

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293419

研究課題名(和文) ヒト線維芽細胞から骨・軟骨細胞への直接分化転換と硬組織再生への応用

研究課題名(英文) Trans-differentiation of human fibroblasts into chondrocytes and osteocytes and its application for regenerative medicine

研究代表者

池田 正明 (IKEDA, Masa-Aki)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・准教授

研究者番号：20193211

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト線維芽細胞を骨・軟骨細胞に直接分化転換させることと、多分化能をもった間葉系幹細胞を長期継代培養できる培養法を開発することを目指して研究をおこなった。その結果、種々の小分子化合物・増殖因子を添加することにより、(1)ヒト線維芽細胞をin vitroで骨・脂肪細胞へ分化させる方法を見出した。(2)骨髄由来の間葉系幹細胞を骨・軟骨・脂肪細胞への分化能を保ちながら長期間で培養できる方法を見出した。多能性をもつ間葉系幹細胞は、骨・軟骨の再生医療において有望な細胞の供給源である考えられている。したがって、本研究の成果は、将来の硬組織再生療法の発展に大きく寄与すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The objectives of this study were to determine (1) culture conditions that enable human fibroblasts to trans-differentiate into chondrocytes and osteocytes, and (2) culture conditions that enable mesenchymal stem cells (MSCs) to maintain proliferation and multilineage differentiation potential in vitro long-term culture. We found a combination of culture supplements that enabled to trans-differentiate human dermal fibroblasts into osteocytes and adipocytes, but not chondrocytes. Furthermore, we found a combination of culture supplements that enabled to maintain proliferation potential of bone marrow-derived MSCs (BM-MSCs) in vitro. The long-term cultured MSCs kept osteogenic, adipogenic, and chondrogenic differentiation capacity and expressed the lineage-specific differentiation markers. These results indicate that the extended culture conditions enabled to maintain proliferation capacity of BM-MSCs while retaining their multipotent differentiation capacity.

研究分野：歯科医用工学・再生歯学

キーワード：骨 軟骨 繊維芽細胞 間葉系幹細胞 分化転換 細胞培養 増殖因子 再生医療

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 骨髄、脂肪組織あるいは歯牙等から採取される細胞の中には、骨、軟骨、脂肪および筋細胞等に分化することの出来る多分化能をもった幹細胞が存在し、骨・軟骨欠損、歯周病、骨粗鬆症等の骨・軟骨疾患への応用が期待されている。しかしながら、その様な幹細胞には、*in vitro*での細胞分裂能に限界がある、採取に比較的大きな侵襲を伴う、高齢者からは十分な量を確保できない等の問題があり、臨床応用を進める上での大きな障害になっている。

(2) 近年、組織を再生させる源となる細胞として iPS 細胞 (人工多能性幹細胞) が注目を集めている。iPS 細胞は、繊維芽細胞などの体細胞に数種類の遺伝子を導入することにより作成された。理論上、体を構成するほぼ全ての組織や臓器に分化誘導することが可能である。しかしながら、移植後、腫瘍を作る危険性が指摘されているとともに、iPS 細胞の作成、安定した供給、および維持・管理には多大な時間、労力およびコストがかかる。

(3) 皮膚・口腔粘膜由来の細胞、特に線維芽細胞は、比較的容易に採取でき大量培養が可能である。線維芽細胞を短期間にかつ効率的に骨・軟骨細胞に分化転換することが出来れば、より汎用性の高い再生医療の開発に繋がると考えられる。研究代表者らは、発生過程における線維芽細胞と間葉系幹細胞の細胞系譜が近いことから、外来性の遺伝子導入やウイルスベクターを用いなくて、ヒト線維芽細胞を骨、軟骨、脂肪細胞に分化転換することができるのではないかと考えた。

(4) 最近、幹細胞の維持あるいは幹細胞化の促進に関する小分子化合物および増殖因子が続々と報告されている。さらに、体細胞から幹細胞への変化を抑制する遺伝子の働きを阻害することにより、体細胞の脱分化や iPS 細胞の作成効率の上昇が起こることが明らかになってきた。例えば、核マトリクス結合因子 ARID3A の発現を抑制すると、体細胞由来のヒト培養細胞の形質が、胚性幹 (ES) 細胞様に変化することが報告されている。

