

令和 4 年 5 月 20 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09598

研究課題名(和文) iPS細胞由来骨芽細胞系細胞の特性および機能解析に基づいた骨形成制御機構の解明

研究課題名(英文) Characterization of iPS cells-derived osteoblast lineage cells and elucidating the control mechanism of bone formation based on functional analysis

研究代表者

宮本 諭 (miyamoto, satoshi)

大阪大学・医学系研究科・特任研究員

研究者番号：40239439

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、確立したiPS細胞から骨芽細胞系細胞への分化誘導法により作製された骨芽細胞系細胞について、どの分化段階にあるのか、また遺伝子発現などを含めた細胞の特性を既存の骨芽前駆細胞および成熟骨芽細胞株との対比を行い、分化段階とその特性を明らかにした。多能性を有するiPS細胞レベルから骨芽細胞系細胞へ分化誘導する過程で働く、骨分化および骨形成を制御する可能性が高い新規因子の発現抑制を行うだけでなく、さらには遺伝子改変マウスを作製し、研究を実施した。これによりHoxb遺伝子クラスター内に存在するlncRNAが骨芽細胞分化と成長後の骨質を左右する因子となり得ることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本申請研究では、代表者らが確立した骨芽細胞分化法により作製した骨芽細胞系細胞の特性と分化段階など位置づけを明らかにすることを目的とした研究である。分化誘導作製した骨芽細胞系細胞の特性は明らかにされたが、さらなる安全面での評価と安全性の追求が必要であると考えられた。このため多能性をもつiPS細胞レベルから骨芽細胞分化に至る過程を制御調節すると考えられる新しい因子の探索と機能解析が必要であった。近年、骨・軟骨の再生医療研究、あるいは骨代謝研究が盛んであり、本研究はそれらの領域において新たな展開もたすことが予想され、学術的意義が高いと考える。

研究成果の概要(英文)：The specific aim in this research project was to provide for determining the differentiation stage of osteoblast. The characterization of osteoblast lineage cell was revealed by this study, however, the method for preparing osteoblast lineage cells from iPS cells would be required to further improve safety without tumorigenesis. Therefore, our research project was to elucidate for a new metabolic-related factors and require functional analysis for osteoblastic differentiation. These findings in vitro and in vivo analysis suggest the existence of regulating new mechanism of bone metabolism.

研究分野：細胞組織学、骨代謝学、骨芽細胞分化

キーワード：骨芽細胞、iPS細胞、骨芽細胞分化、骨形成、レプチン受容体、ノンコーディングRNA、ノックアウトマウス、制御メカニズム

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、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

iPS 細胞から骨芽細胞への分化誘導を行った研究の多くは、その誘導法による iPS 細胞レベルと分化後の対比を行い、遺伝子発現解析を行ったものであり、作製した骨芽細胞系細胞の特性についてはこれまで十分に調べられていなかった。本研究代表者は、これまで iPS 細胞から骨芽細胞への分化誘導を高効率、かつ安全に実施するためにプロトコルの確立と最適化を行い、基礎的検討を重ねてきた。研究を実施する中で作製した骨芽細胞系細胞は、分化過程の中で時空間的にどのような位置づけになるのか、また分化誘導された骨芽細胞系細胞の特徴はどういった点にあるのか、果たして骨再生能は有するのか、また安全性はどうか、という疑問をかねてから有していた。本研究の課題として、「分化誘導培地を添加したから骨芽細胞へ分化している」のではなく、「確立した分化誘導系により、どの分化段階にある骨芽細胞系細胞が作製できたのか」、また「作製された骨芽細胞系細胞の特性を明らかにする」などの点があげられる。さらに研究代表者は、骨形成に関わる因子の多くが組織幹細胞である骨髄間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化段階で見出されてきた背景を考慮し、多能性を有する iPS 細胞から骨芽細胞への分化段階においては、「骨芽細胞分化ならびに骨形成に関わる新規制御因子が存在する可能性が高い」を仮説として、新しい制御メカニズム解明に向けて研究を実施した。

