

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 24 日現在

機関番号：34419

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791670

研究課題名(和文) 多能性幹細胞からの間葉系幹細胞の分化誘導と評価

研究課題名(英文) Induction of Mesenchymal Stem Cells from Pluripotent Stem Cells

研究代表者

寺村 岳士 (TERAMURA, Takeshi)

近畿大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：40460901

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：新規間葉系幹細胞(MSC)ソースの探索を目的に、多能性幹細胞からのMSCの誘導と評価を実施した。SCIDマウス内でのテラトーマ形成を介した*in vivo*での分化誘導、低酸素培養による*in vitro*での誘導両方法により、典型的なMSCの形質を示す多能性幹細胞由来MSC様細胞(pcMSC)が得られた。*In vitro*誘導pcMSCは移植後の腫瘍形成性が認められず、軟骨再生に寄与した。しかし、*in vivo*誘導pcMSCにおいては継代培養により高い腫瘍原性が出現した。以上より、多能性幹細胞は有望なMSCソースとなりうるが、腫瘍原性などが異なる場合があるため慎重な検討を要するという結論が得られた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we derived the MSCs from rabbit ESCs and human iPSCs both *in vivo* and *in vitro*, and examined their detailed characteristics.

Both *in vivo*- and *in vitro*-pcMSCs expressed MSC-markers and showed multiple differentiation properties. In the cases of the *in vitro*-pcMSCs, teratoma formations were not observed, and when rabbit ESC-derived *in vitro*-pcMSCs were transplanted into the model rabbits, successful engraftment were observed. On the other hand, the *in vivo*-induced MSCs derived from human iPSCs showed high telomerase activity and formed teratoma.

We could obtain the MSC-like cells both *in vivo* and *in vitro*. However, the present results suggest that pluripotent stem cells could derive various types of MSCs, and we should select the cells carefully based on the appropriate markers for our purposes.

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：再生医療 多能性幹細胞 間葉系幹細胞

1. 研究開始当初の背景

ES細胞、iPS細胞は多能性幹細胞と呼ばれ、細胞移植医療用資源として有利な性質を多く有しているが、これを安全かつ効果的に使用するためには目的の細胞に『分化誘導』することが必要である。

しかし、神経細胞や心筋細胞など一部の細胞を除き、誘導方法が確立されておらず、運動器再生医療において有用な軟骨細胞や間葉系幹細胞(MSCs)を効率的に誘導する方法については殆ど研究がなされていない。特に、軟骨細胞は発生学的にMSCsに由来することが知られていることから、高純度の軟骨再生を得るためには効果的なMSCs誘導方法が必須である。

2. 研究の目的

本研究ではMSCs誘導に焦点を当て、効果的な分化誘導法の開発と運動器再生医療領域における多能性幹細胞の臨床的価値を正確に評価することを目的に、1) *in vivo*での多能性幹細胞からのMSCの誘導と評価、2) *in vitro*でのMSC誘導法の確立、3)多能性幹細胞由来MSC(pc-MSC)の動物モデルへの移植と機能、安全性評価を計画した。

3. 研究の方法

*in vivo*でのpc-MSCの分化誘導：未分化ウサギES細胞あるいはヒトiPS細胞をマトリゲルに包埋し、SCIDマウス大腿部に移植した。1-2ヶ月後、形成されたテラトーマを回収し、細切およびコラゲナーゼ処理にて細胞液を得た。これを10%FCS-aMEM中にて24時間培養後、PBSにて洗浄を行うことで非接着ならびに弱く接着した細胞を除去した。接着細胞は10%FCS-aMEMで維持した。ヒトiPS細胞由来細胞については、FACSによりCD44/CD73/CD105陽性細胞のみを分取した。

*in vitro*での分化誘導：未分化ウサギES細胞あるいはヒトiPS細胞を直接または胚様体形成後にマトリゲルあるいはゼラチンコートディッシュ上に播種し、1%、5%、20%酸素下で培養を行った。出現したMSC様細胞は10%FCS-aMEMで維持した。ヒトiPS細胞由来細胞については、FACSにより

