

令和 2 年 6 月 3 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10935

研究課題名(和文) 制御可能なiPS細胞注射による低侵襲脊椎固定術の開発

研究課題名(英文) Development of minimum invasive spinal fusion using controllable iPS cell injection

研究代表者

鈴木 亨暢 (Suzuki, Akinobu)

大阪市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：00445016

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：当研究はBMP2及びチミジンキナーゼ(TK)遺伝子を導入したiPS細胞の注射による低侵襲脊椎固定術の開発を目的として行った。まずはiPS細胞ではなく、マウス横紋筋あるいは頭蓋冠由来細胞株を用いて細胞レベルで実験手法の確立を目指した。ガンシクロビル添加による遺伝子導入細胞の細胞死は既の実証できているが、骨形成能が不十分な可能性があり、現在この問題の解決に向けた研究を行っている。細胞レベルで十分な骨形成能が確認できれば、ラットを用いた細胞注射による脊椎固定術の検証、更にはiPS細胞での実験を行う予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、高齢化の進行とともに脊椎手術の必要性も増加の一途をたどっている。当研究が実現すれば、脊椎固定術の低侵襲化及び効率化を図ることができ、患者の早期社会復帰や医療費の減少にも繋がることが予想される。また、この技術は脊椎手術だけでなく、難治性骨折や偽関節の治療などの分野にも応用可能である。当研究は現在細胞レベルでの検証を行っている段階であり、今後も低侵襲脊椎固定術の実現に向けて実験を行っていく。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to develop for minimally invasive spinal fusion procedures by iPS cells injection carrying osteogenic protein 2 and herpes simplex virus type 1 thymidine kinase genes. Firstly, we were trying to establish an experimental method at the cellular level using immortalized mouse myoblast cell lines and osteoblast precursor cell lines derived from mouse calvaria rather than iPS cells. Selective apoptosis of cells transfected with genes by addition of ganciclovir has already been demonstrated, but their osteogenic capacity is inadequate, and we are currently working to address this issue. If we can confirm sufficient osteogenesis at the cellular level, we plan to validate spinal fixation by cell injection in rats and further experiments with iPS cells.

研究分野：整形外科、脊椎外科

キーワード：骨形成タンパク チミジンキナーゼ iPS細胞 脊椎固定術 低侵襲

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 脊椎疾患は高齢者の増加、脊椎手術の技術向上などにより近年脊椎の手術件数は増加の一途をたどっている。同時に我が国は高齢化に伴う医療費の増加が余儀なくされており、手術を低侵襲化させ、患者の早期社会復帰を図り、入院費や介護費を減少させることも重要課題である。近年関連器具の発達に伴い脊椎手術でも低侵襲化が進んでいるが、骨癒合に関してはその促進あるいは低侵襲化が未達成のため術後療法の短縮に直結していないのが現状である。

(2) 我々の研究室は骨形成タンパク (bone morphogenetic protein; BMP) を用いた骨再生・骨新生をテーマとして研究してきた。BMP は強力に骨誘導を起こすことの出来る蛋白質であり、海外では既に難治性骨折や脊椎固定などで実用化されている。しかし BMP 単体の注入では骨形成が認められず、何らかの担体が必要なことも判明しており、BMP の注射による治療といった完全な低侵襲化には至っていない。また、周囲への拡散が速いため大量投与が必要であり、異所性骨化や周囲組織の腫脹などの副反応や高額な医療費も問題となっている。

(3) ヒト人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cell; iPS 細胞) はさまざまな組織の細胞に分化する能力を有し患者本人の細胞から樹立可能である特徴を持ち、再生医療や移植治療への応用が期待され臨床治験が始まろうとしている。また HLA 型により分類した iPS 細胞をストックしバンク化する計画も同時に進み始めている。しかし、iPS 細胞には腫瘍化のリスクが報告されており、iPS 細胞を使用する際には安全性の確立も重要な課題である。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は iPS 細胞注射による低侵襲脊椎固定術を開発し、その可能性と安全性、有用性を検証することである。iPS 細胞に BMP タンパクを恒常的に発現させれば、低侵襲な脊椎固定術が実現できる可能性がある。しかし、臨床応用を考えた際には、BMP2 の副作用や iPS 細胞の腫瘍化が問題点として考えられる。そこで我々は単純ヘルペスウイルス 1 型チミジンキナーゼ (HSV-TK) とガンシクロビルを用いた選択的細胞死滅システムに着目した。HSV-TK が発現した細胞は、ガンシクロビル (GCV) により細胞死が生じる。従って BMP 遺伝子と HSV-TK 遺伝子を共発現する細胞を用いれば、副作用が生じた場合にそれらの細胞を死滅させることや、十分な骨新生が得られた段階で BMP 発現細胞を死滅させ新生骨量をコントロールできる可能性がある。本研究では BMP と HSV-TK を同時発現する細胞を作製し、細胞注射による脊椎固定術が可能か、HSV-TK システムを用いて新生骨の骨量をコントロールすることが可能かを検証する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 遺伝子ベクターの作製

