

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：32650

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861761

研究課題名(和文) ヒトiPS細胞の骨分化誘導条件の検討とその単離およびin vivoでの有効性

研究課題名(英文) Novel strategy for enrichment and isolation of osteoprogenitor cells from iPS cells and the effectiveness in vivo

研究代表者

篠 宏美 (SHINO, HIROMI)

東京歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：00445446

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトiPS細胞を骨芽細胞へ分化させる過程においてFGF-2、IGF-1、TGF- $\beta$ 1を培地に添加することにより高効率にアルカリホスファターゼ(ALP)陽性細胞を増加させることが可能であり、このALP陽性細胞のみをFACSにて分離し培養することで効率よく骨芽細胞への分化を誘導できることを見出した。さらに、これを長期培養することにより骨細胞マーカー遺伝子発現やRANKL、SOSTといった骨細胞マーカータンパク質の発現が増加することを見出した。このことより、ヒトiPS細胞から簡単な操作で骨細胞様細胞にまで分化可能であることが示された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we developed a new method to stimulate osteogenic differentiation in tissue-nonspecific alkaline phosphatase (TNAP)-positive cells liberated from human induced pluripotent stem cells (hiPSCs)-derived embryoid bodies (EBs) with 14 days long. TNAP is a marker protein of osteolineage cells. We analyzed and isolated TNAP-positive by fluorescence-activated cell sorting. Treating hiPSCs-derived cells with a combination of FGF-2, IGF-1, and TGF- $\beta$ 1 generated TNAP-positive cells at high frequency. The isolated cells expressed high levels of osterix, which is an exclusive osteogenic marker. Culturing these TNAP-positive cells in osteoblast differentiation medium (OBM) led to the expression of various osteogenic markers. Furthermore, in OBM they were capable of generating many mineralized nodules with strong expression of receptor activator of NF-kappaB ligand and sclerostin (SOST). Real-time RT-PCR showed a significant increase in the expression of osteocyte marker genes.

研究分野：生化学

キーワード：iPS細胞 骨芽細胞 骨細胞 骨芽細胞分化

1. 研究開始当初の背景

骨に悪性腫瘍などがあった場合、広範囲に骨を切除しなければならず、こうした広範囲の骨切除は自然治癒することがなく何らかの外的処置が必要となる。また、骨粗鬆症は骨量を減少させるだけでなく、骨折した骨を接合する新規の骨形成能も減少させてしまう。こうした病態に対して理想的な治療は自家骨移植であるが採取する骨量には限界がある。そこで、将来有効なソースとして間葉系幹細胞や iPS 細胞が挙げられる。

マウス iPS 細胞から骨芽細胞への分化方法についてはさまざまな方法が報告されている。例えば、マウス iPS 細胞から胚様体 (EB) 形成後レチノイン酸 (RA) 含有培地にて培養し、その後 outgrowth 法にて得られた細胞を骨芽細胞誘導培地 (OBM) にて 4~8 週間培養する、あるいは同様に EB を作製後、接着培養と同時に TGF- $\beta$ 1 を添加し数回の継代後 OBM にて 28 日間培養することでアリザリンレッド陽性石灰物を得るなどの方法が紹介された (Bilousova G et al. Stem Cells. 2011;29:206-216, Li F et al. J Cell Biochem. 2011;29:206-216)。実際に申請者らの先行実験でも、EB を経由せずマウス iPS 細胞を OBM にて 4 週間培養したところアリザリンレッド染色で強陽性が示された。このように、マウス iPS 細胞は骨芽細胞へ比較的容易に分化する。一方、ヒト ES 細胞の骨芽細胞への分化についてはいくつか報告があるがいずれも誘導効率は低い (Barberi T et al. PLoS Med. 2005;2: 554-560)。また、ヒト iPS 細胞の骨芽細胞分化誘導についての報告例は少なく、マウスの例をそのままヒト iPS 細胞に応用するだけでは骨芽細胞への分化誘導は難しいのが現状である。

2. 研究の目的

骨は生体内で特に大量に TGF- $\beta$ 1 と IGF-1 を含む。その生理学的意義については明確な説明がなかった。申請者らは、“TGF- $\beta$ 1 が IGF-1 の骨芽細胞前駆細胞内発現をポジティブ制御し、互いに骨芽細胞の分化を協調的に促進する”という機構を発見し骨に共存する意義を明確にした。この成果をさらに再生医療への実現に応用することが本研究の目的である。具体的には i) ヒト間葉系細胞を TGF- $\beta$ 1 と IGF-1 を含む最も効果的な分化誘導培養条件を明らかにすること、ii) iPS 細胞から骨系細胞へ最も効率的に分化誘導させること、iii) iPS 細胞から適切に未分化細胞を除去し、純粋で安全な骨系細胞を得ることである。最終的に臨床応用可能な骨組織再生法の確立を目指す。

