

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 16 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293336

研究課題名(和文) iPS細胞による次世代骨・軟骨再生療法のための培養誘導技術の開発

研究課題名(英文) Optimization of regeneration technique for bone and cartilage derived from iPS cells

研究代表者

吉川 秀樹 (Yoshikawa, Hideki)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・理事・副学長

研究者番号：60191558

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,500,000円

研究成果の概要(和文)：iPS細胞から胚様体形成を行わずに平面培養だけで高効率に骨芽細胞系細胞を作製することが可能となった。作製した骨芽細胞系細胞とマウス骨髄由来間葉系幹細胞および頭蓋骨由来細胞を比較した結果、高いアルカリフォスファターゼ活性を示すだけでなく、増殖能、遊走能および骨形成能をもつことを特徴としていた。また本細胞は、ホックスおよびセマフォリン遺伝子群の一部を共発現していた。

我々は、無血清培地、低酸素培養および表面加工処理された培養皿に加え、低分子化合物およびサイトカイン添加などの因子を組み合わせることにより、iPS細胞から骨芽細胞系細胞を高効率で作製することに成功した。

研究成果の概要(英文)：Osteoblast lineage cells derived from mouse iPS cells were efficiently differentiated by only two-dimensional culture without inducing embryoid body formation. Directed osteoblast lineage cells were characterized in that they have not only high alkaline phosphatase activity, but also proliferation, migration ability and osteogenic potential, compared with mouse mesenchymal stem cells derived from bone marrow and calvarial cells. Moreover, the osteoblast lineage cells co-expressed in a part of Hox and Semaphorin genes.

We succeeded an efficient optimization for directing osteoblast differentiation from iPS cells in combination with administration of compounds and cytokines, in addition to culture conditions such as serum-free media, hypoxic culture and chemically modified dish surface.

研究分野：医歯薬学

キーワード：骨再生療法 iPS細胞 骨芽細胞系細胞 骨芽細胞分化 間葉系前駆細胞 無血清培地 大型骨欠損

1. 研究開始当初の背景

大型骨欠損に対する再生療法の一つの大きな課題は、細胞源として骨芽細胞系細胞への分化能を有するだけでなく、増殖能も兼ね備えた安全でかつ均一な多くの細胞が得られるかである。これまでわが国では、大学などの研究機関において間葉系幹細胞を用いた臨床研究が行われているが、実際には骨髄由来の付着性細胞を培養して得たものであり、生物学的には様々な細胞種が混在したものと考えられている。幹細胞として自己複製能を有する細胞は、10万個～100万個に1個程度とされ、選択的に増幅することは難しいため、間葉系幹細胞としての均一な細胞製剤の品質を得ることを困難にしてきた。このような欠点を克服するために期待されているのが、多能性幹(iPS)細胞であり、疾患メカニズムの解明や創薬研究だけでなく、多くの分野で臨床応用を目指した再生医療への取り組みが始まっている。我々は、体細胞から人工的に誘導作製が可能であり、無限の自己複製能(増殖能)と多能性(分化能)を合わせ持つiPS細胞を用いて分化誘導を行い、これらを細胞源とする新しい骨・軟骨再生療法のための培養誘導技術の開発を目指すことにした。

iPS細胞を用いて骨芽細胞への分化誘導を行った研究の多くは、血清含有培地を使用し、胚様体(EB)を形成させた上で分化培養誘導法を*in vitro* assayで検討したものである。また、EB形成を行わず平面培養により無血清培地下で骨芽細胞への分化誘導法を検討した報告も少ない。本研究では、iPS細胞から効率的な分化培養誘導法により骨芽細胞系細胞を作製し、その特性を評価した。また、作製した骨芽細胞系細胞を細胞源として実験動物への移植を行い、骨形成能および造腫瘍性試験を行った報告が非常に少ないことから、同細胞を用いた再生療法の可能性、安全性についても検討を行った。

2. 研究の目的

従来から行われている間葉系幹細胞による骨芽細胞の作製に頼らない、無限の増殖能と分化能を合わせ持つiPS細胞から間葉系前駆細胞へ分化誘導し、より多くの骨芽細胞系細胞を細胞源とする三次元組織化を目指した次世代の骨・軟骨の再生療法の確立である。