BMP2 遺伝子と HSV-TK 遺伝子を internal ribosome entry site (IRES) で連結し、pcDNA 3.1 vector (invitrogen, USA) にクローニングした。

#### (2) 遺伝子導入ならびに安定発現細胞株の確立

実験手法を確立するため、まずは iPS 細胞ではなく、マウス横紋筋由来細胞である C2C12 とマウス頭蓋冠由来細胞株である MC3T3-E1 を用いることとした。細胞は 10%FBS 含有 DMEM 培地で培養した。細胞への遺伝子導入は Lipofectamin3000 (invitrogen, USA) を用いて Lipofection 法で行った。遺伝子導入 48 時間後より selection 用抗生剤 G418 (invitrogen, USA) 含有培地に変更し、遺伝子導入細胞の selection を行い、10-14 日で安定発現細胞を確立し、以下の実験に用いた。

#### (3) Real-time polymerase chain reaction (RT-PCR)

遺伝子導入細胞における BMP2 遺伝子発現を解析するために RT-PCR を行った。RNA の抽出、精製は RNeasy Mini Kit (QIAGEN, USA) を用いて行った。300ng の RNA から High-Capacity RNA-to-cDNA<sup>TM</sup> Kit (Applied Biosystems, USA) を用いて cDNA を作製した。7500 リアルタイム PCR システム (Applied Biosystems, USA) で、cDNA および SYBR グリーン色素 (Applied Biosystems, USA) を使用して、RT-PCR を行った。相対的 mRNA 発現を Ct 法で分析し、glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) で補正した。Primer の配列は以下の通りである。BMP2 5' GGCTACCACGCCTTCTACTG 3' , 5' GTTCTCGTCCAGGTACAGCA3' , GAPDH 5' TGTGTCCGTCGTGGATCTGA 3' , 5' TTGCTGTTGAAGTCGCAGGAG 3'

#### (4) アルカリフォスファターゼ (ALP) 活性

遺伝子導入細胞から産生された BMP2 の機能評価を行うため、ALP 活性を測定した。C2C12 細胞および MC3T3-E1 細胞を遺伝子導入細胞の培養上清もしくは通常培地で 3-10 日間培養し、ALP 活性を測定した。また、ポジティブコントロールとして BMP2 含有培地 (50, 100, 200 ng/ml) で 10 日間培養した細胞を使用した。細胞は PBS で洗浄した後、RIPA buffer を添加、凍結融解を繰り返し、4、15 分、15,000rpm で遠心した上清を検体とした。ALP 活性測定は LabAssay ALP (Wako, Japan) を用いてプロトコル通りに行い、405nm の吸光度をマイクロプレートリーダーで測定した。吸光度は BCA protein assay (Thermo Fisher, USA) を用いて測定した蛋白質量で補正した。

#### (5) GCV 投与による細胞死の確認

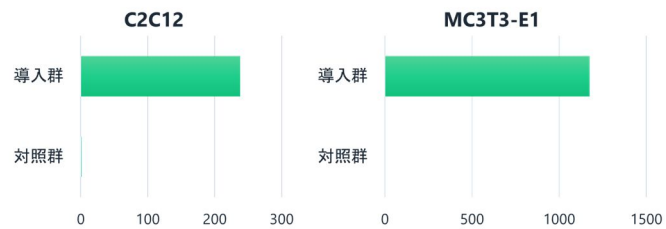
遺伝子導入細胞を 6-well dish に  $3.0 \times 10^5$  ずつ播種し、通常培地および GSV 含有培地 ( $1.6 \mu\text{g}/\text{ml}$ ,  $16 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) で培養し、7 日後もしくは 14 日後に生細胞数を確認した。対照群として遺伝子導入を行っていない細胞を用いた。

### 4. 研究成果

#### (1) RT-PCR

導入群と対照群における BMP2 の発現量を RT-PCR で測定した。C2C12 細胞において対照群では遺伝子発現はほとんどなかったが、導入群では BMP2 の遺伝子発現を認めた(図 1 左)。MC3T3-E1 細胞でも同様に導入群で BMP2 の遺伝子発現を認めたが、対照群ではほとんど発現はなかった(図 1 右)。

