

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 7 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24792202

研究課題名(和文)顎顔面領域における疾患特異的 iPS 細胞を用いた新たな治療法の開発

研究課題名(英文)Development of a new treatment method using a disease-specific iPS cells in the maxillofacial region

研究代表者

小山 典昭 (Koyama, Noriaki)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・医員

研究者番号：30599931

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)：未分化 iPS 細胞(iPSC)からの胚様体(EB)形成、EBからの接着細胞増殖、単層培養、3次元培養の4段階から成る培養法により、軟骨細胞分化誘導に成功した。3次元培養開始前に間葉系幹細胞の細胞表面マーカーが多数発現しており、iPSCが間葉系前駆細胞を経て骨芽細胞・軟骨細胞へと分化していると示唆された。軟骨誘導培地へのCNP添加によりiPSCから軟骨細胞への分化が促進される傾向を認めており、ヒトiPSCから軟骨細胞への分化過程においてもCNPが促進作用を有する可能性が示唆された。また、軟骨無形成症患者由来疾患特異的iPSC株でも、軟骨細胞分化を確認できた。

研究成果の概要(英文)：This study demonstrates that human iPS cells (hiPSC) can be efficiently differentiated into the osteogenic and chondrogenic lineage in vitro via generation of mesenchymal progenitor cells, using a simplified, 4-step culture method. 1:embryoid body (EB) formation, 2:cell outgrowth from EBs, 3:monolayer culture of sprouted cells from EBs, and 4:three-dimensional culture. Monolayer-cultured cells expressed markers for mesenchymal stem cells. The chondrocytes were accelerated from iPSCs by chondrogenic induction medium including CNP. There are possibility the CNP has a promoting effect that in the process of hiPSCs differentiation into the chondrogenic lineage. In addition, the chondrogenic differentiation was confirmed in disease-specific iPSC line from achondroplasia patients.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：iPS細胞 骨軟骨再生 骨代謝

1. 研究開始当初の背景

顎顔面領域では膜性骨化、内軟骨性骨化に異常を来すことで様々な顎変形を呈する疾患がある。C型ナトリウム利尿ペプチド(CNP)には、軟骨伸長作用のある調節因子として注目されており、トランスジェニックマウスでは低身長の治療の改善が報告されている。そこで、疾患特異的 iPS 細胞を樹立し、軟骨形成不全症患者へ CNP の臨床応用に先立ってヒトの細胞における有効性の確認や投与方法、有効投与量を検討する。また線維性骨異形成症や鎖骨頭蓋異形成症患者への各種因子(BMP等)を用いた治療法の確立を目指す。臨床応用にむけた創薬開発、新たなアプローチでの治療法の確立のための評価系を検討するものである。

2. 研究の目的

再生医療で注目されているヒト iPS 細胞は本邦において、申請者の所属する研究機関再生医科学研究所にて、細胞株が樹立されているが、その分化誘導の安定性や癌化する等、未だ臨床への応用に広く普及するには至っていない。

疾患特異的 iPS 細胞を樹立し、骨・軟骨分化誘導能について正常 iPS 細胞と比較の検討、さらに CNP や BMP などを用いた臨床応用に向けた有効性、投与量の検討を行う。また、創薬だけでなく病態解明においても、細胞治療に限らない広範囲での臨床応用に向けた研究を行う。対象疾患は、Fibroblast growth factor receptor 3: FGFR3 の遺伝子変異による軟骨形成不全症で FGFR3 の恒常的活性により低身長をきたす疾患と、Runt-related transcription factor 2: RUNX2 の somatic mutation である線維性異形成症で名前のごとく線維性の骨の異形成を呈する疾患である。外科的に削除された部位は、広範囲な骨欠損となるため、術後の QOL は著しく低下する。そこで、疾患特異的 iPS 細胞を樹立後に各条件下で骨・軟骨細胞分化誘導刺激を行い *in vitro* 下での正常な骨・軟骨誘導を確立する。また、効率的で確実な誘導条件を開発し創薬開発を視野に入れた研究を行っていく。

3. 研究の方法

正常および疾患特異的 iPS 細胞の維持培養フィーダー細胞上で至適細胞数で、確立している方法(Takahashi K et al. Cell 131, 1-12, 2007)にて培養する。維持培地条件は、リプロセル社の霊長類 ES 細胞用培地に bFGF(5ng/ml)を添加したものである。なお iPS 細胞の樹立に関しては、京都大学大学院医学研究科・医学部医の倫理委員会に承認され指針書を得たものであり、患者の同意を得て、手術標本から一部の組織を採取する。疾患特異的 iPS 細胞の樹立は関連施設 CiRA(京都大学 iPS 細胞研究所)で行い、クローンの提供を受ける。

