

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05452

研究課題名(和文) iPS細胞に対してバイオリクターを用いた新しい硝子様軟骨再生法の開発

研究課題名(英文) Development of a new method for regenerating hyaline cartilage using a bioreactor for iPS cells

研究代表者

久保 俊一 (Kubo, Toshikazu)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・特任教授

研究者番号：20178031

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、低酸素環境下でiPSCsから軟骨組織が作製可能かを検討し、低酸素刺激が作製した組織の細胞代謝や純度に与える影響を評価することとした。ヒトiPSCsを定常酸素環境または低酸素環境下で軟骨分化させた。real time RT-PCR、FACSおよび組織学的検討を行い軟骨分化を評価した。低酸素環境下では、未分化中胚葉マーカーの発現が抑制され、軟骨分化マーカーの発現が促進された。SOX9陽性細胞は低酸素環境下での培養で増加した。Safranin O陽性組織と2型コラーゲン陽性組織の割合は低酸素環境下で増加した。本方法により、迅速かつ簡便に高純度の軟骨様組織を作製できる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、幹細胞から培養した軟骨組織移植を含めた再生医療が新たな治療法として有力視されている。特にiPSCは、細胞ソースとして優れている。しかしiPSCを用いた再生医療にも費用、培養期間、組織純度といった問題点がある。iPSCから軟骨組織を作製する方法はすでに確立されているが純度や組織作製にかかる期間が問題となっている。今回われわれの低酸素刺激を加えることで軟骨組織をより早期に、高純度で作製できる可能性があると考えた。本研究により今後iPSCを用いた軟骨組織移植が臨床応用するに当たり、物理刺激を加えることで、早期作製、高純度、低コストでの組織作製が可能になる可能性を見いだした点で意義深いと考える。

研究成果の概要(英文)：We aimed to determine whether cartilaginous tissue can be produced from iPSCs under hypoxia and to evaluate the effects on the cellular metabolism and purity of the tissue. Human iPSCs were cultured for cartilage differentiation in monolayers under normoxia or hypoxia. We evaluated chondrocyte differentiation by real-time RT-PCR and FACS. Then, iPSCs were cultured for cartilage differentiation in 3D culture under normoxia or hypoxia. We evaluated the tissues on days 28 and 56 through histological analyses. Hypoxia suppressed the expression of immature mesodermal markers and promoted the expression of the chondrogenic markers. SOX9-positive cells were increased by culture under hypoxia. Percentages of safranin O-positive and type 2 collagen-positive tissues were increased under hypoxia. Hypoxia not only led to enhanced cartilage matrix production but also improved cell purity. By applying this method, highly pure cartilaginous-like tissues may be produced more rapidly and conveniently.

研究分野：整形外科

キーワード：軟骨 変形性関節症 再生医療 幹細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

◆OA に対する再生医療の現状と課題

変形性関節症 (osteoarthritis: OA) では広範囲の関節軟骨が変性するため従来の再生医療を適用することは困難である。一方 induced pluripotent stem cells (iPS 細胞) の開発以降, iPS 細胞を用いた難病に対する再生医療の実用化が急速に進んでいる。iPS 細胞を効率よく多量の硝子様軟骨へ分化・三次元組織化させる培養系が構築できれば, OA に対する再生医療の道も開けると確信する。われわれは, 静水圧, 温熱, 低酸素など関節内環境を模した物理刺激に関する研究成果を蓄積し, 特に, 幹細胞に対する物理刺激が硝子様軟骨への分化誘導に重要であることを明らかにした。物理刺激は OA に対する再生医療のブレークスルーとなる可能性がある。

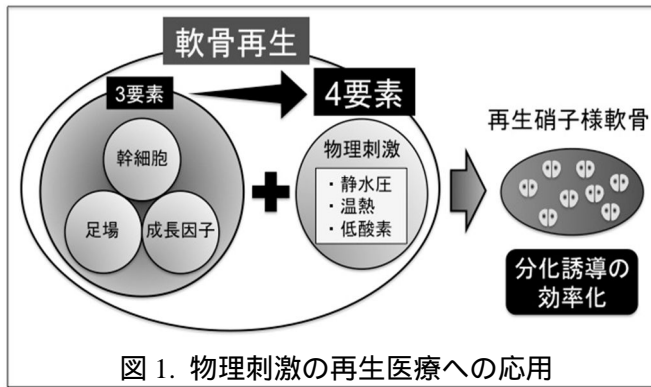


図 1. 物理刺激の再生医療への応用

2. 研究の目的

本研究の目的は, 再生医療の基礎となる 3 要素に物理刺激を加えた硝子様軟骨再生への新規分化培養・三次元組織化システムを確立することである。

3. 研究の方法

物理刺激のうち, 低酸素による分化促進効果がないかについて検討した。

1. 低酸素刺激を加えることでの組織純度評価

既存の iPS 分化プロトコル (Yamashita らのプロトコル) に低酸素刺激を加えることで軟骨分化に与える影響を realtime RT-PCR (T, FOXF1, aggrecan, CD44) で day14 に評価した。

2. 低酸素刺激による組織純度の検討

既存の iPS 分化プロトコル (Yamashita らのプロトコル) に低酸素刺激を加えることで軟骨分化に与える影響を FACS (sox9) で day10,14 に評価した。

