

令和 元年 6月 24日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19755

研究課題名(和文) サイズコントロールしたiPS細胞スフェロイドの自己組織化を応用する骨再生法の開発

研究課題名(英文) Development of bone regeneration method for self-assembly of size-controlled iPS cell spheroid

研究代表者

矢谷 博文(Yatani, Hirofumi)

大阪大学・歯学研究科・教授

研究者番号：80174530

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：大きさならびに形状の異なるマイクロ空間形状プレートを用いて、マウスiPS細胞から細胞スフェロイドの作製を試みた結果、播種細胞数によってスフェロイドのサイズをコントロールすることが可能であることが明らかとなった。各サイズにおけるスフェロイドの内部構造を観察した結果、スフェロイドの小さいサイズにおいては単一の構造を認めたのに対し、スフェロイドのサイズが大きくなるにつれ、スフェロイド内部には2層構造を認め、中心部は壊死を起こしている可能性が示唆された。iPS細胞スフェロイドを骨芽細胞に分化誘導を行った結果、スフェロイドのサイズによって化合物ならびに自己組織化の反応性が異なることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年の三次元培養方法の進展は、細胞の大量培養および、二次元培養では不可能であった細胞の自己組織化を可能とし、ES細胞やiPS細胞などの多能性幹細胞を用いた再生医療への応用が現実的になってきている。iPS細胞は、細胞自身が三次元的な周囲環境を認知し、物理的因子および自身が分泌する因子を有効活用する自己組織化によって、特定の組織や器官にまで分化できる可能性がある。本研究で得られたこれらを制御する技術は、バイオエンジニアリングを基盤としたこれからの再生医療の発展に重要な役割を果たすことが期待される。

研究成果の概要(英文)：This study revealed that mouse iPS cells could control the size of the spheroids using micro well plates with different sizes and shapes by the number of seeded cells. As the result of observing the internal structure of the spheroids in each size, the spheroids of the small size was composed of a single structure. On the other hand, as the spheroids size increased, these spheroids was composed of a two-layered structure, and the central part may be caused in necrosis. The induction of osteogenic differentiation of iPS cell spheroids revealed that the reactivity of the compounds and self-assembly differed depending on the spheroids size.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：再生医療

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

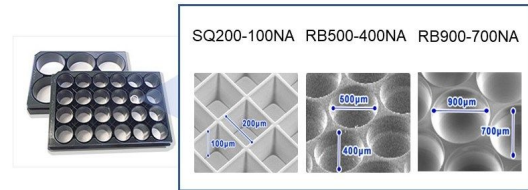
“万能細胞”と呼ばれる iPS 細胞は、培養環境さえ整えば、細胞集合体 (スフェロイド) を経た自己組織化によって、試験管内で組織や器官に分化する可能性を秘めている。スフェロイドのサイズは分化に大きな影響を与えるが、その詳細は不明な点が多い。申請者らはこれまでに、三次元振盪培養を用いて iPS 細胞を細胞塊で分化誘導することで骨様組織に誘導できたことから、至適サイズに培養した均一な iPS 細胞スフェロイドに小分子化合物を応用することで、自己組織化した大量の骨様組織を試験管内で作製するバイオエンジニアリングを着想した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、サイズコントロールを行って作製する iPS 細胞スフェロイドおよび、これにケミカルバイオロジーを応用した新たな三次元培養・分化誘導方法を用いることによって、iPS 細胞の骨組織への自己組織化誘導技術を基盤とする新たな骨造成技術を開発することである。

3. 研究の方法

(1) 空間形状が付与されたサイズの異なる丸底プレート (100-1000 μm; Elplasia, クラレ社: 右図) を用いてマウス iPS 細胞 (研究室所有) スフェロイドを作製した。作製したスフェロイドの均質性およびサイズを計測した。



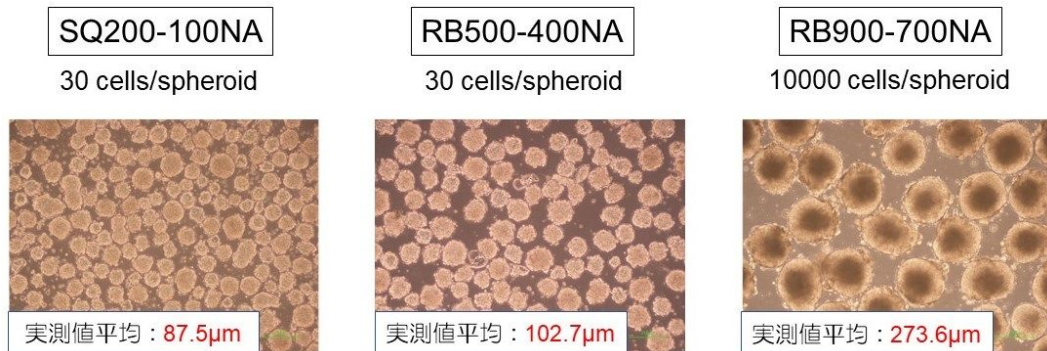
(2) 前項で作製した iPS 細胞スフェロイドの各サイズにおける内部構造の評価を HE 染色による組織学的観察、ならびに Live and Dead 染色を用いて行った。

