

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：24601

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16631

研究課題名(和文) 間葉系幹細胞の酸素濃度変化に着目した変形性膝関節症の病態解明

研究課題名(英文) The elucidation of osteoarthritic pathogenesis based on the modification of oxygen tension for mesenchymal stem cells

研究代表者

稲垣 有佐 (Inagaki, Yusuke)

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：60707529

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、幹細胞を用いて、低酸素環境から通常酸素環境への変化時の分子レベルの機序を通して変形性膝関節症の病態解明をおこなうことである。昨今の急速なiPS細胞研究の基盤整備を鑑み、実験対象細胞をヒトiPS細胞に変更した。

まず通常酸素下で骨分化誘導実験を行い、各評価で骨分化を確認した。遺伝子発現評価ではインターナルコントロール遺伝子として設定が重要であり、各候補遺伝子から解析ソフトにて、TATA box binding proteinが本実験系における最適な遺伝子と決定した。今後は酸素環境を調節し、ヒトiPS細胞骨分化能に対する酸素濃度の検証を継続していく予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

変形性膝関節症の組織学的特徴として、骨代謝亢進の結果、骨硬化・骨棘といった過剰な骨形成があげられ、多くの報告がされてきたが、その詳細な機序はまだ不明な点がある。研究代表者らは低酸素環境にて培養されたラット骨髄間葉系幹細胞が通常酸素環境に暴露されるとその骨形成能が大きく促進されることを報告した。本研究にて、ヒトiPS細胞の骨分化法を確立し、その遺伝子発現評価において、TATA box binding proteinを最適なインターナルコントロール遺伝子として決定したことは、今後酸素濃度を変化させヒトiPS細胞骨分化実験を継続していくうえで、学術的・社会的意義がある。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to elucidate the osteoarthritic pathogenesis based on the modification of oxygen tension for mesenchymal stem cells. The materials have been changed to human induced pluripotent stem cells(iPSCs) to utilize abundant research resources. First, the experimental system for the osteogenic differentiation of human iPSCs was established with the conventional oxygen tension. In the reverse transcription quantitative polymerase chain reaction of the system, TATA box binding protein (TBP) was chosen for the internal control gene based on four algorithms. The experiment continues with the modification of oxygen tension.

研究分野：整形外科学

キーワード：iPS細胞 骨分化 酸素濃度 変形性関節症

1. 研究開始当初の背景

変形性膝関節症(Knee Osteoarthritis: KOA)は、遺伝的素因に膝関節への力学的ストレスを中心とした多因子により発症し、関節軟骨を中心とした関節組織の変性により、膝関節の疼痛、可動域制限といった症状が出現する疾患であり、患者の Quality of life を大きく損なう。本邦における疫学調査からは有訴者 780 万人、単純 X 線によると 2530 万人が罹患していると推定され (Yoshimura et al., J Bone Miner Metab 2009)、疼痛による労働機会の損失や、人工膝関節置換術をはじめとした治療に伴う医療費の経済的負担は、その罹患患者数からは莫大なものとなり、社会的にも大変重要な課題である。

KOA の変化を病理組織学的にみると関節軟骨とその下に存在する軟骨下骨が複合的に変性することが挙げられる。具体的には軟骨内における骨化の亢進や、骨棘の形成などがおこり、それらによる軟骨の力学的環境の変化がさらなる軟骨の破壊を引き起こす (Glyn-Jones et al., Lancet 2015)。さらに骨芽細胞を介した破骨細胞誘導により、骨代謝亢進状態となり骨脆弱性を引き起こす。画像診断においては、magnetic resonance imaging: MRI で骨髄中の高信号は KOA の遷延する疼痛、さらには人工膝関節置換術の予測因子となることが報告され (Dore et al., Arthritis Res Ther 2010)、臨床領域では大変注目されている。

骨髄間葉系細胞 (mesenchymal stem cells: MSCs) は骨髄中に存在し、分化誘導刺激により、骨、軟骨、脂肪、線維組織など各組織へと分化能を有する。KOA における骨硬化・骨棘形成などの骨形成性変化は骨髄中の MSCs 動員によると考えられている。近年は軟骨下骨にも MSCs が存在し、骨髄 MSCs と比して高い骨形成能を有することが報告されている (Lian et al., J Mol Med 2017)。骨髄 MSCs が存在する、骨髄内ニッチの生理的な環境では酸素濃度は約 7% 程度と報告 (Harrison et al. Blood 2002) されており、この環境が、骨髄 MSCs の増殖能および幹細胞性維持に不可欠であるとされている。培養環境における酸素濃度の影響は、酸素自体が細胞培養の非常に根源的な条件であることより細胞の増殖、分化、代謝、細胞死など多岐に渡る。再生医療領域においては骨再生には通常酸素環境、一方、軟骨再生では低酸素環境が望ましいとされている (Inagaki et al. BMC Musculoskelet Disord 2014) が、その細胞源および培地成分を含めた培養環境の差によりいまだに議論の有るテーマである。本年、申請者らは低酸素環境にて培養されたラット MSCs が通常酸素環境に暴露されるとその骨形成能が大きく促進されることを報告した (Inagaki et al., WJ Stem Cell 2017)。

