

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11306

研究課題名(和文) 成熟細胞との共培養によるiPS細胞の分化・成熟促進に関する研究

研究課題名(英文) Acceleration of differentiation and maturation of iPS cell via coculture with mature cells

研究代表者

西條 英人 (Saijo, Hideto)

東京大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：80372390

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：口腔顎顔面領域では骨欠損をきたす機会が多く、iPS細胞などを用いた再生医療による骨再生が実現することが望ましい。iPS細胞を最も効率よく成熟細胞へ分化させる方法は、生体内の成熟細胞などから分泌されると考えられる成熟促進因子を受け取ることであったと考えた。マウスiPS細胞や、ヒト成熟中胚葉系細胞、ヒトiPS細胞などを活用した、生体内環境を模倣したペレット共培養や生体内移植などの検討を行い、iPS細胞由来再生骨を安全で効率よく作製する方法を開発した。

研究成果の概要(英文)：There are so many risks of bone defect in oral and maxillofacial region that realization of bone regenerative therapy such as utilization of iPS cells is being waited. We considered that the efficient protocol to differentiate iPS cells into mature cells is to place iPS cells in vivo and have iPS cells to receive maturation promoting factors from surrounding mature cells. In this research, we examined murine iPS cells, human mature mesodermal cells, and human iPS cells by coculture with pellets mimicking in vivo environment, and in vivo transplantation of cells originate from iPS cells. We developed a safe and efficient protocol to differentiate iPS cells into regenerative bone tissue.

研究分野：外科系歯科

キーワード：iPS細胞 成熟細胞 共培養

1. 研究開始当初の背景

口腔顎顔面領域では様々な要因で骨などの中胚葉系組織を失うことが多い。骨の喪失に対して、現行法では自家骨などによる再建術が主流であるが、より患者負担の軽い再建術の開発が望ましい。

iPS 細胞は理論的に無尽蔵に拡大培養ができるほか、HLA ホモ iPS 細胞ストックプロジェクトが進捗しており、将来的には、日本人の多くが容易に免疫反応の可能性が低い iPS 細胞を入手できる可能性が高まっている。

iPS 細胞の *in vitro* での中胚葉系細胞への分化誘導方法は様々報告されていたものの、中胚葉系の組織の分化誘導法はほとんどなかった。このため iPS 細胞の分化・成熟誘導を最も効率よく実現する方法は、iPS 細胞の生体内への移植であると考えた。

そこで、iPS 細胞を生体内に移植すると、生体内の成熟細胞などが何らかの成熟因子を分泌すると想定し、この成熟因子を明らかにすることで、iPS 細胞の中胚葉系細胞への分化・成熟を促進できると考えた。

2. 研究の目的

iPS 細胞と成熟細胞を生体内の疑似環境に置くことで、成熟細胞から分泌される成熟促進因子を明らかにし、効率よく iPS 細胞から中胚葉系細胞を作製すること。

3. 研究の方法

iPS 細胞を中胚葉系の成熟細胞とハイドロゲルに混和し、ペレット状にして共培養することで、生体内の疑似環境を作製した。

iPS 細胞を中胚葉系の成熟細胞の共培養ペレットを遺伝子学・組織学などの様々な手法をもって解析した。

マウス iPS 細胞のほかに、ヒト iPS 細胞を用いて中胚葉系細胞へ分化誘導・組織化して再生骨が観察されるか動物実験で検討した。

4. 研究成果

マウス iPS 細胞と、ヒト成熟中胚葉系細胞を様々な混合比で 1%アテロコラーゲンに混和しゲル化することでペレットを作製した。このペレットを中胚葉系分化誘導培地で培養し遺伝子学的・組織学的解析を行った。

遺伝子学的解析では、コラーゲン遺伝子のプ

ライマーを、ヒトおよびマウス特異的な配列となるように Primer-Blast を用いて設計した。

それぞれのプライマーは、PCR にてヒトおよびマウスのコラーゲンを特異的に増幅することを確認した。

このプライマーを用いてリアルタイム PCR を実施したところ、70%のマウス iPS 細胞と 30%のヒト成熟中胚葉系細胞を混合したペレットにおいてマウスコラーゲンの発現が最も亢進したことが示唆された。

組織学的解析では、マウス iPS 細胞の追跡が可能となるように、actin プロモーターに GFP タンパクを導入した細胞を採用した。

結果、GFP 陽性のマウス細胞および、GFP 陰性のヒト細胞ともにペレット内で生存したことが観察された。

さらに、ペレット内の細胞以外の領域の染色具合から、中胚葉系組織への成熟が促進されている可能性が示唆された。

新たな知見によりヒト iPS 細胞を *in vitro* で中胚葉系細胞へ分化させ、組織化させることができることが明らかになった。

そこで、当初予定していたミニプタ iPS 細胞を用いた移植実験からヒト iPS 細胞を用いた中胚葉系細胞への分化・組織化を利用した再生骨作製検討へ変更することにした。

ヒト iPS 細胞を中胚葉系細胞へ分化・組織化するプロトコールに順じて中胚葉系組織へ分化させた。これをヌードマウス背部皮下へ移植し、8週間後回収し解析した。

サンプルを解析したところ、X 線所見にて不透過像が観察され、組織学的解析により骨組織が観察されたことから、移植した中胚葉系組織から骨組織が形成されたことが示唆された。

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3件)

(1) Taku SAITO, Fumiko YANO, Daisuke MORI, Manabu KAWATA, Kazuto HOSHI, Tsuyoshi TAKATO, Hideki MASAKI, Makoto OTSU, Koji ETO, Hiromitsu NAKAUCHI, Ung-il CHUNG, Sakae TANAKA.

Hyaline cartilage formation and tumorigenesis of implanted tissues derived from human induced pluripotent stem cells.

Biomedical Research

Volume 36 (2015) Issue 3, 179-186.

DOI: 10.2220/biomedres.36.179

- (2) Masaki Misawa, Naotaka Nitta, Yoshio Shirasaki, Kazuhiko Hayashi, Ryo Kosaka, Koji Hyodo, Tomokazu Numano, Kazuhiro Homma, Shota Kuribayashi, Yuko Fujihara, Kazuto Hoshi.

Characteristic X-ray absorptiometry applied to the assessment of tissue-engineered cartilage development.

J Xray Sci Technol.

2015;23(4):489-502.

DOI: 10.3233/XST-150504.

- (3) Kazuto Hoshi.

Bone Cell Biology Assessed by Microscopic Approach.
Regenerative medicine of cartilage.

Clinical Calcium

01 Jan 2015, 25(10):1499-1504

DOI: CliCa151014991504

[学会発表](計5件)

- (1) 星 和人

足場素材を用いた骨・軟骨再生医療の新展開
第10回しまなみ骨・関節フォーラム
愛媛大学医学部創立40周年記念講堂
(愛媛県東温市)
2015-12-10

- (2) 西條 英人

歯科医療最前線～顎顔面領域における再生医療の現状と将来展望～
新潟県歯科医師会空穂の会学術講演
新潟県歯科医師会館
(新潟県新潟市)
2015-10-24

- (3) 星 和人

骨・軟骨再生医療現状と展望
第7回日本創傷外科学会・学術集会
東京ドームホテル
(東京都文京区)
2015-07-24

- (4) 西條 英人

インプラント医療について考慮すべき再生医療の最新情報について(教育講演).
第5回日本先進インプラント医療学会信州支部会
伊那中央病院
(長野県伊那市)
2015-04-26

- (5) 西條 英人

インプラント医療について考慮すべき再生医療の最新情報について
第5回日本先進インプラント医療学会信州支部会
伊那中央病院
(長野県伊那市)
2015-04-25

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

- (1) 研究代表者

西條 英人(SAIJO, Hideto)
東京大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号: 80372390

- (2) 研究分担者

星 和人(HOSHI, Kazuto)
東京大学・医学部附属病院・教授
研究者番号: 30344451

杉山 円 (SUGIYAMA, Madoka)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：90451814

(3)連携研究者
なし

(4)研究協力者
なし