索を目的とする。

多能性幹細胞は、生体内に移植した場合、腫瘍化、癌化のリスクが高く、骨形成に関して確かな情報が得られない可能性が存在する。この問題点を解決するため、本申請では、過剰増殖を抑制したうえで生体内への細胞移植を行うものとする。腫瘍化、癌化の制御に対する解決策の無い現状を鑑み、本申請においては多能性幹細胞の骨折治療への応用には焦点を当てない。あくまで、誘導された骨系統細胞の特性評価、同定した細胞集団のもつ骨形成作用の分子メカニズムの探索を本申請の主題とし、効率的な頭蓋顎顔面骨骨折治癒を可能にする新規骨芽細胞集団の同定と効果検証を最終目的とする。具体的には以下に関して検討を行う。

1. 多能性幹細胞の骨芽細胞分化誘導系を用いた骨系統細胞の特性評価
2. 頭蓋骨骨折モデルを用いた各骨系統細胞移植後の骨形成作用の *in vivo* 評価
3. 同定した細胞集団のもつ骨形成作用の分子メカニズムの探索

## 3. 研究の方法

第一に、多能性幹細胞からの *in vitro* 骨芽細胞分化誘導において、誘導された骨系統細胞分化の各段階の細胞の特性を、RNA-seq を用いた網羅的遺伝子発現、RT-qPCR を用いた遺伝子発現解析、免疫染色を用いたタンパク発現解析などにより評価し、移植による検討が必要な誘導期間を設定する。第二に、頭頂骨臨界骨骨折モデルに各分化段階の骨系統細胞を移植し、どの骨系統細胞が骨折治癒に有効に作用するかを組織学的解析、免疫組織学的解析をもちいて検証する。最後に、*in vivo* において最も有効な骨治癒を達成した群から、多能性幹細胞由来の骨芽細胞のみを FACS にて単離し、RNA-seq を用いた網羅的遺伝子発現、David ソフトウェアを用いて、移植前後で発現が変動する遺伝子と、その背景にある細胞内シグナル経路に関して探索を行う。以上により、多能性幹細胞の組織誘導系を発生学的なツールとして用いた、新たな頭蓋顎顔面骨骨折治癒促進細胞の同定と骨折治癒のメカニズムを探る。

- (1) 多能性幹細胞の骨芽細胞分化誘導系を用いた骨系統細胞の特性評価  
骨芽細胞特異的に GFP を発現する 2.3kb

Coll1a1-GFP マウス ES 細胞を用い、申請者らが報告している誘導法に準じ誘導を行う。調査する誘導期間は、多能性期 (Day 0)、中胚葉期 (Day 5)、骨格系前駆細胞期 (Day 9)、前骨芽細胞期 (Day12)、骨芽細胞期 (Day 19)、成熟骨芽細胞期 (Day 23)とする。それぞれの期間に対し、定量的 PCR 法による遺伝子発現、細胞免疫染色、フローサイトメトリーによる発現タンパクの定量、石灰化を確認する染色 (アリザリンレッド染色、von Kossa 染色)による骨基質の石灰化を評価する。

(2) 誘導された骨系統細胞集団の骨折治癒促進効果の in vivo 評価

1.で達成された多能性幹細胞由来の骨系統細胞の骨折治癒効果を頭蓋骨骨折モデルにおいて検証する(図 5)。本検証では、マウスにおける頭蓋骨骨折モデルを用い、1.で検証した各分化段階の期間の中から、negative control として誘導前の細胞、前骨芽細胞期、骨芽細胞期、成熟骨芽細胞期の4期間を選択し細胞移植を行う。骨折部の骨形成の評価は、コントロールグループ(細胞非搭載群)との比較を行い、放射線学的に6ヶ月まで経時的に観察し、骨形成に関する基礎データを蓄積する。術後6ヶ月までの間に経時的に麻酔後屠殺し、組織学的解析、免疫組織学的解析、in situ hybridization を行い、骨形成能の評価と治癒過程に関する詳細な解析を行う。