関節軟骨直下には石灰化軟骨による tide mark が存在し、軟骨と軟骨下骨を分離するとともに、軟骨と骨組織それぞれにとって適切な酸素濃度環境を維持している。MSCs が、骨粗鬆症変化や軟骨下骨脆弱性骨折などの微細構造の破綻とそれにともなう血管の侵入 (Shabestari et al., Osteoarthritis Cartilage 2016) 等により本来の低酸素環境から酸素濃度上昇に暴露されることにより、骨分化へと誘導され、さらに骨芽細胞を介した破骨細胞誘導により、骨代謝亢進状態となることが KOA における病態の一因となっていると予想される。

本研究の核心となる仮説は、「関節軟骨下の軟骨下骨および骨髄に存在する MSCs が、関節微細構造の破綻とそれにともなう血管の侵入等により、本来の低酸素環境から酸素濃度上昇に暴露され骨分化へと誘導、さらに骨芽細胞を介した破骨細胞分化誘導により、KOA における病態の一因となっている。」というものである。

2. 研究の目的

本研究の目的は MSCs 等を用いて、低酸素環境から通常酸素環境への変化時の分子レベルの機序を網羅的遺伝子解析し、KOA 病態解明を目指すことである。本研究は再生医療実用化を目的とした研究成果を病態解明に対して利用するという発想転換を行った点において、独自性があり創造的である。近年の induced pluripotent stem cells: iPSCs の利用を鑑みるに、細胞培養研究は治療目的のみならず、病態解明、診断目的にも有用であり、本研究は KOA のさらなる病態解明に、新たな知見をもたらすと考える。また定常的な酸素濃度ではなくその変化に着目する点においても新規性がある。

3. 研究の方法

当初、本研究に使用する幹細胞として、ヒト胚性幹細胞 (embryonic stem cells: ESCs)、ヒト MSCs を予定していたが、昨今の急速な iPS 細胞に関する研究基盤の整備を鑑み、実験対象細胞をヒト iPSCs に変更した。

過去の ESCs 骨分化誘導に関する先行研究など (Karp et al. Stem Cells 2006) をもとに iPSCs 骨分化誘導実験を行った。市販ヒト iPSCs をクランプ継代し、多能性を維持しつつ 80% コンフルエントまで増殖させた後、骨分化誘導培地 (Dulbecco's modified Eagle's medium, fetal bovine serum, 1% nonessential amino acids, 1% antibiotic-antimycotic mixed stock solution) にて分化誘導培養を行った。さらに 5 日目より 10 mM β -glycerophosphate, 50 μ g/ml l-ascorbic acid, 10 nM dexamethasone, 50 nM 1,25-(OH)₂ vitamin D3 を添加し 28 日まで継続培養した。

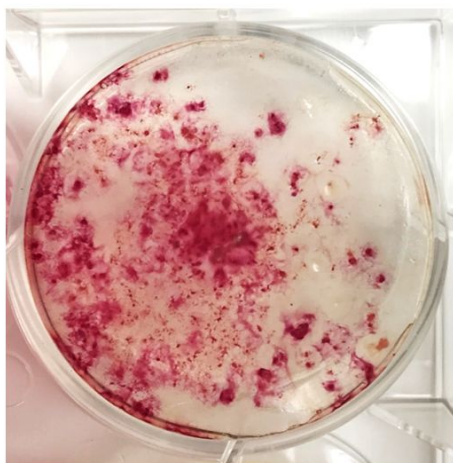
骨分化の評価を形態観察、alkaline phosphatase: ALP 染色、Alizarin red S 染色、遺伝子発

