

機関番号：14501

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21890140

研究課題名（和文） iPS細胞の椎間板変性治療への応用と生体内iPS細胞バンク作成の試み

研究課題名（英文） Regeneration of intervertebral disc by iPS cells and challenge for in situ iPS cell bank.

研究代表者

角谷 賢一郎 (Kakutani Kenichiro)

神戸大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：10533739

研究成果の概要（和文）：

iPS細胞から椎間板髄核細胞、線維輪細胞を分化誘導することを試みた。現在のところ幹細胞から椎間板細胞を効率的に分化させる方法は確立されていない。したがって、我々は互いを共培養させる方法を採用した。まず、iPS細胞と椎間板細胞を共培養することで分化誘導を試みたが、iPS細胞は線維細胞様の細胞に分化し椎間板髄核細胞の特徴は有していなかった。そこで、iPS細胞から胚様体を作成、この胚様体へレチノイン酸を負荷することで間葉系幹細胞を分化誘導し、この間葉系幹細胞と椎間板髄核細胞、線維輪細胞を共培養する手法を選択した。

iPS細胞は浮遊培養することで約7日間後に胚様体の形成をみた。さらにこの胚様体細胞へレチノイン酸を負荷することで間葉系幹細胞様の細胞が誘導された。この間葉系幹細胞の性格を検討するために、骨分化誘導を行いアリザリン染色にてCa沈着を証明し骨分化誘導能を確認した。今後、このiPS細胞誘導間葉系幹細胞から椎間板細胞の分化誘導を図る予定である。

研究成果の概要（英文）：

The stable method to differentiate intervertebral disc (IVD) cell from iPS cells has not been established yet. Here we employed the co-culture method with iPS cells and IVD cells to differentiate iPS cells. At first, we directly co-cultured iPS cells with IVD cells. However iPS cells differentiated fibroblast like cells, not have the characteristics of IVD cells. Next we induced embryoid body from iPS cells, in addition embryoid body cells were treated with retinoic acid for seven days. After treatment, mesenchymal stem like cells were differentiated. Furthermore these differentiated cells were co-cultured with osteoblast inducer reagent for three weeks. We have confirmed the potential of mesenchymal stem like cells to differentiate the osteoblast cell by Alizarin red staining.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,050,000	315,000	1,365,000
2010年度	950,000	285,000	1,235,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,000,000	600,000	2,600,000

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：iPS細胞、椎間板再生、生体内バンク、間葉系幹細胞

## 1. 研究開始当初の背景

現在椎間板再生を目指した治療は、成長因子治療、遺伝子治療、幹細胞治療に分けられ各国で広く研究されている。現在の椎間板に対する治療は切除を中心とした破壊的なものであり、結果的に椎間板の本来の機能を失うものである。さらに腰痛を増悪していることも少なくない。従って椎間板の本来の機能を温存、再生するような治療が望まれている。

椎間板再生を目指した治療は、成長因子治療、遺伝子治療、幹細胞治療に分けられ各国で広く研究がなされている。そこで我々は、椎間板再生を目指し椎間板変性の機序解明と治療に向けた研究を重ねている。機序解明に関しては、人体の椎間板変性に近い椎間板圧迫モデルの作製や椎間板組織のもつ Fas/FasL を介した免疫学的特権に関する研究を報告した。また、治療に関して超音波コントラスト法による *in vivo* でのウイルスベクターを用いない遺伝子導入技術の開発やサイトカイン阻害剤、siRNA 発現ベクターの椎間板再生医療への可能性について報告してきた。

一方、山中らが報告した iPS 細胞は人工多能性幹細胞であり、分化した細胞に数種類の遺伝子を導入することで細胞を初期化し ES 細胞とほぼ同程度の多能性を再獲得した細胞である。この iPS 細胞は ES 細胞の持つ倫理的な問題を解決するものであり、この細胞を用いた研究は広く各国で行われ多方面に渡って研究成果が報告されている。

## 2. 研究の目的

脊髄損傷モデルに対して iPS 細胞が治療に有効であったと報告され注目が高まっている。本研究は、椎間板再生医療

に iPS 細胞を応用することを目指すものである。椎間板再生医療へ向けた基礎研究として、iPS 細胞の椎間板細胞への分化能の評価、および iPS 細胞による椎間板細胞刺激効果の評価が必要と考える。本研究の目的は iPS 細胞の椎間板細胞への分化手法を確立し、その分化能について評価することである。

## 3. 研究の方法

### iPS細胞から椎間板髄核、線維輪細胞を分化誘導する。

マウス iPS 細胞から椎間板細胞を分化誘導する手法は未だ確立されていない。従って、iPS 細胞と椎間板髄核細胞、線維輪細胞を共培養することで分化誘導を図る。この際、iPS 細胞から直接椎間板細胞の分化を行う実験を計画した。さらに、分化効率を高めるために iPS 細胞から胚葉体形成を促し、胚葉体から間葉系幹細胞を誘導、最終的にこの間葉系幹細胞と椎間板髄核細胞、線維輪細胞を共培養することで分化誘導を図る 2 群の実験系を計画した。

この 2 群で分化誘導される細胞を代謝の側面から Type 1, 2 collagen, aggrecan, versican の発現量について誘導前後で western blotting 法、RT-PCR 法にて評価する。次に椎間板髄核細胞には数種類の特異的なマーカーが報告されており、CD24 (glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor protein)、glypican 3 (gpc3)、keratin (k19) を椎間板髄核細胞のマーカー、Pax1 を線維輪細胞のマーカーとして採用し、これらを免疫染色にて評価することで椎間板髄核細胞、線維輪細胞の分化誘導について、評価検討を行う。

