

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10967

研究課題名(和文) ヒトiPS細胞由来間葉系幹細胞を用いた骨再生療法の確立

研究課題名(英文) Bone regeneration using human induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells

研究代表者

李 相亮 (Lee, Sang Yang)

昭和大学・医学部・講師

研究者番号：40533732

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)：軟骨分化誘導させたヒトiPS細胞由来間葉系幹細胞(iMSC)の移植により、軟骨内骨化を介した骨再生が可能であることを検討した。免疫不全マウスに2mmの骨欠損を作製し、iMSCを軟骨分化誘導して得られたiMSC由来軟骨ペレットを骨欠損部に移植した。移植8週後に評価を行ったところ、X線学的・組織学的骨癒合を認めた。組織学的に軟骨内骨化を介した骨再生過程を認めた。腫瘍化は認めなかった。

以上より、iMSC由来軟骨細胞移植によって、軟骨内骨化と類似した過程を経て、骨欠損部の骨再生が起きることが示された。ヒトiPS細胞を用いた軟骨内骨化を模した本骨再生療法は、骨欠損に対する新たな戦略となりうる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、軟骨分化させたiMSCの細胞移植が、難治性骨折・骨欠損において、優れた再生能を有することが明らかとなった。本研究結果は、ヒトiPS細胞を用いた骨再生医療の将来の臨床応用の際の重要な情報となりうる。ヒトiPS細胞を用いた骨再生療法に関する知見が大きく広がり、ひいてはiPS細胞を用いた安全で確実な骨再生療法の実現への一歩となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：We investigated whether implantation of chondrogenically differentiated human iPSCs-derived mesenchymal stem cells (iMSCs) could lead to bone regeneration of bone defects in mice. A 2-mm defect was created at the radius of nude mice. Chondrogenically differentiated iMSC pellets were then implanted in the defect. At week 8, 18 out of 21 (86%) radius in the treated group achieved bone healing, whereas 2 out of 11 (18%) radius in the control group achieved bone healing. At week 8, histology revealed complete bone union in the treated group. At week 4, hypertrophic chondrocytes transitioning to the newly formed bone indicated that endochondral ossification was involved.

Our results for the first time demonstrated that grafting bone defects with chondrogenically differentiated iMSCs led to successful bone regeneration through endochondral bone ossification. Our therapy could be a novel system to repair large bone defects.

研究分野：整形外科学

キーワード：骨再生 iPS細胞 間葉系幹細胞 軟骨分化 軟骨内骨化

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

骨折は整形外科医・救急医が日常診療において頻りに経験する外傷である。超高齢化社会を迎えているわが国では、骨粗鬆症患者の増加に伴い、骨折患者が今後、爆発的に増加していくことが考えられる。骨折は保存的治療(ギブス等による外固定)もしくは手術治療(内固定・創外固定)を行うことで、骨癒合が得られて治癒するが、全体の骨折の5~10%は、治療後6~9ヶ月を経過しても骨癒合が得られずに、難治性骨折に陥ると報告されている。一方、四肢長管骨骨欠損は、交通事故などの高エネルギー外傷による重症骨折のみならず、骨髄炎や骨軟部腫瘍に対して手術で骨の切除を行わざるを得なかった症例で引き起こされる。このような難治性骨折や骨欠損は、患者の著しい生活の質の低下を招く。これらに対して、自家骨移植術・骨移動術・血管柄付き骨移植術などの手術治療が行われるが、合併症や技術的な問題から治癒に至らず複数回の手術を要する場合や、治癒に至らず最終的に切断術に至る場合もある。治療期間は長期間にわたることが多く、患者に精神的肉体的苦痛をもたらす、後遺症に苦しむことも少なくない。従って、難治性骨折や骨欠損に対する新たな治療法の確立は、社会的・医学的急務である。

近年、細胞を用いた再生医療が注目されており、幹細胞を用いた骨再生研究が盛んに行われている。しかし、細胞採取の侵襲性や加齢による細胞の活性の低下、適応が限定されるなどクリアすべき課題は未だ数多く存在している。従って、より効果的で、副作用等のリスクの少ない細胞を用いた骨再生治療の研究・開発が模索されるべきである。2006年に京都大学の山中伸弥教授らのグループが報告した人工多能生幹細胞(induced pluripotent stem cells; iPS細胞)は、全ての細胞に分化できる「多能性」と無限に増殖する「自己増殖能」を持つことを特長とし、分化した体細胞をreprogrammingすることによりヒト胚性幹細胞(embryonic stem cells; ES細胞)とほぼ同等の性質を再獲得した多能性幹細胞である。このiPS細胞は、患者自身の皮膚細胞などから作成可能なためES細胞と違い倫理的問題は生じず、拒絶反応もなく、採取の侵襲も少ないことから、再生医療の細胞資源として有望視されている。難治性骨折や骨欠損の治療に難渋し、後遺症に苦しむ患者に対して、iPS細胞を用いた再生医療が応用されることが、今後、大いに期待される。しかし、骨再生領域におけるiPS細胞研究は未だ萌芽期であり、臨床応用に進展可能な段階に到達するには、分化誘導技術の更なる発展や移植するiPS細胞の安全性・有効性の確立が必要である。我々は、実験動物にてiPS細胞の移植を行い、iPS細胞の骨再生能および安全性を評価する前臨床的な基礎的動物実験を計画した。

### 2. 研究の目的

近年、あらかじめ軟骨分化誘導させた間葉系幹細胞(mesenchymal stem cells; MSCs)を動物の骨折部や骨欠損部に移植することで、軟骨内骨化を介して骨再生させる手法が注目されている。骨折治癒過程においては、膜性骨化と軟骨内骨化が並行して進行し、骨癒合に至るが、この軟骨内骨化の過程が骨折治癒においては非常に重要と考えられている。軟骨内骨化が十分進行しなければ、偽関節や骨癒合遅延に至る。本手法はこの軟骨内骨化の過程を応用しており、未分化なMSCsや骨分化させたMSCsを骨折部や骨欠損部に移植するよりも優れた骨再生能を示すこともこれまでに報告されている。しかし、iPS細胞を用いた本手法の報告はこれまでにない。本研究の目的は、免疫不全マウスの橈骨骨欠損モデルを用いて、あらかじめ軟骨分化させたヒトiPS細胞由来MSCsを骨欠損部へ移植し、骨再生の有効性、そして安全性を検証し、ヒトiPS細胞を用いた効果的で安全な骨再生療法の確立を試みることである。

### 3. 研究の方法

#### (1) *in vitro* 実験

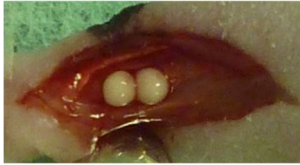
##### ヒト iPS 細胞由来 MSCs の確立

我々がこれまでにヒトES細胞やマウスiPS細胞にて確立したdirect-plating法を用いて、ヒトiPS細胞からMSCsへの*in vitro*での分化誘導を行った。このdirect-plating法とは、iPS細胞やES細胞をMSCsに分化誘導する際に従来用いられていた胚葉体形成という過程を用いない手法である。具体的には、フィーダー・フリー下で未分化な状態に維持されたiPS細胞において、培地をMSC専用培地に交換し、1週間培養を行う。その後、TrypLE Selectにて細胞を剥離しsingle cellsにし、non-coatingのculture dishへ播種し、MSC専用培地で培養を続け、subconfluentとなるたびに継代を繰り返していくことで均質なfibroblasticな細胞すなわちMSCsを得ることができる方法で、再現性の高い手法である。Riken BRCより供与を受けた201B7株と454E2株の2種類のiPS細胞を使用した。得られたiPS細胞由来MSCは以降、iMSCsと呼称する。得られた201B7由来・454E2由来iMSCsを凍結保存し、多数のストックを作製した。これらiMSCsが実際にMSCsと同様の性質を有しているかを検証するため、flow cytometryによる細胞表面抗原解析を行った。さらに、骨・軟骨・脂肪分化能を有しているかを検証するため、iMSCsを骨・軟骨・脂肪分化誘導培地にてそれぞれ3週間培養し、組織学的評価を行った。

##### 軟骨分化誘導した iMSC ペレットの免疫化学染色

iMSCsを軟骨分化誘導培地で3週間の3次元培養を行い、軟骨ペレットを作製した。得られた軟骨ペレットをホルマリンで固定し、パラフィンに包埋し、組織切片を作製した。得られた切片でヒトtype collagen II (Col II)、type X collagen (Col X)、Vascular endothelial growth factors (VEGF)、stromal cell-derived factor 1 (SDF-1)蛋白に対する免疫染色を行った。

