

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K18624

研究課題名（和文）還元ストレスをiPS細胞の分化誘導に応用した新規骨再生技術の開発

研究課題名（英文）Novel Bone Regeneration Technology by Applying Reductive Stress to iPS Cells

研究代表者

渡辺 隼（Watanabe, Jun）

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：30822241

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）：補綴治療の適応を拡大する前処置として、大規模な歯槽骨欠損を再建する骨造成術が臨床的に求められているが、既存の骨造成術の効果は未だ十分ではない。本研究では、人工多能性幹細胞（iPS細胞）の骨芽細胞分化誘導において、還元性の求電子性化合物を応用した。本研究結果により、マウスiPS細胞の骨芽細胞分化誘導において、最適な還元ストレスを与えることで、骨芽細胞分化および石灰化が促進す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

本研究結果は、有機硫黄化合物のフィトケミカルであるスルフォラファンが、骨芽細胞分化誘導中における多能性幹細胞のレドックス環境を制御できる点、および求電子化合物が骨芽細胞分化を促進する可能性を示唆する点である。これらの成果は、新たな骨再生医療技術の開発の基礎的知見に繋がる可能性を秘めており、社会的に大きな意義があると考えられる。一方で、求電子性化合物による細胞内レドックス環境の変化が幹細胞における骨分化誘導に影響を及ぼす可能性を示唆する本研究結果は、幹細胞分化に還元力を基盤としたレドックス生物学を応用できる可能性を示唆しており、学術的に大きな意義がある。

研究成果の概要（英文）：Bone augmentation therapies to reconstruct massive alveolar bone defects are clinically required for pretreatment to expand the prosthodontic treatment. However, they remain insufficiently effective.

This study applies the reductive electrophilic compound in the osteogenic induction of mouse induced pluripotent stem cells (iPS cells). These results suggest that optimal reducing stress might promote osteoblast differentiation and calcification of iPS cells.

研究分野：歯科補綴、再生医療

キーワード：骨芽細胞分化 レドックス制御 iPS細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

インプラント治療の適応を拡大する前処置として、広範で大規模な顎堤吸収や歯槽骨欠損を再建する骨造成術が臨床的に求められている。しかしながら、既存の骨造成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、試験管内で三次元的な石灰化構造体を形成する。しかし、臨床応用に向けて、iPS 細胞を用いた骨様組織を短期間、低コストで作製することが必須である。そのため、さらなる効率的な 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。

還元ストレスは、「活性イオウ分子種」と呼ばれるシステイン等のチオール基に過剰なイオウ原子が付加したパースルフィドあるいは硫化水素を主体とする求電子性・還元性の強い生理活性物質により引き起こされる細胞ストレスである。これまで細胞内の還元的代謝経路や代謝物は、同定が困難で見落とされてきたため、生体内の酸化還元状態に基づくレドックスバイオロジーは酸化ストレスに偏重されてきた。分析技術の発展により、生体内還元性物質が同定され還元ストレスの実態が解明され始めてきた。これまで、還元性物質が生体内で一定量生合成されており、細胞増殖、抗アポトーシスあるいは酸化ストレス制御に関与すること (Nilkantha S et al., *J Mol Biol.* 2018) が明らかにされており、生体機能を制御する新たな生理活性物質として注目されている。

また近年、還元ストレスが幹細胞の骨芽細胞分化に関与する可能性が示唆されている。硫化水素による還元ストレスを与えることで、電位依存性カルシウムチャネルあるいは、ヒストン脱アセチル化酵素の制御を介して間葉系幹細胞の骨芽細胞分化を促進することが知られている (Liu Y et al., *Cell Stem Cell.* 2014) (Wang J et al., *Cell Death Dis.* 2016)。一方で、硫化水素の産生経路を阻害することで間葉系幹細胞の骨芽細胞分化が抑制される (Li C et al., *Mol Med Rep.* 2014)。また、iPS 細胞はその高い細胞増殖により酸化ストレス状態にあるため、細胞内レドックスバランスを制御することで分化に影響を及ぼす可能性が示唆されている (Szczepanek K et al., *Mitochondrion.* 2012)。以上を背景に、申請者は「還元ストレスを応用した効率的な iPS 細胞の骨芽細胞分化誘導法の開発」を着想した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、還元ストレスを応用した iPS 細胞の骨芽細胞分化誘導技術を開発し、新たな顎骨再生技術の基盤を確立することである。これを達成するために、iPS 細胞の骨芽細胞分化過程における細胞内の還元ストレスを含むレドックス状態の変化を明らかにすること、還元ストレス供与することで iPS 細胞の骨芽細胞分化能への影響を評価する。