(3) 同定した細胞集団のもつ骨形成作用の分子メカニズムの探索

今回の検証では、骨芽細胞に特異的に GFP を発現する ES 細胞を用いる。細胞移植の後に、移植した細胞が骨芽細胞へと分化した場合、これらは GFP を発現するため、これらを単離することで、ES 細胞由来の骨芽細胞のみを採取できる。そこで、形成された骨組織から骨芽細胞を酵素的に単離し、FACS にて GFP 陽性細胞を採取する。そして、網羅的遺伝子解析を行い、骨折治癒前後でどのような遺伝子発現変化が起こっているかを調査し、同定した細胞集団のもつ骨形成作用の分子メカニズムを探索する。

#### 4. 研究成果

(1) 多能性幹細胞の骨芽細胞分化誘導系を用いた骨系統細胞の特性評価

多能性幹細胞の骨芽細胞分化誘導系は、1. 多能性期、2. 中胚葉期、3. 骨芽細胞期、4. 成熟骨芽細胞期の4つのフェイズに大別できる。申請者らは、2. 中胚葉期で誘導された中胚葉細胞は、Hh シグナル誘導性の「3. 骨芽細胞期」において骨芽細胞への運命決定がなされ、Runx2, Coll1a1 を発現する骨芽細胞前駆細胞、

Sp7 や Ibsp を発現する前骨芽細胞、Bglap を発現する成熟骨芽細胞、へと分化していくことを報告している。さらに、骨芽細胞前駆細胞が認められる前段階では、Dermo1 を発現する骨格系前駆細胞への分化を認めている。

タンパクの発現においては、2.3kb Coll1a1-GFP の高発現を認めており、骨芽細胞分化と、アリザリンレッド染色において高い石灰化能を有することが分かった。

(2) 誘導された骨系統細胞集団の骨折治癒促進効果の in vivo 評価

頭蓋骨骨折モデルにおける検証においては、現在進行中である。現在、比較や検証にあたり、各分化段階における時期の最適化をおこなっている。

(3) 同定した細胞集団のもつ骨形成作用の分子メカニズムの探索

頭蓋骨骨折モデルにおける細胞集団の確保が行えていないため、当初の計画から進んではいないが、vitro における、細胞のソートを行っていない集団の確保はできており、現在マイクロアレイや RNA-seq などの網羅的遺伝子解析の準備を行っている。

(4) その他

頭蓋骨骨折治療において、3次元的な骨再生・骨治癒を可能にするために、今回の誘導法において、アテロコラーゲンスポンジを用いて検証を行ったところ、多能性幹細胞からの骨芽細胞の3次元誘導法に関して検証した。2次元培養と同等の誘導効率を認め、今回の申請とは直接的な関係にはないものの、頭蓋骨骨折の治癒や骨折治癒に関与する細胞の同定に有用なツールとなる方法を開発した。その結果の一部を、2017年 Science Advances 誌に共著者として報告している (Zujur D et al, Sci Adv. 2017)。

<引用文献>

- Endogenous bone marrow MSCs are dynamic, fate-restricted participants in bone maintenance and regeneration. Park D, Spencer JA, Koh BI, Kobayashi T, Fujisaki J, Clemens TL, Lin CP, Kronenberg HM, Scadden DT. Cell Stem Cell. 2012 Mar 2;10(3):259-72. doi: 10.1016/j.stem.2012.02.003
- Stepwise differentiation of pluripotent stem cells into osteoblasts using four small molecules under serum-free and feeder-free conditions. Kanke K, Masaki H, Saito T, Komiyama Y,

Hojo H, Nakauchi H, Lichtler AC, Takato T, Chung UI, Ohba S.  
Stem Cell Reports. 2014 May 22;2(6):751-60.doi:  
10.1016/j.stemcr.2014.04.016

- Three-dimensional system enabling the maintenance and directed differentiation of pluripotent stem cells under defined conditions. Zujur D, Kanke K, Lichtler AC, Hojo H, Chung UI, Ohba S. Sci Adv. 2017 May 12;3(5):e1602875. doi: 10.1126/sciadv.1602875

## 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2件)

(1) Zujur D, Kanke K, Lichtler AC, Hojo H, , Chung UI, Ohba S. Three-dimensional system enabling the maintenance and directed differentiation of pluripotent stem cells under defined conditions. Sci Adv. 2017 May 12 3(5): e1602875. doi: 10.1126/sciadv.1602875

