

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：34408

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K10003

研究課題名（和文）ゼノフリーiPS細胞由来幹細胞の三次元細胞構造体が拓く骨再生医療

研究課題名（英文）Bone regenerative medicine pioneered by three-dimensional cell structures derived from xeno-free iPS cell-derived stem cells

研究代表者

橋本 典也（HASHIMOTO, Yoshiya）

大阪歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：20228430

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）：間葉系幹細胞（MSC）維持培地としてMSCGM（ロンザ株式会社）を用いた。今回、MSCGMを用いた検証の結果、iPS細胞からMSC様細胞を誘導することに成功した。iPS-MSCGMはin vitroで骨芽細胞と軟骨細胞に分化することができ、骨と軟骨の再生に使用できることが示唆される。軟骨や骨の再生のための組織工学は口腔顎顔面領域で広く必要とされており、MSCGMを用いた分化誘導法がこの論文で明らかになった。この研究は再生医療に有用な情報を提供する可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年の組織工学的技術の発展と幹細胞生物学の進歩により、培養した幹細胞を用いた組織再生あるいは疾患治療が可能となり、次世代医療の一つとして注目されている。顎顔面領域では、しばしば大型の骨欠損が治療対象となることがある。先天的な顎裂部位、癌・腫瘍のための顎骨区域切除、交通事故などによる骨の実質欠損など、非常に大きな骨の再建が必要とされる臨床例に遭遇する。大型の骨再建に必須となる、大量の骨芽細胞を理論上無限の細胞供給源になりうるiPS細胞から作製することが可能となるならば大型の骨欠損治療にきわめて有効になる。

研究成果の概要（英文）：MSCGM (Lonza Corporation) was used as mesenchymal stem cell (MSC) maintenance medium. In this study, MSC-like cells were successfully induced from iPS cells as a result of validation using MSCGM. iPS-MSCGM can differentiate into osteoblasts and chondrocytes in vitro, suggesting that it can be used for bone and cartilage regeneration. Tissue engineering for cartilage and bone regeneration is widely needed in the oral and maxillofacial area, and the differentiation induction method using MSCGM has been demonstrated in this paper. This study may provide useful information for regenerative medicine.

研究分野：再生歯学

キーワード：iPS細胞

## 1. 研究開始当初の背景

近年の組織工学的技術の発展と幹細胞生物学の進歩により、培養した幹細胞を用いた組織再生あるいは疾患治療が可能となり、次世代医療の一つとして注目されている。2007年に山中らが開発した iPS 細胞は線維芽細胞にごく少数の遺伝子を導入することによって人体のすべての細胞に分化する能力(多能性)を獲得した幹細胞であり、治療に用いる細胞源として期待されている(Cell, 2007)。iPS 細胞は、移植に際して残存未分化細胞や誘導遺伝子に由来する腫瘍形成という大きな問題が存在する一方で、胚の破壊の必要が無く、拒絶反応のない無限に増殖する万能細胞による疾患治療ができるという大きな利点を有しており、計り知れない治療戦略上の可能性を持っていると言える。iPS を用いた治療に対する問題点は iPS 細胞の発見直後より広く認識され、リプログラミング方法の改良や日本人の多くをカバーできる HLA 型 3 座ホモ iPS の樹立など、問題の解決策の開発が急速に進められている。

顎顔面領域では、しばしば大型の骨欠損が治療対象となることがある。先天的な顎裂部位、癌・腫瘍のための顎骨区域切除、交通事故などによる骨の実質欠損など、非常に大きな骨の再建が必要とされる臨床例に遭遇する。骨を形成する骨芽細胞は骨髄や骨膜に由来する間葉系幹細胞から分化し、その分化メカニズムについては多くの情報が蓄積されており、実際に多くの過去の研究が培養した骨芽細胞を用いて骨組織の再生を試みて来た。しかしながら、骨芽細胞移植によって形成できる骨の量は未だ限られており、さらに現在行われる自家骨・人工骨移植を用いても上記のような大型の骨欠損の完全な骨再生には至っていないのが現状である。細胞移植による骨形成量の限界には、供給できる細胞数に限りがある事、そして移植後に局所に定着する細胞数が(移植細胞の細胞死など)少ないことが大きな問題と考えられる。