本研究ではiPS細胞から間葉系前駆細胞への分化誘導を行い、培養人工骨作製技術の最適化を行った。主な内容としては、iPS細胞由来間葉系前駆細胞への分化誘導法の最適化、間葉系前駆細胞から作製した骨芽細胞系細胞の特性解析、実験動物への培養人工骨の移植により骨形成能および造腫瘍性を評価する。

3. 研究の方法

(1) iPS細胞から骨芽細胞系細胞への分化誘導法の最適化

マウスiPS細胞(20D-17)を用いて、無血清培地にサイトカインおよび低分子化合物を組み合わせ、段階的に添加濃度を変化させるだけでなく、低酸素培養および化学的表面処理が施された培養皿についても段階的に組み合わせることにより骨芽細胞系細胞の分化誘導法の最適化を行った。

(2) 作製した骨芽細胞系細胞の特性評価

最適化した分化誘導法により作製した骨芽細胞系細胞(図1)の特性について、マウス頭蓋骨由来細胞(CCs)および骨髄由来間葉系幹細胞(MSCs)との比較検討を行った。

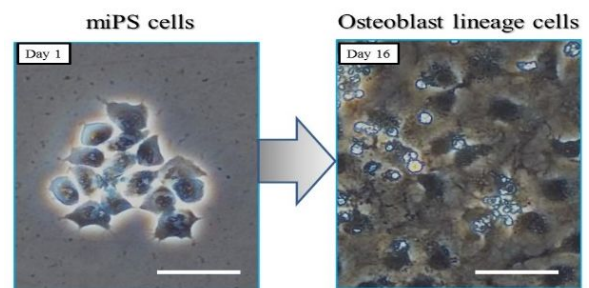


図1 iPS細胞から骨芽細胞系細胞への分化誘導

(3) 実験動物への培養人工骨移植による骨形成能および造腫瘍性の評価

細胞源として骨芽細胞系細胞を増幅し、当科で開発したハイドロキシアパタイトによる人工骨に細胞を播種、iPS細胞由来培養人工骨を作製し、実験動物に皮下移植を行った。移植後8週および12週間で移植片の骨形成能および奇形腫形成を評価した。

4. 研究成果

(1) 骨芽細胞系細胞の分化誘導法

iPS細胞由来の間葉系前駆細胞、骨芽細胞系細胞への分化誘導法の最適化については、6種類のサイトカインと2種類の化合物の濃度と添加時

期を組み合わせた基礎的検討に加え、初期の分化誘導過程に沿った二段階の低酸素培養法の併用、さらに化学的修飾された培養皿を併用することにより、骨芽細胞系細胞への分化誘導プロトコルの最適化を行った(図2)。

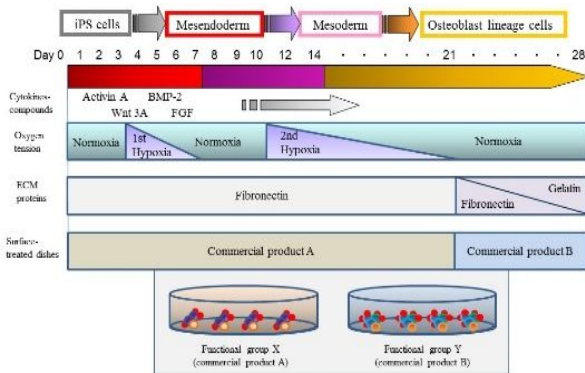


図2 骨芽細胞分化誘導のための最適化プロトコル

効率良く骨芽細胞系細胞を作製するためには、Activin、Wnt、BMPをはじめとする種々のサイトカインの段階的な濃度勾配と低分子化合物の組み合わせ添加が重要な鍵を握ると思われる。本分化誘導法において、さらなる効率化を図るためには、低酸素培養法と化学的 surface 処理した培養皿などを併用し、種々の環境因子を考慮する必要がある。

