

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：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25463071

研究課題名(和文) iPS細胞の最小限の分化誘導による再生骨の作製とブタ顎骨欠損モデルへの応用

研究課題名(英文) The manufacture of the regeneration bone by the minimum differentiation induction of iPS cells and application to a pig defect of jaw bone model

研究代表者

西澤 悟 (Nishizawa, Satoru)

東京大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：00646200

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目標は必要最小限の分化培養によってミニブタiPS細胞(piPSC)を中胚葉系細胞へ分化誘導し、この細胞を細胞源として用いることで腫瘍化などの恐れがない安全・確実なiPS細胞を応用した顎骨再生医療を提供することである。

本研究では同種移植が可能な近交系実験動物であるクラウン系ミニブタの胎性線維芽細胞に山中4因子をウイルスベクターで導入してiPS-like細胞を樹立した。そしてアクチビンA、BMP-4を含む無血清培地で中胚葉系細胞に分化誘導した。さらにこの分化誘導細胞から未分化細胞を除去して中胚葉系細胞を純化する方法を検討した。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to apply iPS cells to regenerative medicine for jawbone. We attempt to culture iPS cells from a miniature pig (piPSC) with minimum differentiation induction toward mesodermal cells and confirm the safety and reliability of the cells as a cell source by investigating the risk of tumorigenesis. In this study, we adopted clawn miniature pigs as inbred strains suitable for allogeneic transplantation and established so called "iPS-like cells" by introducing the Yamanaka factors (Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc) into miniature pig embryonic fibroblasts using virus vectors. Afterwards, the cells were cultured in serum-free medium containing Activin A and BMP-4 and differentiated into mesodermal cells. Finally, we examined purification methods of the differentiation-induced cells by removing undifferentiated cells.

研究分野：再生医学

キーワード：iPS細胞 骨再生

1. 研究開始当初の背景

(1) 急増する顎骨欠損患者数

我が国ではかつてない高齢社会を迎え、歯周疾患や口腔領域の悪性新生物の患者数はここ 10 年で約 1.5 倍に急増している。このような疾患により歯槽骨や顎骨を失うとその後の QOL は著しく低下する。そのためこれらの欠損に対する再建治療の重要性は益々高まっている。現在、再建治療としては主に自家骨移植が行われているが、患者への侵襲や長期入院、など負担も大きい。そのため幹細胞を用いた骨再生医療の実現が期待されている。

(2) 間葉系幹細胞による骨再生医療の現状

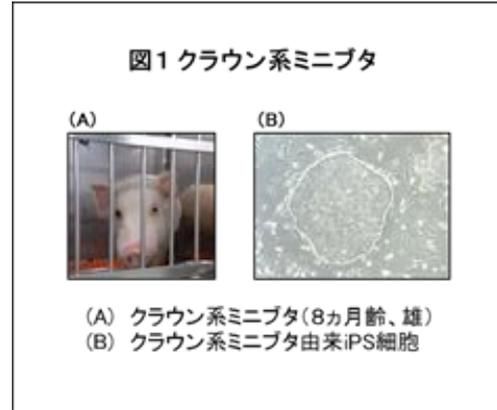
中等度以上の骨欠損を間葉系幹細胞の移植で再建するためには相当数の細胞が必要であり、採取した間葉系幹細胞を時に数千～数万倍以上にまで培養する必要がある。しかし間葉系幹細胞の分裂回数には有限であり、細胞増殖は極端な多分化能低下を伴う。これは再生医療の持つ本質的な課題であるが、この問題を回避できる細胞は、今のところ胚性幹細胞 (ES 細胞) と人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) しかない。これらの細胞はすべての組織に分化する多能性を保ちつつ、ほぼ無限に増殖させる事ができる。しかし、ES 細胞は倫理的な面から本邦での臨床応用は難しく、また同種 (他家) 移植にならざるを得ず免疫拒絶の問題もある。それに対し、iPS 細胞は自己体細胞から樹立可能なためこのような問題は原理的に生じないと思われるため、iPS 細胞の臨床導入への期待は高い。

