

令和 5 年 10 月 26 日現在

機関番号：32650

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K19176

研究課題名（和文）末梢血由来iPS細胞の骨再生療法を目指した基礎的研究

研究課題名（英文）Basic study of the bone regeneration therapy using induced pluripotent stem cells derived from human peripheral blood cells

研究代表者

加藤 宏 (Kato, Hiroshi)

東京歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：10755036

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）：本研究はヒト末梢血血液細胞から樹立したiPS細胞を活用した低侵襲な骨再生療法の開発を目指すものである。本研究期間では、健康人の末梢血由来血液細胞からiPS細胞の樹立に成功し、骨芽細胞誘導を行うことができた。その後に行った動物実験はラットの頭蓋骨欠損モデルを使用した。足場材料はアテロコラーゲンを使用し、足場のみの移植群では骨新生がほとんどないのに対し、細胞・足場移植群では骨新生を確認することができた。組織学的な評価でも、新生骨はliving boneと考えられ、移植細胞は骨形成能を有することが示唆された。また、移植に伴う感染や腫瘍形成といった有害事象は認めなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでに末梢血血液細胞由来iPS細胞から骨芽細胞誘導を行った報告はみられないことから、本研究では、末梢血血液細胞から樹立したiPS細胞を骨芽細胞誘導し、骨形成能を有することをin vitroおよびin vivoにて評価した。末梢血採取という比較的侵襲が小さく・簡便な手技にて細胞を取得し、それをiPS細胞とする方法は、幹細胞取得手技としては低侵襲な方法である。本研究方法を応用することで、外科処置が困難な小児患者においても適用が可能な低侵襲な骨再生療法の樹立が可能となる。

研究成果の概要（英文）： This study aims to develop a minimally invasive bone regeneration therapy utilizing iPS cells established from human peripheral blood cells. In this research, we succeeded in establishing iPS cells from peripheral blood cells of healthy individuals and inducing osteoblasts. Animal experiments were performed using the rat calvaria bone defect model. We used the atelocollagen as scaffold. While there was almost no osteogenesis in the scaffold-only group, osteogenesis was confirmed in the cell/scaffold transplant group. Histological evaluation also showed that the new bone was considered to be living bone, suggesting that the transplanted cells had osteoinductive ability. No adverse events such as infection or tumor formation were observed.

研究分野：口腔外科

キーワード：iPS細胞 骨芽細胞 骨再生 末梢血

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

iPS 細胞はその性質から再生医療における材料としての利用が期待され、現在では実用に向けた取り組みが加速し、臨床研究も多く行われている。しかしながら、骨再生医療においてはまだ臨床研究には至っていない。現在までに様々な細胞からの樹立手技が確立されており、血液細胞からも iPS 細胞を樹立することが可能である。低侵襲な骨再生療法の確立において末梢血由来 iPS 細胞は有用であると考えられるが、末梢血由来 iPS 細胞から誘導した骨芽細胞が骨組織再生治療におけるポテンシャルをどの程度有するのかは不明であった。

### 2. 研究の目的

本研究では、末梢血由来 iPS 細胞から誘導した骨芽細胞の機能解析を *in vitro* および *in vivo* にて行い、骨組織再生治療のドナー細胞としての有用性の評価を目的とした。

### 3. 研究の方法

- (1) 健常者から採取した末梢血から Ficoll 法を用いて単核球を取得し、その後リンホカイン活性化キラー(LAK)細胞を選択的に取得した。LAK 細胞にセンダイウィルスベクターを用いて初期化 4 因子(Klf-4,Oct3/4,Sox2,c-Myc)を導入し、iPS 細胞を樹立した。
- (2) 得られたヒト血液由来 iPS 細胞を申請者が以前に報告した骨芽細胞誘導方法に準じて骨芽細胞誘導を行い、骨芽細胞マーカーの発現を Real Time PCR 法にて評価し、アリザリンレッド染色にて骨形成能を評価した。
- (3) ノードラットの頭蓋骨骨欠損モデルに足場材料とともに移植して、生体内における骨形成能を画像的・組織学的に評価した。