3. 研究の方法

(1) 求電子性化合物による iPS 細胞の細胞内レドックスバランスの評価

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) 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、ハイドロコルチゾン、 β -グルセロフォスフェート、アスコルビン酸含有の培地で、7 日間培養した細胞を試料とした。

還元性の求電子化合物として報告されているイソチオシアネート系化合物の DL-Sulforaphane (以下、SFN) をジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解させ、各濃度 (0-50 μ M) に調整した。SFN 添加後、12 時間後に細胞内抗酸化物質であるグルタチオン (以下、GSH) を吸光光度法で測定した。次に、細胞内レドックスバランスの評価として細胞内活性酸素種 (以下、ROS) を細胞膜透過性の 2',7'-ジクロロフルオロセインジアセートを用いて、蛍光アッセイにて定量を行った。

(2) レドックスバランスの変化による iPS 細胞の骨芽細胞分化に及ぼす影響の検討

マウス iPS 細胞は前述の骨芽細胞分化誘導法に則り、胚葉体形成を行った後、ハイドロコルチゾン、 β -グルセロフォスフェート、アスコルビン酸含有の培地で、骨芽細胞分化誘導を行った。培地交換は 2 日毎に行い、その際に実験群では 0.1 もしくは 1.0 μ M の SFN を添加し、対照群では実験群と同量の DMSO を添加した。骨芽細胞分化は骨芽細胞分化マーカーであるオステオポンチン (Spp1)、骨シアロタンパク質 (BSP)、オステオカルシン (Bglap)、オステリックス (Osx) 等の遺伝子発現をリアルタイム RT-PCR により評価した。基質の石灰化は、Alizarin Red 染色の定量により評価した。

4. 研究成果

(1) 求電子性化合物による iPS 細胞の細胞内レドックスバランスの評価

細胞内 GSH 量は SFN 添加濃度が 0.1-1.0 μM で非添加群と比較して、有意に増加した (図 1A)。一方、25 μM 以上の SFN を加えることで細胞毒性により、細胞数が有意に減少することが認められた。

続いて、H2DCFDA を用いて、骨芽細胞分化誘導中における細胞内 ROS について検討を行った。0.1-1.0 μM の SFN 添加により、ROS が抑制されることが明らかとなった (図 1B)。同様に代表的な ROS である過酸化水素 (H_2O_2) レベルを発光アッセイにて測定した。単位 DNA あたりの H_2O_2 レベルは SFN 添加により有意な減少が認められた。

これらの結果により、骨芽細胞分化誘導中の iPS 細胞において、SFN が細胞内 GSH を増加し、酸化ストレスを抑制できる可能性が示唆された。

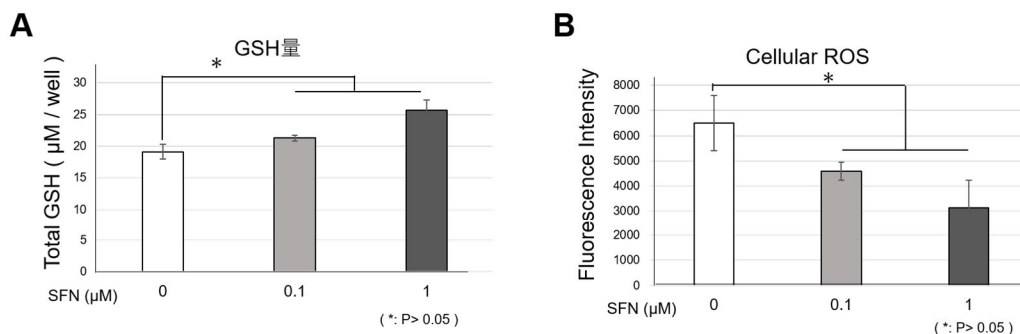


図 1 SFNがiPS細胞のレドックスバランスに及ぼす影響

(2) レドックスバランスの変化による iPS 細胞の骨芽細胞分化に及ぼす影響の検討

SFN の添加により、骨芽分化誘導初期 (7 日目) においても骨芽分化誘導後期 (21 日目) においても、Spp1、Sp7、BSP、Bglap、Col1a2 等の骨芽細胞分化誘導関連遺伝子の発現が非添加群と比較し、有意に増加することを認めた (図 2)。一方で、10 μM 以上の濃度の SFN を添加すると細胞増殖能、細胞分化能が低下し、骨芽細胞分化誘導が抑制されることが認められた。