現等で行った。quantitative polymerase chain reaction: qPCR により幹細胞性遺伝子(POU class 5 homeobox 1: POU5F1, Nanog homeobox: NANOG)および骨分化関連遺伝子(Alkaline phosphatase: ALP, Osteocalcin: OC, Dentin matrix acidic phosphoprotein 1: DMP1, Sclerostin: SOST, Runt related transcription factor 2: RUNX2, Sp7: SP7, Collagen type I alpha 1: COL1A1)の発現評価にあたりインターナルコントロール遺伝子の設定が重要であり、 Δ Ct method, BestKeeper, NormFinder, geNorm の algorithm に従って、インターナルコントロール候補遺伝子(actin, beta: ACTB, beta-2-microglobulin: B2M, glucose-6-phosphate dehydrogenase: G6PD, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: GAPDH, glucuronidase, beta: GUSB, hydroxymethylbilanesynthase: HMBS, hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1: HPRT1, phosphoglycerate kinase 1: PGK1, ribosomal protein L13a: RPL13A, ribosomal protein, large,P0: RPLP0, ribosomal protein S18: RPS18, TATA box binding protein: TBP, transferrin receptor: TFRC, 14-3-3 protein, zeta polypeptide: YWHAZ)の発現安定性を評価した。

4. 研究成果

形態観察において、骨分化誘導群では細胞外基質の産生・ハイドロキシアパタイトの沈着を認め、ALP 染色、Alizarin red S でも染色陽性であった。(下 図 1)