(2) 骨芽細胞系細胞の特性

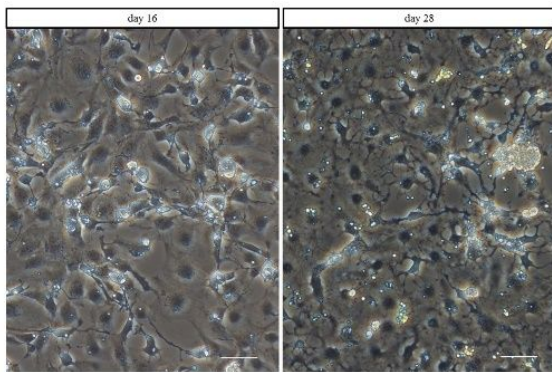


図3 作製したマウスiPS細胞由来の骨芽細胞系細胞(28日目)

iPS細胞から分化誘導し作製した28日以降の骨芽細胞系細胞の特性(図3)については、骨髄由来間葉系幹細胞および頭蓋骨由来骨芽細胞に比べて増殖能、遊走能を失わない(図4,5)だけでなく、著しく高いアルカリフォスファターゼ(ALP)活性を示すことが特徴である。作製した骨芽細胞系細胞は、従来の骨分化液性因子の添加にともない10日~14日後には基質石灰化を生じるが、MSsおよびCCsはこの期間内での石灰化を確認できなかった(図6)。

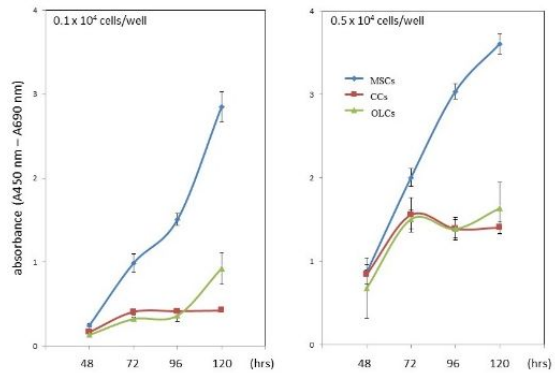


図4 増殖能の比較 (WST-1 assay)

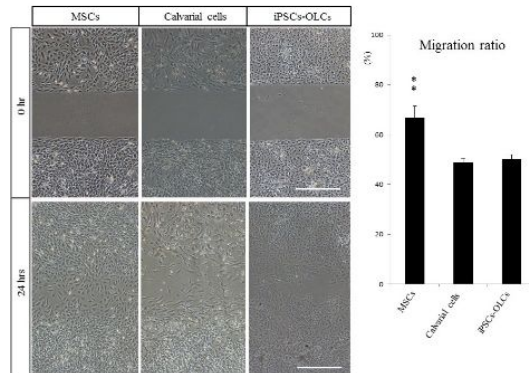


図5 遊走能の比較 (Wound healing assay)

28日以降の骨芽細胞系細胞は、比較的安定して石灰化生じることなく維持培養が可能であることを63日以降も確認している(図7)。

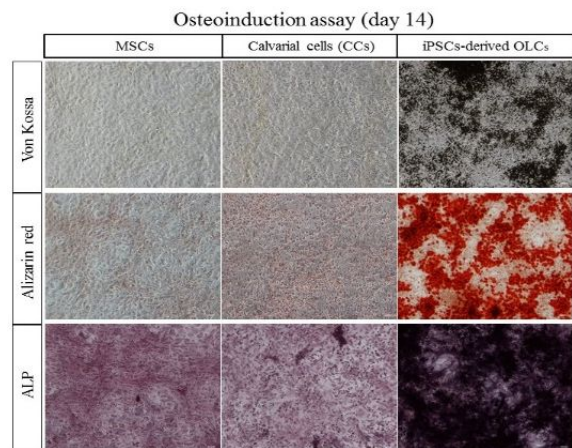


図6 液性因子による骨分化の比較(14日目)

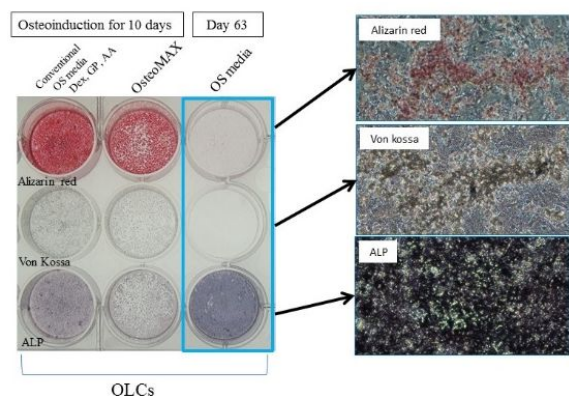


図7 骨芽細胞系細胞は骨分化能をもち維持培養可能である

骨芽細胞系細胞は、MSCs および CCs に比べ骨分化開始前に著しく高い ALP 活性を示すものの石灰化を生じた後には低下したのに対し、カルシウム含有量は石灰化にともない明らかに増大した（図 8）。

