

令和 5 年 6 月 29 日現在

機関番号：17301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K21091

研究課題名（和文）骨代謝関連細胞の時間・空間的コミュニケーションを制御するiPS巨核球治療の基盤研究

研究課題名（英文）Fundamental research on iPS megakaryocyte therapy that regulates the temporal and spatial communication of bone metabolism-related cells.

研究代表者

魚返 拓利 (ogaeri, takunori)

長崎大学・医歯薬学総合研究科（歯学系）・助教

研究者番号：70548776

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：研究代表者らは、血小板の骨再生治療の開発に取り組んでおり、巨核球については骨恒常性維持に機能することが一部知られているものの、骨再生を制御することは調べられていない。本研究では、同種iPS細胞由来巨核球（iMK）の骨再生における巨核球の役割を調査し、新規骨再生・骨疾患治療の開発を試みる。また、成熟期iMKが優れた骨誘導能を示すことを見出した。しかし、成熟期より増殖期iMKが、骨髄由来間葉系幹細胞（BMMSC）の増殖と骨芽細胞への分化を刺激し、破骨細胞の分化を促進した。そのため、増殖期や成熟期初期にあるiMKの骨代謝機能の解明とそれを応用した骨再生の可能性について解析を進めているところである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年巨核球が骨恒常性を制御することが示唆されている。研究代表者らは、血小板放出前の巨核球、あるいは放出後の分解巨核球が、骨誘導に機能する成長因子群を高濃度に保有することを見出した。他方で、これまでの知見から、増殖期にある巨核球が骨芽細胞の増殖、および破骨前駆細胞の分化抑制に機能することが示唆されている。そのため、本課題では、骨再生や骨疾患の治療に巨核球自体を応用することを着想した。iMKは、増殖期に強い骨代謝促進能を発揮し、成熟期には含有する成長因子群によって骨再生促進に働くと考えられる。以上から、iMKは骨再生治療、特に高齢者を対象とした治療戦略に有用性が高いと考えた。

研究成果の概要（英文）：We have tried to develop the bone regenerative therapies with platelets. Meanwhile, megakaryocytes, which produce the platelets, are partially known to contribute to skeletal homeostasis, but their potential function in bone regeneration has not been well investigated. The aim of this study is to develop an alternative remedy for bone regeneration using allogeneic iPSC-derived megakaryocytes (iMKs) while clarifying the molecular function of megakaryocytes on bone metabolism. Regarding the outcomes, we first confirmed iMKs in late differentiation phase (before platelet release) induced robust bone formation in rat calvarial bone defects compared with PRP. However, iMKs in proliferative and early differentiation phases were found to stimulate the proliferation and osteoblast differentiation of co-cultured bone marrow mesenchymal stem cells (BMMSCs). Furthermore, such immature iMKs showed the enhanced expression of osteoclastogenesis inhibitory factors such as osteoprotegerin (OPG).

研究分野：骨再生医学

キーワード：iPS細胞 巨核球 骨代謝 再生医学

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年巨核球が骨恒常性を制御することが示唆されている。研究代表者らは、血小板放出前の巨核球、あるいは放出後の分解巨核球が、骨誘導に機能する成長因子群を高濃度に保有することを見出した。他方で、これまでの知見から、増殖期にある巨核球が骨芽細胞の増殖、および破骨前駆細胞の分化抑制に機能することが示唆されている。そのため、本課題では、骨再生や骨疾患の治療に巨核球自体を応用することを着想した。iMKは、増殖期に強い骨代謝促進能を発揮し、成熟期には含有する成長因子群によって骨再生促進に働くと推定される。以上から、iMKは骨再生治療、特に高齢者を対象とした治療戦略に有用性が高いと考えた。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、増殖・分化の制御、あるいは特定の機能付加が可能な iMK を応用することで、巨核球が骨再生に果たす機能を明らかにしつつ、iMK を活用した骨再生・骨疾患の新規治療戦略の基盤を開発することにある。