(2) Kanke K, Abe T, Abe M, Mori Y, Hoshi K, Takato T. In-hospital surgical treatment for haemorrhage after aesthetic mandibular osteotomy performed as an office-based day surgery: A case report. Ann Med Surg (Lond). 2017 Oct 13;24:15-18. doi: 10.1016/j.amsu.2017.10.001

〔学会発表〕(計11件)

(1) Zujur DC, Kanke K, Chung UI, Ohba S: Generation of hiPSC-derived osteoblasts by using small molecule inducers under fully defined, xeno-free conditions. CiRA-ISSCR International Symposium, March 22-24 2016, Kyoto, Japan, Kyoto University

(2) Zujur DC, Kanke K, Chung UI, Ohba S: Differentiation of human iPSC osteoblasts by using small molecule inducers under fully defined, xenofree conditions. ISSCR2016, June 22-25 2016, San Francisco, USA, Moscone West

(3) Zujur DC, Kanke K, Chung UI, Ohba S: Differentiation of human iPSC into osteoblasts by using small molecule inducers under fully defined, xenofree conditions 第34回日本骨代謝学会学術集会 第3回アジア太平洋骨代謝学会議, July 20-23 2016, Osaka, Japan, 大阪国際会議場

(4) Zujur DC, Kanke K, Chung UI, Ohba S: Differentiation of hiPSCs into Osteoblasts by Using Small Molecule Inducers Under Fully Defined Xeno-free Conditions. ASBMR2016, September 16-19 2016, Atlanta, USA, Georgia World Congress Center

(5) Zujur DC, Kanke K, Chung UI, Ohba S: Three Dimensional Differentiation of Mouse Pluripotent Stem Cells into Osteogenic Cells under Defined Conditions. ASBMR2016, September 16-19 2016, Atlanta, USA, Georgia World Congress Center

(6) Zujur CD, 菅家康介, Chung UI, 大庭伸介: Differentiation of pluripotent stem cells in three dimensional cultures under defined conditions. 第15回日本再生医療学会総会 2016年3月17日 大阪国際会議場, 大阪

(7) 内山貴夫, 西條英人, 杉山円, 菅野勇樹, 菅家康介, 高戸毅: サイナスリフト後の上顎臼歯部広範囲欠損症例に対しメッシュプレートを用いて骨増生術を施行した1例. 第19回日本先進インプラント医療学会学術大会・総会 2016年9月4日 一ツ橋記念講堂, 東京

(8) 菅野 勇樹, 西條 英人, 杉山 円, 内山 貴夫, 菅家 康介, 高戸 毅 Le FortI型骨切り術に併用して上顎洞底挙上術を行いインプラントを埋入した1例. 第19回日本先進インプラント医療学会学術大会・総会 2016年9月4日 一ツ橋記念講堂, 東京

(9) 多喜川 紗耶, 杉山 円, 菅家 康介, 五十嵐 正樹, 内山 貴夫, 末永 英之, 西條 英人, 星 和人 口腔ならびに咽頭, 鼻腔を占拠し, 口腔外にも及んだ巨大な上顎体の1例 第51回 NPO 法人日本口腔科学会関東地方部会学術集会 2017年9月30日 慶應義塾大学医学部信濃町キャンパス北里講堂, 東京

(10) 菅家康介, 杉山円, 五十嵐正樹, 川上大, 西條英人, 星和人, 高戸毅 頬部膨隆を呈した乳児期の歯原性粘液線維腫の一例 第62回公益社団法人日本口腔外科学会総会・学術大会 2017年10月20日 国立京都国際会館, 京都

(11) 菅家康介, 西條英人, 杉山円, 星和人 全前脳胞症を伴う正中上唇裂における当科の周術期管理 第29回一般社団法人日本小児口腔外科学会総会・学術大会 2017年11月18日 アートホテル新潟駅前, 新潟

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等 なし

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

菅家 康介 (KANKE, Kosuke)

東京大学, 医学部附属病院, 助教

研究者番号: 90779810