(5) 研究代表者らは、長年、ARID3A の機能解析をおこなってきたが、その過程で ARID3A の発現を抑制すると、細胞のエピジェネティックな制御が部分的に改変されること、しかしながら、ARID3A 単独の発現抑制では、ヒト正常細胞の形質を変化させるには不十分であった (未発表データ)。そこで、幹細胞化を阻害することが報告されている遺伝子、幹細胞化を促進・維持する小分子化合物・増殖因子を検索し、ヒト線維芽細胞から骨・脂肪細胞への分化転換を指標に機能的なスクリーニングをおこなった。その結果、ヒト線維芽細胞を効率的に骨・脂肪細胞に分化転換できる可能性のある分子の組み合わせを見出した。以上の予備研究の結果は、小分子化合物・増殖因子を組み合わせることによって、ヒト線維芽細胞の分化転換が可能であることを示唆している。

2. 研究の目的

以上の研究背景に基づき申請者らは、本研究の目的を以下の通り設定した。

(1) ヒト線維芽細胞を骨・軟骨・脂肪細胞へ直接分化転換することのできる培養系を開発する。

- (2) 間葉系幹細胞の特徴（多分化能・自己複製能）を解析し、その長期継代培養法を検討する。
- (3) 得られた細胞の生体内での硬組織形成能を明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) 研究計画の概要は以下の3点である。(1) ヒト線維芽細胞の脱分化・分化転換に最適な条件を詳細に検討し、骨・軟骨・脂肪細胞へ転換できる培養系を検討する。(2) 間葉系幹細胞の長期継代培養に最適な条件を詳細に検討する。(3) 免疫不全マウスに移植して生体内での硬組織形成能・造腫瘍能を調べる。
- (2) ヒト線維芽細胞の分化転換および間葉系幹細胞の長期継代培養法の確立
線維芽細胞と間葉系幹細胞のそれぞれについて、最適な条件を検討する。その後、分化誘導培地で3週間培養し、石灰化・軟骨・脂肪染色等により分化状態を評価する。
- (3) in vivo における硬組織形成能の解析
得られた細胞をハイドロキシアパタイトなどの培養担体とともに免疫不全マウスに移植する。4~8週間後に硬組織形成能を解析する。
- (4) 骨・軟骨・脂肪細胞の分化マーカー発現解析
分化形質および分化マーカーの発現について、遺伝子およびタンパク質レベルでの発現解析をおこなう。
- (5) 脱分化・分化転換過程におけるエピジェネティック制御の解析
骨・軟骨・脂肪細胞分化に重要な遺伝子のプロモーター領域にお

けるに DNA メチル化およびヒストン修飾等の解析をおこなう。

4. 研究成果

- (1) 種々の小分子化合物・増殖因子を培養液に添加することにより、ヒト線維芽細胞を in vitro で骨・脂肪細胞へ分化させる方法を見出した。ヒト線維芽細胞から軟骨細胞への分化転換効率を上昇させるための培養条件の詳細な検討をおこなったが、軟骨細胞への分化転換の効率を上昇させることはできなかった。したがって、ヒト線維芽細胞を軟骨細胞へ分化転換させるためには、さらに条件を検討する必要がある。
- (2) 骨・軟骨細胞に分化する能力をもつ細胞を大量に増やす方法がなければ、再生医療に応用することは難しい。しかしながら、骨・軟骨に分化する能力をもつ間葉系幹細胞を長期間 in vitro で培養する方法は確立されていない。そこで本研究では、多分化能をもつ成体幹細胞の長期継代培養法を開発することも目的の一つとして研究をおこなった。
- (3) 間葉系幹細胞の増殖分化に関与することが報告されている種々の増殖因子や小分子化合物を選び、それらを様々な組み合わせでヒト骨髄由来間葉系幹細胞に添加し、間葉系幹細胞の増殖能と多分化能に対する影響を検討した。その結果、多分化能を維持した間葉系幹細胞を長期間培養することができる培養添加物の組み合わせを見出した。培養添加物を添加した若年提供者由来の間葉系幹細胞は継代数 12 回まで骨・軟骨・脂肪細胞への分化能を保ち、分化誘導後、分化関連遺伝子も発現していた。こ