### 3. 研究の方法

#### (1) iMKの誘導・作製；

本研究では、研究代表者らがiPS細胞由来血小板製剤を安定的に製造するために確立したiPS細胞由来の不死化巨核球(iMK)を使用した。iMKは、ヒトiPS細胞から誘導した造血前駆細胞に細胞増殖や自己複製、細胞死抑制に関わるc-Myc, Bmi-1, Bcl-xLの3遺伝子を過剰発現させることで、巨核球が前駆細胞の状態から自己複製する株化細胞である。そして、この3遺伝子の発現を消失させると成熟が進み、血小板を産生する。そのため、このiMKの培養系では、Tet-Onシステムを応用したドキシサイクリン(Dox)添加後の3遺伝子の発現誘導による増殖期巨核球の維持・増殖、そして、培地からのDox除去による発現解除後の成熟巨核球への分化・血小板放出を誘導する2ステップの系が確立している。本研究では、この培養系で得られる「増殖期巨核球」と「成熟期巨核球」の二つの分化段階にあるiMKを実験に応用した。

#### (2) 改変型iMKの作製；

巨核球が産生し、骨芽細胞の増殖を促す遺伝子群を導入することで、骨芽細胞増殖や骨形成誘導に対する効能に変化がどうかを検討した。

#### (3) 骨誘導能の評価；

生体内での骨誘導能の評価には、骨再生(頭蓋骨欠損)と骨疾患(OVXによる骨粗鬆症)の2つの動物モデルに増殖期iMKと成熟期iMK、および改変型iMKの移植を行った。頭蓋骨欠損モデルでは、それぞれのiMKを人工骨基質、さらに骨芽細胞を播種した人工骨基質と共に移植し、iMKの骨再生促進能を検討した。卵巣摘出(OVX)による骨粗鬆症モデルでは、増殖期iMKおよび改変型iMKの骨髄内投与を行い、病態改善能を検討することにした。

#### (4) 骨代謝機能の評価；

3次元共培養系を構築し、骨芽細胞や破骨細胞に作用させることで、骨代謝におけるiMKの巨核球機能を明らかにする試みを行った。具体的には、間葉系幹細胞からスフェロイドを形成させ、

バイオ 3D プリンターを用いて積層し、細胞塊をI型コラーゲンゲル上に置く。次に、Organ-on-a-chip を利用して、増殖期 iMK や改変型 iMK、および破骨前駆細胞を加えた還流三次元培養系を構築し、骨微小環境を再現した。

#### 4 . 研究成果

実験に先立ち、iMK について増殖期と成熟期における増殖・分化の誘導にかかわる条件の最適化を行った。改変型 iMK の作製については、骨芽細胞の増殖に関わる分泌蛋白質をコードする遺伝子の導入を実施したところ、MSC の増殖を誘導する機能が增強された iMK を作製できる可能性が示唆された。一方で、血小板放出前の成熟期 iMK を人工骨材料に播種し、ラット頭蓋骨欠損部に移植したところ、PRP と比較して優れた新生骨形成が認められた。3次元培養系での骨代謝機能評価では、増殖期や成熟期初期にある iMK が BMMSC の増殖や骨芽細胞への分化に機能することを見出した。さらに、共培養後の iMK では、破骨細胞分化の抑制因子である OPG の発現が增強されていることが判明した。そのため、現在は organ-on-a-chip を応用した3次元共培養系にて、MSC によるスフィロイド体に iMK と破骨前駆細胞を培養することで、iMK の骨代謝機能について詳細な調査を継続しているところである。また、このような増殖期や成熟期 iMK の骨再生治療に対する有効性についても併せて研究を進めているところである。

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
研究協力者	中内 啓光  (nakauchi hiromitsu)		
研究協力者	江藤 浩之  (eto koji)		
研究協力者	武部 貴則  (takebe takanori)		
研究協力者	住田 吉慶  (sumita yoshinori)		
研究協力者	坂下 直美  (sakashita naomi)		
研究協力者	山本 英幸  (yamaoto hideyuki)		

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	朝比奈 泉  (asahina izumi)		
研究協力者	重盛 智大  (shigemori tomohiro)		
研究協力者	佐竹 真  (satake makoto)		

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