

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890120

研究課題名(和文) iPS細胞の骨芽細胞分化を促進する小分子化合物スクリーニングシステムの開発

研究課題名(英文) Enhanced Osteogenesis of iPS Cells by Small Molecules

研究代表者

萱島 浩輝 (Kayashima, Hiroki)

大阪大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：50632121

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：本研究計画は、ケミカルバイオロジーのアプローチによって、iPS細胞の強力な骨形成作用を有する小分子化合物による新規骨再生材料の開発を目的として、広範なケミカルライブラリーを活用し、スクリーニングシステムを構築することで同定した化合物が、iPS細胞の骨芽細胞分化に及ぼす影響を検討した。その結果、スクリーニングシステムにより同定された小分子化合物は、iPS細胞の骨芽細胞特異的遺伝子の発現および細胞外基質の石灰化を促進し、その基質からはアパタイトに関連するリン酸カルシウムの存在が確認された。また、マウス皮下において、新生骨形成を示し、iPS細胞の腫瘍化を認めないことが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to investigate osteogenic differentiation capacity of iPS cells, and to examine effects of osteoblast-targeting small-molecules on the iPS cell osteogenesis. iPS cells produced robustly mineralized bone nodules that contained abundant calcium phosphate in vitro, and the osteogenesis can be enhanced by small molecules. iPS cell/gel scaffold construct by transplantation into the back of the SCID mouse skin showed apparent new bone formation without tumor formation.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：補綴系歯学

キーワード：バイオロジー 再生医療

1. 研究開始当初の背景

抜歯、歯周病等によって吸収した顎堤を再建するために行われる骨再生誘導療法には、治癒期間の延長、術後の組織吸収などの問題が残っており、より効率のよい骨組織再生治療法の開発が望まれている。これに対して、個々の患者から作製した iPS 細胞に、既存の骨形成因子として作用する生理活性物質を応用する戦略は有望であるが、BMP などのタンパク質シグナル分子には、安定化、動物由来、コストなどの解決すべき課題が残る。一方で、小分子化合物は、副作用に対する安全性、コスト面での利点を有しており、その再生医療への応用が期待されている。したがって強力な骨形成作用をもつ小分子化合物開発できれば、これらの課題を解決できるものと期待される。

ポストゲノム時代の新しい研究領域であるケミカルバイオロジーの戦略とは、化学(小分子化合物)を推進力として、広範なケミカルライブラリーを活用し、スクリーニングシステムを構築し、生命現象を解明することにより創薬の基盤科学を築くことである。そこで、本研究代表者は、多数の化合物の中から、iPS 細胞の骨形成促進作用を有する化合物を絞り込むためには効率的なスクリーニングシステムの構築が必要となると考えた。

2. 研究の目的

本研究計画では、小分子化合物による新たな骨組織再生材料を開発するために、以下の項目を明らかにすることを目的とした。

(1) これまでに報告のある骨芽細胞への分化を促進する小分子化合物を用いて iPS 細胞を骨芽細胞へ分化誘導し、iPS 細胞の骨芽細胞分化に及ぼす影響についてスクリーニングを行う。

(2) 同定した小分子化合物が、iPS 細胞の骨芽細胞分化に及ぼす影響を明らかにする。

(3) iPS 細胞の三次元培養システムの検討を行い、骨芽細胞分化に及ぼす影響を明らかにする。

(4) 同定した小分子化合物含有 iPS 細胞がマウス背皮下における新生骨形成に及ぼす影響を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) これまでに報告のある骨芽細胞の分化を促進する小分子化合物郡を骨芽細胞分化誘導培地に添加して iPS 細胞を培養し、誘導 21 日後に von Kossa 染色を用いて、スクリーニングを行い、基質の石灰化を促進した小分子化合物を候補化合物とする。

(2) 骨芽細胞の分化を促進する候補小分子化合物を骨芽細胞分化誘導培地に添加して iPS 細胞を培養し、化合物郡が、実際に iPS 細胞の骨芽細胞分化に促進的に作用するかどうかを評価する。

分化の評価は、骨芽細胞特異的遺伝子 (Runx2, Osterix, BSP, Osteocalcin) の発現を RT-PCR 法にて解析する。

(3) 骨芽細胞の分化を促進させる作用を有する小分子化合物に対して、フィブリンゲル粒子に含浸させて架橋剤によりゲル化し、さらに小分子化合物含有骨芽細胞分化誘導培地で培養し、iPS 細胞の骨芽細胞分化に及ぼす影響について評価する。

(4) iPS 細胞含有フィブリンゲルを骨芽細胞へ分化誘導した後、マウス背皮下に移植し、4 週後の新生骨の形成の有無を観察する。

4. 研究成果

(1) iPS 細胞の骨芽細胞分化能および骨芽細胞分化促進小分子化合物のスクリーニング

骨芽細胞分化誘導培地を用いた分化誘導によって、iPS 細胞は、細胞外基質に著明な石灰化物の沈着を示した。(図 1) さらに、iPS 細胞が形成した石灰化基質には、骨組織に特異的なリン酸カルシウムの存在を認めた。(図 2)