(3) iPS 細胞を再生医療に応用するための課題

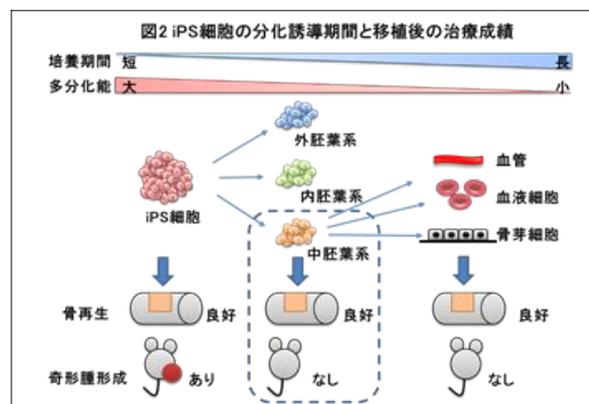
iPS 細胞による骨再生研究は開始されたばかりであり、マウス iPS 細胞由来骨芽細胞をマウスに移植して骨再生を確認したことが昨年報告された。[Bilousova 2011 Stem Cell][Hayashi 2011 Cell transplant]しかし、マウスなどの齧歯類と大動物や人などの iPS 細胞は性質が異なる。前者は「naïve な iPS 細胞」と言われ ES 細胞に一致した未分化能を有するのに対し、後者は「prime な iPS 細胞」と言われ、むしろ分化が進んだエピプラスト由来細胞に近い性質を持っている。したがって、臨床に直結する知見を得るためには iPS 細胞の性質が類似しており、また骨欠損の大きさも臨床に近似する大動物で実験する必要がある。そのため、申請者は純系移植が可能な近交系ミニブタ (クラウン系、図 1) に着目し、世界に先駆け、独自にクラウン系ミニブタ iPS 細胞株を樹立した。しかし、iPS 細胞は作製時に、いわゆる Yamanaka ファクターと呼ばれる 4 つ遺伝子 (Klf4, c-Myc, Sox2, Oct3/4) を導入する。この 4 遺伝子のうち c-Myc はがん原遺伝子であり、細胞の c-Myc が活性化するとガン化する恐れがある。

c-Myc を使用しない作製法なども検討されているが、さらには細胞移植後、未分化 iPS 細胞がホストの体内に残存し奇形腫を形成することもある。奇形腫形成の予防は iPS 細胞臨床応用の大きな課題の一つである。

2. 研究の目的



本研究では、前述の課題を克服するために、移植前の iPS 細胞分化誘導と細胞選別を検討する。分化誘導については、移植母床からの局所因子が強力に骨再生を誘導すると考えている。脇谷らは、ラット膝関節の骨軟骨複合欠損において、ES 細胞を分化誘導せずに移植しても、骨ならびに軟骨の修復が得られたと報告している。[Wakitani 2004 Cell Transplant]これらの結果は、多分化能を有する細胞を移植すれば、骨移植母床からの局所因子が適切に作用することにより骨分化誘導が期待できることを示唆している (図 2)。しかし、この実験では、同時に奇形腫の形成例も報告している (図 2)。多分化能を有する細胞を適切に移植できれば、骨再建の成否はむしろ、奇形腫抑制が鍵を握ると考えられる。したがって、本研究では、奇形腫の形成が抑制できる最小限の分化誘導 (ミニマム・インダクション) かつ、未分化細胞を残さない高効率な細胞選別を検討する。本研究の目的は、これらの知見を、申請者が樹立したミニブタ由来 iPS 細胞を応用してミニマム・インダクションによる再生骨組織を作製し、同系のミニブタの骨欠損モデルに移植し、骨再生を実証することにより、iPS 細胞の臨床導入



の足がかりにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1)骨再生用ミニブタ iPSC 様細胞の作製

