

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月24日現在

機関番号：14501
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2010～2011
 課題番号：22791379
 研究課題名（和文） 胚様体形成を介さないマウス iPS 細胞の骨分化誘導法の確立と骨再生への応用
 研究課題名（英文） Efficient derivation of osteoprogenitor cells from induced pluripotent stem cells for bone regeneration
 研究代表者
 李 相亮（SANG YANG LEE）
 神戸大学・医学部附属病院・特定助教
 研究者番号：40533732

研究成果の概要（和文）：胚様体形成を介さないマウス iPS 細胞の骨分化誘導法を確立し、iPS 細胞から高い骨分化能をもつ osteoprogenitor cells を高い再現性で大量に得ることが可能となった。本研究により iPS 細胞の骨分化誘導技術に関する知見が大きく広がり、骨折患者に対する骨再生療法の臨床応用の実現の加速が期待される。

研究成果の概要（英文）：The novel direct-plating method described here provides a significant technical advance over conventional methods of iPSC-induced osteoprogenitor cells by avoiding the embryonic body formation that often leads to heterogeneous and unpredictable osteogenic differentiation. Because of simplicity, our novel direct-plating method could be amenable to large-scale production of osteoprogenitor cells for bone regeneration.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：四肢機能再建学・再生医療

1. 研究開始当初の背景

一般的に骨折患者においては、保存的治療（ギプス等による外固定）や骨折部の解剖学的整復と固定を行うことで、骨癒合が得られて治癒する。しかし、全体の骨折の5-10%

は治療後6-8ヶ月を経過しても骨癒合が得られずに難治性骨折・偽関節に陥り、著しいQOLの低下を招く。また、交通事故や転落などの高エネルギー外傷による骨折や骨腫

瘍摘出術後などでは、広範な骨欠損が生じることも少なくない。このような偽関節や骨欠損が生じた場合、現在行われている治療を行っても、治癒に至らず切断術にいたるケースも少なくなく、たとえ治癒したとしても、治療期間が長期にわたり、患者に精神的肉体的苦痛をもたらし、後遺症に苦しむことも少なくない。したがって、新たな治療法の確立は、社会的・医学的急務といえる。

近年、再生医療の研究が多方面で推し進められている。京都大学山中伸弥教授らのグループが報告した人工多能生幹細胞 (induced pluripotent stem cells; iPS 細胞) は、様々な細胞に分化できる「多能性」と、細胞自身で無限に増殖する「自己増殖能」を持つことを特長とし、分化した体細胞を **reprogramming** することにより **ES 細胞** とほぼ同等の性質を再獲得した細胞である。2009 年には、脊髄損傷モデルに対して iPS 細胞が治療に有効であったと報告され、整形外科領域でも注目が高まっていた。

iPS 細胞研究は未だ萌芽期であり、ヒトに投与する臨床応用へ進行可能な段階に到達するには、分化誘導技術の更なる発展が必要である。iPS 細胞は、**in vitro** において、胚様体とよばれる細胞塊形成を介して骨・軟骨分化誘導できることが以前より報告されている。近年、**ES 細胞** において胚様体形成を介さずに骨分化誘導を行う研究が行われ、より短期間に、より高純度の骨芽様細胞を効率よく得る方法が報告されている。我々は、iPS 細胞でも本手法を用いれば効率よく骨芽様細胞が得られると仮説を立てた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、研究代表者が **embryonic stem cells (ES 細胞)** を用いて確立した「胚様体形成を介さない」骨分化誘導の手法を応

用し、**in vitro** におけるマウス人工多能生幹細胞 **iPS 細胞** の効率的な骨芽細胞分化法を確立することである。さらに、ラット難治性骨折モデルを作成し、本法で分化させた **iPS** 由来骨芽様細胞を移植し、**in vivo** の骨再生能力を評価することである。本研究により、将来の **iPS 細胞** を用いた、骨再生への臨床応用に有益な情報をもたらすことを目標とした。

3. 研究の方法

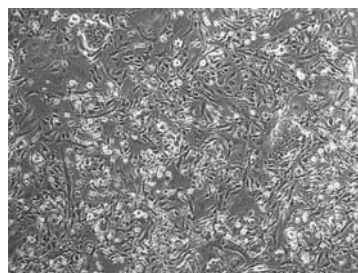
マウス **iPS 細胞** (**iPS-MEF-Ng-20D-17** および **iPS-MEF-Ng-178B-5**) の未分化維持培養後、**iPS 細胞** の **MSC** 様細胞への分化を、胚様体形成法を介さずに、**direct-plating** 法にて行った。均質な **fibroblastic** な形態を持つ細胞 (以下 **direct-plated cells**) が得られるまで、継代を繰り返し、**FACS** にて細胞表面抗原マーカーを計測定し、さらに **real-time PCR** にて **Oct-3/4** の発現を測定した。

次に、得られた **direct-plated cells** の骨分化誘導を行い、骨分化能を評価した。

続いて、骨分化誘導した **direct-plated cells** の **in vivo** での骨再生能を検討した。免疫不全ラット難治性骨折モデルを作成し、骨折部に **direct-plated cells** を移植し、骨折治癒能を評価した。

4. 研究成果

Direct-plating 法にて、未分化な **iPS 細胞** から均質な **fibroblastic** な形態を持つ **direct-plated cells** を得ることができた。

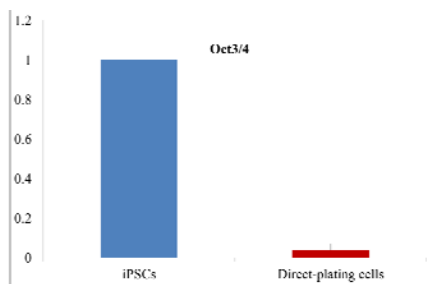


この **direct-plated cells** の細胞表面抗原を

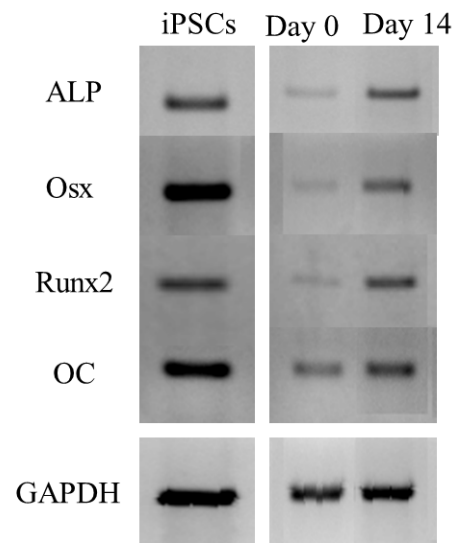
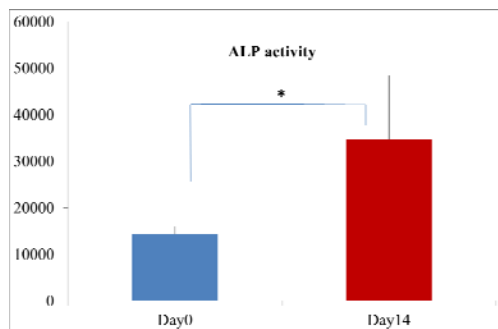
Cell surface marker	Direct-plated cells
CD29	91.7 ± 4.7
CD44	64.3 ± 13.1
Sca-1	70.0 ± 4.4
CD11b	0.2 ± 0.0
CD45	1.7 ± 0.3
CD117	3.1 ± 0.7
CD105	4.1 ± 0.7

FACSにて解析したところ、mouse MSCと類似した表面抗原、すなわち CD29・CD44・Sca-1 が陽性であることが明らかになった。

また、direct-plated cells は iPS 細胞の未分化維持時に比べ Oct-3/4 の発現は有意に低下していることが Real-time PCR にて確認され、direct-plated cells が多能性を失っていることが示唆された。



次に direct-plated cells を二週間、骨分化誘導培地にて培養したところ、非常に高い骨分化能を有することが Alizarin red S 染色・RT-PCR・ALP 活性にて確認された。



In vivo 実験に関しては、現在進行中であるが、direct-plated cell 移植群では移植後 6 週後に骨癒合を認める傾向があり、in vivo でも優れた骨分化・骨再生能を有することが示唆されている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

1. Dogaki Y, Lee SY, Niikura T, Koh A, Koga T, Okumachi E, Nishida K, Kuroda R, Kurosaka M. Efficient derivation of osteoprogenitor cells from induced pluripotent stem cell for bone regeneration. 1st AO Trauma Asia Pacific Scientific Congress. 2012.5.11-12, Hong Kong, China.
2. Dogaki Y, Lee SY, Niikura T, Koh A, Koga T, Okumachi E, Kakutani K, Hirata H, Nishida K, Kuroda R, Kurosaka M. Efficient differentiation

and characterization of murine induced pluripotent stem cell-derived osteoprogenitor cells without embryoid body formation. 58th Annual Meeting of Orthopaedic Research Society. 2012.2.4-7, San Francisco, CA, USA.

〔図書〕（計0件）

〔その他〕
ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

李 相亮 (SANG YANG LEE)
神戸大学・医学部附属病院・特定助教
研究者番号：40533732

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者