## 4. 研究成果

(1) マウス iPS 細胞をフィーダー細胞上

で安定して培養し、継代することに成功した。さらにこの安定供給される iPS 細胞を直接、椎間板髄核細胞、線維輪細胞を共培養を行っても、iPS 細胞の脱分化が誘導されるのみで形態的にも生化学的にも椎間板細胞への分化誘導は困難であった。

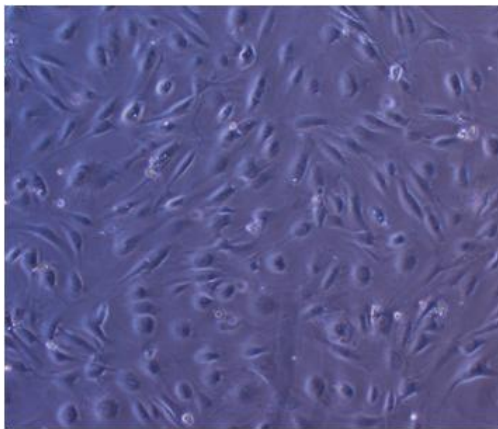


図1 フィーダー細胞

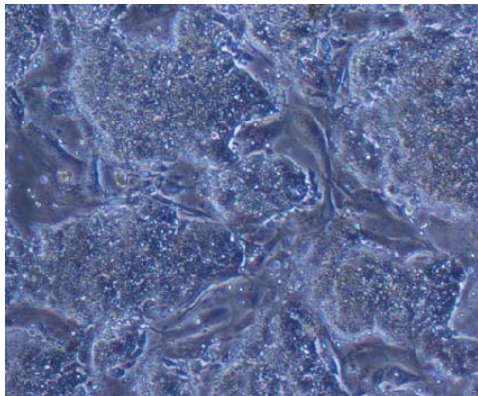


図2 マウス iPS 細胞

(2) iPS 細胞から SFEB(Serum-free Floating culture of Embryoid Body-like aggregates) 法にて胚様体を作成した。すなわち、iPS 細胞を浮遊培養することでや

がて散乱した iPS 細胞が集簇し胚細胞に似た胚葉体を形成した。この行程には約 7 日間が必要であった。

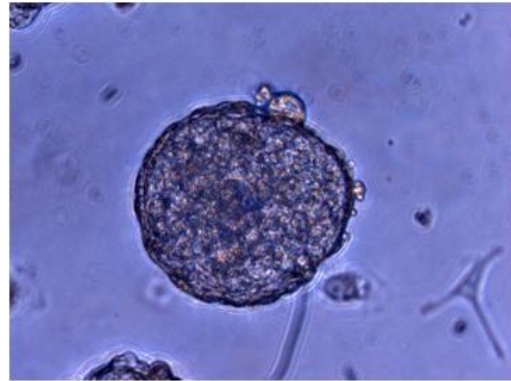


図2 胚葉体

この作成された胚葉体は間葉系細胞への分化誘導に優れていることが知られており、レチノイン酸を負荷し接着培養を行うことで約 3 週間後に間葉系幹細胞への分化が形態的に観察された。

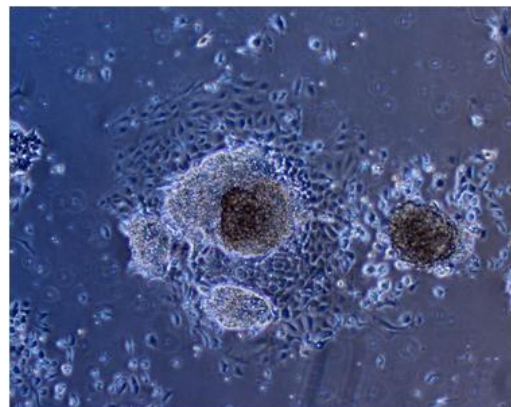


図3 間葉系幹細胞

この間葉系幹細胞の評価として、まずは骨分化誘導能の評価を行った。骨分化誘導能は骨分化誘導培地で約 3 週間培養すると間葉系幹細胞は形態が変化しアリザリン染色にて Ca 沈着を確認した。

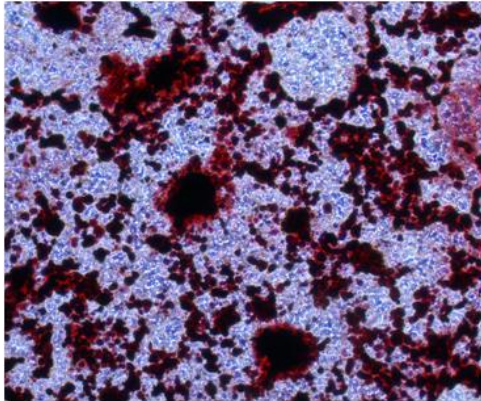


図4 アリザリン染色

本研究によって、iPS 細胞から胚葉体形成、さらに間葉系幹細胞が安定的に分化誘導可能であることが明らかとなった。また、この iPS 細胞誘導間葉系幹細胞には、骨分化誘導能が確認された。今後、この間葉系幹細胞とマウス椎間板髄核細胞、線維輪細胞を共培養することで世界で初めて iPS 細胞から椎間板細胞の分化誘導に成功することが予想される。

## 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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

角谷 賢一郎 (KAKUTANI KENICHIRO)

神戸大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：10533739