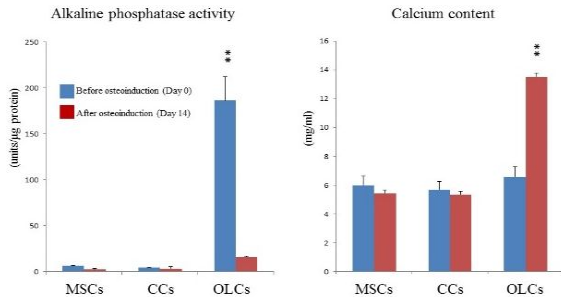


図 8 骨芽細胞系細胞を骨分化させた際のALP活性とカルシウム量の変化

骨細胞への分化能をもつ骨芽細胞株(IDG-SW3)を用いて骨分化させたところ、IDG-SW3 細胞と作製した骨芽細胞系細胞はほぼ同様な傾向で 14 日までに基質石灰化を示した（図 9）。以上のことから、骨形成能を有する骨芽細胞に近い細胞が得られたことを確認した。

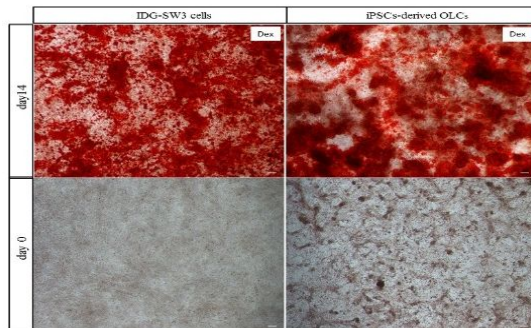


図 9 骨芽細胞株(IDG-SW3)との骨分化傾向の比較

マイクロアレイによる網羅的な遺伝子発現解析の結果、分化誘導にともない間葉系細胞および骨芽細胞分化に関連する遺伝子発現が認められた。Hoxb および Semaphorin クラス 3 遺伝子がクラスター発現を示すことも特徴の一つであることを見出した（図 10、11）。

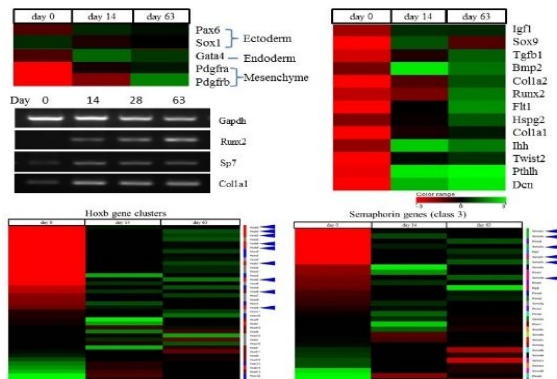


図 10 遺伝子発現解析の結果、Hox, Semaphorin遺伝子クラスター発現(青印)

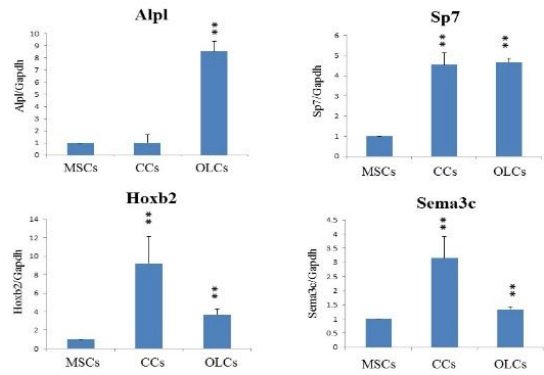


図 11 遺伝子発現定量解析の比較

さらに、FACS による表面マーカー解析の結果から、骨芽細胞系細胞において Alpl および Pdpn の発現がともに陽性を示す細胞の割合は、約 8 割に及ぶことを確認しており（図 12）、

