

機関番号：24303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2013

課題番号：25670656

研究課題名(和文)ダイレクト・リプログラミング技術に基づくヒト骨再生

研究課題名(英文)Bone regeneration based on direct reprogramming technologies

研究代表者

松田 修(Osam, Mazda)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：00271164

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：骨粗鬆症性骨折、関節リウマチに伴う関節破壊、骨肉腫切除後の骨欠損部の修復等、様々な骨の病態に、骨リモデリングの異常が関与する。患者由来の骨芽細胞を多数調整して骨欠損部位に移植できれば、効果的な治療法となる可能性がある。

我々はヒト骨芽細胞を体細胞より直接誘導することに成功した。そこで安全性の高いベクターを用いてこの技術の向上を図り、実用的な骨再生医療への基盤を確立することを目的とした。その結果、非ウイルス的方法によって骨芽細胞を誘導することができ、その骨形成能を認めた。本研究の成果は、移植用のテーラーメイド骨芽細胞を提供し、骨粗鬆症性骨折や人工関節置換後の骨修復等の再生治療に応用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Bone remodeling is crucially involved in various pathological conditions of bone diseases including osteoporosis, bone disruption in rheumatoid arthritis, and bone healing after a surgical removal of bone tumor. If an enough number of active osteoblasts can be induced from patients' somatic cells and transplanted into the bone lesions, such procedures may be effective as a novel treatment for these bone diseases.

We have recently succeeded in inducing osteoblasts from normal human somatic cells. In this study we improved this technology to establish safer and feasible methods to induce human osteoblasts. As results, osteoblasts were successfully induced using nonviral procedures, and the resultant osteoblasts produced mineralized bone matrix at a high level. The present study may provide tailor-made osteoblasts that are suitable for transplantation, and propose novel regenerative medicine for osteoporotic fracture, bone remodeling after arthroplasty, and other bone diseases.

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：骨軟骨代謝学 再生医療 骨芽細胞

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

骨粗鬆症に伴う骨折、関節リウマチに伴う関節破壊、変形性関節症における軟骨下骨の異常等、さまざまな骨の病態に、骨リモデリングの異常が関与している。骨芽細胞は、骨形成を担い、骨組織再生に寄与する細胞である。もし患者由来の骨芽細胞を多数調整して骨欠損部位に自家移植できれば、上記疾患に対する効果的な再生医療が樹立できる可能性がある。従来から、骨肉腫の摘出手術後の骨欠損部の修復を目的として、間葉系幹細胞を含む骨髄細胞を移植し、骨再生を促進する治療が行われている。しかし骨粗鬆症等の患者は多くが高齢者であり、大きな侵襲を伴う骨髄採取は困難である。さらに高齢者からは十分な数の骨髄細胞を得難く、また間葉系幹細胞の比率が低く、骨芽細胞への分化も若齢者に比して悪い。

線維芽細胞などの体細胞に、少数の既知因子を導入することで、心筋細胞、肝細胞、軟骨細胞等、さまざまな組織細胞に直接 convert することができると報告されている（ダイレクト・リプログラミングまたはダイレクト・コンヴァージョン）。そこで我々は線維芽細胞をヒト骨芽細胞に直接リプログラミングすることを試み、これに成功した。すなわち、骨芽細胞に関連する少数の既知因子を、ヒト線維芽細胞に導入することで、その 80% 以上を機能的な骨芽細胞に、直接変えられる技術を開発した。しかし本技術を骨再生医療に応用するためには、さらなる向上が必要である。

2. 研究の目的

本研究では、さらに安全性の高いベクターを用いてヒト線維芽細胞から骨芽細胞へのダイレクト・リプログラミングを行うことで、上記の技術の向上を図ることを目的とした。さらに得られた細胞の骨基質産生能、ミネラルリゼーション、骨芽細胞特異的遺伝子発現プロファイル等を評価し、実用的な骨再生医療への基盤を確立することを目的とした。