れに対して、無添加の間葉系幹細胞は継代数 10 回で増殖を停止した。

- (4) 65 歳以上の高齢者から採取した間葉系幹細胞について、さらに培養条件の検討を続けた結果、高齢者の間葉系幹細胞の骨・軟骨・脂肪細胞への分化能と増殖能を継代数 8 回まで維持できる培養添加物の組み合わせを見出した（投稿準備中）。
- (5) 脂肪由来間葉系幹細胞は、骨髄系間葉系幹細胞より、容易に採取することが可能であるが、高い多分化能を保ったまま大量に増やすことが困難であった。そこで、ヒト脂肪由来間葉系幹細胞についても、上記と同様の検討をおこなった。その結果、脂肪由来間葉系幹細胞を長期間培養できる小分子化合物・増殖因子を見出した。長期培養した脂肪由来間葉系幹細胞は、骨・脂肪細胞への分化能を維持していた。しかしながら、脂肪由来間葉系幹細胞の軟骨分化能を向上させるためにはさらに条件の検討をおこなう必要がある。
- (6) 多分化能を保った間葉系幹細胞の長期間培養法は、未だに樹立されていない。したがって本研究の成果は、間葉系幹細胞の臨床応用に向けて大きく貢献するものと考えられる。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 9 件）

Tsuchida N, Ikeda MA, Grieco M, Vecchio G FUCA1 is induced by wild-type p53 and expressed at different levels in thyroid cancers depending on p53 status. *Int. J. Oncol.*, 査読有、50 (6) 2043-2048 (2017)
DOI: 10.3892/ijo.2017.3968

Zhang K, Ikeda Y, Kasugai S, Ikeda MA Extended Culture Conditions for Multipotent Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells . *J Stomatol Soci Japan*, 査読有、83 (1) 13-23 (2016)

Pratama E, Tian X, Lestari W, Iseki S, Ichwan S J A, Ikeda MA Critical role of ARID3B in the expression of pro-apoptotic p53-target genes and apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 査読有、468, 248-254 (2015)
DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.10.121

Ikeda Y, Ikeda MA Cyclin E marks quiescent neural stem cells and caspase-3-positive newborn cells during adult hippocampal neurogenesis in mice. *Neurosci Lett.*, 査読有、607:90-96 (2015)
DOI: 10.1016/j.neulet.2015.09.017

Ikeda Y, Ikeda MA Cdk2-independent expression of cyclin E in adult hippocampal neurogenesis in mice. *Data in Brief*, 査読無、in press (2016)

Tsuchida E, Kaida A, Pratama E, Ikeda MA, Suzuki K, Harada K, Miura M. Effect of X-Irradiation at Different Stages in the Cell Cycle on Individual Cell-Based Kinetics in an Asynchronous Cell Population. *PLoS One.*, 査読有、10(6) e0128090. (2015)
DOI: 10.1371/journal.pone.0128090.
eCollection 2015

Auerkari EI, Joewono V, Handjari DR, Sarwono1 AT, Suhartono AW, Eto K, Ikeda MA. Expression of p27Kip1 and

E-cadherin in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma of Indonesian Patients. *Open Dentistry J.*、査読有、8, 136-143 (2014)
DOI: 10.2174/1874210601408010136.
eCollection 2014

Ichwan SJ, Al-Ani IM, Bilal HG, Suriyah WH, Taher M, Ikeda MA. Apoptotic Activities of Thymoquinone, an Active Ingredient of Black Seed (*Nigella sativa*), in Cervical Cancer Cell Lines. *Chin J Physiol.*、査読有、57, 249-55 (2014)
DOI: 10.4077/CJP.2014.BAB190.

Yuniardini S Wimardhani, Dewi F Suniarti, Hans J Freisleben, Septelia I Wanandi, Nurjati C Siregar, Masa-Aki Ikeda. Chitosan exerts anticancer activity through induction of apoptosis and cell cycle arrest in oral cancer cells. *J. Oral Sci.*、査読有、Vol. 56, No. 2, 119-126 (2014)
doi.org/10.2334/josnusd.56.119

〔学会発表〕（計 11 件）

Saadat KASM , Pratama E, Lestari W , Ma T, Ohtani K , Ikeda MA “Critical role of ARID3B in the expression of E2F-responsive genes and cell proliferation.” 第 39 回日本分子生物学会年会、2016 年 11 月 30 日-12 月 2 日、パシフィコ横浜（神奈川県、横浜市）

Arman K, Igci YZ, Saadat KASM, Altan Z, Sahin Y, Ikeda MA, Igci M. “Opposite roles of lncRNA ERICD (E2F1-regulated inhibitor of cell death) and ARID3A (AT-rich interaction domain 3A)

inosteosarcoma, glioblastoma and lung cancer.” *The FEBS Journal* 283 (Suppl. 1) (2016) 282-283, The 41th FEBS Congress, Ephesus, Turkey, September 3-8, 2016

Ikeda, MA “Novel Candidates of Therapeutic Targets for Head and Neck Squamous Cell Carcinomas Defined by Recent Comprehensive Mutation Analysis “ The 17th Scientific and Refresher Course in Dentistry (KPPIKG 2016), Jakarta, Indonesia, February 24 – February 27, 2016

Pratama E, Saadat KASM , Lestari W , Ichwan S, Iseki S, Ohtani K , Ikeda MA “ARID3B promotes gene expression critical for E2f-mediated cell cycle progression and p53-mediated apoptosis.” 第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会合同大会 2015 年 12 月 1 日- 4 日、神戸ポートアイランド（兵庫県、神戸市）

Saadat KASM, Kaiffee A, Ahmet A, Iseki S, Ohtani K, Ikeda MA “Expression study of E2F-target genes in osteosarcoma (U2OS) and glioblastoma (T98G) cell lines after knocking down ARID3A and ARID3B. XIV. National Congress of Medical Biology and Genetics, October 27 – 30, 2015 Ölüdeniz – Fethiye, Turkey

Saadat KASM, Kaiffee A, Ahmet A, Ohtani K, Ikeda MA “Overexpression of ARID3 facilitates E2F-dependent apoptosis” XIV. National Congress of Medical Biology and Genetics, October 27 – 30, 2015 Ölüdeniz – Fethiye, Turkey

Zhang Kui, Shohei Kasugai, Masa-Aki Ikeda “Maintenance of Stemness in Mesenchymal Stem Cells during Long-Term Culture.” 第 79 回口腔病学会学術大会、2014 年 12 月 5 日- 6 日、東京医科歯科大学（東京都、文京区）

Ikeda Y, Ikeda MA
“Immunohistochemical detection of cyclin E in non-proliferating neurons of the mouse adult hippocampal dentate gyrus.” Society for Neuroscience 2014 Annual Meeting, November 15 - 19 2014, Washington, DC, USA

Ikeda MA “Mesenchymal Stem Cells and Bone Tissue Engineering - Overview and Our Approach – Regional Oral Biology Scientific Meeting 2014, October 30 – 31, 2014 Depok, Indonesia.

Endrawan Pratama, Sachiko Iseki, Masa-Aki Ikeda “Critical roles for ARID3B in Expression of Proapoptotic p53-Target Genes and Cell Death Following DNA Damage.” 第 37 回日本分子生物学会年会、2014 年 11 月 25 日 - 27 日、パシフィコ横浜（神奈川県、横浜市）

Endrawan Pratama、井関祥子、池田正明 “アポトーシス関連 p53 標的遺伝子の発現と細胞死誘導における DNA 結合因子 ARID3B の重要な役割” 第 56 回歯科基礎医学会学術大会・総会、2014 年 9 月 25 - 27 日、福岡国際会議場（福岡県、福岡市）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

池田 正明（IKEDA, Masaaki）
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合
研究科・准教授
研究者番号：20193211

(2) 研究分担者

春日井 昇平（KASUGAI, Shohei）
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合
研究科・教授
研究者番号：70161049

池田 やよい（IKEDA, Yayoi）
愛知学院大学・歯学部・教授
研究者番号：00202903

大谷 清（Ohtani, Kiyoshi）
関西学院大学・理工学部・教授
研究者番号：30201974

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者