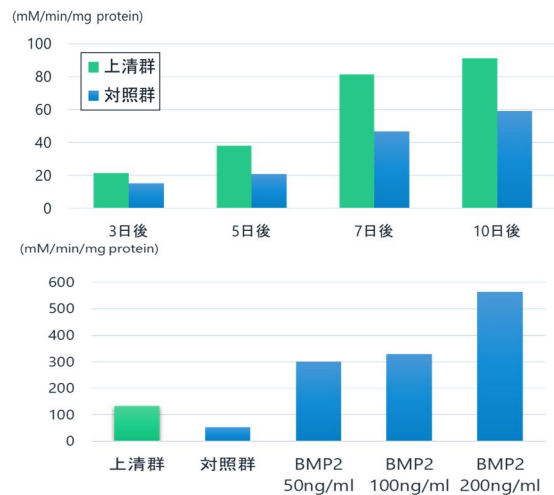
図 1. BMP2 相対発現量



#### (2) ALP 活性

遺伝子導入細胞の培養上清で培養した導入群と通常培地で培養した対照群において培養開始後 3, 5, 7, 10 日後に ALP 活性を測定した。MC3T3-E1 細胞を用いた実験では、導入群、対照群ともに培養日数とともに ALP 活性は上昇したが、対照群と比較し、導入群において ALP 活性の上昇は大きかった (図 2 上)。続いて、導入群、対照群に加え、BMP2 含有培地 (50, 100, 200 ng/ml) で培養した陽性対照群を 10 日間培養し、ALP 活性を測定した。MC3T3-E1 細胞では導入群で対照群よりも ALP 活性は上昇していたが、陽性対照群と比べると低値であった (図 2 下)。一方で C2C12 細胞では上清群、対照群ともに ALP 活性は上昇しなかった。

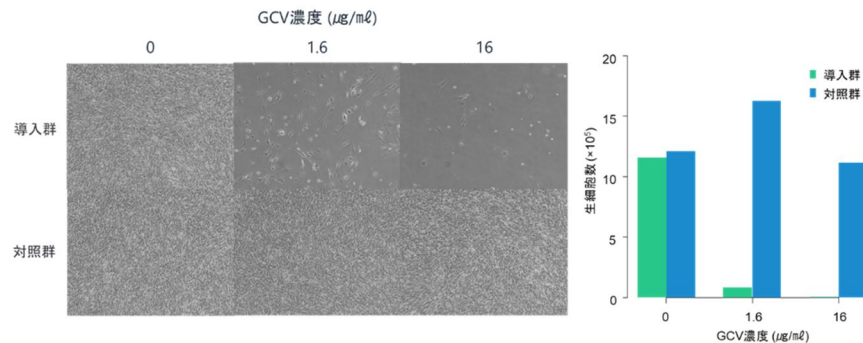
図 2. ALP 活性 (MC3T3-E1)



#### (3) GCV 投与による細胞死

遺伝子導入細胞と遺伝子導入を行っていない対照群の細胞を GCV 含有培地 (GCV 濃度 0, 1.6,  $16 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) で培養し、生細胞数を測定した。C2C12 細胞を用いた実験では、導入群は GCV 投与後 7 日目でほとんどの細胞が死滅していたが、対照群では細胞への影響はほとんどみられなかった (図 3)。同様に MC3T3-E1 細胞でも、導入群においてのみ GCV 投与後 14 日でほとんどの細胞が死滅していた。

図 3. GCV 投与後 7 日目の生細胞数 (C2C12)



以上の結果から、本研究で使用中のベクターでは HSV-TK は機能しているものの、BMP2 遺伝子の発現が不十分である可能性が考えられる。今後は ELISA で培養上清における BMP2 の検出を行い、その産生量を評価する。BMP2 の産生が少なければウイルスベクターへの載せ替えを行う予定である。In vivo での評価としては、遺伝子導入細胞を無胸腺ラットの横突起間に注射し、4 週間、8 週間の時点で犠牲死させ単純 X 線、micro CT にて骨新生の状態を確認する。さらに注射部分の脊椎を摘出し組織学的な評価を行う。また、GCV 投与により骨新生が制御できるかどうかを検討する。in vivo の実験で意図した結果が得られれば、iPS 細胞での実験を行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	寺井 秀富  (Hidetomi Terai)  (20382046)	大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授   (24402)	
研究分担者	中村 博亮  (Hiroaki Nakamura)  (60227931)	大阪市立大学・大学院医学研究科・教授   (24402)	