骨芽細胞のダイレクト・リプログラミングは、我々だけの完全に独創的な革新技術である。本研究の成果は、さまざまな骨疾患の治療に革命をもたらす可能性がある」と期待で

きる。また、骨疾患の発症機構の解明や新しい創薬標的分子の発見などにも応用可能であろう。

3. 研究の方法

- (1) 細胞と遺伝子導入。ヒト由来正常細胞を用いた。骨芽細胞の分化に関する転写因子等の遺伝子をくみこんだベクターを種々構築した。これらをさまざまな非ウイルス的導入法を用いて上記の細胞に導入後、種々の条件で培養した。
- (2) アルカリフォスファターゼ活性の評価。上記の細胞を経時的に培養後、Alkaline phosphatase (ALP) 染色を行った。また ALP 染色後の細胞抽出液の Optical density を測定して、定量的に ALP 活性を評価した。
- (3) 骨基質形成能とミネラルリゼーション等の評価。上記の細胞を経時的に培養後、Alizarin red S 染色と von Kossa 染色等を行ってミネラル化骨基質の産生を評価した。また Alizarin red S 染色後の細胞抽出液の Optical density を測定して、定量的にミネラルリゼーションを評価した。また免疫蛍光染色を行って、I 型コラーゲン、オステオカルシン (OC)、オステオポンチン (OP)、Bone sialoprotein (BSP) 等の骨基質タンパク質の発現を評価した。
- (4) 遺伝子発現解析。細胞から RNA を採取し、リアルタイム RT-PCR にて、OC、OP、BSP 等の骨関連遺伝子等の発現を解析した。また DNA マイクロアレイ解析を行ってゲノムワイドな遺伝子発現プロファイルを解析した。

4. 研究成果

- (1) ヒト体細胞から骨芽細胞への非ウイルス的ダイレクト・リプログラミング。非ウイルス的手法によって、線維芽細胞より骨芽細胞を直接誘導することに成功した。具体的には、上述の研究で見出した、ヒト線維芽細胞から骨芽細胞へのダイレクト・リプログラミングを誘導する遺伝子群を含むベクターを種々構築し、さまざまな手法で導入し、さらに種々の条件で培養を行った後、得られた細胞に

ついてアルカリフォスファターゼ活性、骨基質産生能とミネラル化を評価することで、骨芽細胞誘導に適したベクター、導入条件、培養条件等を決定することができた。

- (2) 非ウイルス的なダイレクト・リプログラミングでヒト体細胞より誘導した骨芽細胞のキャラクタリゼーション。上記の方法で得られた誘導骨芽細胞の骨基質産生能等を調べたところ、高いミネラル化骨基質産生能を有することが分かった(図)。また、骨芽細胞特異的遺伝子発現プロファイリング等の解析を行ったところ、骨芽細胞に類似の遺伝子発現パターンを呈することが分かった。網羅的遺伝子発現解析でも、同様に骨芽細胞との類似性が示された。

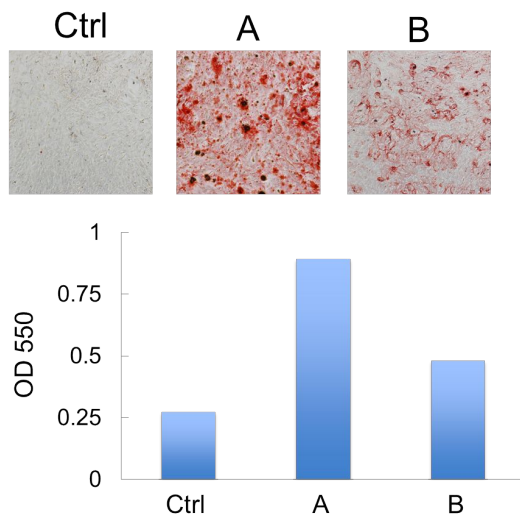


図 異なる遺伝子の組み合わせ(A,B)の導入後、Alizarin Red S染色した実体顕微鏡像(上)とその吸光度(下)。Aの導入により高い効率でミネラル化骨基質を産生する骨芽細胞が誘導された。

以上の結果から、非ウイルス的な技術によってもヒト体細胞から骨芽細胞へのダイレクト・リプログラミングが可能であること、この技術で得られた骨芽細胞が、高い骨基質産生能を有することが示された。本技術は、患者への侵襲が少なく、癌化のリスクが低く、迅速、簡便、安価な、骨再生に対して理想的なテラメド再生医療を提供する可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