(2) *in vivo* 実験 (動物実験)



(1) で得られた iMSC 軟骨ペレット移植による *in vivo* での骨再生能を検証するため、免疫不全マウス (BALB/cAJcl-nu/nu; 10 週齢・雄) の橈骨骨欠損モデルを用いた動物実験を行った。本モデルは、橈骨骨幹部中央の 2 mm の骨を取り除くことで、何らかの治療介入なしには骨切除部の骨再生が起きず、骨欠損に至るモデルである。83 匹の免疫不全マウスを以下の 3 群に分けた:

201B7 由来 iMSC 軟骨ペレット移植群 (201B7 移植群) 454E2 由来 iMSC 軟骨ペレット移植群 (454E2 移植群) 生食のみを移植したコントロール群。移植群では iMSC 軟骨ペレットを骨欠損部に 2 個移植した (上図)。移植 2 週後に免疫不全マウスの骨欠損部の RNA を採取し、RT-PCR 評価を行い、ヒト osteocalcin (OC)・VEGF・SDF-1・type 1 collagen (Col I)・Col II・Col X および glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) の発現の有無を評価した。移植 2 週後の骨欠損部の血管新生評価のため、isolectin B4 蛋白に対する免疫化学染色を行い、毛細血管密度の定量評価を行った、さらに移植 2・4・8 週後に骨欠損部を含む橈骨を採取し、組織学的評価 (safranin-O/fast green 染色) を行った。移植 8 週後にマイクロ CT による X 線学的骨癒合評価を行った。

4. 研究成果

(1) *in vitro* 実験

iMSCs の表面抗原解析を flow cytometry にて行ったところ、MSC 関連マーカーである CD29、CD44、CD105、CD166 は強陽性であり、血球系マーカーである CD31、CD34、CD45、CD133 は陰性であった (右表)。一方、iPS 細胞に特有の pluripotent marker である TRA-1-60 および TRA-1-81 はともに陰性であったことから、iPS 細胞の特性である多能性はこの時点で失われていることが示唆された。

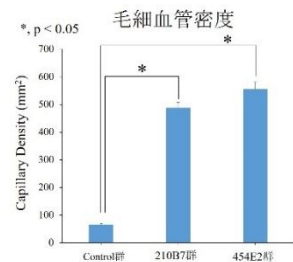
Cell-surface antigen markers	Positive expression rate (%)	
	454E2 derived cells	201B7 derived cells
CD29	99.0 ± 0.9	99.1 ± 0.8
CD44	99.2 ± 0.8	99.4 ± 0.6
CD105	45.8 ± 9.0	94.3 ± 4.3
CD166	85.0 ± 12.7	95.4 ± 1.8
CD31	6.0 ± 0.4	3.1 ± 0.5
CD34	5.7 ± 0.6	2.6 ± 1.0
CD45	6.0 ± 0.6	2.7 ± 0.9
CD133	5.8 ± 0.7	2.8 ± 1.0
TRA-1-81	6.5 ± 2.3	3.9 ± 1.8
TRA-1-60	6.3 ± 0.8	3.3 ± 1.1

次いで、iMSCs の骨・軟骨・脂肪分化誘導をそれぞれ 3 週間行い、組織学的検討を行った。その結果、Alizarin red S 染色・Safranin-O 染色・Oil-red O 染色の全てにおいて強染色性を示した。以上より、iMSCs が多分化能を持つ MSC 細胞に非常に似た特性を持つ細胞であることが証明された。これらの結果は両株由来 iMSC で同様であった。

iMSCs を軟骨分化誘導培地にて 3 週間三次元培養したところ、光沢のある軟骨様のペレットが得られた。免疫化学染色を行ったところ、ヒト Col II・Col X・VEGF・SDF-1 蛋白の染色性を認めた。両株由来 iMSC ペレットで同様の結果を示した。

(2) *in vivo* 実験 (動物実験)

移植後 2 週に採取した RNA に対する RT-PCR 解析を行ったところ、ヒト・Col II・Col X・VEGF・SDF-1 の遺伝子発現を両移植群で認めしたが、ヒト OC・Col I の遺伝子発現は認めなかった。一方、コントロール群ではヒト由来の遺伝子はすべて陰性であった。移植 2 週後の骨欠損部周囲の新生血管を isolectin B4 蛋白に対する免疫化学染色にて定量評価したところ、対照群と比し両移植群で有意に高い毛細血管密度を示した (右図)。



