

令和元年5月29日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11675

研究課題名(和文) 自己iPS細胞由来間葉系幹細胞による顎骨壊死治療法の検討

研究課題名(英文) Examination of osteonecrosis of the jaw treatment method by autologous iPS cell origin mesenchymal stem cell

研究代表者

西澤 悟 (Nishizawa, Satoru)

東京大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：00646200

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)：細胞移植治療に用いられるMSCの多くは骨髄または脂肪組織から採取したものである。しかし特性の高いMSCは大量には採取できない。しかも、MSCは培養により急速に脱分化し細胞特性を喪失する。さらに高齢者ではMSCの増殖性が低下していることから、全年齢を対象とした治療方法にはなり得ない。そこでMSC供給源として人工多能性幹細胞(iPS細胞)に着目し、iPS細胞から細胞治療に使用するMSCを作製した。このとき血小板由来成長因子受容体をコードするPdgr遺伝子の発現量を指標として、成熟度が異なるMSCを製造した。このMSCを顎骨壊死疾患モデルマウスに投与して治療効果を評価した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の特色はiPS細胞の分化誘導技術とモデル動物作製技術を組み合わせることで、これまでの骨髄由来MSCを用いた方法では不可能だった大量かつ分化段階の異なるMSCをiPS細胞から誘導し、薬剤性顎骨壊死(ARONJ)モデル動物を用いて細胞移植治療の各種検討をおこなうことでARONJに対する細胞移植治療の有用性を実証することにある。本研究で得られた成果は、口腔外科領域のみならず、脳神経外科、整形外科や形成外科など、骨再建を担う他科においても有意義な知見となるものであり、広く医療に貢献するものと考えている。

研究成果の概要(英文)：MSCs used for cell transplantation therapy are harvested from bone marrow or adipose tissue. However, high quality MSCs can not be collected in large quantities. In addition, MSCs are rapidly dedifferentiated by culture and lose cellular properties. Furthermore, MSCs collected from elderly people have reduced proliferative potential. Therefore, treatment for all patients is not possible. We focused on induced pluripotent stem cells (iPSC) as a source of MSCs, and generated MSCs for use in cell therapy from iPSC. At this time, MSCs having different degrees of maturity were produced using the expression level of the Pdgr gene encoding the platelet-derived growth factor receptor as an index. The MSCs were administered to a jaw bone necrosis disease model mouse to evaluate the therapeutic effect.

研究分野：再生医療

キーワード：薬剤性顎骨壊死 iPS細胞 細胞治療 MSC

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 増加する薬剤関連顎骨壊死 (MRONJ)

薬剤関連顎骨壊死 (MRONJ) は骨粗鬆症、悪性腫瘍に伴う高カルシウム血症、および骨転移の治療薬ビスホスホネートや、同様な効能があるデノスマブなどの生物学的製剤などの投与で発生する顎骨壊死症状である。MRONJ はそれらの薬剤によって骨微細構造の変化及び血流障害が生じて顎骨の骨芽細胞、破骨細胞が死滅し、さらに抜歯などの外科処置によって感染が加わることで発症すると考えられている。[重篤副作用総合対策検討会 ビスホスホネート系薬剤による顎骨壊死 2009]。そのため、口腔外科領域の外科的治療後に発生、顕在化することが多く、発症後の症状は進行性かつ難治性である。MRONJ に対する予防法、対処法は確立されておらず、本邦においても MRONJ 発生例が増加しつつあることから、MRONJ に対する有効な治療法の確立は、口腔外科における重要な課題となっている。

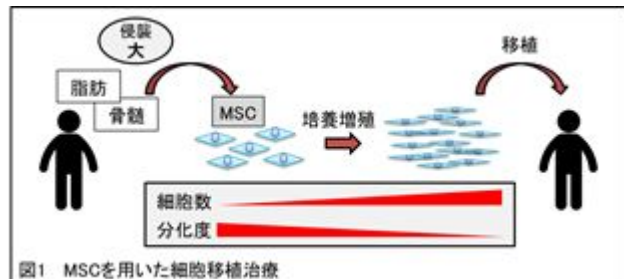
(2) 臨床導入が期待される細胞移植治療

骨髄、脂肪組織から採取した間葉系幹細胞 (MSC) を全身または局所に投与すると傷害部位に集積し新生組織形成を担う細胞の供給源となるのみならず、MSC が有するパラクリン作用により、ホスト側の細胞活性を増加させたり、炎症反応を低減させたり、病変組織を保護したりする効果があることが明らかとなってきた。[Glenn JD 2014 World J Stem Cells] この MSC が有する特性を例えば加齢による皺の修復や変形性関節症の治療などに応用した細胞移植治療 (Cell therapy) が近年注目されつつある。再生医療の分野においても足場素材とともに細胞を移植する治療法に比べて製造工程が簡便で投与時の侵襲も少ないため、臨床導入への期待は高い。