### 4. 研究成果

- (1) 研究計画書・本学倫理申請書に従って、同意を頂いた 32 歳の健常人から末梢血を採取した。Ficoll 法を用いて単核球を分離し、試薬を添加した血液培地を用いて LAK 細胞を選択的に取得した。得られた細胞は、センダイウィルスベクターを用いて初期化遺伝子導入を行い、iPS 細胞の樹立を行った。線維芽細胞から樹立した場合とほぼ同様で、センダイウィルス感染後約 30 日でヒト ES 細胞様コロニーの出現を多数確認した。樹立した iPS 細胞はアルカリホスファターゼ染色にて陽性反応を示し、未分化マーカー・多分化マーカーが RT-PCR 法にて検出された。また、テラトーマ形成により組織学的に外胚葉・中胚葉・内胚葉の 3 胚葉分化が観察され、多分化能を認めた。
- (2) 誘導骨芽細胞は Real Time PCR 法により、タイプ コラーゲン、アルカリホスファターゼ、RUNX 2 などの骨芽細胞マーカーの発現上昇を認めた。誘導 30 日後にはアリザリンレッド染色に陽性反応を示し、硬組織誘導能も示唆された。
- (3) 細胞移植実験として、ラットの頭蓋骨骨欠損モデルにおいて骨新生を確認した。マイクロ CT における画像所見として、細胞を移植しない群は新生骨の形成をほとんど認めないのに対し、細胞移植群では骨欠損部周辺からの新生骨形成だけでなく、中心部においても硬組織形成が認められた。また、組織学的評価(H-E 染色・トルイジンブルー染色)にて、移植により形成された硬組織は板状構造を示し、内部には骨細胞が存在し、表面には lining cell の存在を認めた。これらの所見により新生骨が成熟骨で living bone であることが考えられた。

(4) 新生骨は成熟骨で living bone と考えられたが、移植に伴う感染や腫瘍形成といった有害事象の検討が不十分であったため、上記実験動物モデルを使用して、誘導骨芽細胞を移植群の予後検討を行ったが、明らかな有害事象は認めることはなかった。

本研究にて、末梢血 iPS 細胞から骨芽細胞誘導が可能であることが示唆された。骨形成能を有することから、今後の骨再生医療のドナーとしての有用性が示された。

## 5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Akira Watanabe, Shuji Yoshida, Hiroshi Kato, Takaharu Ariizumi, Masayuki Takano	4. 巻 8
2. 論文標題 Practical Orthognathic Surgery Approach to the Old Bilateral Mandibular Condylar Head Fractures	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Surgery	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.29011/2575-9760.001707	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 渡邊 章, 柴野 正康, 吉田 秀児, 加藤 宏, 高野 正行	4. 巻 122
2. 論文標題 顎骨疾患プロジェクトからの情報発信 口唇裂・口蓋裂の原因遺伝子の追究	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 歯科学報	6. 最初と最後の頁 399-403
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 Kato Hiroshi, Watanabe Katsuhito, Saito Akiko, Onodera Shoko, Azuma Toshifumi, Takano Masayuki	4. 巻 30
2. 論文標題 Bone regeneration of induced pluripotent stem cells derived from peripheral blood cells in collagen sponge scaffolds	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Applied Oral Science	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1590/1678-7757-2021-0491	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 Osaka Ryuta, Kato Hiroshi, Hamada Yuji, Fujimoto Yasuhiro, Mizusawa Nobuhito, Watanabe Daisuke, Kaneko Akihiro	4. 巻 -
2. 論文標題 Clinicostatistical analyses of medication related osteonecrosis of the jaws (MRONJ): Evaluation of the treatment method and prognosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oral Science International	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/osi2.1098	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 Kato Hiroshi, Watanabe Akira, Takano Masayuki, Yoshida Mitsutaka, Yajima Yasutomo, Shibahara Takahiko	4. 巻 32
2. 論文標題 A case of maxillary partial aseptic necrosis after Le Fort I osteotomy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology	6. 最初と最後の頁 53 ~ 56
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajoms.2019.08.002	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 -

[学会発表] 計5件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 間奈津子, 大野建州, 中村貴, 齋藤暁子, 小野寺晶子, 加藤宏, 青木栄人, 東俊文
2. 発表標題 Hajdu-Cheney 症候群疾患特異的iPS細胞を用いた破骨細胞分化誘導
3. 学会等名 第54回日本臨床分子形態学会総会・学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 加藤 宏, 渡邊 章, 小郷直之, 有泉高晴, 大野啓介, 吉田秀児, 片倉 朗, 高野正行
2. 発表標題 顎矯正手術後の顎骨治癒不全に対して再建手術を行った2例
3. 学会等名 第30回日本顎変形症学会総会・学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 加藤 宏, 渡邊豪士, 長谷川大悟, 東 俊文, 高野正行
2. 発表標題 iPS細胞を利用した顎骨再生療法の開発と疾患特異的iPS細胞の活用
3. 学会等名 第66回日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 加藤 宏
2. 発表標題 ヒト末梢血液細胞由来iPS細胞を用いた骨再生療法の開発
3. 学会等名 2020年度東京歯科大学口腔科学研究センターワークショップ
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 加藤宏
2. 発表標題 ヒト末梢血液細胞由来iPS細胞を用いた骨芽細胞誘導
3. 学会等名 第307回 東京歯科大学学会
4. 発表年 2019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
---------	---------