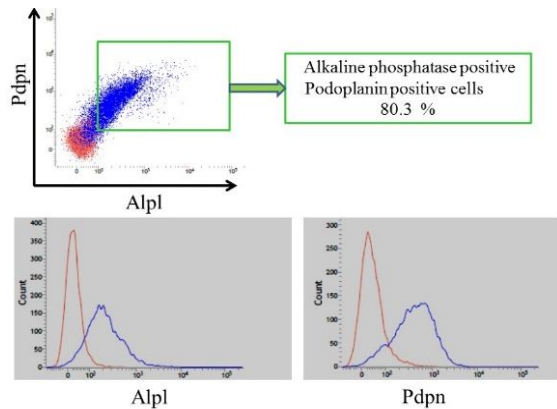


図 12 骨芽細胞系細胞におけるAlpl+ Pdpn+ 細胞の割合

骨芽細胞系細胞を分化誘導する際の表面マーカーとして有力な指標に成り得るのではないかと考える。

(3) 培養人工骨の骨形成能および造腫瘍性

作製した骨芽細胞系細胞による培養人工骨を実験動物に移植した結果、移植時期とサイトカインの添加濃度によっては奇形腫を形成することを確認した（図 13）。

腫瘍化する原因としては、分化誘導過程において、間葉系前駆細胞とは異なる系譜に分化した細胞の混在、分化抵抗性の未分化細胞の残存、分化程度が不十分、などが挙げられる。これらの点を解決するには分化誘導プロトコルを見直す必要性があり、この段階で多大な時間を要することになった。とくに分化誘導開始から 6 週以内の細胞移植は腫瘍化し易い傾向にあり、移植後 8 週以内で腫瘍化を示さなくてもその後 12 週間までに腫瘍化する例が認められている。

一方、作製した骨芽細胞系細胞は、生体内で軟骨および骨形成能を示すことも確認している(図14)。



図13 細胞移植後8週までに奇形腫を形成した例 (一部骨様構造を認める)

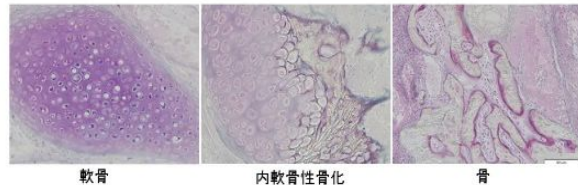


図14 奇形腫内部で軟骨および骨形成を認める(移植後8週目)

以上のことから、分化誘導開始から28日以降の骨芽細胞系細胞の維持培養は、サイトカインおよび低分子化合物の添加濃度を修正し、細胞移植の時期については分化誘導開始から少なくとも9週~12週以降に行うべきであると考えられる。今後の課題としては、動物iPS細胞により最適化した分化誘導プロトコルをヒトiPS細胞に応用し、分化誘導作製した骨芽細胞系細胞を同様に生体内へ移植し、骨形成能および造腫瘍性試験を行う必要がある。また、実験動物への移植後の評価期間については、少なくとも9週~12週間以上の長期にわたる安全性の確認が肝要である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計6件)

Koizumi, K., Ebina, K., Hart, D.A., Hirao, M., Noguchi, T., Sugita, N., Yasui, Y., Chijimatsu, R., Yoshikawa, H., Nakamura, N.: Synovial mesenchymal stem cells from osteo- or rheumatoid arthritis joints exhibit good potential for cartilage repair using a scaffold-free tissue engineering approach. *Osteoarthritis Cartilage*, 24:1413-1422, 2016.

DOI:[10.1016/j.joca.2016.03.006](https://doi.org/10.1016/j.joca.2016.03.006)

Yasui, Y., Chijimatsu, R., Hart, D.A., Koizumi, K., Sugita, N., Shimomura, K., Myoui, A., Yoshikawa, H., Nakamura, N.: Preparation of scaffold-free tissue-engineered constructs derived

from human synovial mesenchymal stem cells under low oxygen tension enhances their chondrogenic differentiation capacity. *Tissue Engineering*, 22A:490-500, 2016.

DOI:[10.1089/ten.tea.2015.0458](https://doi.org/10.1089/ten.tea.2015.0458)

Yasui, Y., Ando, W., Shimomura, K., Koizumi, K., Chijimatsu, R., Hamamoto, S., Kobayashi, M., Yoshikawa, H., Nakamura, N.: Scaffold-free, stem cell-based cartilage repair. *Journal of Clinical Orthopaedics and Trauma*, 7:157-163, 2016.

DOI:[10.1016/j.jcot.2016.06.002](https://doi.org/10.1016/j.jcot.2016.06.002)

Noguchi, T., Ebina, K., Hirao, M., Morimoto, T., Koizumi, K., Kitaguchi, K., Matsuoka, H., Iwahashi, T., Yoshikawa, H.: Oxygen ultra-fine bubbles water administration prevents bone loss of glucocorticoid-induced osteoporosis in mice by suppressing osteoclast differentiation. *Osteoporosis International*, 28:1063-1075, 2017.