(3) 細胞移植療法の課題

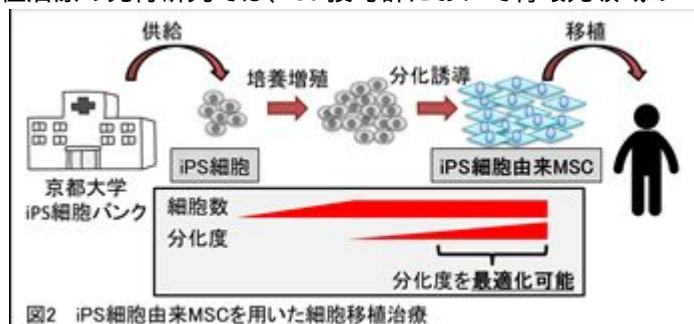
前述の通り細胞移植治療に用いられる MSC の多くは骨髄または脂肪組織から採取したものである。特性の高い MSC は、細胞ソーターを用いて厳密に分取する必要があり、元来大量には採取できない。しかも、MSC は培養により急速に脱分化し細胞特性を喪失することが知られている。

先行する臨床試験の報告では、必要となる MSC の細胞数は $1 \times 10^7 \sim 8$ オーダーであるのに対し、採取可能な細胞数 1×10^6 オーダーのため、採取後の培養は必須となっており、脱分化の問題は避けることができない。さらに高齢者では MSC の増殖性が低下していることから、全年齢を対象とした治療方法にはなり得ない。さらに MSC は骨髄液、脂肪組織から単離するため、採取する際には大きな侵襲が伴う (図 1)。この問題を全て解決可能な細胞として人工多能性幹細胞 (iPSC) が知られている。iPSC 細胞はすべての組織に分化する多能性を保ちつつ、ほぼ無限に増殖させる事ができる。現在、京都大学では iPSC 細胞のバンキング化が進んでおり、国民の大多数をカバーできる HLA ホモタイプ iPSC 細胞が供給できる可能性があるため、患者の侵襲はほぼ皆無である。したがって iPSC 細胞を大量に増殖培養し、MSC に分化誘導した iPSC 細胞由来 MSC に骨髄由来または脂肪由来 MSC と同等の細胞治療効果がみられれば、全ての患者に対応可能な有効な治療法になると思われる。また iPSC 細胞から分化段階の異なる MSC を誘導することが可能なため、細胞移植治療に最適な MSC の分化段階を同定することが出来れば、更に有望な治療方法になると考えられる (図 2)。



(4) MRONJ に対する細胞治療法の開発に向けた展望

MRONJ モデル動物を用いた MSC 細胞移植治療の先行研究では、MSC 投与群において骨壊死領域の有意な減少および血清中の炎症マーカーの有意な低減を示したことを報告している [Takashi K 2010 JBMR]、しかし投与した MSC は骨髄からの単離後に培養増殖した MSC を用いており、脱分化している可能性は否定できない。従って脱分化していない MSC を用いることで、更に優れた治療効果を発揮する可能性がある。



2. 研究の目的

薬剤関連顎骨壊死 (MRONJ) はビスホスホネートなどの投与で発生する疾患であり、治療法は未確立である。骨壊死部では骨芽細胞が減少し、骨リモデリングが破綻する。間葉系幹細胞 (MSC) の移植療法は、骨壊死部に生着した MSC が骨芽細胞の供給源となるだけでなく、ホストに残存する骨の細胞の活性を促進する因子を供給するため、有効な治療法と期待されている。しかし、MSC は純化・単離方法が確立されていない上に、培養により急速に脱分化して細胞特性を失うため、本来の治療効果が発揮されていない可能性がある。この問題を解決する方

