

令和 2 年 6 月 16 日現在

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06271・19K21362

研究課題名（和文）iPS細胞の細胞内レドックス制御を基盤とした新規骨再生法の開発

研究課題名（英文）Redox biology-based strategy in bone regeneration of iPS cells

研究代表者

渡辺 隼（Watanabe, Jun）

東北大学・大学病院・医員

研究者番号：30822241

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,300,000円

研究成果の概要（和文）：人工多能性幹細胞（iPS細胞）は自己組織化により、試験管内で三次元的な石灰化骨様組織を形成する。しかし、骨芽細胞分化誘導効率の低さが課題である。近年、細胞内活性酸素種（ROS）は細胞内レドックスバランスを破綻させることで酸化ストレスを引き起こすだけでなく、幹細胞の運命決定に重要な役割を担うことが示されている。

本研究ではマウスiPS細胞の骨芽細胞分化誘導において、抗酸化物質を応用した。本研究結果により、酸化ストレスの抑制がiPS細胞の骨芽細胞分化を促進している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

広範な顎骨欠損を回復する骨再生技術の開発は、歯科補綴学の発展にとって重要な課題の一つである。しかしながら、既存の顎堤増生術の効果は未だ十分ではなく、幹細胞を用いた新規骨再生技術の開発に期待が寄せられている。本研究結果は幹細胞由来の骨再生医療に役立つ可能性を秘めているため社会的に大きな意義がある。また、iPS細胞の骨芽細胞分化とレドックス環境の変化の関連性を示唆する本結果は、幹細胞分化の分子生物学的機序の解明にも繋がるため学術的にも意義が大きいと言える。

研究成果の概要（英文）：Induced pluripotent stem cells (iPSCs) fabricate three-dimensional calcified bone-like constructs in vitro. However, the low efficiency of osteogenic differentiation is a one of the challenge. Recently, reactive oxygen species (ROS) do not only disrupt the intracellular redox balance, resulting in oxidative stress, but also play an important role in stem cell fate.

I applied small molecule antioxidants to induce osteogenic differentiation in mouse iPS cells. These results indicated that the suppression of oxidative stress might promote osteogenic differentiation in iPS cells.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：iPS細胞 酸化ストレス 骨芽細胞分化 骨再生

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

補綴前処置として、広範で大規模な顎堤吸収や歯槽骨欠損を再建する顎堤増生術が臨床的に求められている。しかしながら、既存の顎堤増生術の効果は未だ十分ではなく、幹細胞を用いた新規骨再生技術の開発に期待が寄せられている。

人工多能性幹細胞(iPS細胞)は患者由来の細胞から作製可能で、また無限ともいえる増殖能や多分化能をもち、再生医療の有用な細胞源として注目を集めている。申請者の研究室では、これまで、マウス歯肉線維芽細胞由来 iPS 細胞を骨芽細胞へと誘導する技術(Egusa H et al., Stem Cells Dev. 2014)や iPS 細胞の自己組織化を促進する培養法を開発し、試験管内で高度に石灰化した三次元的骨様組織を作製することに成功している(Okawa H et al, Stem Cells Int. 2016)。しかし、iPS 細胞を用いた骨再生技術を確立するためには培養期間の短縮が必須であるため、効率的な iPS 細胞の骨芽細胞分化誘導技術の開発が求められている。

活性酸素種(ROS)は、好気呼吸過程でミトコンドリアなどの細胞小器官から発生する。過剰に発生した ROS はアポトーシス誘導や増殖/分化の阻害をもたらす酸化ストレスを引き起こす(Sart S et al., Oxid Med Cell Longev. 2014)。そのため、グルタチオン(GSH)をはじめとする抗酸化分子が ROS を消去することにより、細胞内レドックスバランスを保っている。一方、ROS は幹細胞の運命決定を司るセカンドメッセンジャーとして働くことも知られている。細胞内レドックス環境を変化させることにより、胚性幹細胞(ES細胞)は心筋細胞へ分化する(Ding L et al., Stem Cells Dev. 2008)。また、間葉系幹細胞の骨芽細胞への分化指向性に細胞内レドックス環境の変化が関与することが知られている(Sun N et al., Int J Mol Med. 2013)。