CD44/CD73/CD105陽性細胞のみを分取した。

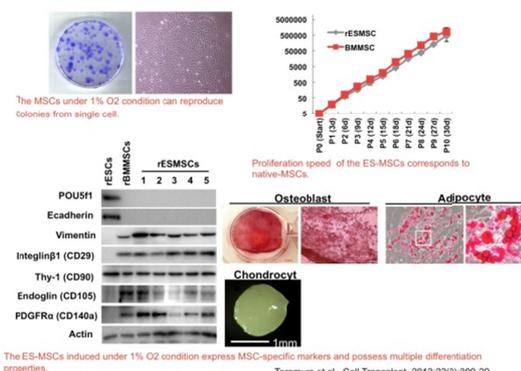
誘導したMSC(pc-MSC)は細胞数計測による増殖速度の評価、qRT-PCRによる遺伝子発現解析、FACSによる細胞表面抗原の評価、骨芽細胞、脂肪細胞、軟骨細胞への分化誘導、軟骨全層欠損モデル動物(ウサギ、Nudeラット)への移植により機能評価を行った。

4. 研究成果

テラトーマ由来接着細胞画分は紡錘体の形状を示し、単一細胞由来のMSC様コロニーを形成した。*In vivo*-MSC like cell (*in vivo* pcMSC)においてはNanog, Oct4, EcadといったES/iPS細胞のマーカ―遺伝子の発現が著しく減少しており、VimentinやPDGFRaの発現上昇が認められた。ヒトiPS由来*in vivo* pcMSCについてFACS解析を行ったところ、CD29、CD44、CD105、CD106が陽性であった。分化誘導を行ったところ、*in vitro*において骨芽細胞、脂肪細胞、軟骨細胞への分化が観察され、得られた細胞はMSCと同様の性質を有することが確認された。ヒトiPS由来*in vivo* pcMSCをNudeラット関節内に移植したところ、1ヶ月後に高頻度の腫瘍(テラトーマ)形成を認めた。詳細に解析したところ、*in vivo*誘導MSCsにおいては高テロメラーゼ活性が認められ、さらに、継代培養によりiPS細胞誘導時に使用したウイルスの再活性化が生じることが明らかとなった。

*In vitro*誘導においては、酸素分圧1%の培養環境下において、未分化多能性細胞(ウサギを用いたモデル研究)が選択的に死滅することが観察され、同条件下

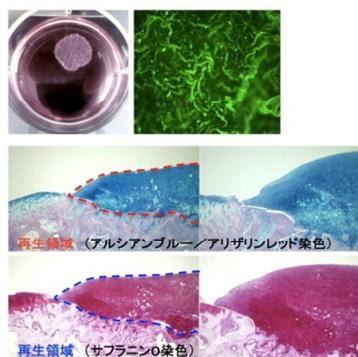
図1. ウサギES細胞より得られた*in vitro*-pcMSCsの性状解析



で得られたpcMSCはBMMSCと同等の増殖力を示すとともに、ES細胞マーカ―の消失、MSC

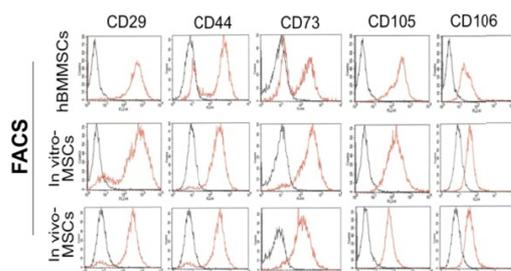
マーカーの発現が認められた。In vitro における骨芽細胞、脂肪細胞、軟骨細胞への分化能力も観察された。次に、ウサギ ES 細胞より誘導した in vitro pcMSCpc-MSCs より細胞シートを作成し、ウサギ軟骨全層欠損モデルに移植、1ヶ月後に組織の観察を行ったところ、豊富な細胞外マトリクスを有する再生軟骨組織により欠損部がほぼ完全に修復されていることが確認された。