図1 ヒトiPSCs 通常酸素環境下 骨分化誘導培養 28日目



ALP 染色



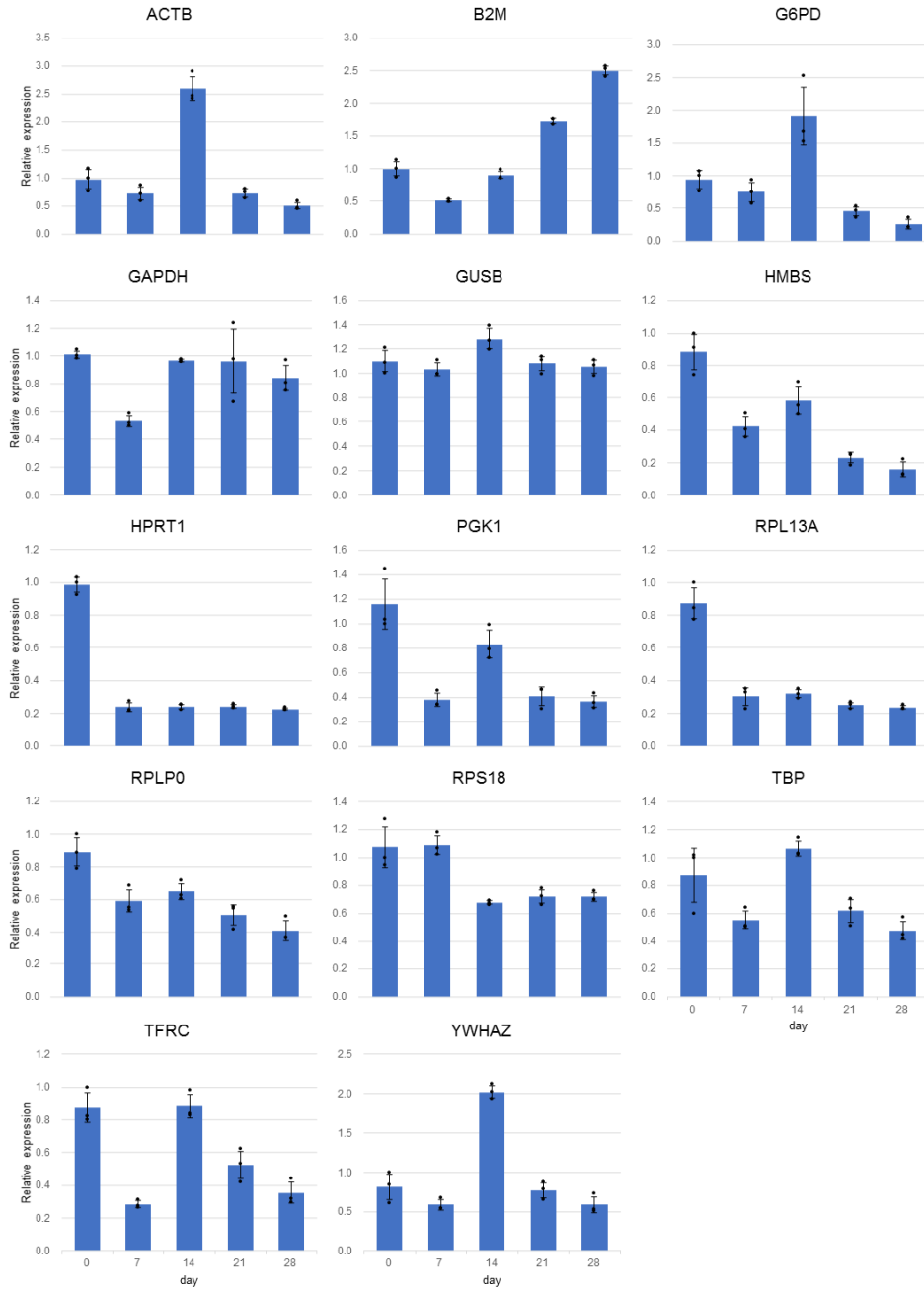
Alizarin Red S 染色

また幹細胞性遺伝子(POU5F1, NANOG)の経時的な減少と骨分化関連遺伝子(OC, DMP1, SOST, RUNX2, SP7, COL1A1)の発現亢進を認め、適切な骨分化誘導培養を行うことにより、通常酸素環境でヒト iPSCs の骨分化誘導が確認できた。

各インターナルコントロール候補遺伝子から Δ Ct method, BestKeeper, NormFinder, geNorm の algorithm に従って、発現安定性を評価したところ TBP が本実験系における最適な遺伝子と決定し(次項 図 2)、報告(Okamura et al. Sci Rep 2020)した。このことは、各々の実験デザインに適したインターナルコントロール遺伝子を選択するために、各候補遺伝子の発現安定性評価をその都度行う必要性を示唆した。

上記結果をもとに、当初の研究計画通り、ヒト iPSCs を低酸素環境に馴化し、骨形成培養実験を継続している。今後、KOA 病態解明にむけて、ヒト iPSCs 骨分化能に対する酸素濃度の影響を検証していく予定である。

図2 ヒトiPSCs 骨分化誘導培養中の
 インターナルコントロール候補遺伝子経時的発現



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Egawa Takuya	4. 巻 20
2. 論文標題 Silicate-substituted strontium apatite nano coating improves osteogenesis around artificial ligament	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BMC Musculoskelet Disord	6. 最初と最後の頁 396
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12891-019-2777-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 稲垣 有佐	4. 巻 93
2. 論文標題 骨形成細胞シートを用いた移植腱骨孔間治癒の促進(解説)	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本整形外科学会雑誌	6. 最初と最後の頁 1091-1097
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 稲垣 有佐	4. 巻 71
2. 論文標題 整形トピックス 骨形成細胞シートによる移植腱骨孔間治癒の促進(解説)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 整形外科	6. 最初と最後の頁 138
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Okamura Kensuke, Inagaki Yusuke, Matsui Takeshi K., Matsubayashi Masaya, Komeda Tomoya, Ogawa Munehiro, Mori Eiichiro, Tanaka Yasuhito	4. 巻 10
2. 論文標題 RT-qPCR analyses on the osteogenic differentiation from human iPS cells: an investigation of reference genes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 11748
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-68752-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kawasaki Sachiko、Inagaki Yusuke、Akahane Manabu、Furukawa Akira、Shigematsu Hideki、Tanaka Yasuhito	4. 巻 21
2. 論文標題 In vitro osteogenesis of rat bone marrow mesenchymal cells on PEEK disks with heat-fixed apatite by CO2 laser bonding	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMC Musculoskeletal Disorders	6. 最初と最後の頁 692
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12891-020-03716-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 赤羽 学
2. 発表標題 骨形成促進作用を持つ人工骨の開発に向けた新規アパタイトの効果
3. 学会等名 第34回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉良 務
2. 発表標題 ケイ酸ストロンチウムアパタイトコーティングによる人工骨への骨新生能付与の試み
3. 学会等名 第34回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 稲垣 有佐
2. 発表標題 酸素濃度変化に着目したヒトiPS細胞による骨再生の試み
3. 学会等名 第38回整形外科バイオマテリアル研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 稲垣 有佐
2. 発表標題 変形性関節症病態解明にむけた酸素濃度変化に着目したヒトiPS細胞骨分化の試み
3. 学会等名 第32回日本軟骨代謝学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 杉本 啓紀
2. 発表標題 ストロンチウムアパタイトコーティングによる リン酸三カルシウム骨誘導能付与
3. 学会等名 第135回中部日本整形外科災害外科学会・学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 稲垣 有佐
2. 発表標題 革新的医療機材開発 ストロンチウムアパタイトコーティングによる生体材料骨形成能促進
3. 学会等名 第135回中部日本整形外科災害外科学会・学術集会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岡村 建祐
2. 発表標題 ヒトiPS細胞の骨分化誘導実験において逆転写-定量的リアルタイムPCR(RT-qPCR)に使用する参照遺伝子の比較検討
3. 学会等名 第35回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 杉本 啓紀
2. 発表標題 ストロンチウムアパタイトコーティングによる人工骨の骨新生促進効果
3. 学会等名 第35回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2020年

〔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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関