

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K09508

研究課題名（和文）ヒト人工多能性幹細胞の酸素濃度に着目した変化の検証と変形性膝関節症の病態解明

研究課題名（英文）The elucidation of osteoarthritis pathogenesis based on the osteogenic culture experiment of induced pluripotent cells with the modification of oxygen tension

研究代表者

稲垣 有佐（Inagaki, Yusuke）

奈良県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：60707529

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,000,000円

研究成果の概要（和文）：変形性膝関節症(KOA)は大変重要な福祉健康課題であるが、その発症に関与する分子レベルでの詳細については未だ明らかにされていない。本研究ではヒト人工多能性幹細胞(iPSCs)を用い、培養酸素濃度変化時の遺伝子発現量の解析を行い、KOAの病態解明と、将来的にそれに対応した新規薬剤の開発に資することである。

本研究結果から、酸素濃度7%の環境下であっても、培養中に酸素濃度を変化させても、ヒトiPS細胞の骨分化が示された。さらに、骨分化誘導培養中に酸素濃度を上昇させることで、骨分化が進行が示唆された。以上より、微小環境の酸素濃度変化が、KOA進行に寄与している可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

変形性膝関節症(KOA)は膝関節への力学的ストレスを中心とした多因子性疾患であり、疼痛や可動域制限により活動性が低下し、Quality of Life (QOL)の悪化要因とされる。我が国では有症状者は780万人、単純X線写真で異常所見のある者は2530万人と高い有病率が推定されており(Yoshimura et al. J Bone Miner Metab 2009)、急速な高齢化により、今後ますますの患者数増加また、KOAは転倒リスクや大腿骨近部骨折のリスクとなり、社会的にもKOAの治療は大変重要な課題である。

研究成果の概要（英文）：Knee osteoarthritis (KOA) is a very important welfare and health issue, but the details of its pathogenesis at the molecular level have not yet been clarified. In this study, we used human induced pluripotent stem cells (iPSCs) to analyze the gene expression levels during changes in the oxygen concentration in culture to elucidate the pathogenesis of KOA and to contribute to the development of new therapeutic drugs for KOA in the future. The results of this study showed that osteogenic differentiation of human iPS cells was demonstrated even under an oxygen concentration of 7% (hypoxia) and even when the oxygen concentration was changed during culture. Furthermore, it was suggested that osteogenic differentiation progressed by increasing the oxygen concentration during osteoinductive culture. These results suggest that changes in oxygen concentration in the microenvironment may contribute to KOA progression.

研究分野：整形外科学

キーワード：変形性膝関節症 ヒト人工多能性幹細胞 低酸素

様式 C-19、F-19-1 (共通)

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、その罹患者数からは莫大なものとなる。また、KOA は転倒リスクや大腿骨近部骨折のリスク (Dore et al. Arthritis Care Res, Jacob et al. Osteoarthritis Cartilage) 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

養環境の差違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

ヒト iPS 細胞を未分化維持培地で培養し、confluent に達した時点を day 0 とした。チャンバー内の酸素濃度を 7% とし、day 0 から骨分化誘導培地へ変更し day 28 まで培養した群を H 群とした。チャンバー内の酸素濃度を 7% とし、day 0 から骨分化誘導培地へ変更し day 7 まで培養し、次にチャンバー内の酸素濃度を 21% に変更し day 28 まで培養継続した群を HN 群とし

た。day 0, 7, 14, 21, 28 のサンプルから RNA を抽出し、TATA binding protein: TBP を参照遺伝子として、未分化マーカー(POU domain, class 5, transcription factor 1: POU5F1)・骨芽細胞分化マーカー(Runt-related transcription factor 2: RUNX2, Osterix: SP7, Osteocalcin: OC)、骨細胞分化マーカー(Sclerostin: SOST)についての RT-qPCR を行った。

4. 研究成果

RT-qPCR で両群とも未分化マーカーは経時的に有意に減少し、骨芽細胞・骨細胞分化マーカーは増加傾向を示した。両群でヒト iPS 細胞の骨分化が示唆された。HN 群と H 群を比較した結果、HN 群で day 21 以降の骨芽細胞分化マーカー (RUNX2, BMP2, SP7) と骨細胞分化マーカー (SOST) が高値である傾向を示した。本研究の結果から、酸素濃度 7% の環境下であっても、培養中に酸素濃度を変化させても、ヒト iPS 細胞の骨分化が示された。さらに、骨分化誘導培養中に酸素濃度を上昇させることで、骨分化が進行する可能性が示された。上記結果により、KOA の病態において、微小環境の酸素濃度変化が、その進行に寄与している可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

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 オープンアクセスとしている（また、その予定である）	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 オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 岡本 公一、岡村 建祐、稲垣 有佐、内原 好信、齊藤 謙一郎、小川 宗宏、森 英一朗、田中 康仁
2. 発表標題 酸素濃度の変化が iPS 細胞の骨分化に与える影響 とは
3. 学会等名 第37回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Masakazu Okamoto, Yusuke Inagaki, Kensuke Okamura, Yoshinobu Uchihara, Kenichiro Saito, Munehiro Ogawa, Yasuhito Tanaka
2. 発表標題 What is the best reference gene of RT-qPCR analyses for the three-dimensional osteogenic differentiation of human induced pluripotent stem cells?
3. 学会等名 Orthopaedic Research Society 2023 Annual Meeting（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岡村 建祐, 稲垣 有佐, 森 英一朗, 岡本 公一, 内原 好信, 小川 宗宏, 田中 康仁
2. 発表標題 ヒトiPS細胞の骨分化誘導実験における培養期間がRT-qPCRの適切な参照遺伝子の選択に及ぼす影響についての検討
3. 学会等名 第36回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岡本 公一, 岡村 建祐, 稲垣 有佐, 内原 好信, 杉本 啓紀, 齊藤 謙一郎, 小川 宗宏, 森 英一朗, 田中 康仁
2. 発表標題 低酸素環境下ヒトiPS細胞骨分化誘導実験における逆転写-定量的リアルタイムPCR(RT-qPCR)の最適な参照遺伝子とは何か
3. 学会等名 第36回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Masakazu Okamoto, Kensuke Okamura, Yusuke Inagaki, Yoshinobu Uchihara, Kenichiro Saito, Yasuhito Tanaka
2. 発表標題 What is the best reference gene of RT-qPCR analyses for the osteogenic differentiation of human induced pluripotent stem cells?
3. 学会等名 Orthopaedic Research Society 2022 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 杉本 啓紀, 稲垣 有佐, 赤羽 学, 吉良 務, 川崎 佐智子, 田中 康仁
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、川崎 佐智子、杉本 啓紀、吉良 務、赤羽 学、田中 康仁
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、稲垣 有佐、森 英一朗、岡本 公一、内原 好信、小川 宗宏、田中 康仁
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、稲垣 有佐、赤羽 学、古川 彰、吉良 務、川崎 佐智子、内原 好信、斎藤 謙一郎、岡本 公一、西村 優輝、田中 康仁
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
研究分担者	岡村 建祐 (Okamura Kensuke) (60812691)	奈良県立医科大学・医学部附属病院・研究員 (24601)	

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