## 2. 研究の目的

多能性を有する iPS 細胞から骨芽細胞系細胞 (OLC) への独自の分化誘導法を確立した。本分化誘導法により作製した骨芽細胞系細胞 (OLC) がどのようなステータス、すなわち分化段階にあるのかについて、既存の骨芽前駆細胞株 (MC3T3-E1) 成熟骨芽細胞 ~ 骨細胞株 (IDG-SW3) との対比を行うことで明らかにすることにした。また同時に、作製した骨芽細胞系細胞 (OLC) の特性として、どのような発現マーカーが存在するのかを明らかにするため発現解析を行った。さらに作製した骨芽細胞系細胞 (OLC) が骨形成能と安全性を有するかについて、免疫不全マウスを用いて細胞の皮下移植を行い、評価した。本研究では、とくに多分化能を有する iPS 細胞レベルから OLC 作製までの分化過程における遺伝子動態に着目し、骨形成を制御する新しいメカニズムを解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

京都大学 iPS 細胞研究所から提供されたマウス iPS 細胞株 (iPS-MEF-Ng-20D-17) を用いて、独自に確立した骨芽細胞への分化誘導プロトコルに従い、骨芽細胞系細胞 (OLC) を作製し、マウス骨芽前駆細胞 (MC3T3-E1) および成熟骨芽細胞 ~ 骨細胞株 (IDG-SW3) との対比を行い、アリザリンレッド染色あるいは Von Kossa 染色により石灰化結節 (bone nodule) 形成と遺伝子発現について解析した。これらの細胞について骨芽細胞への分化誘導を行い、透過型電子顕微鏡により観察した。網羅的遺伝子発現解析ならびに定量 PCR 解析の結果、MC3T3-E1 の骨分化誘導を行うと、Hoxb 遺伝子の発現上昇が認められるだけでなく、クラスター内の特定の lncRNA が発現上昇を示すことが分かった (図 1, 2)。

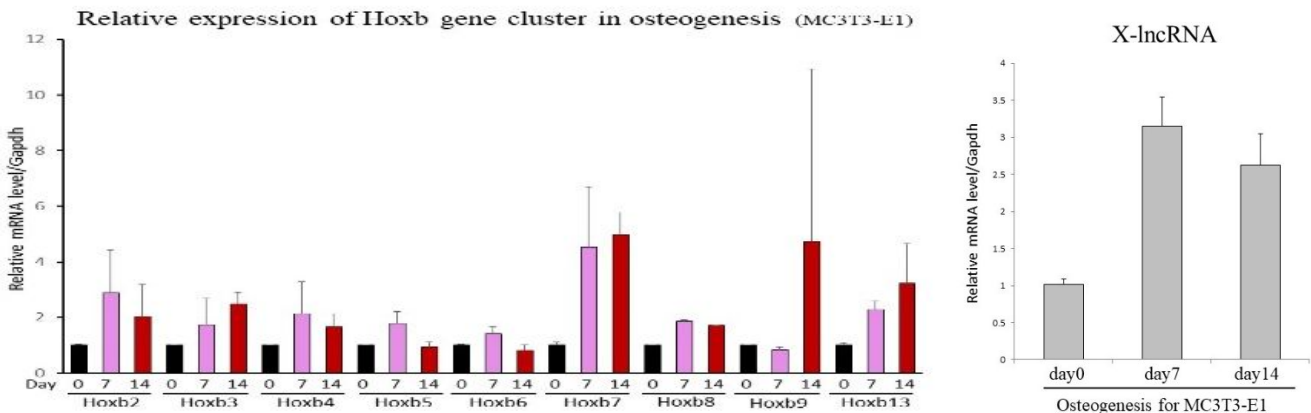


図1. Hoxb 遺伝子クラスター内の経時的遺伝子発現

図2. lncRNA の遺伝子発現

このことから骨分化および骨形成制御因子と考えられた二つの Hoxb-lncRNA および X-lncRNA について、siRNA による遺伝子発現抑制により石灰化結節形成ならびに遺伝子発現解析を行った。さらに、このうちの X-lncRNA の発現抑制を行うと IDG-SW3 では石灰化結節形成が減少することが明らかとなった (図3)。

X-lncRNA が骨分化ならびに骨形成の新規制御因子である可能性が高いという仮説を立て、この lncRNA-KO マウスを群馬大学の研究協力者らと作製し、大腿骨、脛骨および頭蓋骨について、マイクロCTによる骨形態計測と表現型解析を行った。