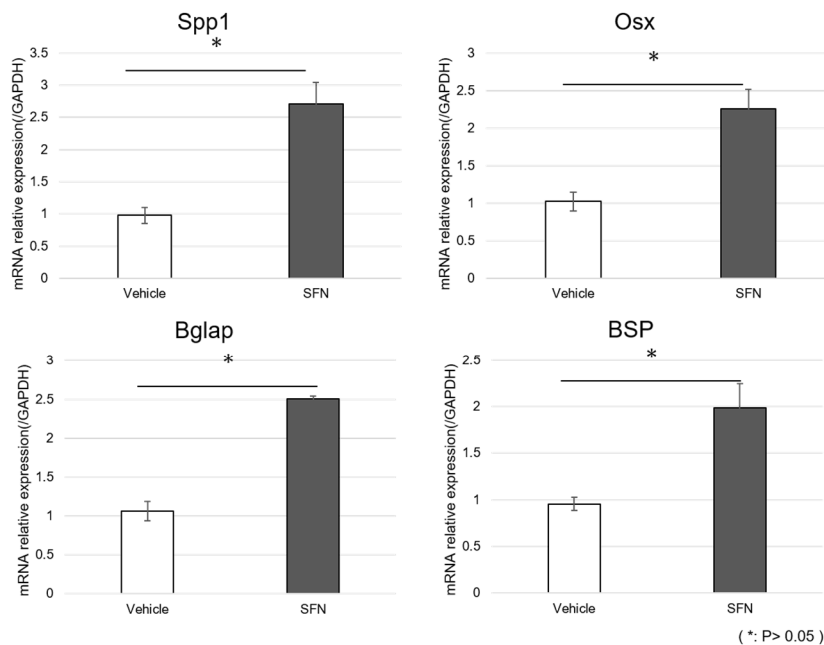


図 2 レドックスバランスの変化がiPS細胞の骨芽細胞分化に及ぼす影響

また、SFN 添加群では Alizarin Red 陽性領域の増加が観察され、定量評価により骨芽分化誘導初期 (7 日目) においても骨芽分化誘導後期 (21 日目) においても、対照群と比較して有意に吸光度が増加した (図 3)。

上記の結果により、適切な濃度の SFN が骨芽細胞分化を強化し、石灰化を促進することが示唆された。

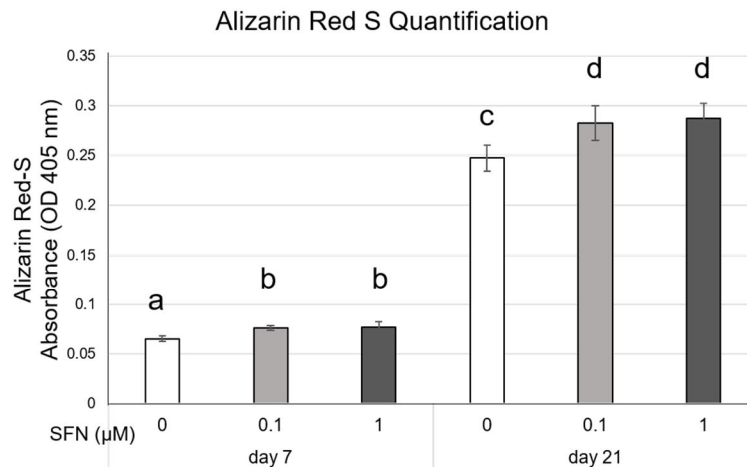


図3 レドックスバランスの変化がiPS細胞の石灰化に及ぼす影響

本研究結果は、有機硫黄化合物のフィトケミカルである SFN が、骨芽細胞分化誘導中における多能性幹細胞のレドックス環境を制御できるという新たな知見である。また、求電子化合物が骨芽細胞分化を促進する可能性を示唆するものであり、新たな骨芽細胞分化誘導化合物の開発に繋がる可能性を秘めている。一方で、求電子性化合物による細胞内レドックス環境の変化が幹細胞における骨分化誘導に影響を及ぼす可能性を示唆する本結果は、幹細胞分化に還元力を基盤としたレドックス生物学を応用できる可能性を秘めており、学術的・社会的に大きな意義があると考えられる。さらに、活性イオウ分子種は、酸化ストレスの抑制だけでなく、血管新生の誘導や、抗炎症効果に関与することが報告されているため、骨再生医療技術への応用により、再生効果を著しく向上させることができる可能性も考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------