図2. ウサギES細胞由来in vitro-pcMSCsによる軟骨再生



次に、GFP 導入 pc-MSCs を用い、再生組織から FACS ソーティングにより pc-MSC 由来細胞のみを分離、詳細な解析したところ、移植細胞は軟骨細胞として組織に定着することが明らかとなった。本研究で開発した in vitro 誘導法はともにヒト iPS 細胞でも有効であり、典型的な MSC マーカーの発現、分化能力を示す pc-MSC が得られた。

図3. ヒトiPS細胞より得られたpcMSCsのFACS解析



ヒト iPS 細胞由来 in vitro pc-MSCs を SCID マウス皮下に移植したところ、2ヶ月間の観察でテラトーマ形成は認められなかった。

以上より、1) 多能性幹細胞からは移植可能な MSC が得られること、2) iPS 細胞を由来とした場合においては、誘導方法によって腫瘍原性などが異なる場合があり、より慎重な検討を要するという研究結果が得られた。

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4件)

1. Teramura T, Sugimoto H, Frampton J, Kida Y, Nakano M, Kawakami M, Izumi H, Fukunaga N, Onodera Y, Takehara T, Fukuda K, Hosoi Y. Generation of embryonic stem cell lines from immature rabbit ovarian follicles. *Stem Cells Dev.* 2013 Mar 15;22(6):928-38. 査読：有

2. Teramura T, Onodera Y, Takehara T, Frampton J, Matsuoka T, Ito S, Nakagawa K, Miki Y, Hosoi Y, Hamanishi C, Fukuda K. Induction of functional mesenchymal stem cells from rabbit embryonic stem cells by exposure to severe hypoxic conditions. *Cell Transplant.* 2013;22(2):309-29. 査読：有

3. Takehara T, Teramura T, Onodera Y, Hamanishi C, Fukuda K. Reduced oxygen concentration enhances conversion of embryonic stem cells to epiblast stem cells. *Stem Cells Dev.* 2012 May 20;21(8):1239-49. 査読：有

4. Teramura T, Takehara T, Onodera Y, Nakagawa K, Hamanishi C, Fukuda K. Mechanical stimulation of cyclic tensile strain induces reduction of pluripotent related gene expressions via activation of Rho/ROCK and subsequent decreasing of AKT phosphorylation in human induced pluripotent stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012 Jan 13;417(2):836-41. 査読：有

〔学会発表〕(計4件)

1. Takeshi Teramura, Toshiyuki Takehara, Yuta Onodera, John Frampton, Kanji Fukuda. Induction of Mesenchymal Stem Cells from Human iPS cells in vivo and in vitro. 11th International Society for Stem Cell Research, Annual Meeting. June 13 2013. Boston, MA USA.

2. 寺村岳士、小野寺勇太、竹原俊幸、福田寛二. 低酸素培養によるヒト iPS 細胞からの間葉系幹細胞の分化誘導. 第12回日本再生医

療学会 .2013 年 3 月 22 日 .パシフィコ横浜 .

3. 寺村岳士、小野寺勇太、竹原俊幸、福田寛二・間葉系幹細胞シートによるラット関節軟骨全層欠損の軟骨再生 .第 26 回日本軟骨代謝学会 . 2013 年 3 月 1 日 . 千里ライフサイエンスセンター .

4. 寺村岳士、小野寺 勇太、竹原俊幸、中川晃一、浜西千秋、福田寛二 . 低酸素培養によるウサギ ES 細胞からの間葉系幹細胞の分化誘導 . 第 11 回日本再生医療学会 . 2012 年 6 月 12 日 . パシフィコ横浜 .

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称 : 免疫不全動物を用いた細胞の製法

発明者 : 寺村岳士、福田寛二

権利者 : 学校法人近畿大学

種類 : 特許

番号 : 特許公開 2 0 1 2 - 1 2 0 4 8 6

出願年月日 : 2 0 1 0 年 1 2 月 8 日

国内外の別 : 国際

6 . 研究組織

(1)研究代表者

寺村 岳士 (TERAMURA, Takeshi)

近畿大学・医学部附属病院・講師

研究者番号 : 40460901