DOI:[10.1007/s00198-016-3830-1](https://doi.org/10.1007/s00198-016-3830-1)

Uchida, R., Nakata, K., Kawano, F., Yonetani, Y., Ogasawara, I., Nakai, N., Mae, T., Matsuo, T., Tachibana, Y., Yokoi, H., Yoshikawa, H.:

Vibration acceleration promotes bone formation in rodent models. *PLoS One*, 12:e0172614, 2017.

DOI:[10.1371/journal.pone.0172614](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172614)

Shimomura, K., Moriguchi, Y., Nansai, R., Fujie, H., Ando, W., Horibe, S., Hart, D.A., Gobbi, A.,

Yoshikawa, H., Nakamura, N.: Comparison of 2

different formulations of artificial bone for a hybrid implant with a tissue-engineered construct derived from synovial mesenchymal stem cells.

American Journal of Sports Medicine, 45:666-675, 2017.

DOI:[10.1177/0363546516668835](https://doi.org/10.1177/0363546516668835)

[学会発表] (計10件)

吉川秀樹: 人工骨による骨再生、過去・現在・未来第1回外傷人工骨研究会(特別講演).

(2016.01. 大阪)

吉川秀樹: バイオマテリアルによる骨再生:過去・現在・未来. 日本バイオマテリアル学会シンポジウム2016(特別講演). (2016.11. 福岡)

吉川秀樹: 新しい骨補填材に対する期待: 臨床の立場から. 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2016 (タウンホールミーティング). (2016. 11. 福岡)

吉川秀樹: 人工骨による骨再生: 過去・現在・未来第 12 回しまなみ骨・関節フォーラム. (2016. 12. 松山)

宮本 諭, 吉田 清志, 吉川 秀樹, 名井 陽: 多能性幹細胞から分化誘導した骨芽細胞系細胞は、高い骨形成能を有し、Semaphorin および Hox 遺伝子を発現する. 第 34 回日本骨代謝学会学術集会. (2016. 07. 大阪).

Myoui, A., Fujimoto, T., Tamai, N., Ezoe, S., Shimokawa, T., Yoshikawa, H.: Clinical Research on Safety and Efficacy of Autologous MSC Integrated with Porous Ceramics for Bone Defect Repair after Benign Tumor Removal. 2015 4th TERMIS World Congress. (2015. 09. ポストン)

名井 陽: 運動器疾患の治療におけるバイオマテリアルの位置づけと今後のニーズ. 日本バイオマテリアル学会シンポジウム. (2016. 11. 福岡)

名井 陽: 治療に活かすために知っておきたい人工骨の基礎知識と高機能化研究の現状. 第 42 回日本骨折治療学会. (2016. 07. 東京)

森口 悠, 李 大成, 増田 一仁, 浜口 智志, 吉川 秀樹, 名井 陽: ハイドロキシアパタイト人工骨に対する低温プラズマ処理. 第 35 回整形外科バイオマテリアル研究. (2015. 12. 東京)

名井 陽: セラミックス人工骨の基礎と臨. . 第 34 回整形外科バイオマテリアル研究会. (2014. 12. 東京)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉川 秀樹 (Yoshikawa, Hideki)
大阪大学・大学院医学系研究科・理事・副学長
研究者番号: 60191558

(2) 研究分担者

名井 陽 (Myoui, Akira)
大阪大学・医学部付属病院・准教授
研究者番号: 10263261

中田 研 (Nakata, Ken)
大阪大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 00283747

中村 憲正 (Nakamura, Norimasa)
大阪大学・学内共同利用施設・教授
研究者番号: 50273719

梅澤 明弘 (Umezawa, Akihiro)
国立研究開発法人・国立成育医療研究センター・副
所長
研究者番号: 70213486

福田 寛二 (Fukuda, Kanji)
近畿大学・医学部・教授
研究者番号: 50201744

(3) 連携研究者

浜口 智志 (Hamaguchi, Satoshi)
大阪大学・工学研究科・教授
研究者番号: 60301826

後藤 直久 (Goto, Naohisa)
大阪大学・微生物研究所・講師
研究者番号: 60448157