## 2. 研究の目的

今回、我々は細胞移植による大型の骨欠損治療のハードルとなっている二つの原因、移植する細胞数の確保、および移植細胞定着の改善を研究ターゲットとした新規大型骨再建法の開発を目的とした研究を計画した。すなわち、大型の骨再建に必須となる、大量の骨芽細胞を理論上無限の細胞供給源になりうる iPS 細胞から作製し、さらに局所定着細胞数の向上には移植細胞の生存を向上させる新規の移植担体であるヒト I 型コラーゲン様リコンビナントペプチドを用いることにより、これまでの細胞移植の問題点を解決し、大型の骨再生を誘導する方法を見出すことを本研究課題の目的とした。さらに、iPS 細胞からの骨芽細胞分化誘導および細胞移植までのステップの全てを、動物由来成分を排除したプロトコル(Xeno-Free 条件)で行うことで、本研究結果をより早期に現実的な臨床応用へ生かせるように工夫した。

## 3. 研究の方法

iPS 細胞(HPS0381 株)は理研バイオリソースセンターおよびロンザ株式会社より購入し、StemFit®(味の素株式会社)においてシングルセル・フィーダーレス条件で培養を行った。iPS 細胞の多能性の確認には Oct4, Sox2, Nanog の免疫染色、および SSEA4, TRA-1-60, TRA-1-81 の Flow cytometry による発現解析によって行った。MSC 維持培地として MSCGM (ロンザ株式会社) KBM ADSC-4 (コージンバイオ株式会社)、Cellartis® MSC Xeno-Free Culture Medium (タカラバイオ株式会社)、StemFit MSC (味の素株式会社)を用いた。培養 iPS 細胞を MSC 維持培地を用いて培養を行い、顕微鏡下で細胞形態の変化を観察しながら細胞培養を行った。

骨芽細胞の分化のために、50 µg/mL L-アスコルビン酸 2-リン酸(Sigma-Aldrich、セントルイス、ミズーリ州、米国)、 $10^{-8}$  M デキサメタゾン(Sigma-Aldrich)、および 10 nM -グリセロリン酸(Sigma-Aldrich)を使用した。増殖培地で培養した iPS-MSCGM は、対照群として使用した。4% PFA で細胞を固定した後、アリザリンレッド S (ナカライ)で染色することにより石灰化を可視化した。軟骨細胞の分化のために、StemPro Chondrogenesis Differentiation Kit (Thermo Fisher) を使用してペレット培養を 3 週間実施した。増殖培地で培養した iPS-MSCGM ペレットを対照群として使用した。凍結細胞ペレット切片を調製し、アルシアンブルー(ナカライ)で染色した。

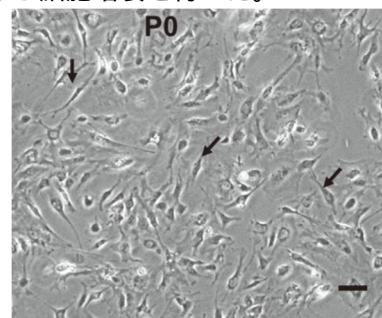


図 1. MSCGM による iPS 細胞の分化誘導

## 4. 研究成果

培養 2 週後に分化誘導細胞をコラーゲンコート培養皿上で継代培養すると、MSC に類似した線維芽細胞様の細胞が旺盛に増殖した(図 1)。

MSC に特化した維持培地を用いて iPS 細胞の分化誘導を検討したところ、MSCGM 以外では分化誘導を行うことは出来なかった。一方、MSCGM を用いることによって MSC に類似した形態を持つ細胞へ分化し、MSCGM が iPS 細胞から MSC への分化誘導に有用である可能性が考えられた。そこ

で、この細胞の MSC としての機能について検証を行った。iPS-MSCGM の遺伝子発現パターンを、iPS 細胞と MSC で発現する遺伝子群について調べた。3 つの iPS-MSCGM サンプル ( iPS-MSCGM#1-3 ) を解析した。その結果、iPS-MSCGM#1-3 では、Oct4A と Nanog は発現していなかった。しかし、CD73 と CD90 は発現していた ( 図 2 )。このことは、iPS-MSCGM の遺伝子発現パターンが骨髄 MSC と類似していることを示唆している。