間葉系細胞分化誘導

未分化細胞は浮遊し、(間葉系細胞への)分化傾向にある細胞は細胞が明瞭となり接着するとされる。維持培養された iPS 細胞を、解離液を用いて回収後、bFGF 不含の霊長類 ES 細胞用培地にて7日間浮遊培養する。EB を回収後、10% FBS 入りの DMEM にて cell culture dish 上で培養すると、EB が接着し outgrowth してくる。out-growth した細胞を EB とともに Trypsin-EDTA にて回収し、セルストレイナーを用いて可及的に EB を取り除き、再度 10% FBS 入りの DMEM にて単層培養する。接着細胞を Trypsin-EDTA にて回収し、各分化誘導に用いる。10% FBS 入りの DMEM にて cell culture dish 上で培養すると、EB が接着し outgrowth してくる。outgrowth した細胞を EB とともに Trypsin-EDTA にて回収し、セルストレイナーを用いて可及的に EB を取り除き、再度 10% FBS 入りの DMEM にて単層培養する。接着細胞を Trypsin-EDTA にて回収し、各分化誘導に用いる。

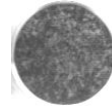
軟骨細胞分化誘導

軟骨分化誘導は、約 3.0×10^5 の細胞を DMEM/F-12、10% FBS、 1×10^{-8} M ITS+Premix、デキサメタゾン、アスコルビン酸、ピルビン酸、TGF- β を用いて、三次元培養下で行う。5% CO₂ インキュベーター内で3日毎に培地を交換する。



骨芽細胞分化誘導

骨芽細胞分化誘導は、10% FBS と DMEM にて単層培養しコンフルエント後、 α MEM、15% FBS、アスコルビン酸、グルタミン、 β -グリセロリン酸、デキサメタゾンを用いて行う。培養期間は4週間で、5% CO₂ インキュベーター内で3日おきに培地を交換する。



分化誘導における解析、評価

各分化系の関連遺伝子、タンパク質の定量・定性、組織学的検討を、real time RT-PCR 法で分化に関連した発現遺伝子、各種 Kit を使用しタンパク量を解析する。また、組織学的検討も併せて行う。

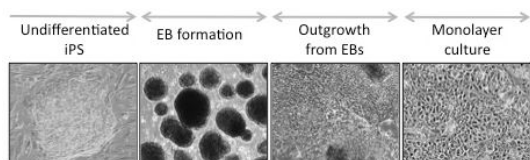
成長因子添加による分化能の検討

骨・軟骨細胞分化誘導における CNP、BMP の直接的な細胞への作用の検討を行う。また添加量(投与量)による影響も併せて検討し、正常 iPS 細胞と疾患特異的 iPS 細胞の比較、疾患特異的 iPS 細胞の分化誘導における rescue 実験を行う。他に新たな有用な評価方法があれば、適宜考慮する。

4. 研究成果

ヒト iPS 細胞株 201B7 を用いて検討した結果、未分化 iPS 細胞からの EB 形成、培養皿上に接着させた EB からの細胞増殖、単一細胞に解離させ残存 EB を除去後の単層培養、3次元培養による軟骨細胞分化誘導 / 単層培養による骨芽細胞分化誘導 の4段

階から成る培養法を用いて分化誘導を行った。



軟骨細胞分化誘導では、3次元培養開始後21日で細胞は明るい細胞質を有する大型で円形の軟骨細胞様の形態となり、細胞周囲はアルシアンブルー染色で濃染し、軟骨基質の産生が示された。Ⅱ型コラーゲン、アグリカンの遺伝子発現も経時的に増加したが、Ⅰ型コラーゲン遺伝子の発現は認めなかった。軟骨細胞への誘導成功率は約73%であった。ただし免疫組織化学的検討ではⅡ型コラーゲンを検出できず、軟骨細胞としての成熟度は不十分である可能性がある。また、骨芽細胞分化誘導では、1~3週で経時的にアリザリンレッド陽性となる石灰化物沈着を認めた。Ⅱ型コラーゲン、オステオカルシン等の遺伝子発現も経時的に増加した。他の複数のヒトiPS細胞株でも骨芽細胞、軟骨細胞分化が確認された。第1段階の細胞の表面マーカーを確認したところ間葉系幹細胞のマーカーが多数発現していたことから、この培養法でiPS細胞は間葉系前駆細胞を経て骨芽細胞・軟骨細胞へと分化しており、より生体に近似した分化系といえる。

軟骨分化誘導培地へのCNP添加群/非添加群について比較を行った。

3週間のペレット培養後、ペレット内のiPS細胞は軟骨細胞様の形態を示し、ペレット全体がアルシアンブルーで濃染した。免疫染色により、Ⅱ型コラーゲン、アグリカンの発現を認めた。また、軟骨分化誘導初期よりCNPならびにGC-B遺伝子の発現を認めており、ペレット培養開始後経時的にⅡ型コラーゲンとアグリカンの遺伝子発現の増加を認めた。CNP非添加群と比較し、添加群ではⅡ型コラーゲン、アグリカンともに遺伝子発現及び免疫染色における蛋白発現の増加傾向を示した。経時的なグリコサミノグリカン産生の増加傾向も認めた。

CNP添加によりiPS細胞から軟骨細胞への分化が促進される傾向を認めた。ヒト軟骨細胞におけるCNPの効果についてはほとんど報告がないが、今回の検討によりヒトiPSCから軟骨細胞への分化過程においてもCNPが促進作用を有する可能性が示唆された。