以上を背景に、申請者は「細胞内レドックス制御による効率的な iPS 細胞の骨芽細胞分化誘導法の開発」を着想した(図 1)。

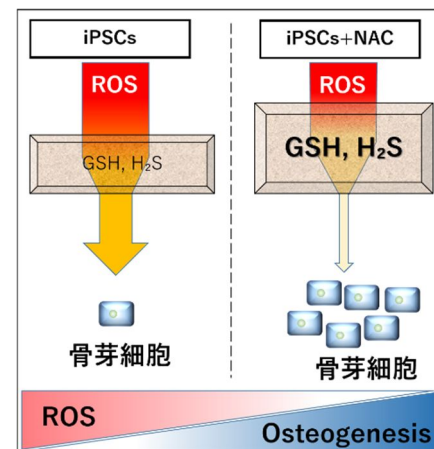


図 1 本研究の概念図

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、細胞内レドックス環境の制御による iPS 細胞の骨芽細胞分化誘導技術を開発することであり、これを達成するために、iPS 細胞株の細胞内レドックス制御を可能とする化合物の同定、骨芽細胞分化誘導した iPS 細胞の細胞内レドックス環境の評価および細胞内レドックス制御が iPS 細胞の骨芽細胞分化能に与える影響の評価を行う。

## 3. 研究の方法

### (1) 小分子化合物による iPS 細胞の細胞内抗酸化分子への作用

申請者の研究室で樹立したマウス歯肉線維芽細胞由来 iPS 細胞(Egusa H et al., PLoS ONE. 2010)に、細胞膜透過性小分子化合物である N アセチルシステイン(NAC)を添加した。細胞内抗酸化物質である GSH 量は吸光光度法で評価した。また抗酸化作用があることが知られている硫化水素量は蛍光アッセイにて測定し、単位 DNA 当たりの硫化水素量を評価した。

### (2) iPS 細胞の骨芽細胞分化過程における細胞内レドックスバランスの評価

iPS 細胞を、既に確立している骨芽細胞分化誘導法(Egusa H et al., Stem Cells Dev. 2014)に則り、ヒドロコルチゾン、 $\beta$ -グルセロフォスフェート、アスコルビン酸含有の培地で、骨芽細胞分化誘導初期として 5 日間、骨芽細胞分化誘導後期として 21 日間培養した。細胞内レド

ックスバランスは ROS である過酸化水素 ( $H_2O_2$ ) レベルを発光アッセイにて評価した。実験群のみ NAC を培地交換の際に添加した。

### (3) 細胞内レドックス制御が iPS 細胞の骨芽細胞分化に及ぼす影響の検討

基質の石灰化については Alizarin Red 染色およびカルシウム濃度の定量により評価した。Alizarin Red 染色は実験と同様に接着培養により行った。カルシウム濃度の測定は、既に確立している振盪培養による骨芽細胞分化誘導法 (Okawa H et al, Stem Cells Int. 2016) で 28 日間培養を行い評価した。骨芽細胞分化はリアルタイム RT-PCR 法により評価した。

## 4. 研究成果

### (1) 小分子化合物による iPS 細胞の細胞内抗酸化分子への作用

細胞内 GSH 量は NAC 添加濃度が 1-10 mM でピークに達した (図 2A)。また、単位 DNA 量当たりの硫化水素量は NAC 添加群で有意な増加を認めた (図 2B)。以上の結果から、NAC が iPS 細胞の細胞内抗酸化分子量を増加させることができる可能性が示唆された。

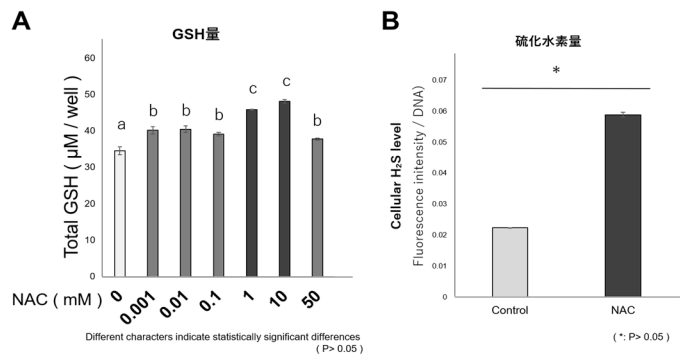


図 2 NACが細胞内抗酸化分子に及ぼす作用

### (2) iPS 細胞の骨芽細胞分化過程における細胞内レドックスバランスの評価

細胞内  $H_2O_2$  レベルは骨芽細胞分化誘導初期 (5 日目) が後期 (21 日目) より高いことが明らかとなった。一方で、NAC 添加群では骨芽細胞分化誘導初期においても後期においても有意に細胞内  $H_2O_2$  レベルを減少させた (図 3)。この結果により、骨芽細胞分化過程の各段階において、NAC が酸化ストレスを抑制できる可能性が示唆された。