- (1) Silencing the expression of connexin 43 decreases inflammation and joint destruction in experimental arthritis. Tsuchida S, Mazda O, et al. J Orthop Res, 31 (4): 525-530, 2013. 査読有 doi: 10.1002/jor.22263.
- (2) Myostatin acts as an autocrine/paracrine negative regulator in myoblast differentiation from human induced pluripotent stem cells. Gao F, Mazda O, et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 431 (2): 309-314, 2013. 査読有 doi: 10.1016/j.bbrc.2012.12.105.
- (3) Mild electrical stimulation with heat stimulation increase heat shock protein 70 in articular chondrocyte. Hiraoka N, Mazda O, et al. J Orthop Res. 31 (6): 894-900, 2013. 査読有 doi: 10.1002/jor.22307.
- (4) In vivo gene transfer using pDNA/chitosan/chondroitin sulfate ternary complexes: Influence of chondroitin sulfate on the stability of freeze-dried complexes and transgene expression in vivo. Hagiwara K, Mazda O, et al. J Gene Med. 15(2):83-92, 2013. 査読有 doi: 10.1002/jgm.2694.

〔学会発表〕(計6件)

- (1) Sonoporation-mediated transduction of siRNA targeting TNF alpha ameliorated experimental arthritis. Inoue H, Arai Y, Nakagawa S, Saito M, Tsuchida S, Inoue A, Matsuki T, Morihara T, Shirai T, Mazda O, Kubo T. 60th Annual Meeting of Orthopaedic Research Society. 2014年3月17日~18日, New Orleans, Louisiana, USA
- (2) Anti-inflammatory effects of lansoprazole by suppressing ROS production in murine macrophage RAW 264.7 cells. S. Ichimaru, S. Nakagawa, Y. Arai, S. Tsuchida, H. Inoue, T. Matsuki, Y. Mikami, T. Ikeda, R. Oda,

- O. Mazda, T. Kubo. 2014年3月16日.
2014 Orthopaedic Research Society
Annual Meeting, New Orleans,
Louisiana, USA
- (3) Evaluation of femoral perfusion in a rabbit model of steroid-induced osteonecrosis with a high magnetic field MRI system. S. Hayashi, M. Fujioka, K. Ikoma, M. Saito, K. Ueshima, M. Ishida, M. Kuribayashi, A. Ikegami, O. Mazda and T. Kubo. 60th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society. 2014. 3.15-18; New Orleans, Louisiana, USA
- (4) Femoral perfusion after electromagnetic fields stimulation to the steroid-induced osteonecrosis model. A. Ikegami, K. Ueshima, K. Ikoma, M. Fujioka, M. Saito, S. Hayashi, M. Ishida, M. Kuribayashi, O. Mazda and T. Kubo. 2014. 3.15-18. ORS 60th Annual Meeting; New Orleans, LA
- (5) The roles of heat shock protein 70 on chondrocyte. Matsuki T, Arai Y, Tsuchida S, Terauchi R, Inoue H, Nakagawa S, Inoue A, Mazda O, Kubo T. 16th World Congress of the Osteoarthritis Research Society International, 2013.4.18-21, Philadelphia, USA.
- (6) Effect of mechanical stress on the hypertrophic differentiation related gene expression in cultured chondrocytes. Inoue H, Arai Y, Terauchi R, Nakagawa S, Saito M, Hiraoka N, Tsuchida S, Matsuki T, Mazda Osam, Kubo T. 16th World Congress of the Osteoarthritis Research Society International, 2013.4.18-21, Philadelphia, USA.

〔産業財産権〕

出願状況（計2件）

- (1) 産業財産権の名称：骨芽細胞及びその調製方法；発明者：山本健太他；権利者：京都府大学法人；産業財産権の種類：特許権；番号：特願 2013-156025；出願日：2013年（平成25年）7月26日；国内・国外の別：国内

- (2) 産業財産権の名称：骨芽細胞及びその調製方法；発明者：山本健太他；権利者：京都府大学法人；産業財産権の種類：特許権；番号：特願 2014-012441；出願日：2014年（平成26年）1月27日；国内・国外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松田 修 (MAZDA OSAM)

京都府立医科大学・医学研究科・教授

研究者番号：00271164

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

新井 祐志 (YUJI ARAI)

京都府立医科大学・医学研究科・講師

研究者番号：50347449

森原 徹 (TORU MORIHARA)

京都府立医科大学・医学研究科・講師

研究者番号：90336735