また、軟骨無形成症患者由来の疾患特異的iPS細胞株Ach-a1においても、4段階からなる分化誘導法を用いることで、間葉系前駆細胞を介した軟骨細胞分化誘導が可能であった。

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1件)

Koyama N, Miura M, Nakao K, Kondo E, Fujii T, Taura D, Kanamoto N, Sone M, Yasoda A, Arai H, Bessho K, Nakao K. Human induced pluripotent stem cells differentiated into chondrogenic lineage via generation of mesenchymal progenitor cells. *Stem Cells Dev*. 査読有、22(1): 102-113. 2013

[学会発表](計10件)

三浦晶子, 小山典昭, 中尾一祐, 上田依利子, 山下唯, 近藤絵里, 藤井寿人, 金本巨哲, 曾根正勝, 八十田明宏, 荒井宏司, 別所和久, 稲垣暢也, 中尾一和. ヒトiPS細胞からの軟骨細胞分化誘導におけるCNPの作用に関する検討. 第87回日本内分泌学会学術総会 福岡市 2014/4/24-26

小山典昭, 三浦晶子, 中尾一祐, 上田依利子, 山下唯, 近藤絵里, 藤井寿人, 磯部悠, 池野正幸, 山中茂樹, 金本巨哲, 曾根正勝, 八十田明宏, 荒井宏司, 別所和久, 稲垣暢也, 中尾一和. ヒトiPS細胞から軟骨細胞への分化誘導過程におけるCNPの作用に関する検討. 第13回日本再生医療学会総会 京都市 2014/3/4-6

小山典昭, 三浦晶子. ヒトiPS細胞を用いた軟骨細胞再生の試み. 第27回日本軟骨代謝学会スポンサーシンポジウム 京都市 2014/2/28-3/1

磯部悠, 小山典昭, 池野正幸, 中尾一祐, 高橋克, 別所和久. ヒトiPS細胞を用いて間葉系前駆細胞を介した骨芽細胞への分化誘導. 第58回日本口腔外科学会総会 福岡市 2013/10/11-13

Koyama N, Miura M, Nakao K, Kondo E, Fujii T, Kanamoto N, Yasoda A, Arai H, Bessho K, Nakao K. The development of culture method for chondrogenic differentiation of human iPS cells. 2nd Joint Meeting of the IBMS and the JSBMR, Young Investigator Seminar. Kobe, 2013/5/28-6/1

喜早ほのか, 高橋克, 磯部悠, 齊藤和幸, 東郷由弥子, 池野正幸, 小山典昭, 別所和久. 線維性異形成症のヒト疾患特異的iPS細胞樹立に向けた病変部におけるGNAS1遺伝子変異の検討. 第24回日本口腔科学会近畿地方部会 大津市 2012/11/17

小山典昭, 三浦晶子, 中尾一祐, 上田依利子, 山下唯, 近藤絵里, 藤井寿人, 田浦大輔, 金本巨哲, 曾根正勝, 八十田明宏, 荒井宏司, 別所和久, 中尾一和. ヒトiPS細胞は間葉系前駆細胞を介して軟骨細胞へ分化する. 第30回日本骨代謝学会学術集会 東京都 2012/7/19-21

小山典昭, 三浦晶子, 中尾一祐, 上田依利子, 山下唯, 大澤賢次, 近藤絵里, 藤井寿人, 野口倫生, 園山拓洋, 田浦大輔, 曾根正勝, 金本巨哲, 八十田明宏, 荒井宏司,

別所和久, 中尾一和. 間葉系細胞を介した軟骨細胞分化におけるヒト iPS 細胞と ES 細胞の比較検討. 第 11 回日本再生医療学会総会 横浜市 2012/6/12-14

小山典昭, 三浦晶子, 中尾一祐, 上田依利子, 山下唯, 近藤絵里, 藤井寿人, 田浦大輔, 金本巨哲, 曾根正勝, 八十田明宏, 荒井宏司, 別所和久, 中尾一和. ヒト人工多能性幹細胞から軟骨細胞への *in vitro* における分化誘導法に関する検討. 第 42 回骨カルシウム代謝研究会 京都市 2012/5/11

三浦晶子, 小山典昭, 上田依利子, 山下唯, 近藤絵里, 中尾一祐, 藤井寿人, 田浦大輔, 曾根正勝, 金本巨哲, 八十田明宏, 荒井宏司, 中尾一和. ヒト多能性幹細胞の *in vitro* における軟骨細胞分化能に関する検討. 第 85 回日本内分泌学会学術総会 名古屋市 2012/4/19-21

〔図書〕(計 1 件)

小山典昭, 他多数. [2]分化誘導法 <1>ヒト iPS 細胞から間葉系前駆細胞を介した軟骨細胞分化誘導法. 「再生医療」再生医療における臨床研究と製品開発～医工連携に向けた「自社技術」と「再生医療」の接点を探る～. 技術情報協会, 東京, 2013, p188-190.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (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

小山 典昭 (KOYAMA, Noriaki)

京都大学・大学院医学研究科・特定助教

研究者番号: 30599931