

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：34408

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25463041

研究課題名(和文) iPS細胞をセルソースとした肥大軟骨細胞による骨再生の試み

研究課題名(英文) Bone regeneration by hypertrophic cartilage cells using iPS cells as cell source

研究代表者

橋本 典也 (HASHIMOTO, Yoshiya)

大阪歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：20228430

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト歯肉線維芽細胞から遺伝子の挿入変異の影響が少ないエピソードベクターを用いてiPS細胞を樹立することが可能となった。樹立したiPS細胞は増殖性、多能性においてES細胞と同様の能力を有する細胞であることが示唆された。さらに樹立したiPS細胞から作製した間葉系幹細胞(MSC)様細胞は、MSCより増殖能力が高く、MSC同様の分化能があるため、広域な組織再生医療のための重要なツールになると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Mesenchymal stem cells (MSCs) are considered a potential autologous therapy for tissue engineering. The available procedures for MSC retrieval from patients are invasive, and their limited in vitro proliferation restricts their use in the treatment of damaged tissues. Therefore, it is important to establish an alternative and safe source of MSCs. The objective of this study was to demonstrate induced pluripotent stem cell (iPSC) generation from a combination of an accessible source tissue and an integration-free method; we also attempted the differentiation of iPSCs into MSC-like cells (MSLCs) for future autologous tissue engineering.

研究分野：歯科理工学

キーワード：iPS細胞 骨再生

1. 研究開始当初の背景

欠損補綴、顎顔面補綴においてはインプラントによる形態、機能回復が拡大傾向にある。このような状況の中で治療経過を大きく左右する要素として喪失した骨、軟組織をいかにインプラント治療に適した環境に改善するかという点に着目されており、現在の骨補填材に代わり、今後は細胞を用いた再生医療による安全で確実な骨増生が望まれている。

再生医療に用いる再生組織をあらかじめ工業的に大量生産して、必要時にいつでも利用可能にするには、培養系を用いた invitro 組織再生が望ましい。山中らは 2007 年ヒトの線維芽細胞にごく少数の遺伝子を導入することによって多能性幹細胞である iPS 細胞を樹立した。iPS 細胞は従来の間葉系幹細胞と比較して無限に増殖する長所を有しており顎顔面補綴のような大きな欠損を治療するには適している。

現在、歯科再生医療で行われている細胞治療は骨髄間葉系幹細胞を採取し、骨芽細胞へと分化させ移植するという試みである。今後は iPS 細胞においても期待される技術である。しかし、現在の骨形成は凝集した間葉系細胞が直接骨を形成する結合組織内骨化であり、広範囲に及ぶ骨欠損治療に対して優れた治療効果をもたらしているとは言い難い。原因として、血管の乏しい欠損内および骨再生担体内での低い生存率が上げられる。一方で、低酸素耐性・血管新生能に富む肥大軟骨は、間葉系幹細胞に代わる新たな骨再生治療の細胞ソースとして期待されている。それゆえ、顎顔面補綴のような大きな欠損では、肥大軟骨により、まず軟骨の型が形成された後、軟骨組織が骨に置き換わる内軟骨性骨化が望ましい。

骨髄間葉系幹細胞や脂肪肝細胞から軟骨細胞への誘導法はすでに確立されている。一方で、iPS 細胞から軟骨細胞への誘導技術についての基礎研究は始まったばかりである。さらに、間葉系幹細胞と異なり、無限に増殖する iPS 細胞から肥大軟骨細胞を作製するといった試みは行われていない。当然、ヒト肥大軟骨細胞から in vivo 実験において骨形成を行なう研究は、世界で初めての試みである。

世界中で行われている iPS 研究成果を柔軟に研究手法として取り入れるため iPS 細胞をセルソースとした肥大軟骨細胞の作製が可能であると信じている。また、免疫不全ラットにおける肥大軟骨細胞移植実験では、従来の間葉系細胞を移植し、直接骨を形成する結合組織内骨化とは骨再生のスピードや骨質が異なることが予想される。我々はイヌの iPS 細胞を世界に先駆けて作製する技術を開発した。本申請によってプロトコルが確立すればイヌによる前臨床試験も可能となり、臨床への道も広がる。無限に増殖する iPS 細胞による細胞移植治療が顎骨の再生を促進すれば、顎顔面補綴治療のような大欠