3. 研究の方法

(1) ヒト iPS 細胞からの骨芽細胞誘導

ヒト iPS 細胞 (201B7 細胞株) を使用する。通法に従いフィーダー細胞上に iPS 細胞を培養したのち、低接着性プレートに播種し 6 日

間培養することで Embryonic Body (EB、胚様体) を形成する。Thiazovivin (ROCK 阻害剤) 含有培地にて 1 時間前培養後、コラゲナーゼ、およびトリプシン EDTA 処理により EB を単一細胞にし、コラーゲンコートプレートに播種する。翌日、培地を 25 ng/ml FGF-2、100 ng/ml IGF-1、1 ng/ml TGF- $\beta$ 1 を添加した OBM に交換し骨芽細胞分化誘導を開始する。分化誘導から 14 日目に FACS にて ALP 陽性および陰性細胞を分離・回収した。

(2) FACS 分離直後の ALP 陽性細胞の評価

(1) に準じて ALP 陽性・ALP 陰性細胞を分離回収後、QIAzol Lysis Reagent (QIAGEN) を用いて RNA 抽出を行った。未分化マーカー (OCT3/4、SOX2、NANOG、REX1、ESG1、TERT) の発現量をリアルタイム PCR 法にて解析した。同様に骨芽細胞マーカー (RUNX2、TNAP (ALP)、COL1A1、OSX、BSP、OCN) の発現量をリアルタイム PCR 法にて解析した。

(3) FACS 分離後 40 日の骨芽細胞マーカーの発現解析

(1) に準じて ALP 陽性・ALP 陰性細胞を分離回収後、再度 OBM にて 40 日間培養した。その後、骨芽細胞マーカー (RUNX2、TNAP (ALP)、COL1A1、OSX、BSP、OCN) の発現量をリアルタイム PCR 法にて解析した。

(4) 骨細胞マーカーの発現解析

(1) に準じて ALP 陽性・ALP 陰性細胞を分離回収後、再度 OBM にて 40 日間培養した。アリザリンレッド染色による石灰物の検出と抗 RANKL 抗体、抗 SOST 抗体を用いて免疫蛍光染色を行った。また、骨細胞マーカー (SOST、RELN、NPY、DMP1、FGF23、PHEX、MEPE、PDPN) の発現量をリアルタイム PCR 法にて解析した。

(5) ALP 陽性細胞の細胞形態学的評価

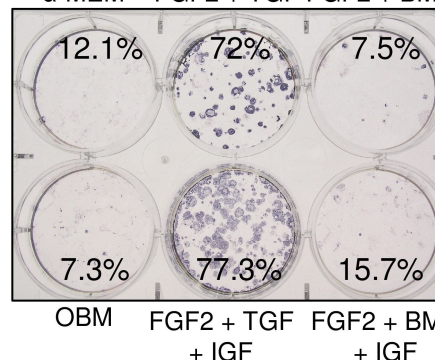
(1) に準じて ALP 陽性・ALP 陰性細胞を分離回収後、再度 OBM にて 120 日間培養した。走査型電子顕微鏡、および透過型電子顕微鏡にて細胞形態学的評価を行った。

4. 研究成果

(1) ヒト iPS 細胞からの骨芽細胞誘導

EB を形成後 OBM での培養の際に、FGF-2、IGF-1、TGF- $\beta$ 1 を添加すると効率よく ALP 陽性細胞が誘導可能であることが示された (図 1)。

図 1 骨芽細胞誘導 14 日後の ALP 染色像  
 $\alpha$ -MEM FGF2 + TGF FGF2 + BMP



(2) FACS 分離直後の ALP 陽性細胞の評価

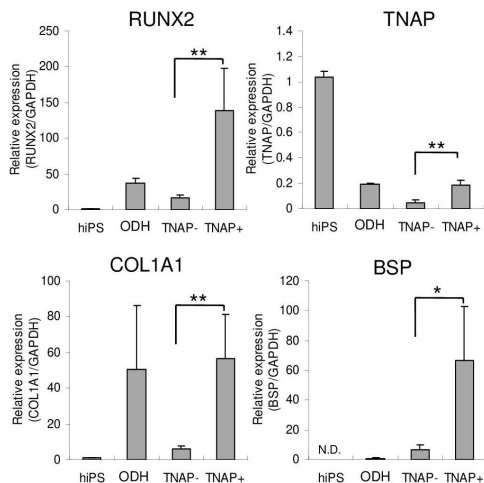
FACS 分離直後の細胞において、いずれの未分

化マーカーも parent ヒト iPS 細胞と比較して ALP 陽性細胞は有意に減少していた。ALP 陰性細胞と比較して ALP 陽性細胞では ALP、OSX の発現が増加していた。RUNX2、OCN には有意な差は認められなかった。

(3) FACS 分離後 40 日の骨芽細胞マーカーの発現解析

ALP 陰性細胞と比較して ALP 陽性細胞では RUNX2、ALP、COL1A1、BSP の発現が有意に増加していた(図 2)。

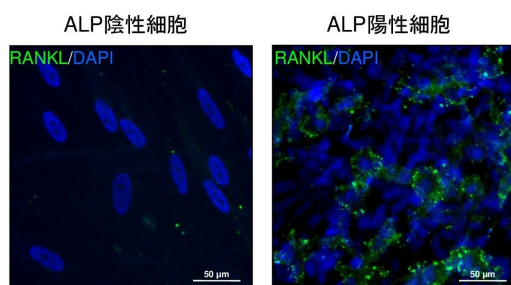
図 2 FACS 分離後培養 40 日目の骨芽細胞マーカーの発現量



(4) 骨細胞マーカーの発現解析

ALP 陽性細胞ではアリザリンレッド染色で強染色される石灰物が検出された。また、ALP 陽性細胞でのみ mineralized nodule が認められ、同部位において骨細胞マーカーである RANKL(図 3)、および SOST 陽性の細胞が存在した。