用いた小分子化合物のなかで、特にフェナミル、シンバスタチン、フルバスタチン、レスベラトロールは、細胞外基質の石灰化を著明に促進した。(図 3)

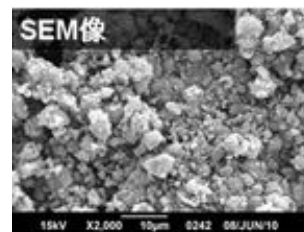


図 1 iPS 細胞の骨芽細胞分化 (SEM 像)

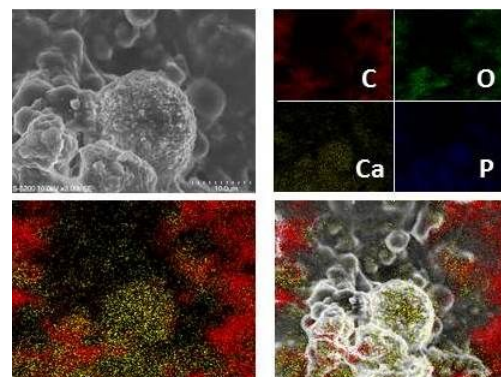


図 2 骨芽細胞へ分化誘導した iPS 細胞が形成した石灰化基質の成分解析 (EDX 解析)

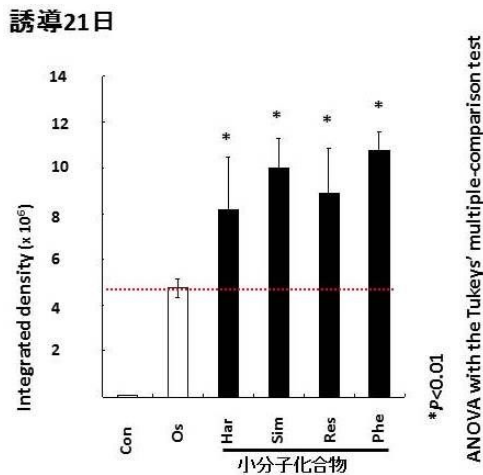


図3 von Kossa 染色および染色陽性面積計算によるスクリーニングにより検出された骨芽細胞促進小分子化合物

(2) 同定した小分子化合物が骨芽細胞分化に及ぼす影響

同定した小分子化合物のなかで、特にフェナミル、シンバスタチン、フルバスタチン、レスベラトロールはiPS細胞の骨芽細胞特異的遺伝子の発現を著明に促進した。(図4)

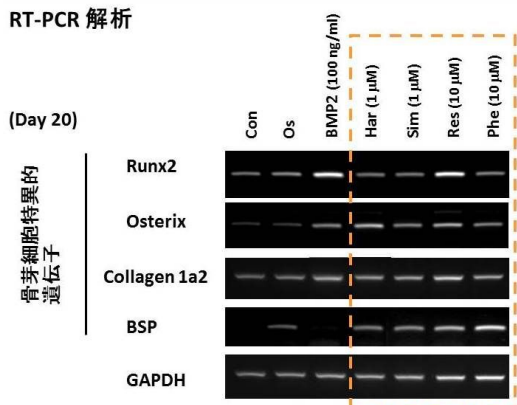


図4 同定した小分子化合物がiPS細胞の骨芽細胞特異的遺伝子発現に及ぼす影響(RT-PCR解析)

(3) 三次元のiPS細胞集合体が骨芽細胞分化に及ぼす影響
骨芽細胞へ分化誘導したiPS細胞集合体は、von Kossa陽性の石灰化基質の形成を認めた。(図5)

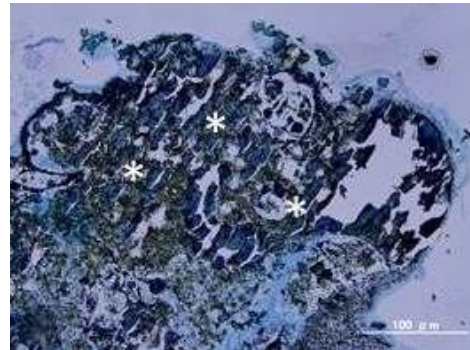


図5 骨芽細胞へ分化誘導したiPS細胞集合体(von Kossa染色)

(4) 同定した小分子化合物がマウス背皮における新生骨形成における影響

骨芽細胞分化誘導培地で分化誘導したiPS細胞集合体は、移植先で新生骨を形成したものの、著明な腫瘍(奇形腫)形成を示した。(図6)一方で、iPS細胞含有フィブリンゲルを分化誘導した場合には、移植先における腫瘍形成を認めなかった。(図7)



図6 iPS細胞集合体が新生骨形成に及ぼす影響



図7 iPS細胞含有フィブリンゲルが新生骨形成に及ぼす影響

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1件)

第43回公益社団法人日本口腔インプラント
学会学術大会(2013.9.13-15,福岡)
移植に安全なiPS細胞技術を基盤とした新規
骨増生術の開発
萱島浩輝,江草 宏,飯田 務,明石喜裕,
矢谷博文

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

萱島浩輝(KAYASHIMA HIROKI)

大阪大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号:50632121