損部への治療に新たなオプションを提供することになり本課題は大きな意義がある。

2. 研究の目的

研究開発当初の目的としては、iPS 細胞をセルソースとした肥大軟骨細胞を作製し、骨再生を行う目的であったが、大量の細胞数を確保するためには iPS 細胞から間葉系幹細胞を作成するほうが有利であると考えた。

そこで、エピソーマルベクターを用いて初期化因子である OCT3/4、SOX2、KLF4、L-MYC、LIN28、p53-shRNA をエレクトロポレーション法にて口腔粘膜由来線維芽細胞に導入し iPS 細胞を樹立する。in vivo 試験によって三胚葉分化能を確認し、さらに、マトリゲル上で iPS 細胞をフィーダーフリー条件下で培養し iPS 細胞由来間葉系幹細胞 (iPSMSC) への誘導を行う。

さらに、iPSMSC を骨芽細胞、脂肪細胞、軟骨細胞へと分化誘導し、qRT-PCR、Flow Cytometry ならびに特殊染色法によって多分化能を確認し、また、核型解析についても調べることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) プラスミドベクターを用いた歯肉、口蓋粘膜線維芽細胞からのヒト iPS 細胞の樹立
術後廃棄された歯肉および歯肉パンチを用いて採取した口腔粘膜上皮から outgrowth 法によって線維芽細胞を培養する。その際、ウイルスやマイコプラズマ汚染等について検査する。この線維芽細胞にプラスミドベクターを用いて 4 つの初期化因子 (pCXLE-hOct3/4-shp53-F, pCXLE-hSox-Klf4, pCXLE-L-Myc-Lin28) をエレクトロポレーション法を用いて遺伝子導入する。線維芽細胞に遺伝子導入後、マイトマイシン C にて処理した SNL フィーダー細胞および ES 細胞培地を準備する。ES 細胞培地は 0.1 mM-DMEM/F-12 に 20%KSR、2 mM L-グルタミン、1%NEAA、4 ng/mL b-FGF にて調整する。遺伝子導入した線維芽細胞を ES 細胞培地の SNL フィーダー細胞上に播種し、両部位から得られた iPS 細胞の樹立効率を比較する。遺伝子導入後の線維芽細胞のコロニー出現率を調べ、樹立効率の高い iPS 細胞について同定し、動物実験に用いる。iPS 細胞のコロニーを単離させて培養した後、形態 アルカリフォスファターゼ活性 ファックスによる細胞表面抗原の同定 RT-PCR による遺伝子発現の解析 マイクロアレイ解析 ノードマウスへの細胞移植によるテラトーマ形成 メチル化解析の 7 項目から iPS 細胞の同定を行う。

(2) 歯肉 iPS 細胞からの iPSMSC の樹立の効率化

歯肉 iPS 細胞は mTeSR1 (Stemcell Technologies, Vancouver, BC, Canada) の培養液を用いてマトリゲル上で (GFRM; BD) フィーダ細胞無しで 3 日間培養を行う。培養液は 10% FBS を含む DMEM low glucose に 10

ng/mL bFGF で 2 週間培養し、継代を行い、ゼラチンコートシャーレに移し、同様の培養液を用い培養を続ける。4 継代で iPSMPC 様に形態が変化する。すでに細胞播種密度、培養液組成（血清品質、bFGF）、細胞外マトリックス（ゼラチン、マトリゲル）が効率化に影響することを明らかにしており、それら条件を変化させることで歯肉 iPS 細胞からの iPSMPC の樹立効率の最適化を行う。効率化は、フローサイトメトリー解析にて MSC 特異的マーカーである CD44, CD73, CD90, および CD105 の発現率ならびに内皮細胞および造血幹細胞の CD34 および CD45 のマーカー、SSEA-3 および TRA-1-60 のような多能性マーカーが発現していないことから調べる。

(3) iPSMPC の多分化能評価

iPSMPC を骨芽細胞、脂肪細胞、軟骨細胞へと分化誘導し、qRT-PCR、Flow Cytometry ならびに特殊染色法によって多分化能を確認する。

4. 研究成果

(1) プラスミドベクターを用いた歯肉、口蓋粘膜線維芽細胞からのヒト iPS 細胞の樹立 エピソームベクターを用いて初期化因子である OCT3/4, SOX2, KLF4, L-MYC, LIN28, p53-shRNA をエレトロポレーション法にて口腔粘膜由来線維芽細胞に導入した。樹立した iPS 細胞は ES 細胞様の形態および増殖能を示した。また、アルカリフォスファターゼ染色、免疫染色および Flow Cytometry を用いた細胞表面抗原解析においては ES 特異的マーカー発現を確認した（図 1）。さらに、qRT-PCR において導入したエピソームベクターのサイレンシングと未分化マーカーである OCT3/4, NANOG, SOX2, KLF4, REX, TERT, ESG1 の発現を確認した。胚様体形成試験ならびに in vivo 試験によって三胚葉分化能を確認し（図 2）、染色体解析では G-band 法および M-FISH 法にて正常であった。さらに、上記初期化因子に Glis1 を加えて iPS 細胞の樹立も 行い、初期化に要する時間が短くなることを明らかにした。

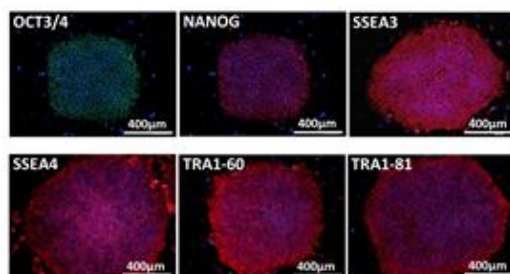


図 1. OCT4, NANOG, SSEA3, SSEA4, TRA1-60, TRA1-81 の発現

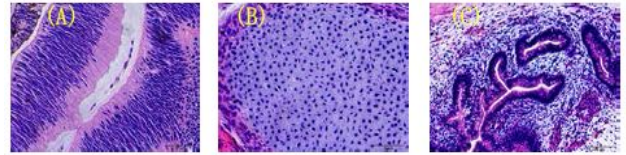


図 2. in vivo 分化試験、(A) 神経、(B) 軟骨、(C) チューブ様腸組織

(2) 歯肉 iPS 細胞からの iPSMPC の樹立の効率化

マトリゲル上で iPS 細胞をフィーダーフリー条件下で培養し iPSMPC への誘導を行ったところ、間葉系幹細胞マーカーの発現を認めた（図 3）。

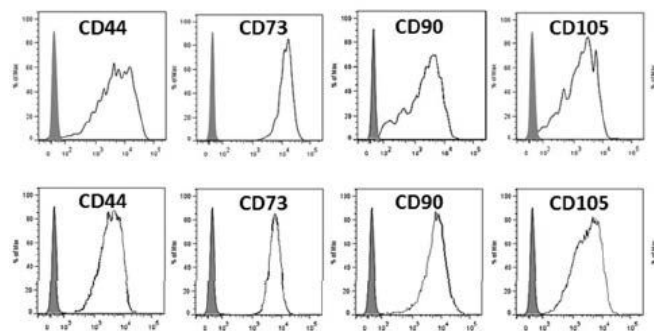


図 3. 間葉系幹細胞マーカーの発現 (上) iPSMPC (下) 間葉系幹細胞

(3) iPSMPC の多分化能評価

iPSMPC を骨芽細胞、脂肪細胞、軟骨細胞へと分化誘導し、qRT-PCR、Flow Cytometry ならびに特殊染色法によって多分化能を確認できた。また、核型解析も正常であることが確認できた（図 4）。

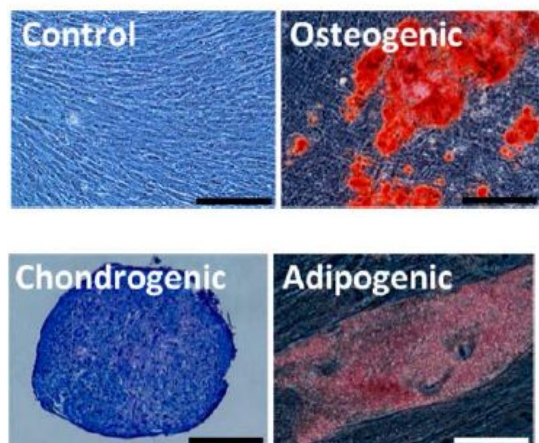


図 4. iPSMPC の多分可能の確認。骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Kashiwagi T, Hashimoto Y, Tanaka M, Baba S. Accelerated generation of human induced pluripotent stem cells from human oral mucosa using episomal plasmid vectors and maternal transcription factor Glis1. *J Oral Sci Rehabil* 2016 印刷中 査読有り

Umezaki Y, Hashimoto Y, Nishishita N, Kawamata S, Baba S. Human gingival integration-free iPSCs; a source for MSC-Like cells. *Int J Mol Sci* 2015; 16: 13633-13648. doi:10.3390/ijms160613633 査読有り

Okita N, Honda Y, Kishimoto N, Liao W, Azumi E, Hashimoto Y, Matsumoto N. Supplementation of strontium to a chondrogenic medium promotes chondrogenic differentiation of human dedifferentiated fat cells. *Tissue Eng Part A* 2015; 21: 1695-1704. doi:10.1089/ten.TEA.2014.0282 査読有り

〔学会発表〕(計 8 件)

柏木隆宏, 橋本典也, 田中昌博, 馬場俊輔. エピソーマルプラスミドベクターと母性転写因子 Glis1 を用いたヒト口腔粘膜からのヒト人工多能性幹細胞樹立の加速化 日本口腔インプラント学会 第 35 回近畿北陸支部学術大会 2015.12.12 北國新聞赤羽ホール、金沢市.

梅崎泰之, 橋本典也, 海田浩治, 馬場俊輔, 川添堯彬. ヒト歯肉由来 iPSC 細胞から間葉系幹細胞への無フィーダー分化誘導 第 45 回 公益社団法人 日本口腔インプラント学会 学術大会 2015.9.22 岡山コンベンションセンター、岡山市.

梅崎泰之, 橋本典也, 西下直希, 川真田伸, 馬場俊輔. ヒト歯肉由来インテグレーションフリー iPSC 細胞; MSC 様細胞ソースのための利用 第 13 回 日本再生歯科医学会学術大会・総会 2015.8.29 日本歯科大学生命歯学部、新潟市.

Hashimoto Y, Umezaki Y, Baba S, Imai K. Generation of mesenchymal progenitors from human gingiva-derived iPSC cell 93th General Session & Exhibition of the IADR 2015.3.14 Boston, USA.

Umezaki Y, Kashiwagi T, Nishishita N, Kawashita S, Hashimoto Y, Baba S. iPSC cell derivation by a non-integrating plasmid from human gingiva, 62nd Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research 2014.12.4 Osaka.

梅崎泰之, 橋本典也, 西下直希, 川真田伸, 馬場俊輔, ヒト歯肉由来 iPSC 細胞を用いた間葉系前駆細胞の効率的な作製方法, 日本動物実験代替法学会第 27 回大会 2014.12.7 横浜国立大学、横浜市.

柏木隆宏, 山本貴子, 西下直希, 川真田伸, 本田義知, 橋本典也, 梅崎泰之, 寺内

理恵, 上村直也, 新井是宣, 馬場俊輔, 川添堯彬. エピソーマルベクターを用いたヒト歯肉組織由来 iPSC 細胞の樹立, 第 12 回日本再生歯科医学会総会・学術大会 2014.8.26 徳島大学、徳島市.

梅崎泰之, 山本貴子, 西下直希, 川真田伸, 本田義知, 橋本典也, 柏木隆宏, 寺内理恵, 上村直也, 新井是宣, 馬場俊輔, 川添堯彬. エピソーマルベクターを用いたヒト歯肉組織由来 iPSC 細胞の樹立, 第 12 回日本再生歯科医学会総会・学術大会 2014.8.26 徳島大学、徳島市.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

橋本 典也 (HASHIMOTO, Yoshiya)

大阪歯科大学・歯学部・講師

研究者番号: 20228430

(2) 研究分担者

本田 義知 (HONDA, Yoshitomo)

大阪歯科大学・歯学部・講師

研究者番号: 90547259