図 3 抗 RANKL 抗体の免疫蛍光染色

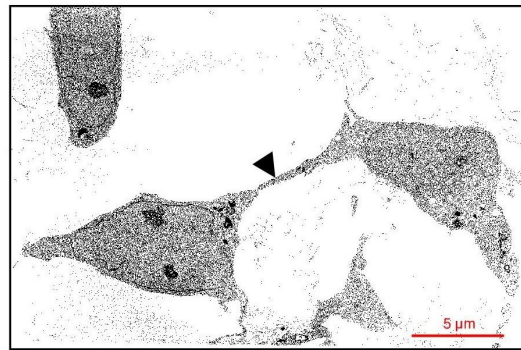


その他、DMP1、FGF23、MEPE、RELN、NPY といった骨細胞マーカーの発現も増加していた。

(5) ALP 陽性細胞の細胞形態学的評価

走査型電子顕微鏡像より ALP 陰性細胞と比較し ALP 陽性細胞では骨細胞に特徴的な樹状突起が多数伸長していた。また、透過型電子顕微鏡像からは細胞自身から伸長した突起による細胞間の結合が認められた(図 4)。

図 4 ALP 陽性細胞の透過型電子顕微鏡像



以上のことより、簡単な操作でヒト iPS 細胞を骨芽細胞に分化誘導、また分離回収が可能であり、さらにその細胞は骨細胞様細胞まで分化可能であることが示唆された。

## 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 3 件)

Hiroshi Kato, Hiroimi Ochiai-Shino, Shoko Onodera, Akiko Saito, Takahiko Sibahara, Toshifumi Azuma, Promoting effect of 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamin D<sub>3</sub> in osteogenic differentiation from induced pluripotent stem cells to osteocyte-like cells, *Open Biology*, 査読有, 5(2), 2015, 140201, DOI: 10.1098/rsob.140201

Eiichi Suzuki, Hiroimi Ochiai-Shino, Hideto Aoki, Shoko Onodera, Akiko Saito, Atsushi Saito, Toshifumi Azuma, Akt activation is required for TGF-1-induced osteoblast differentiation of MC3T3-E1 pre-osteoblast, *Plos One*, 査読有, 9(12), 2014, e112566, DOI: 10.1371/journal.pone.0112566

Hiroimi Ochiai-Shino, Hiroshi Kato, Takashi Sawada, Shoko Onodera, Akiko Saito, Tsuyoshi Takato, Takahiko Sibahara, Takashi Muramatsu, Toshifumi Azuma, A novel strategy for enrichment and isolation of osteoprogenitor cells from induced pluripotent stem cells based on surface marker combination, *Plos One*, 査読有, 9(6), 2014, e99534, DOI: 10.1371/journal.pone.0099534

〔学会発表〕(計 5 件)

加藤 宏、篠 宏美、小野寺 晶子、齋藤 暁子、林 宰央、長谷川 大悟、柴原 孝彦、東 俊文、iPS 細胞から誘導した骨芽細胞を用いた創薬評価 活性型ビタミン D<sub>3</sub> の効果判定、第 32 回日本骨代謝学会学術集会、2014 年 7 月 24 日~7 月 26 日、大阪国際会館(大

阪府)

東 俊文、齋藤 暁子、小野寺 晶子、加藤 宏、篠 宏美、iPS 細胞から骨前駆細胞分化誘導および単離の新規方法開発と骨細胞様細胞への分化誘導、第 32 回日本骨代謝学会学術集会、2014 年 7 月 24 日～7 月 26 日、大阪国際会館(大阪府)

加藤 宏、篠 宏美、小野寺 晶子、齋藤 暁子、林 宰央、長谷川 大悟、柴原 孝彦、東 俊文、iPS 細胞から誘導した骨芽細胞を用いた創薬評価、第 68 回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会、2014 年 5 月 8 日～5 月 9 日、京王プラザホテル(東京都)

齋藤 暁子、篠 宏美、小野寺 晶子、東 俊文、ヒト iPS 細胞の骨芽細胞への分化誘導時における ALP 発現の動態についての検討、第 13 回再生医療学会総会、2014 年 3 月 4 日～3 月 6 日、国立京都国際会館(京都府)

篠 宏美、加藤 宏、齋藤 暁子、小野寺 晶子、佐藤 裕、東 俊文、ヒト iPS 細胞から骨細胞への効果的な誘導、第 86 回日本生化学会大会、2013 年 9 月 11 日～9 月 13 日、パシフィコ横浜(神奈川県)

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

篠 宏美 (SHINO HIROMI)

東京歯科大学・生化学講座・助教

研究者番号：00445446