

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月25日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22659370

研究課題名（和文）人工多能性幹（iPS）細胞の間葉系幹細胞を経由した骨芽細胞への分化誘導法の確立

研究課題名（英文）Establishment of differentiation method from induced pluripotent stem (iPS) cells to osteoblasts via mesenchymal stem cells

研究代表者 宮本洋二 (MIYAMOTO YOUJI)

徳島大学・大学院ヘルスケアサイエンス研究部・教授

研究者番号：20200214

研究成果の概要（和文）：

本研究では、iPS 細胞を、間葉系幹細胞に分化させ、次いで骨芽細胞に分化させることによって効率のよい骨芽細胞への分化誘導法の確立を目的とした。

TGF- β 、レチノイン酸添加によって、間葉系幹細胞のマーカーの発現増加が観察された。次に、この間葉系幹細胞に骨誘導培地を添加することによって、骨芽細胞の分化マーカーの発現が上昇し、骨芽細胞への分化が促進されることが明らかとなった。また、ハイドロキシアパタイトなどのバイオセラミック上で培養すると、骨芽細胞の分化マーカーの発現が増強した。よって、iPS 細胞を、間葉系幹細胞を経由させて、効率的に骨芽細胞に分化させることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：

The aim of this study is to establish a method to differentiate iPS cells into mesenchymal stem cells, followed by to differentiate mesenchymal stem cells into osteoblasts, in order to efficiently differentiate from iPS cells into osteoblasts.

The expressions of the markers of mesenchymal stem cells, were enhanced by addition of TGF- β and retinoic acid. Then, we examined the differentiation of the mesenchymal stem cells into osteoblasts by addition of bone induced medium. The expressions of the differentiation markers of osteoblasts were enhanced. In addition, it was revealed that the expression of these differentiation markers of osteoblasts was also increased when the mesenchymal stem cells were cultured on bioceramics, such as hydroxyapatite. Therefore, it was demonstrated that the iPS cells can differentiate into osteoblasts via the mesenchymal stem cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	0	1,600,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	390,000	3,290,000

研究分野： 医歯薬学

科研費の分科・細目： 歯学・外科系歯学

キーワード： iPS 細胞、骨、再生医療、間葉系幹細胞、ハイドロキシアパタイト

1. 研究開始当初の背景

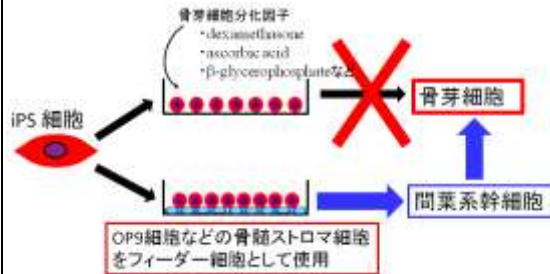
口腔外科領域では、外傷や腫瘍の治療の結果として顎骨が欠損することが多く、その再建方法が大きな課題となっている。従来、骨移植による再建がゴールドスタンダードとして行われてきたが、骨移植にも採取できる骨の量や形、移植後の感染や吸収などの問題がある。そして、最も大きな欠点は、健全部に二次的な侵襲を加えて、健全組織を採取することである。そこで、ハイドロキシアパタイトなどの人工骨が使用されてきたが、ハイドロキシアパタイトは生体内で吸収されず永久に残存し、後に感染の原因となることもある。そこで、自己組織を増殖させて、組織を再生させる再生医療が注目されるようになった。

再生医療では、細胞とシグナル（誘導因子）およびスキファールド（細胞の足場）が重要である。われわれも、骨髄細胞を細胞ソースとして、新規に開発した連通気孔を有する炭酸アパタイト多孔体（*Arch BioCeramics Res*, 5, 75-78, 2005）をスキファールドとすることによって実験動物の皮下で骨を再生できることを明らかにしてきた。しかし、体性幹細胞を細胞ソースとする場合には、細胞採取に伴う侵襲や採取できる幹細胞数に制限があることが課題となっていた。この問題を解決する一つの方法として、分化した細胞にレトロウイルスを用いて多能性幹細胞特異的転写因子（Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Myc）を導入し、多能性を獲得した iPS(induced Pluripotent Stem)細胞が注目を集めている（Takahasi K & Yamanaka S: *J Clin Invest* 115, 102-109, 2005）。iPS 細胞は、精子や卵子を含めた全ての細胞に分化することができる。しかし、iPS 細胞に骨芽細胞分化因子（dexamethasone、ascorbic acid、 β -glycerophosphate など）を添加しても、全ての iPS 細胞が骨芽細胞に分化することはなく、その分化誘導効率も低い（Tashiro K et al.: *Stem Cells* 27, 1802-1811, 2009）。すなわち、iPS 細胞の効率のよい骨芽細胞への分化プロトコールは未だ開発されていない。本研究では、iPS 細胞を、一旦、間葉系幹細胞に分化させ、次いで骨芽細胞に分化させることによって効率のよい骨芽細胞への分化誘導法の確立することを目的とした。