クラウン系ミニブタ(SLA type C2 ホモ)の受胎発生 25-30 日胎児由来の線維芽細胞(PEF)に *c-Myc*, *Klf4*, *Oct3/4*, *Sox2* をレトロウイルスベクターで導入した。この細胞を MMC 処理したマウス胎児由来線維芽細胞(MEF)フィーダー上に 5×10^3 cells/cm² の密度で播種し、ヒト ES 細胞培地(FGF+)にて 37 5%CO₂ インキュベーターで培養した。培地は 2 回/週の頻度で交換した。形成された ES 細胞様のコロニーを顕微鏡下で採取して、新しい別の MMC 処理した MEF フィーダー上に植え替え、ヒト ES 細胞の培養法を用いて以降の培養をおこなった。そして 20 継代以上 ES 細胞様のコロニー形態を維持したロットの細胞をミニブタ iPSC 様細胞(piPSC like cell piPSCLC)として実験に使用した。

(2)初期中胚葉系細胞への分化条件の検討

piPSCLC をヒト ES/iPS 細胞剥離液 (CTK 溶液)で回収し、ピペティングにて細胞を分散させ、低接着培養ディッシュ (直径 10 cm) に 2×10^6 cell を中胚葉分化誘導培地 (mTeSR1+BMP4+Activin A)を用いて播種した (day 0)。培地は 2 日ごとに半量を交換した。

4. 研究成果

(1)in vitro における piPSCLC の特性評価

樹立した piPSCLC の多能性幹細胞マーカー遺伝子である *Nanog*, *Oct3/4*, そして導入した初期化 4 因子 *mKlf4*, *mC-Myc*, *mSox2*, *mOct3/4* の mRNA 発現量を realtime-RT-PCR 法で測定した。その結果、piPSCLC の *Nanog*, *Oct3/4* の発現量は増加していることが確認された。一方、導入した 4 因子の発現は高レベルで発現が維持しており、初期化の過程で生じるといわれるサイレンシングは確認できなかった(図 3)。piPSCLC の G バンド法による核型検査の結果、染色体はブタ (雌) のものであることが確認できた。また検査を実施した 50 個の細胞に染色体異常はみられなかった (図 4)。

piPSCLC およびミニブタ胎性線維芽細胞のテロメラーゼ活性をオリゴヌクレオチドへのテロメアリピート付加を指標として realtime RT-PCR 法で測定した。piPSCLC のテロメラーゼ活性は、誘導前の線維芽細胞のものと比較すると 1000 倍以上増加していることが確認された。

図 3 piPSCLC 遺伝子発現の定量評価

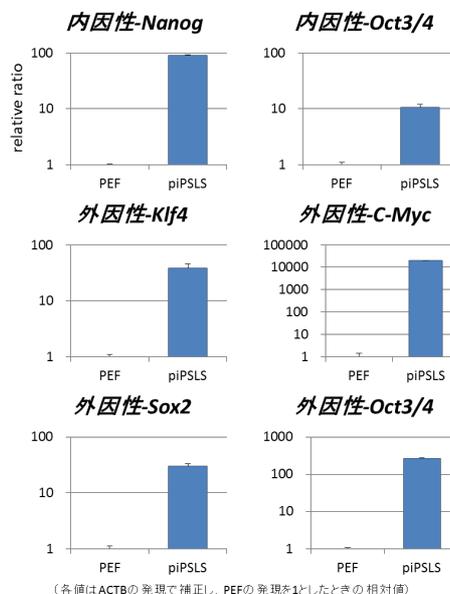


図 4 piPSCLC の染色体検査

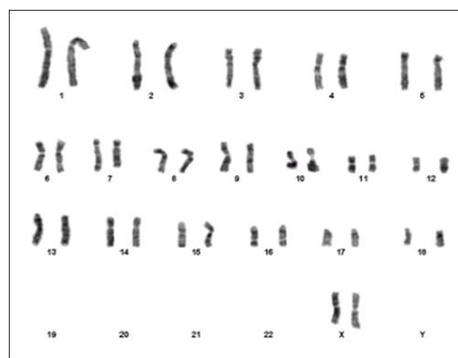
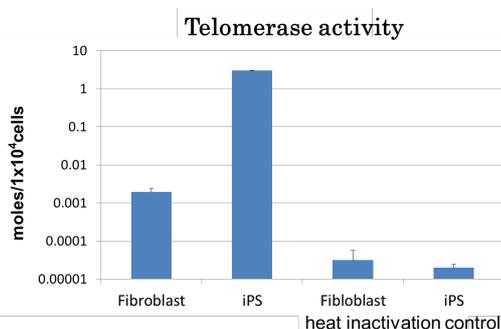


図 5 piPSCLC のテロメラーゼ活性測定

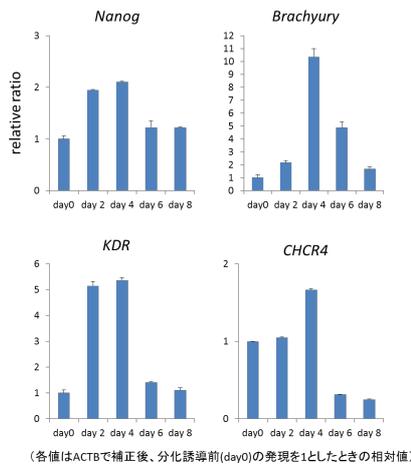


(2)初期中胚葉細胞への分化誘導の検討

piPSCLC を BMP-4, Activin A を含有する無血清培地を用いて培養し中胚葉系に分化誘導した。day2 から初期中胚葉マーカー遺伝子 *Brachyury*, *KDR*, *CHCR4* の発現が増加し、day 4 で発現量が最大となった。一方未分化 iPS 細胞マーカーである *Nanog* の発現は day8 においてもほとんど低下が確認できなかった(図

6)。

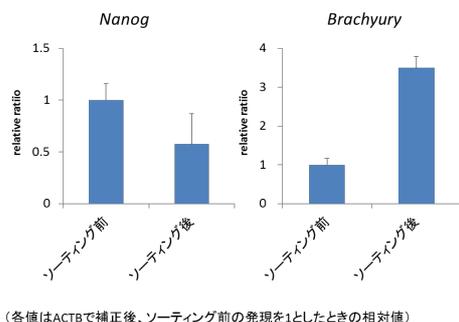
図6 分化誘導後の細胞の遺伝子発現



(3) 初期中胚葉細胞の純化方法の検討

初期中胚葉細胞を純化することを目的として、(2)項において分化誘導した細胞(day 4)をフローサイトメトリーでソーティングし、中胚葉系細胞マーカーとして報告されている CD326⁻ CD56⁺ 細胞を分取し realtime RT PCR 法で遺伝子発現を測定した。ソーティングした CD326⁻ CD56⁺ 細胞の *Brachyury* 発現量はソーティング前と比較して約 4 倍に増加したことから本法で中胚葉系細胞を濃縮することが可能であることが示唆された(図6)。一方、CD326⁻ CD56⁺ 細胞の存在率は 5-8%と低く、さらに *Nanog* 発現も消失していなかった。よって *in vivo* の検討に用いる $1 \times 10^6 \sim 10^7$ オーダーの高品質な中胚葉細胞を本法で得るためには更に高効率な分化誘導法が必要と考えられた。

図7 ソーティング前後の細胞の遺伝子発現の比較



(4) まとめ

本研究では同種移植可能な近交系大動物クラウン系ミニブタ由来の iPSCLC を樹立し、中胚葉系に分化誘導し、既報の初期中胚葉マーカーを用いて分化細胞を選別する方法を確立することを試みた。しかしブタ iPSCLC

はヒトやマウスの ES/iPS 細胞と比較すると分化誘導効率が低く *in vivo* の検討に用いる未分化マーカーの発現のない高品質な中胚葉系細胞を得るためには iPSCLC の品質を向上させることが必要と考えている。現在までのブタ iPSC 樹立報告を俯瞰すると、導入した初期化因子のサイレンシングやテラトーマ形成能が確認されていないものが殆どであり、キメラ形成能に関しては成功例が皆無の状況である。したがってヒトやマウスと同品質の多能性幹細胞をブタで樹立するためには初期化に必要な条件がヒト、マウスの条件と異なる可能性がある。ヒトとブタのリプログラミング前後の変動遺伝子の違いを解析することが原因を解明する一助になると考え、現在マイクロアレイによる測定を実施し解析中である。

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4件)

Saito T, Yano F, Mori D, Kawata M, Hoshi K, Takato T, Masaki H, Otsu M, Eto K, Nakauchi H, Chung UI, Tanaka S. Hyaline cartilage formation and tumorigenesis of implanted tissues derived from human induced pluripotent stem cells. *Biomed Res.* (査読有) 36(3):179-86. 2015
doi.org/10.2220/biomedres.36.179

Takato T, Mori Y, Fujihara Y, Asawa Y, Nishizawa S, Kanazawa S, Ogasawara T, Saijo T, Abe T, Abe M, Suenaga H, Kanno Y, Sugiyama S, Hoshi K. Preclinical and clinical research on bone and cartilage regenerative medicine in oral and maxillofacial region. *Oral Sci Int.* (査読有) May;11(2), 45-51. 2014
doi:10.1016/S1348-8643(14)00008-1

Ogasawara T, Ohba S, Yano F, Kawaguchi H, Chung UI, Saito T, Yonehara Y, Nakatsuka T, Mori Y, Takato T, Hoshi K. Nanog promotes osteogenic differentiation of the mouse mesenchymal cell line C3H10T1/2 by modulating bone morphogenetic protein (BMP) signaling. *J Cell Physiol.* (査読有) 228(1):163-171 2013
doi: 10.1002/jcp.24116.

Uto S, Nishizawa S, Takasawa Y, Asawa Y, Fujihara Y, Takato T, Hoshi K. Bone and cartilage repair by transplantation of induced pluripotent stem cells in murine joint defect model.

Biomed Res. (査読有) 34(6):281-288.
2013
https://www.jstage.jst.go.jp/article/biomed/34/6/34_281/_article

〔学会発表〕(計5件)

宇都さくら、西澤悟、高戸毅、星和人 大型で複雑な耳介形状の再生軟骨作製における任意形状付与に関する新規足場素材の開発検討. 第16回再生医療学会総会 2016年3月17日~2016年3月19日 大阪国際会議場 大阪府大阪市

Hoshi K. Recent trends of cartilage regenerative medicine and its application to the oral and maxillofacial surgery 日露修好160年記念 日露医学歯学フォーラム(招待講演)(国際学会) 2015年9月1日 Sechenov First MSU Simulation Center, Moscow, Russia

宇都さくら、西澤悟、高戸毅、星和人 ミニブタ関節欠損モデルを用いたiPS細胞移植による関節再生 第68回NPO法人日本口腔外科学会学術集会 2014年5月7日~2014年5月9日 京王プラザホテル 東京都新宿区

宇都さくら、西澤悟、高戸毅、星和人 ミニブタ関節欠損モデルにおけるiPS細胞を用いた再生軟骨の形成 第33回日本運動器移植・再生医学研究会 2014年9月27日 第一ホテル両国 東京都墨田区

宇都さくら、西澤悟、高戸毅、星和人 ミニブタ関節欠損モデルを用いたヒトiPS細胞移植による関節再生 第13回日本再生医療学会総会 2014年3月4日~3月6日 国立京都国際会館 京都府京都市

6. 研究組織

(1)研究代表者

西澤 悟 (NISHIZAWA, Satoru)
東京大学医学部附属病院・特任助教
研究者番号: 00646200

(2)研究分担者

星 和人 (HOSHI, Kazuto)
東京大学医学部附属病院・口腔外科・准教授
研究者番号: 30344451

(3)連携研究者

高戸 毅 (TAKATO, Tsuyoshi)
東京大学医学部附属病院・口腔外科・教授
研究者番号: 90171454