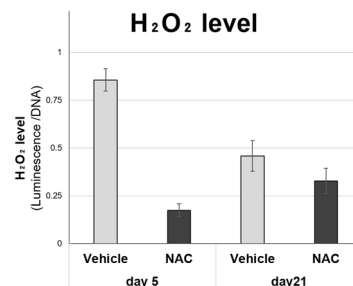


図 3 iPS細胞の骨芽細胞分化過程における過酸化水素レベル

### (3) 細胞内レドックス制御が iPS 細胞の骨芽細胞分化に及ぼす影響の検討

NAC 添加群において骨芽細胞分化誘導 7 日目から Alizarin Red S 染色陽性がやや増加する傾向を示した (図 4A)。Alizarin Red の定量評価により骨芽細胞分化誘導 14 日目、28 日目において NAC 群で有意に高い値を示した (図 4B)。一方で、振盪培養法においても構造体のカルシウム濃度は NAC 群で有意に増加した (図 4C)。次に、骨芽細胞分化マーカーの一つである Bglap の遺伝子発現は NAC 群で有意に増加した (図 5)。これらの結果より、NAC 添加することで接着培養においても振盪培養においても iPS 細胞の骨芽細胞分化を促進し、より高度に石灰化した構造物を作製できる可能性が示唆された。さらに興味深いことに、実験群においてナトリウム依存性リン酸トランスポーターである Pit1 および Pit2 の遺伝子発現の増加をみとめたことから、NAC が細胞内へのリン酸の流入を促進することで、石灰化を促進している可能性も予想される。

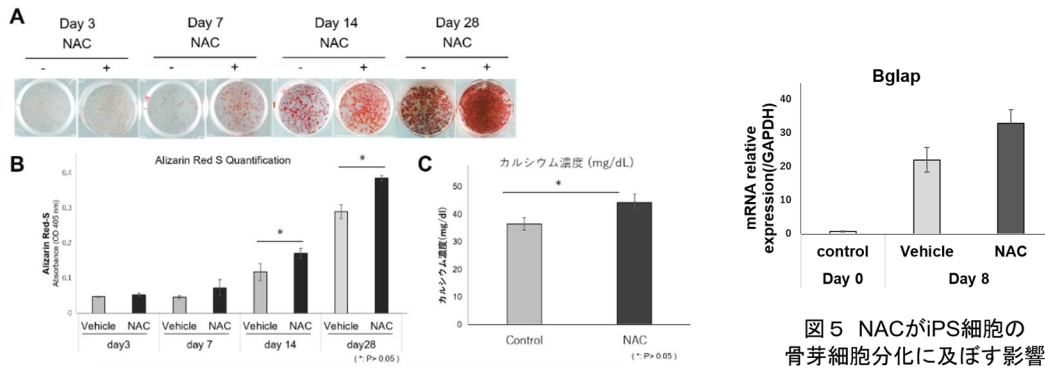


図4 NACがiPS細胞の石灰化に及ぼす影響

図5 NACがiPS細胞の骨芽細胞分化に及ぼす影響

本研究結果は、細胞内レドックス環境の制御が iPS 細胞の骨芽細胞分化誘導に影響するという新たな知見であり、新規の骨芽細胞分化誘導技術の開発に繋がる可能性がある。また、レドックス環境の制御は、抗アポトーシス作用、抗炎症作用、血管新生に関与することが示唆されている。そのため、この方策により得られた骨芽細胞を含む石灰化構造体は、細胞移植術に伴う急性炎症により惹起される酸化ストレスを抑制し、移植細胞の生存率を向上させ、さらに血管新生を誘導することで、骨再生効果を飛躍的に向上させる可能性を秘めている。一方で、iPS 細胞の骨芽細胞分化とレドックス環境の変化の関連性を示唆する本結果は、幹細胞分化の分子生物学的機序の解明にも繋がるため学術的・社会的に大きな意義があると言える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 渡辺 隼, 山田将博, 江草 宏
2. 発表標題 骨髄間葉系幹細胞のNAC処理は抗アポトーシスおよび抗炎症作用を介して骨再生を促す
3. 学会等名 日本補綴歯科学会 第128回 学術大会（課題口演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡辺 隼, 山田将博, 江草 宏
2. 発表標題 レドックスバイオロジを基盤とした骨再生技術の創成
3. 学会等名 日本歯科医学会 第35回歯科医学を中心とした総合的な研究を推進する集い
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

受賞 課題口演優秀賞 日本補綴歯科学会 第128回学術大会2019 年 骨髄間葉系幹細胞のNAC処理は抗アポトーシスおよび抗炎症作用を介して骨再生を促す  優秀発表賞 日本歯科医学会 第35回歯科医学を中心とした総合的な研究を推進する集い レドックスバイオロジを基盤とした骨再生技術の創成 2019 年
--

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