2. 研究の目的

iPS(induced Pluripotent Stem)細胞はあらゆる細胞に分化可能な万能細胞であるが、効率のよい骨芽細胞への分化プロトコールは未

だ開発されていない。本研究では、iPS 細胞を各種のバイオセラミックス上で培養することによって、一旦、間葉系幹細胞に分化させた後に、骨芽細胞に分化させることによって効率のよい骨芽細胞への分化誘導法の確立の可能性を探ることが目的である。



3. 研究の方法

(1) iPS細胞の入手、培養・維持

iPS細胞は、ヒトの皮膚の綿維芽細胞に Oct3/4、Sox2、Klf4 の 3 遺伝子をレトロウイルスベクターによって導入したヒト人工多能性幹細胞株（RBRC-HPS0002）を RIKEN CellBank から購入し実験に使用した。iPS細胞は、マウス胎仔線維芽細胞に SV-40 をトランスフェクトして不死化した MEF-1 上々 ES 細胞培養液（DMEM supplemented with 15% FBS、NEAA、L-glutamine、1% P/S、55 μ M β -mercaptoethanol、and 1000 U/mL of LIF.）で培養維持した。

(2) バイオセラミックスの作製と物性試験

カーボネイトアパタイトの作製は、水酸化カルシウムの粉末をステンレス製のモールドに入れて、2M Pa で加圧し、直径 10 mm、厚さ 2 mm のディスク状の水酸化カルシウムを作製し、この水酸化カルシウムディスクを炭酸ガス中に室温で 3 日間静置して炭酸化して、炭酸カルシウム硬化体を作製した。さらに、この炭酸カルシウム硬化体を 60°C のリン酸水素 2 ナトリウム溶液中に 14 日間、浸漬してリン酸化し、カーボネイトアパタイト硬化体を作製した。ハイドロキシアパタイトは、ハイドロキシアパタイト粉末を上記のモールドで加圧成形し、1280°C で焼結して作製した。

細胞分化に及ぼす影響を厳密に規定するために、バイオセラミックスの組成・物性を粉末 X 線回折解析、フーリエ変換赤外分光光度計分析、ダイアメトラル引張強度試験を行って解析した。

(3) iPS細胞からヒト間葉系幹細胞の分化誘導とその評価方法

iPS細胞からヒト間葉系幹細胞の誘導は

確立されていないため、各種の骨髄ストロマ細胞（OP9など）をフィーダー細胞として利用する方法と細胞成長因子を利用する2つの方法を検討したが、細胞成長因子などの添加によってES細胞の開葉系幹細胞への分化の報告があるので、まず、この方法をiPS細胞に適用した。すなわち、TGF-βまたはレチノイン酸の存在環境下にiPS細胞を培養して間葉系幹細胞への分化を評価した。間葉系幹細胞のマーカーとしては、CD34、STRO-1をELISA法にて細胞表面の発現を検討した。

(4) ヒト間葉系幹細胞の骨芽細胞への分化誘導とその評価方法

得られた間葉系幹細胞を骨分化誘導培地 (DMEM/ 10%FBS, 100 nM dexamethasone, 50 μM ascorbic acid 2-phosphate, 10 mM β-glycerol phosphate) にて21日間培養し、アリザリンレッド染色を行って石灰化能を、RT-PCR法により骨芽細胞分化マーカー遺伝子 (I型コラーゲン、アルカリフォスファターゼ、オステオカルシンなど) の発現を測定し、骨芽細胞への分化能を評価した。また、得られた間葉系幹細胞をバイオセラミックス上で骨分化誘導培地にて培養し、同じく骨芽細胞分化マーカーの発現をRT-PCR法にて検討した。

4. 研究成果

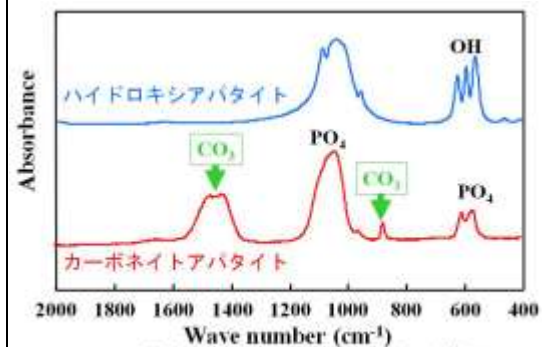
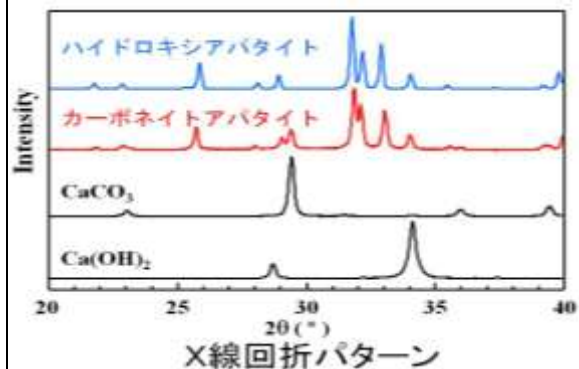
(1) 液性因子によるiPS細胞からヒト間葉系幹細胞の分化誘導

各種の骨髄ストロマ細胞 (OP9、FS-1、HS-22など) をフィーダー細胞として利用する方法と細胞成長因子を利用する2つの方法を検討したが、細胞成長因子などの添加によってES細胞を開葉系幹細胞へ分化させられるとの報告があるので、まず、この方法をiPS細胞に適用した。すなわち、TGF-β またはレチノイン酸の存在環境下にiPS細胞を培養して間葉系幹細胞への分化をCD34、STRO-1をマーカーとして評価した。iPS細胞は、TGF-βとレチノイン酸添加によって、CD34とSTRO-1の発現が増強された。種々の濃度のTGF-βとレチノイン酸の組み合わせを検討した結果、TGF-β (20ng/ml)、レチノイン酸 (0.5mM) 添加によって、CD34とSTRO-1の発現が最大に達することを明らかにした。よって、以後の研究では、この組み合わせを至適濃度として用いた。

(2) 作製したバイオセラミックスの分析

作製したカーボネイトアパタイトとハ

イドロキシアパタイトがiPS細胞および間葉系幹細胞の分化に及ぼす影響を分析する前に、これらバイオセラミックスの組成および結晶性の同定を行った。粉末X線回折解析では、作製した両バイオセラミックスともにアパタイトのピークが確認された。ピークのシャープさと重なりから、ハイドロキシアパタイトは高結晶性、カーボネイトアパタイトは低結晶性アパタイトであることが明らかとなった。カーボネイトアパタイトは、FT-IR解析において吸収ピークが1450、1410、875カイザーに観察されたため、B型カーボネイトアパタイトであることが明らかとなった。炭酸イオンの含有量は15.5 wt%、ダイアメトラル引張



フーリエ変換赤外分光光度計分析 (FT-IR)

強度は5.55 MPaであった。

(3) バイオセラミックスによるiPS細胞のヒト間葉系幹細胞への分化誘導

iPS細胞を2種類のバイオセラミックス上で7日間培養し、CD34、STRO-1をマーカーとして評価した。両バイオセラミックスはCD34とSTRO-1の発現を増強させた。なお、2種類のバイオセラミックスの間には明らかな差は認められなかった。

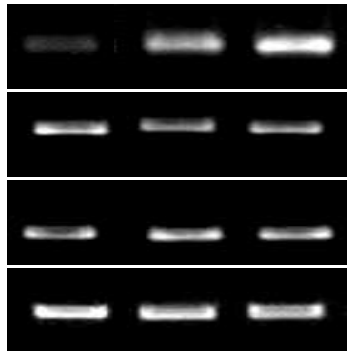
(4) 骨誘導因子によるヒト間葉系幹細胞の骨芽細胞への分化誘導

得られた間葉系幹細胞を骨誘導培地 (100 nM dexamethasone, 50 μM ascorbic acid 2-phosphate, 10 mM β-glycerol phosphate) にて21日間培養し、アリザリ

ンレッド染色を行った。骨誘導培地で培養した細胞は、アリザリンレッド染色陽性を示したのに対して、コントロールではアリザリンレッドは検出されなかった。これはiPS細胞を間葉系幹細胞に分化させた後、骨誘導培地によって骨芽細胞分化を誘導し、石灰化が生じたことを示している。



RT-PCR法にて、I型コラーゲン(Coll I)、アルカリフォスファターゼ(ALP)、オステオカルシン(OCN)のmRNAの発現を21日間検討した。その結果、3種類のマーカー遺伝子の発現は継時的に増強した。さらに、得られた間葉系幹細胞をバイオセラミックス上で骨分化誘導培地にて培養し、同じく骨芽細胞分化マーカーの発現をRT-PCR法にて検討したところ、骨分化誘導培地単独よりも、さらに強いOCN発現が確認された(下図)。



以上の結果から、iPS細胞を、間葉系幹細胞を経由させて、骨芽細胞に分化させることが明らかになった。

(現在の研究と今後の課題)

個々のiPS細胞がどの程度、骨芽細胞に分化したかを定量的に検討する必要がある。そこで、フローサイトメトリーによる分析と細胞純化を行っている。また、現在、本実験によって得られたデータを使用して、論文作成中である。

また、本実験によってバイオセラミックスが骨芽細胞への分化を誘導することが明らかになったので、さらに分化効率を高めるために、顆粒状やディスク状のバイオセラミックスを用いるのではなく、より骨

組織に近い状態の多孔質のバイオセラミックスをscaffoldとして使用することが有効であると考えている。今後、このような骨の微小環境を模したリン酸カルシウム系のバイオセラミックスを利用した研究を計画している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0件)

〔学会発表〕(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:

<http://www.dent.tokushima-u.ac.jp.geka2/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮本 洋二 (MIYAMOTO YOUJI)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

研究者番号: 20200214

(2) 研究分担者

・永井 宏和 (NAGAI HIROKAZU)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・准教授

研究者番号: 50282190

・玉谷 哲也 (TAMATANI TETSUYA)

徳島大学・病院・講師

研究者番号: 30274236

・内田 大亮 (UCHIDA DAISUKE)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教

研究者番号: 20335798