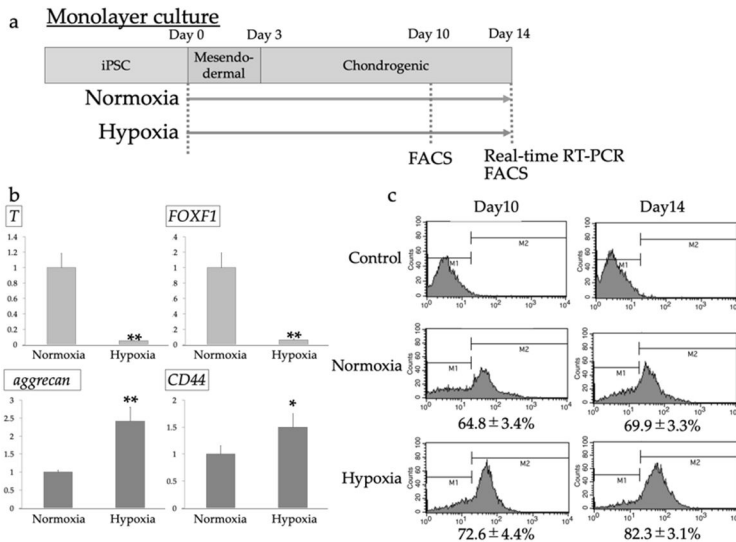
3. 低酸素刺激による分化促進効果の検討

既存の iPS 分化プロトコル (Yamashita らのプロトコル) に低酸素刺激を加えることで軟骨分化に与える影響を組織学的 (HE, SO, Type1,2 collagen) に day28 で評価した。

4. 研究成果

1. 軟骨分化における低酸素刺激が純度に与える影響

次に軟骨分化における低酸素環境の影響を real time RT-PCR で検討した。分化培養開始から定常酸素で培養した群と 5% 低酸素環境下で培養した群を軟骨分化がある程度進んだ day14 で回収し遺伝子発現について検討した。未分化マーカーである Oct4 は N 群が H 群に比較し発現が上昇していた。未分化中胚葉マーカーである T や FOXF1 の発現は N 群に比較し, H 群が著明に低下していた。軟骨基質のマーカーである aggrecan は H 群で N 群と比較し有意に発現が上昇していた。



2. 軟骨分化における低酸素刺激が基質産生に与える影響

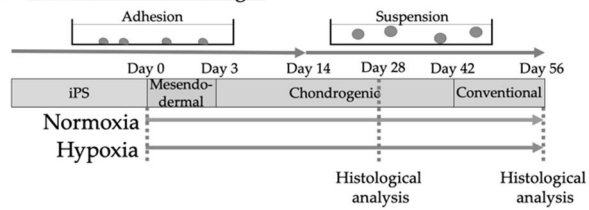
軟骨細胞の master 遺伝子である sox9 の発現を確認するため, 分化培養開始から定常酸素で培養した群と 5% 低酸素環境下で培養した群を day14 で sox9 に対する FACS を行い検討した。結果低酸素環境で培養することで sox9 陽性細胞の割合は 10% 程度上昇した。

3. 低酸素環境での軟骨組織作成

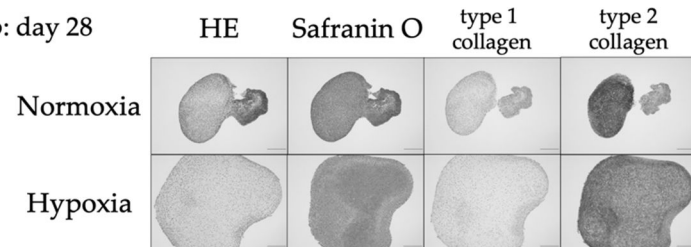
既存の軟骨分化プロトコールで hiPSC 株である Toe が軟骨組織へ分化することが可能か確認するため、Yamashita らが報告したプロトコールを用いて分化実験を行った。結果、作製した組織塊は SafraninO で強く染色され、type 2 collagen の免疫染色でも強く染色され、type1 collagen での免疫染色では中央部はあまり染色されなかった(Figure 1a)。次に低酸素環境下でも同様に軟骨組織を作製することが可能か確認するため同様の分化培養を 5%低酸素環境下で培養した(Fig. 1b)。結果、定常酸素環境と同様に低酸素環境下で培養して

も同様に safranin O で強く染色され、type 2 collagen の免疫染色でも強く染色され、type1 collagen での免疫染色では中央部は染色されない組織が作成可能であった。このことから低酸素刺激を加えることにより軟骨分化を促進できる可能性があると考えた。

a 3D culture with Matrigel



b: day 28



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Seiji Shimomura, Hiroaki Inoue, Yuji Arai, Shuji Nakagawa, Shinji Tsuchida, Shohei Ichimaru, Yuta Fujii, Osamu Mazda, Toshikazu Kubo
2. 発表標題 Effects of hypoxic conditions in differentiation of human iPSC to cartilage
3. 学会等名 2018 ORS annual meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 下村征史, 井上裕章, 新井祐志, 中川周士, 土田真嗣, 市丸昌平, 松田 修, 久保俊一
2. 発表標題 低酸素環境によるヒトiPS細胞から軟骨組織への分化促進効果の検討
3. 学会等名 第32回日本整形外科基礎学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kenta Kaihara, Shuji Nakagawa, Yuji Arai, Yuta Fujii, Hiroaki Inoue, Shinji Tsuchida, Yoichiro Kamada, Osamu Mazda, Yasuo Mikami
2. 発表標題 Effect Of Hif-1 Stabilization By Deferoxamine On Chondrocyte And Articular Cartilage
3. 学会等名 66th Annual Meeting of Orthopaedic Research Society (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	新井 祐志 (Arai Yuji) (50347449)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授 (24303)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	中川 周士 (Nakagawa Shuji) (30643382)	京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・助教 (24303)	
研究 分 担 者	井上 裕章 (Inoue Hiroaki) (60457968)	京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・助教 (24303)	