フローサイトメトリーを用いて、iPS 細胞および iPS-MSCGM の細胞表面抗原発現プロファイルを評価した。

図 3A に示すように、iPS-MSCGM 細胞は iPS 細胞表面マーカー ( TRA-1-60R、TRA-1-81、TRA-1-81 ) 陰性であった。iPS-MSCGM 細胞は、iPS 細胞表面マーカー ( TRA-1-60R、TRA-1-81、SSEA4 ) 造血細胞マーカー ( CD14、CD34、CD45 ) に対して陰性であり、MSC 細胞表面マーカー ( CD73、CD90、CD105 ) に対して陽性であった。

これらの結果から、iPS-MSCGM は多能性幹細胞表面マーカーと造血細胞マーカーを欠くが、MSC マーカーを発現しており、MSC 様特性を有していることが示唆される。

一方、iPS 細胞は iPS 細胞マーカー陽性、造血細胞マーカー陰性、MSC マーカー陰性であった ( 図 3B )。

我々は、iPS-MSCGM の骨芽細胞と軟骨細胞への分化の可能性を調べた。iPS-MSCGM による骨芽細胞分化誘導の結果、( 図 4A ) に示すように、21 日後にはアリザリンレッド陽性のカルシウム沈着が大量に見られた。

増殖培地中で iPS-MSCGM を培養した対照群では、染色は観察されなかった。骨芽細胞マーカーである Runx2 と OCN の遺伝子発現は、骨形成分化群において有意に上昇した。骨形成分化群では、遺伝子発現が有意に上昇した (  $p < 0.05$  ) ( 図 4B )。軟骨分化については、iPS-MSCGM をペレット培養で 21 日間分化誘導した。得られた細胞塊は、軟骨組織に特有のアルシアンブルー陽性細胞外マトリックスを含む、軟骨組織の特徴を示した ( 図 4C )。

iPS-MSCGM を増殖培地で培養した対照群では、ペレットサイズが小さく、染色が弱かった ( 図 4C )。

今回、MSCGM を用いた検証の結果、iPS 細胞から MSC 様細胞を誘導することに成功した。

iPS-MSCGM は *in vitro* で骨芽細胞と軟骨細胞に分化することができ、骨と軟骨の再生に使用できることが示唆される。軟骨や骨の再生のための組織工学は口腔顎顔面領域で広く必要とされており、MSCGM を用いた分化誘導法がこの研究で明らかになった。この研究は再生医療に有用な情報を提供する可能性がある。

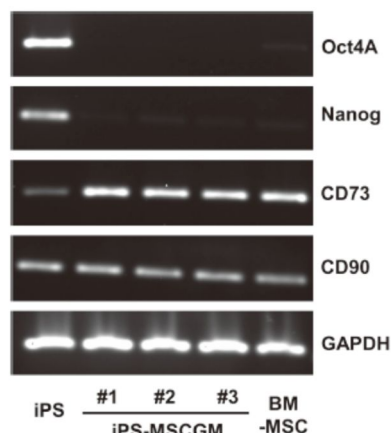


図 2. iPS-MSCGM の遺伝子

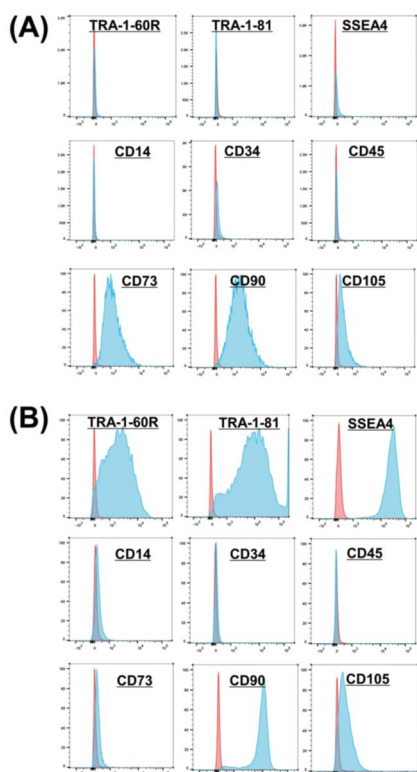


図 3. iPSGM の表面マーカープロファイル

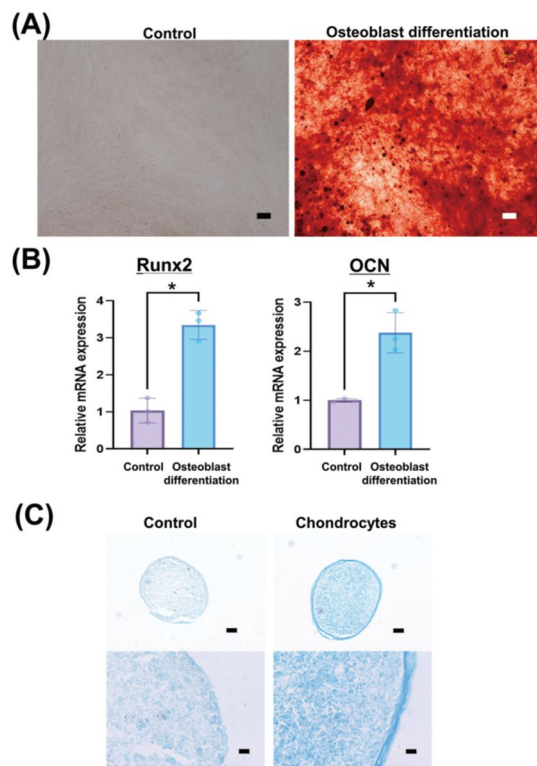


図 4. iPSMSCGM の骨芽細胞、軟骨芽細胞分化

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6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 5件）

1. 著者名 橋本典也	4. 巻 特別号2022
2. 論文標題 iPS細胞由来間葉系幹細胞を用いた広域顎骨組織欠損再生	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 歯界展望	6. 最初と最後の頁 135-136
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 Lyu Jinzhao, Hashimoto Yoshiya, Honda Yoshitomo, Matsumoto Naoyuki	4. 巻 22
2. 論文標題 Comparison of Osteogenic Potentials of Dental Pulp and Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Using the New Cell Transplantation Platform, CellSaic, in a Rat Congenital Cleft-Jaw Model	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 9478 ~ 9478
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms22179478	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 Wang Xinchun, Honda Yoshitomo, Zhao Jianxin, Morikuni Hidetoshi, Nishiura Aki, Hashimoto Yoshiya, Matsumoto Naoyuki	4. 巻 22
2. 論文標題 Enhancement of Bone-Forming Ability on Beta-Tricalcium Phosphate by Modulating Cellular Senescence Mechanisms Using Senolytics	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 12415 ~ 12415
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms222212415	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 Tsumano Nobuhito, Kubo Hirohito, Imataki Rie, Honda Yoshitomo, Hashimoto Yoshiya, Nakajima Masahiro	4. 巻 11
2. 論文標題 Bone Regeneration by Dedifferentiated Fat Cells Using Composite Sponge of Alfa-Tricalcium Phosphate and Gelatin in a Rat Calvarial Defect Model	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Applied Sciences	6. 最初と最後の頁 11941 ~ 11941
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/app112411941	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 Nakano Kosuke, Kubo Hirohito, Nakajima Masahiro, Honda Yoshitomo, Hashimoto Yoshiya	4. 巻 13
2. 論文標題 Bone Regeneration Using Rat-Derived Dedifferentiated Fat Cells Combined with Activated Platelet-Rich Plasma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Materials	6. 最初と最後の頁 5097
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ma13225097	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 Han Xiaoyu, Honda Yoshitomo, Tanaka Tomonari, Imura Kazuki, Hashimoto Yoshiya, Yoshikawa Kazushi, Yamamoto Kazuyo	4. 巻 13
2. 論文標題 Gas Permeability of Mold during Freezing Process Alters the Pore Distribution of Gelatin Sponge and Its Bone-Forming Ability	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Materials	6. 最初と最後の頁 4705
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ma13214705	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3件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 孫 雨竹, 城 潤一郎, 橋本典也
2. 発表標題 Assessment of the Osteogenic Potential of Rat-derived Adipose Mesenchymal Stem Cells under Xeno-free conditions
3. 学会等名 国際歯科材料会議 2022 第80回 学術講演会 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 WU Yufan, 岩崎剣吾, 橋本典也
2. 発表標題 Differentiation of iPS cells into periodontal ligament cell-like cells
3. 学会等名 国際歯科材料会議 2022 第80回 学術講演会 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 橋本典也
2. 発表標題 iPS細胞由来間葉系幹細胞を用いた広域顎骨組織欠損再生
3. 学会等名 日本歯科医学会（招待講演）
4. 発表年 2021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	岩崎 剣吾  (IWASAKI Kengo)  (40401351)	大阪歯科大学・歯学部・准教授   (34408)	
研究分担者	本田 義知  (HONDA Yoshitomo)  (90547259)	大阪歯科大学・歯学部・教授   (34408)	

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