移植 8 週後のマイクロ CT による X 線学的骨癒合率は、201B7 移植群では 100%、454E2 移植群では 70% であり、18% の対照群に対し共に有意差 ( $p < 0.05$ ) を認めた。組織学的には、移植 2~4 週で pellet 辺縁での軟骨細胞の肥大化、血管新生および pellet 周囲の線維性骨の出現を両移植群で認め、軟骨内骨化を介した骨形成・骨再生が進行したことが示唆された。移植 8 週後では層板骨への remodeling が認められた。コントロール群では移植 8 週後で線維性組織が存在し骨再生されていない。なお、全ての移植群において、癌化は認めなかった。

以上より、ヒト iMSCs を軟骨分化誘導させた軟骨 pellet の移植により、軟骨内骨化と類似した過程を経て、骨欠損部の骨再生が起きることが証明された。ヒト iPS を用いた軟骨内骨化を模した本骨再生療法は、骨欠損に対する新たな有望な骨再生戦略となりうる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 6件）

1. 発表者名	Arakura M, Lee SY, Fukui T, Oe K, Takahara S, Kuroiwa Y, Kumabe Y, Oda T, Kuroda R, Niikura T.
2. 発表標題	Endochondral bone tissue engineering using chondrogenically differentiated human induced pluripotent stem cells.
3. 学会等名	The 5th Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society (TERMIS) World Congress (国際学会)
4. 発表年	2018年

1. 発表者名	Arakura M, Lee SY, Fukui T, Oe K, Takahara S, Kuroiwa Y, Kumabe Y, Oda T, Kuroda R, Niikura T.
2. 発表標題	Endochondral bone regeneration using chondrogenically differentiated human induced pluripotent stem cells.
3. 学会等名	The 16th Biennial Conference of the International Fracture Repair Society (国際学会)
4. 発表年	2018年

1. 発表者名	Arakura M, Lee SY, Fukui T, Oe K, Takahara S, Kuroiwa Y, Kumabe Y, Kuroda R, Niikura T.
2. 発表標題	Bone regeneration through endochondral ossification achieved with chondrogenically differentiated human induced pluripotent stem cells.
3. 学会等名	65th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society (国際学会)
4. 発表年	2019年

1. 発表者名	新倉路生, 李相亮, 福井友章, 大江啓介, 高原俊介, 黒岩祐, 隈部洋平, 黒田良祐, 新倉隆宏
2. 発表標題	ヒトiPS細胞による軟骨内骨化を介した骨再生療法
3. 学会等名	第33回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年	2018年

1. 発表者名 李相亮, 新倉路生, 福井友章, 黒田良祐, 新倉隆宏
2. 発表標題 ヒトiPS細胞による軟骨内骨化を介した骨再生の試み
3. 学会等名 第18回日本再生医療学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Michio Arakura, Sang Yang Lee, Tomoaki Fukui, Shunsuke Takahara, Yu Kuroiwa, Yohei Kumabe, Ryosuke Kuroda, Takahiro Niikura
2. 発表標題 Endochondral Bone Regeneration Using Chondrogenically Differentiated Human Induced Pluripotent Stem Cells
3. 学会等名 64th Annual meeting of Orthopaedic Research Society (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Lee SY, Arakura M, Fukui T, Kuroda R, Niikura T.
2. 発表標題 Endochondral Bone regeneration Using Chondrogenically Differentiated Human Induced Pluripotent Stem Cells
3. 学会等名 4th AO Trauma Asia Pacific Scientific Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Lee SY, Arakura M, Fukui T, Kuroda R, Niikura T.
2. 発表標題 Endochondral bone regeneration using chondrogenically differentiated human induced pluripotent stem cells.
3. 学会等名 20th European Federation of National Associations of Orthopaedics and Traumatology Annual Congress (国際学会)
4. 発表年 2019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	新倉 隆宏  (Niikura Takahiro)  (40448171)	神戸大学・医学研究科・准教授   (14501)	
研究 分担者	福井 友章  (Fukui Tomoaki)  (50437688)	神戸大学・医学部附属病院・特定助教   (14501)	