法として、本研究では iPS 細胞由来 MSC を使い、iPS 細胞由来 MSC の細胞移植治療効果を MRONJ モデル動物で評価し、その有用性を実証する。

3. 研究の方法

(1) 分化段階の異なる iPS 細胞由来 MSC の誘導条件の検討

iPS 細胞由来 MSC を誘導する方法は複数報告されているが、その中でも Obara らが報告した方法は分化誘導時の継代回数条件を調整することで分化段階の異なる iPS 細胞由来 MSC を得られる方法である [Obara et al. Stem Cells Int. 2016]。本法で C57BL/6 マウス iPS 細胞由来 MSC を誘導し、FCM による MSC 表面マーカー解析及び real time RT-PCR による MSC マーカー遺伝子発現解析をおこなった。これらの MSC マーカーの発現量を指標として、Progenitor like から Mature like までの各分化段階の iPS 細胞由来 MSC を誘導する条件を設定した。このとき最も Progenitor like な分化段階を Stage 1、最も Mature like な分化段階を Stage 3、その間の分化段階を stage 2 と定義し、各 Stage の iPS 細胞由来 MSC を大量に分化誘導し以降の検討に使用した (図 3)。なお、この実験で用いるマウス iPS 細胞は、GFP を恒常的に発現する細胞株 (APS0006:iPS-Stm-FB/gfp-99-3 RIKEN BRC) を使い、投与後に生体内における追跡及びホスト/ドナーの識別が出来るようにした。

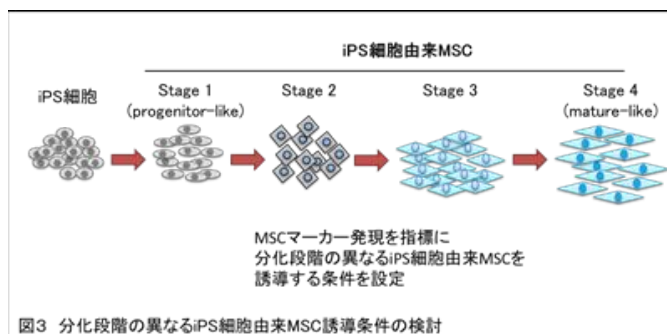


図3 分化段階の異なるiPS細胞由来MSC誘導条件の検討

(2) 顎骨壊死モデルマウスにおける iPS 細胞由来 MSC による治療効果の検証

C57BL/6 マウス(8 週齢雌、各群 n=3)にゾレドロン酸水和物 125 µg/kg およびシクロフォスファミド 150 mg/kg を週二回静脈内投与し、初回投与の 21 日後に左上顎第一大臼歯を麻酔下で抜歯し、その後も同量のゾレドロン酸および週 1 回投与に減量したシクロフォスファミドを継続して投与することで MRONJ モデルマウスを作出した[Kuroshima et al. 2018 JBMR]。抜歯直後に iPS 細胞由来 MSC (Stage 1, 2, 3) の PBS 懸濁液 (1x10⁶ cells/mL) を尾部静脈から 1mL 投与した。別個体の GFP トランスジェニックマウスから採取・培養した骨髄由来 MSC の投与群および saline 投与群をコントロールとした。移植後 6、24 時間、3、7、10、14、30 日の時点で生体イメージング(PerkinElmer IVIS Imaging System 現有)およびマイクロ CT 撮影(島津 InspeXio SMX-100CT 現有)、および血液検査をおこない、移植細胞の傷害部位への集積性および顎骨壊死の病変進行度、血清中の炎症マーカー値(IL-10, IL-6, IL-17, CRP)を評価した。30 日の撮影後に安楽死させ、口腔粘膜ごと一括切除した上顎骨の組織学的評価(H.E.染色による壊死性骨領域測定、TRAP 染色による成熟破骨細胞活性評価、GFP を指標としたホスト/ドナー細胞の識別)を行い、マイクロ CT 所見とあわせて評価し、MRONJ 細胞移植治療に適する iPS 細胞由来 MSC の分化段階を検討した。

4. 研究成果

(1) 分化段階の異なる iPS 細胞由来 MSC の誘導条件

図 4 のスケジュールで得られた iPS 細胞由来 MSC (p0 ~ p5) の mRNA 発現は継代数の増加により多能性幹細胞マーカー Nanog, Oct4 の低下が確認された。また骨髄由来 MSC で発現している Pdgfr 遺伝子は p3 から発現量が増加した。p5 以降は増殖能が低下し以降の継代培養は困難であった。また FCM を用いた表面マーカーは、陽性率の変化に一定の傾向は確認できたが、ばらつきが大きく分化度の指標とすることは困難であった。そこで Nanog の発現が消失した段階の細胞を stage1、Pdgfr が発現増加した段階の細胞を stage3、その間の細胞を Stage 2 として以降の BRONJ 治療効果の検討に用いた。