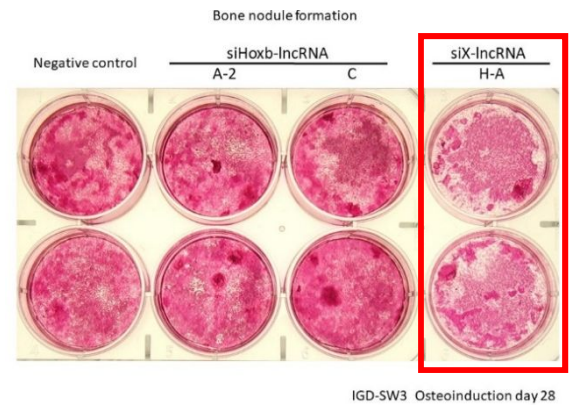


図3. siRNA による石灰化形成の減少

#### 4. 研究成果

マウス iPS 細胞 (20D-17) から分化誘導を行い作製した骨芽細胞系細胞 (OLC) の特性について解析を行ってきた。その結果、OLC は骨芽前駆細胞 (MC3T3-E1) を骨芽細胞分化 day14 まで行った早期段階に比較して、遺伝子発現傾向では後期段階の成熟骨芽細胞 (IDG-SW3) より前段階の骨芽細胞系細胞 (MC3T3-E1 < OLC < IDG-SW3) と位置付けられる一方で、透過型電子顕微鏡による形態観察所見では、OLC と IDG-SW3 は、石灰化に先立ち ECM を盛んに分泌しており、同一の段階にある活動型の骨芽細胞と考えられた。

骨分化にともない OLC は MC3T3-E1 と同様に ALP、Podoplanin、Sp7 を発現し、内軟骨性骨化様分化を呈することを明らかにしていたが、骨芽前駆細胞 MC3T3-E1、あるいは成熟骨芽細胞から骨細胞様細胞 IDG-SW3 とは異なり、骨芽細胞と脂肪細胞に分化する骨髄間葉系細胞で確認されているレプチン受容体を高発現する特性をもつことが明らかになった (図4)。

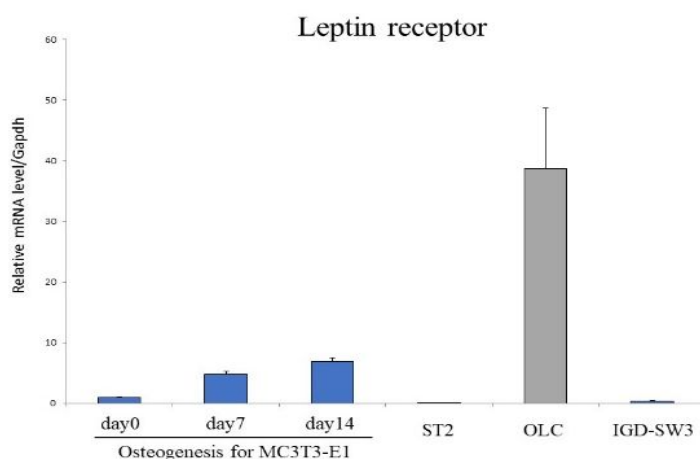


図4. 細胞種、分化段階の違いによるレプチン受容体

OLC への分化誘導時に Hoxb 遺伝子群が特異的な発現傾向を示すこと、また Hoxb 遺伝子間に存在する分化初期段階で発現上昇する長鎖ノンコーディング RNA (lncRNA) を確認した。この着目した lncRNA 遺伝子の発現傾向は、Hoxb 遺伝子群と同一傾向を示したことから、lncRNA 遺伝子について、siRNA による発現抑制を行ったところ、石灰化結節形成が減弱されるだけでなく、下流の骨分化関連遺伝子を調節していることが示された。そこで骨芽細胞分化を上流で調節すると考えられる X-lncRNA 遺伝子のノックアウトマウスを作製し、表現型解析を行ったところ、成長期の骨形成に異常はきたさないものの老齢化 (26 週齢) にともない石灰化形成が脆弱となる所見が示された (図5, 6, 7)。不思議なことに lncRNA-KO マウス成長板直下の遠位部の骨梁形成は増加傾向になるのに対し、皮質骨では菲薄化を生じている可能性があり、骨の石灰化形成に関与する新規制御因子である可能性が高いと考える。

表現型解析を行ったところ、成長期の骨形成に異常はきたさないものの老齢化 (26 週齢) にともない石灰化形成が脆弱となる所見が示された (図5, 6, 7)。不思議なことに lncRNA-KO マウス成長板直下の遠位部の骨梁形成は増加傾向になるのに対し、皮質骨では菲薄化を生じている可能性があり、骨の石灰化形成に関与する新規制御因子である可能性が高いと考える。

Phenotype of WT and IncRNA-KO mouse (26 weeks-old)

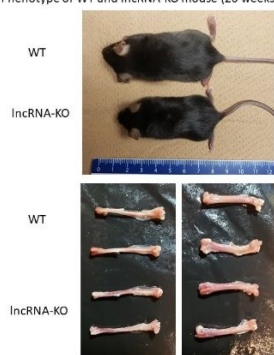


図5. IncRNA-KO マウス

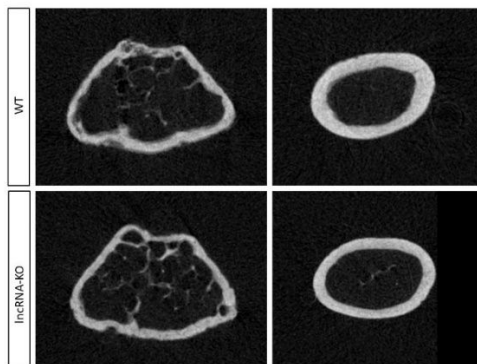


図6. マイクロCT (WT vs IncRNA-KO)

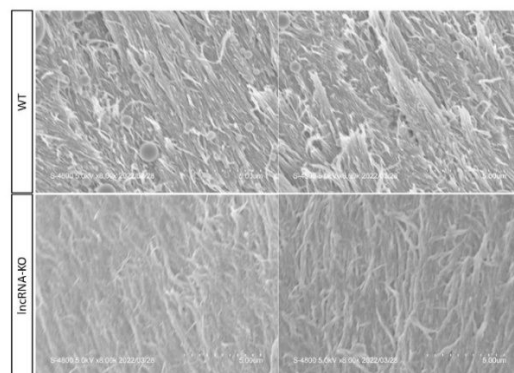


図7. 上腕骨断面SEM像 (WT vs IncRNA)-KO)

## まとめ

ES細胞と同様にiPS細胞は無限の増殖能をもつことから、安全かつ高効率に分化誘導を行い、骨芽細胞が作製できれば、臨床において大きな骨欠損に対する再生医療への応用が期待されている。しかし、研究代表者らが基礎的検討を積み重ねて確立した骨芽細胞の分化誘導法だけでなく、他の有用性が高い手法をもってしても100%安全な骨芽細胞系細胞だけが得られるかと言えば現時点では難しいと考える。一方で、骨形成や骨分化において、新規制御因子と考えられるIncRNAによる骨形成制御メカニズムがさらに解明されれば、骨形成、骨代謝の研究領域において新たな局面と展開を生じることが予想される。今後さらに研究が進むことで新規制御因子による高効率かつ安全で確実な骨芽細胞系細胞への分化誘導法の確立への応用が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 10件）

1. 著者名 Kiyohara E, Tanemura A, Sakura K, Nakajima T, Myoui A, Yamazaki N, Kiyohara Y, Katayama I, Fujimoto M, Kaneda Y.	4. 巻 5
2. 論文標題 A phase I dose-escalation, safety/tolerability, and preliminary efficacy study of the intratumoral administration of GEN0101 in patients with advanced melanoma.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Immunol Immunother	6. 最初と最後の頁 s00262-03122
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00262-021-03122-z	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 Satoshi Miyamoto, Hideki Yoshikawa, Ken Nakata	4. 巻 15
2. 論文標題 Axial mechanical loading to ex vivo mouse long bone regulates endochondral ossification and endosteal mineralization through activation of the BMP-Smad pathway during postnatal growth	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bone Reports	6. 最初と最後の頁 101088
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bonr.2021.101088	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 Outani H, Hamada K, Yasuda N, Ueda T, Myoui A, Yoshikawa H, Okada S.	4. 巻 20
2. 論文標題 Impact of surgical resection on survival in patients with metastatic soft tissue sarcoma and comparison between synchronous and metachronous metastases	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Orthop Sci.	6. 最初と最後の頁 S0949-2658
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jos.2021.03.013.	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 Nakai S, Yamada S, Outani H, Nakai T, Yasuda N, Mae H, Imura Y, Wakamatsu T, Tamiya H, Tanaka T, Hamada K, Tani A, Myoui A, Araki N, Ueda T, Yoshikawa H, Takenaka S, Naka N.	4. 巻 10(1)
2. 論文標題 Author Correction: Establishment of a novel human CIC-DUX4 sarcoma cell line, Kitra-SRS, with autocrine IGF-1R activation and metastatic potential to the lungs	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Science Report	6. 最初と最後の頁 684
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-55752-0	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 Takenaka S, Araki N, Ueda T, Kakunaga S, Imura Y, Hamada KI, Outani H, Naka N, Myoui A, Yoshikawa H.	4. 巻 30
2. 論文標題 Clinical Outcomes of Osteoarticular Extracorporeal Irradiated Autograft for Malignant Bone Tumor	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sarcoma	6. 最初と最後の頁 9672093
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2020/9672093.	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 Kiyohara E, Tanemura A, Nishioka M, Yamada M, Tanaka A, Yokomi A, Saito A, Sakura K, Nakajima T, Myoui A, Sakurai T, Kawakami Y, Kaneda Y, Katayama I.	4. 巻 29
2. 論文標題 Intratumoral injection of hemagglutinating virus of Japan-envelope vector yielded an antitumor effect for advanced melanoma: a phase I/IIa clinical study	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Immunol Immunother.	6. 最初と最後の頁 9672093
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00262-020-02509-8	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 Saitou H, Nakatani D, Myoui A, Kubota T, Ozono K.	4. 巻 69
2. 論文標題 Pediatric drug development in Japan: Current issues and perspectives.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clin Pediatr Endocrinol.	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1297/cpe.29.1	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 Nakai S, Tamiya H, Imura Y, Nakai T, Yasuda N, Wakamatsu T, Tanaka T, Outani H, Takenaka S, Hamada K, Myoui A, Araki N, Ueda T, Yoshikawa H, Naka N.	4. 巻 19
2. 論文標題 Eribulin Suppresses Clear Cell Sarcoma Growth by Inhibiting Cell Proliferation and Inducing Melanocytic Differentiation Both Directly and Via Vascular Remodeling	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Mol Cancer Ther.	6. 最初と最後の頁 742-754
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/1535-7163.MCT-19-0358	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 Hashimoto Y, Nishida Y, Takahashi S, Nakamura H, Mera H, Kashiwa K, Yoshiya S, Inagaki Y, Uematsu K, Tanaka Y, Asada S, Akagi M, Fukuda K, Hosokawa Y, Myoui A, Kamei N, Ishikawa M, Adachi N, Ochi M, Wakitani S.	4. 巻 11
2. 論文標題 Transplantation of autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells under arthroscopic surgery with microfracture versus microfracture alone for articular cartilage lesions in the knee: A multicenter prospective randomized control clinical trial.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Regen Ther.	6. 最初と最後の頁 106-113
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.reth.2019.06.002.	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 Oka K, Tanaka H, Okada K, Sahara W, Myoui A, Yamada T, Yamamoto M, Kurimoto S, Hirata H, Murase T.	4. 巻 17
2. 論文標題 Three-Dimensional Corrective Osteotomy for Malunited Fractures of the Upper Extremity Using Patient-Matched Instruments: A Prospective, Multicenter, Open-Label, Single-Arm Trial	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Bone Joint Surg Am.	6. 最初と最後の頁 710-721
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2106/JBJS.18.00765.	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 該当する

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 宮本 諭、吉田 清志、岡本美奈、吉川 秀樹、名井 陽
2. 発表標題 マウスiPS細胞由来骨芽細胞系前駆細胞の骨形成能
3. 学会等名 日本再生医療学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 R. Orito, S. Miyamoto, K. Yoshida, A. Myoi
2. 発表標題 Hoxb5-mediated inactivation of ERK pathway is required to promote early osteogenesis
3. 学会等名 Annual Orthopaedic Research Meeting of the Japanese Orthopaedic Association
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
研究分担者	名井 陽  (Myoui Akira)  (10263261)	大阪大学・医学部附属病院・教授   (14401)	
研究分担者	吉田 清志  (Yoshida Kiyoshi)  (50645570)	大阪大学・医学系研究科・助教   (14401)	
研究分担者	岡本 美奈  (Okamoto Mlna)  (50457008)	大阪大学・医学部附属病院・助教   (14401)	
研究分担者	吉川 秀樹  (Yoshikawa Hideki)  (60191558)	大阪大学・医学系研究科・理事・副学長   (14401)	

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
---------	---------