(3) さらに iPS 細胞スフェロイドの各サイズにおける iPS 細胞の骨組織への自己組織化能を評価するため、レチノイン酸化合物を添加し、中胚葉分化特異的遺伝子の発現ならびに骨芽細胞分化特異的遺伝子の発現をリアルタイム RT-PCR 法を用いて確認した。

4. 研究成果

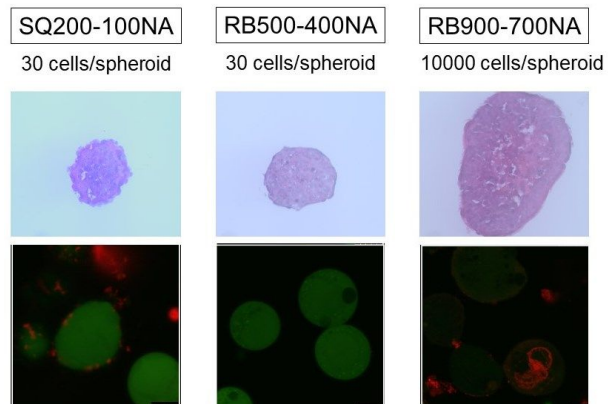
(1)

空間の大きさならびに形状の異なるマイクロ空間形状プレートを用いて、マウス iPS 細胞胚様体から細胞スフェロイドの作製を試みた結果、それぞれにおいてサイズの均一な細胞スフェロイドの形成が確認できた。さらに、播種細胞数によってスフェロイドのサイズをコントロールすることが可能であることが明らかとなった (下図)。



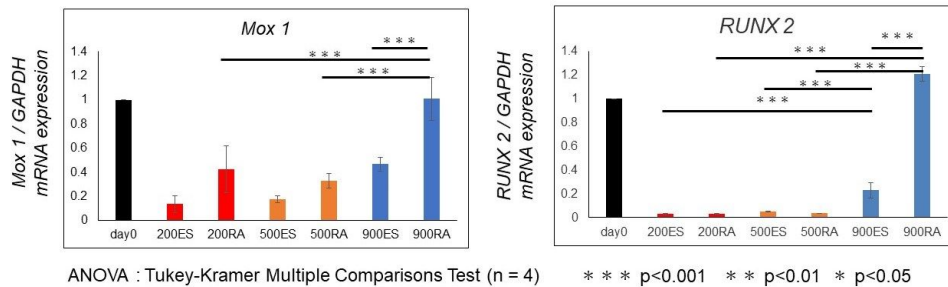
(2)

各サイズにおけるスフェロイドの内部構造を、HE 染色による組織学的観察ならびに、Live and Dead 染色による細胞生死観察による評価した結果、スフェロイドの小さいサイズにおいては単一な構造を認めたのに対し、スフェロイドのサイズが大きくなるにつれ、スフェロイド内部には 2 層構造を認め (右図上段: RB700-900), 中心部は壊死を起している可能性が示唆された (右図下段, 赤染色部)。



(3)

各サイズにおける iPS 細胞スフェロイドを骨芽細胞へ分化誘導を行い、分化に及ぼす影響を検討した。リアルタイム RT-PCR 解析の結果、誘導 4 日目において、サイズの大きいスフェロイドが有意に分化を促進したことから、スフェロイドのサイズによって化合物ならびに自己組織化の反応性が異なることが明らかとなった(下図)。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

1. Y. Bando, H. KAYASHIMA, S. Matsuoka, H. Tatsumi, H. Egusa, H. Yatani
Development of a New Evaluation Model for Extra-Vertical Bone Augmentation
96th IADR Poster Session.
2018/7/25-28
London (UK)

2. 畔堂佑樹、萱島浩輝、石本卓也、中野貴由、江草 宏、矢谷博文
外側性の垂直的骨造成モデルを用いた新生骨の多面的評価
第 40 回 バイオマテリアル学会
2018/11/12
神戸

〔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

特記事項なし

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：江草 宏

ローマ字氏名：EGUSA HIROSHI

所属研究機関名：東北大学大学院歯学研究科

部局名：分子・再生歯科補綴学分野

職名：教授

研究者番号(8桁): 30379078

研究分担者氏名：萱島 浩輝

ローマ字氏名：KAYASHIMA HIROKI

所属研究機関名：大阪大学

部局名：大学院歯学研究科

職名：助教

研究者番号（8桁）：50632121

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。