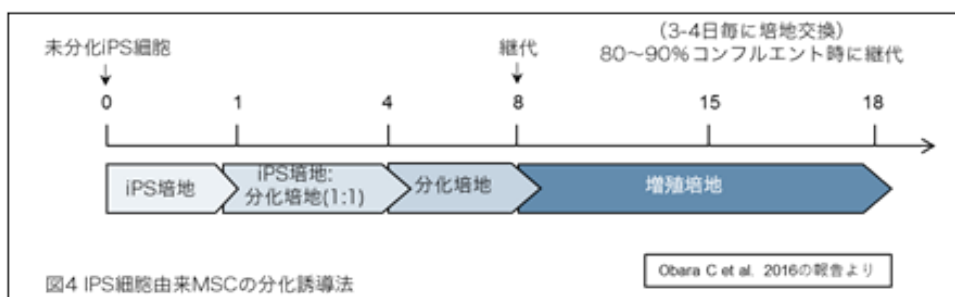
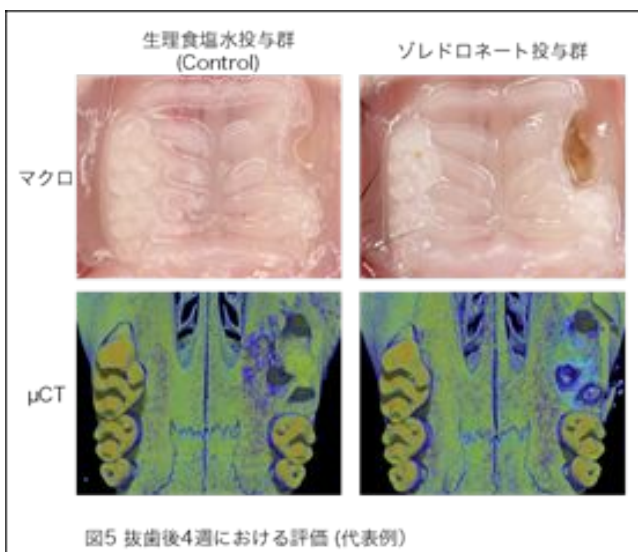


図4 iPS細胞由来MSCの分化誘導法

Obara C et al. 2016の報告より

(2) 顎骨壊死モデルマウスにおける iPS 細胞由来 MSC による治療効果の検証

BRONJ モデルマウスの作製をおこなった。抜歯後 4 週の時点で生理食塩水投与群では抜歯部位の上皮形成がみられた。また μ CT 解析においても抜歯窩における新生骨形成が確認された。組織評価においても正常な治癒過程が行われていることが確認された。ゾレドロンート投与群では上皮形成不全、抜歯窩における新生骨の形成遅延、組織評価において壊死骨を示すエンブレティラクナ領域の形成を示す BRONJ 様の病態を示すマウスがみられた (図 5)。しかし BRONJ の発症率は約 30% と低く、発症率の向上を目指し抜歯方法、術後の管理方法などの条件検討をおこなっている。また iPS 細胞由来 MSC の投与をおこない、治療効果の解析をおこなっている。



5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Uto S, Nishizawa S, Hikita A, Takato T, Hoshi K. Application of Induced pluripotent stem cells for cartilage regeneration in CLAWN miniature pig osteochondral replacement model. *Regenerative Therapy* (査読有) Aug 24;9:58-70. 2018
doi: 10.1016/j.reth.2018.06.003.

Horie N, Hikita A, Nishizawa S, Uto S, Takato T, Hoshi K. Impairment of the transition from proliferative stage to prehypertrophic stage in chondrogenic differentiation of human induced pluripotent stem cells harboring the causative mutation of achondroplasia in fibroblast growth factor receptor 3, *Regenerative Therapy* (査読有) Jan 26;6:15-20. 2017
doi.org/10.1016/j.reth.2016.11.002

Kanazawa S, Nishizawa S, Takato T, Hoshi K. Biological roles of glial fibrillary acidic protein as a biomarker in cartilage regenerative medicine. *J Cell Physiol.* (査読有) Nov;232(11):3182-3193. 2017
doi: 10.1002/jcp.25771.

〔学会発表〕(計 1 件)

堀江尚弘、西澤悟、宇都さくら、高戸毅、星和人 ゲノム編集による軟骨無形成症特異的ヒト iPS 細胞の樹立及び、病態研究 第 16 回日本再生医療学会総会 2017 年 3 月 7 日 ~ 2017 年 3 月 9 日 仙台国際センター 宮城県仙台市

6 . 研究組織

研究分担者

研究分担者氏名：星 和人
ローマ字氏名：(HOSHI, Kazuto)
所属研究機関名：東京大学
部局名：医学部附属病院
職名：教授
研究者番号 (8 桁)：30344451

研究分担者氏名：浅輪 幸世
ローマ字氏名：(ASAWA, Yukiyo)
所属研究機関名：東京大学
部局名：医学部附属病院
職名：特任助教
研究者番号 (8 桁)：10769912

については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます