

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：16101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893157

研究課題名(和文) FGF18と骨微小環境模倣性スキャフォールドを用いたiPS細胞による骨再生医療

研究課題名(英文) Bone regeneration by combination with human iPS cells and FGF18 in bone microenvironment-imitated Scaffold

研究代表者

小林 真左子 (KOBAYASHI, Masako)

徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・助教

研究者番号：90706954

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：多分化能を持つiPS細胞と成長因子の一つである線維芽細胞増殖因子およびスキャフォールド(骨再生の場)に注目し、骨再生医療への応用の可能性について検討した。ヒトiPS細胞をわれわれがスキャフォールドとして注目している炭酸アパタイト(カーボネイトアパタイト)顆粒および炭酸カルシウム顆粒、 β -TCP顆粒上で骨を誘導するかどうか細胞培養およびヌードマウスへの移植を行い検討したところ、炭酸アパタイト顆粒の有用性が示された。

以上より、炭酸アパタイトおよびヒトiPSC細胞を用いた骨再生医療の応用の可能性の新知見が示された。

研究成果の概要(英文)：We focused on human induced Pluripotent Stem (iPS) cells, Fibroblast growth factors, and carbonate apatite as a scaffold in order to realize ideal bone tissue formation for bone regenerative medicine. Implantation of iPS cells with either carbonate apatite granules, calcium carbonate granules, or β -TCP granules to nude mice showed that bone like-structure surrounding the granules could be observed in carbonate apatite group and calcium carbonate group.

研究分野：口腔外科

キーワード：iPS細胞 骨再生 FGF スキャフォールド

1. 研究開始当初の背景

iPS(induced Pluripotent Stem)細胞はあらゆる細胞に分化可能な細胞であり、様々な組織、臓器再生医療への応用が期待されている。現在、高齢者の骨粗鬆症による易骨折性、それに伴う Activities of Daily Living (ADL) の低下は問題となっており、骨折、骨欠損に対する、骨組織再生分野においても、その発展が期待されている。ティッシュエンジニアリングの手法を用いた組織再生は、主に、細胞と、シグナル(誘導因子)、スキャフォールド(細胞の足場)の3つの因子が密接に関わっている。本研究では、細胞因子として、ドナーの細胞採取に伴う侵襲またドナー組織のフレキシビリティに関して将来的に有利だと期待される iPS 細胞を応用し、骨組織再生を目指すことを考えた。

iPS 細胞を用いた骨芽細胞への分化誘導効果を検討した報告は散見される。しかし、分化させた iPS 細胞を生体に移植しても石灰化組織を形成するが、個体本来の骨組織を再現できるまでには至っていない。そこで、本研究では、多分化能持つ iPS 細胞と、骨再生過程において骨芽細胞分化も、破骨細胞分化にも関与する線維芽細胞増殖因子(FGF)に注目した。

さらに、最終的に、iPS細胞を用いた骨再生医療の開発を行う上で重要なのが、スキャフォールドである。共同研究者である、徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部口腔外科学分野、宮本洋二教授、九州大学大学院歯学研究院生体材料学分野、石川邦夫教授らが開発したカーボネイトアパタイトに注目した。その組成は、ハイドロキシアパタイトではなく、生体骨のアパタイトである8%の炭酸基を含むカーボネイトアパタイトで破骨細胞によって吸収されるとともに骨に置換する性質がある新しい骨置換バイオマテリアルである。

以上の様に、本研究では、細胞として、iPS細胞を、成長因子としてFGFをスキャフォールドとしてカーボネイトアパタイトなどの骨置換材を応用し、理想的な骨再生の実現の可能性について検討した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、多能性を有するヒト iPS 細胞、iPS 細胞の未分化能の維持に重要である反面、骨芽細胞分化にも関与する FGF、およびカーボネイトアパタイトなどの新規スキャフォールドを効率的に利用して、生体を模倣した骨形成微小環境を再現し、新生骨を誘導することおよびこれら様々な因子を用いた骨再生医療の可能性を模索することである。

3. 研究の方法

(1) rhFGF2 および 18 が iPS 細胞未分化維持、細胞増殖へ及ぼす影響

ヒト iPS 細胞(hiPSC)は理化学研究所より 253G1 細胞を購入した。MEF 細胞をフィーダー細胞として培養し、さらにマトリゲルコートディッシュ上でフィーダーフリー培養したのち、各種実験に使用した。

hiPSC 細胞を 6well plate に播種し、rhFGF2 および rhFGF18 をそれぞれ 5ng/ml、50ng/ml 添加した群を作り、添加してから 2 日後および 4 日後の細胞数を計測した。

また、それぞれの群で、ALP 染色、免疫染色 (E-cadherin, Oct3/4, Nanog) を行った。

(2)骨置換材が iPS 細胞の骨芽細胞分化に与える影響

骨置換材は、炭酸カルシウム、カーボネイトアパタイト、 β -TCP を使用した。なお、カーボネイトアパタイトの合成は、水酸化カルシウム ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) を出発物質として炭酸化し、リン酸水溶液中で一定時間放置して、リン酸化を行い、カーボネイトアパタイトを調整した。カーボネイトアパタイト生成の確認は、粉末 X 線回折およびフーリエ変換赤外分光光度計にて行った。

iPS 細胞はフィーダーフリー培養の後、胚様体を作成し、間葉系幹細胞誘導培地で間葉系幹細胞に分化させた(以下 iPS-MSC と呼ぶ)。iPS-MSC から骨芽細胞、脂肪細胞、軟骨細胞に分化することを確認した。

24well plate 上で炭酸カルシウム、 β -TCP ならびにカーボネイトアパタイトの顆粒を底面に配置し、iPS-MSC を播種し、骨芽細胞分化誘導培地で培養を行った。骨芽細胞誘導培地に変更してから 2 週間後、ALP assay を行った。

(3)骨置換材による骨組織再生への影響の検討 (in vivo)

動物は日本白色ウサギ(♂、2.5-2.99kg)を使用した。大腿骨遠位端に径 5mm×8mm の円柱状の欠損を作成し、欠損に炭酸カルシウムあるいはカーボネイトアパタイトを充填し、4 週間および 8 週後に屠殺し評価した。マイクロ CT による検討および研磨標本を作成し、トルイジンブルー染色を行い、骨置換材の吸収の程度および骨置換材周囲の骨量ならびに形態組織学的評価を行った。

(4) iPS 細胞および骨置換材のヌードマウス背部皮下移植

iPS-MSC を 1 週間骨芽細胞誘導培地上で培養し、カーボネイトアパタイト顆粒、炭酸アパタイト顆粒、 β -TCP 顆粒とともに nude mouse の背部皮下へ移植し、移植後、4 週間

および8週後に試料を含めた周囲組織を一塊として摘出した。非脱灰研磨標本を作成し、トルイジンブルー染色を行い、組織学的評価を行った。

4. 研究成果

(1) rhFGF2 および 18 が iPS 細胞未分化維持、細胞増殖へ及ぼす影響

iPSの未分化維持の過程においてrhFGF2およびrhFGF18が細胞増殖に与える影響を検討した。rhFGF2およびrhFGF18をそれぞれ5ng/mlおよび50ng/mlの濃度で2、4日間培養し、細胞増殖について検討を行ったところ、濃度に関わらず、rhFGF2は2倍程度細胞数が増加した。一方、rhFGF18では細胞の形態は変化しないものの、2日目と4日目で比較し、細胞数は増加しなかった(図1)。またrhFGF2およびrhFGF18それぞれの群において、ALP染色ならびに未分化マーカーであるE-Cadherin、Oct3/4、Nanogの免疫染色を行ったところ、いずれの群においても差異はなく、未分化は維持されていると考えられた。したがって、維持培養における細胞増殖において、rhFGF2の方が有利に作用することがわかった。

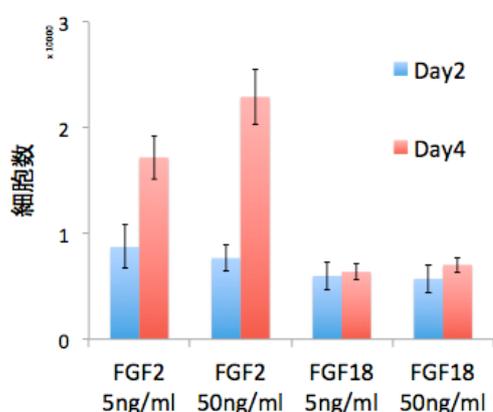


図1; FGF添加によるhiPS細胞の細胞増殖

(2) 骨置換材が iPS 細胞の骨芽細胞分化に与える影響

続いて、骨置換材が iPS 細胞の骨芽細胞分化にどう影響するかについて検討した。hiPSCを直接、骨分化誘導培地で骨芽細胞へ分化誘導させたところ、3週間後に石灰化ノジュールは観察されたが、分化効率はよくなかった。そこで、まず、胚様体を作成したのち、間葉系幹細胞に分化させ(iPS-MSC)、実験に使用した。われわれがスキヤフォールドとして注目しているカーボネイトアパタイト顆粒および炭酸カルシウム顆粒、β-TCP顆粒上でiPS-MSCを骨芽細胞誘導培地で培養したところ、プラスチックディスクに比べて

ると細胞増殖は抑制されたものの、2週後、ALP活性は上昇した。特に、カーボネイトアパタイト顆粒では、他の群に比べて、ALP活性が優位に上昇した。

(3) 骨置換材による骨組織再生への影響の検討

ウサギ大腿骨遠位端骨欠損モデルを用い、炭酸カルシウムならびにカーボネイトアパタイトが骨再生に及ぼす影響について検討した。マイクロCTによる顆粒の吸収の検討では、炭酸カルシウムは4週後ですでに半分以上吸収され、8週後にはほぼ吸収されていたが、カーボネイトアパタイト顆粒は8週後でも残存していた。非脱灰研磨組織標本を作製し、トルイジンブルー染色したところ、カーボネイトアパタイト顆粒は、顆粒の周囲に薄紫色で染色された新生骨が誘導されているのが観察された。トルイジンブルー染色の切片で新生骨量を定量したところ(図2)、炭酸カルシウムでは、4週の時点である程度の新生骨の形成は見られるも、顆粒の吸収に伴い、8週後には新生骨はほとんど認めなかった。一方、カーボネイトアパタイトでは8週の時点で良好な骨形成が観察された。

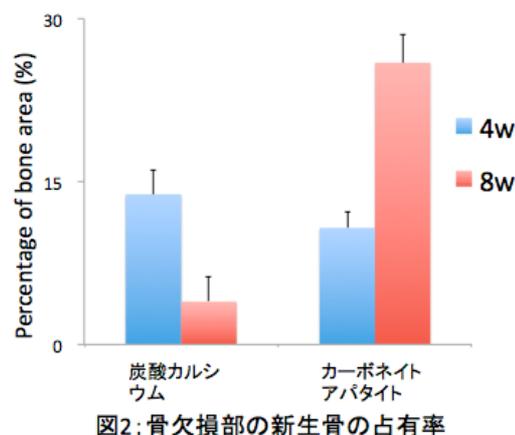


図2; 骨欠損部の新生骨の占有率

(4) iPS細胞および骨置換材のヌードマウス背部皮下移植

iPS-MSC、骨置換材(炭酸アパタイト顆粒、カーボネイトアパタイト顆粒、β-TCP顆粒)をnude mouseの背部皮下へ移植し、移植後、4週および8週後の変化を観察した。8週後、いずれの群においてもテラトーマの形成はなかった。また、炭酸アパタイト顆粒、カーボネイトアパタイト顆粒、β-TCP顆粒のいずれの群においても、骨置換材は残存しており、その周囲に線維組織および血管形成が観察された。いずれの群においても骨梁構造ならびに骨髄組織を伴う完全な骨組織再生には至らなかった。しかしながら、炭酸アパタイト顆粒およびカーボネイトアパタイト顆粒周囲には、骨組織様の石灰化物が観察され

た(図3)。一方、 β -TCP 顆粒の群では骨様組織が観察されなかった。

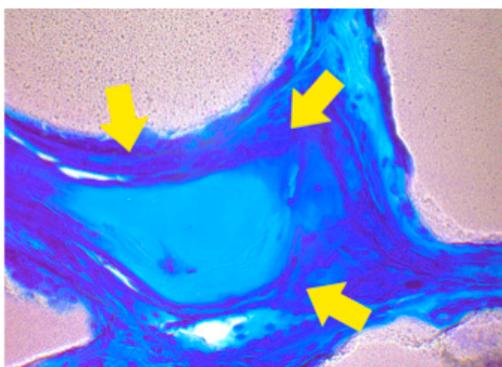


図3:iPS細胞移植4週後におけるカーボネイトアパタイト周囲の骨様組織

(5)結果のまとめ

以上のように、細胞因子として、iPS細胞を、成長因子としてFGFを、スキャフォールドとしてカーボネイトアパタイトなどの骨置換材を応用した。骨梁構造、骨髄組織を伴う様な理想的な骨組織再生には至らなかったが、in vivo実験ではiPS細胞および新規材料であるカーボネイトアパタイトを用いた骨再生の可能性が示唆された。今後は、完全な骨組織再生を目指し、さらなる研究を進めていく予定である。

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 1件)

- ① Nagai H, Kobayashi-Fujioka M, Fujisawa K, Ohe G, Takamaru N, Hara K, Uchida D, Tamatani T, Ishikawa K, Miyamoto Y. Effects of low crystalline carbonate apatite on proliferation and osteoblastic differentiation of human bone marrow cells. J Mater Sci Mater Med. 査読有, Vol. 26, No.2, 2015, pp.99.
DOI: 10.1007/s10856-015-5431-5.

[学会発表] (計 2件)

- ① Masako Fujioka-Kobayashi, Hirokazu Nagai, Kanae Hara, Kenji Fujisawa, Youji Miyamoto. Nobel bone regeneration system using carbonate apatite-coated carbonate calcium in vivo. AAOMS 96th Annual Meeting, September 11, 2014, Honolulu (U.S.A).
- ② 小林真左子、永井宏和、原 香苗、鎌田久美子、工藤隆治、藤澤健司、宮本洋二、炭酸アパタイト被覆炭酸カルシウムを用

いた 新規骨置換材料による骨再生の試み. 第 59 回日本口腔外科学会学術大会、2014 年 10 月 18 日、幕張メッセ 国際会議場・国際展示場 (千葉県千葉市)

[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

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

小林 真左子 (KOBAYASHI, Masako)

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：90706954

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし