

令和 4 年 5 月 28 日現在

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K23015

研究課題名（和文）iPS細胞由来軟骨細胞塊の血管新生因子制御を基盤とした骨再生技術の開発

研究課題名（英文）Fabrication of iPS cell derived chondrocyte sphere

研究代表者

河阪 幸宏（Yukihiro, Kosaka）

東北大学・大学病院・医員

研究者番号：40880448

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：トランスポゾンを用いたマウスiPS細胞へのVEGF-A遺伝子導入実験を行なったところ、VEGF-A遺伝子の導入効率が非常に低く、遺伝子導入iPS細胞の作製が困難であった。そこで、細胞の分化を促進すると報告のある(V Wei, et al., 2019, Adv Mater)、異なる3種類のキラリティーを有する3次元細胞外マトリックスゲル内でHUVECを培養し、血管新生作用を有するスフェロイドの作製を行うこととした。3次元細胞外マトリックスゲル内でHUVECは血管マーカー遺伝子の発現を上昇し、ラット頭蓋骨欠損部位への移植を行うと、欠損部において血管新生を促進したことが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

外傷や腫瘍の摘出、歯周病によって顎骨に大規模な欠損が生じた場合、インプラントを用いた補綴歯科治療が困難となる。しかしながら、既存の骨造成術の効果は未だ十分ではなく、幹細胞を用いた新規骨再生技術の開発に期待が寄せられている。

本研究の意義は、顎骨再生にiPS細胞由来軟骨細胞の軟骨内骨化を応用する点にあり、このような試みはこれまでに国内外の報告はなく新規性および創造性が高い。骨組織の再生過程において軟骨内骨化と膜性骨化という骨化様式の違いに焦点をあてることで、発生様式の違いおよび欠損の大きさの違いによる骨再生機序の解明にも繋がるため骨再生医療の先端的研究になり得る。

研究成果の概要（英文）：When a VEGF-A gene transfer experiment was performed on mouse iPS cells using a transposon, the efficiency of VEGF-A gene transfection was extremely low, and it was difficult to produce VEGF-A gene controlled iPS cells. Therefore, HUVEC was cultured in a three-dimensional extracellular matrix gel with three different types of chirality, which has been reported to promote cell differentiation (V Wei, et al., 2019, Adv Mater). One of chirality gel could promote angiogenic differentiation of HUVEC in vitro. It was revealed that HUVEC increased the expression of the vascular marker gene in the three-dimensional extracellular matrix gel, and that transplantation to the rat skull defect site promoted angiogenesis in the defect site.

研究分野：補綴歯科

キーワード：iPS細胞 血管 軟骨

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

外傷や腫瘍の摘出、歯周病によって顎骨に大規模な欠損が生じた場合、インプラントを用いた補綴歯科治療が困難となる。しかしながら、既存の骨造成術の効果は未だ十分ではなく、幹細胞を用いた新規骨再生技術の開発に期待が寄せられている。現在、間葉系幹細胞(MSC)は骨再生医療に応用されているが、多くの課題も残されている。採取できる組織量には限界があり、MSCの増殖能にも限界があるため、大規模な骨欠損に必要な細胞数を得るのは困難である。また、MSCを用いた骨再生医療の多くは、移植細胞の増殖を促し、構造を保持するためスキャフォールドを利用している。しかし、スキャフォールド自体の免疫原性や加水分解時の炎症惹起性等、細胞と生体材料の相互作用の厳密な制御が困難である。近年、これらの課題を克服する幹細胞源として人工多能性幹細胞(iPS細胞)が注目されている。iPS細胞は患者由来の細胞から作製可能で、また無限ともいえる増殖能や多分化能をもち、自己組織化により三次元構造体を作製することが可能である。申請者らはこれまでマウス歯肉線維芽細胞由来iPS細胞から試験管内で軟骨細胞を含む三次元構造体の作製に成功している。この三次元構造体は自身が産生した細胞外マトリックスを豊富に含むため、追加で移植組織の安定のためのスキャフォールドを併用する必要がない。近年、軟骨内骨化(内軟骨性骨化)を利用した骨再生に注目が集まっている。軟骨内骨化を経た骨再生のプロセスでは、骨損傷(欠損)部に形成(移植)された軟骨細胞は成熟・肥大化し、周囲組織から血管やMSCを誘導することで軟骨基質は骨組織に置換される。一般に、大きな骨損傷では軟骨内骨化を経て骨修復に至る。軟骨細胞は低酸素環境に対する順応性が高いことも知られているため、広範の骨欠損では軟骨内骨化を介した骨再生アプローチが有効である可能性が示唆される。一方、軟骨基質の石灰化の促進及び低酸素・低栄養による移植細胞のネクロシスの抑制という2点において血管新生が重要である。肥大軟骨細胞は血管内皮細胞増殖因子(VEGF)を分泌し侵入してくる血管内皮細胞の血管新生の誘導および破骨細胞(破軟骨細胞)遊走を誘導し、軟骨基質の骨組織置換が促進される(Kai H et al., *J Clin Invest.* 2016)。VEGFは血管新生において最も重要な役割を担う細胞増殖因子である(Hoeben A et al., *Pharmacol Rev.* 2014)。VEGFファミリーこれまで7つのファミリーが報告されているが、骨組織の再生ではVEGF-Aの関与がよく知られている。以上を背景に、申請者は「VEGF制御性iPS細胞由来軟骨細胞移植による軟骨内骨化を介した大規模骨再生技術の開発」を着想した。しかし、VEGFは軟骨細胞の増殖や分化を抑制するため(Nagao M et al., *Sci Rep.* 2017)(Prasadam I et al., *Lab Invest.* 2017)、単純に過剰発現させるのではなく、任意に発現時期を制御する必要がある。そこで、申請者の研究室で確立しているPiggyBacトランスポゾン遺伝子導入およびテトラサイクリン(Tet)制御性-On/Off発現誘導システムを用いて、VEGF-A遺伝子制御性iPS細胞株を樹立肥大軟骨細胞まで分化誘導し、VEGF-A遺伝子を移植後に発現させる方策を考案した。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、軟骨内骨化を介した、VEGF-A遺伝子制御性iPS細胞由来軟骨細胞の軟骨内骨化を介した骨再生技術を開発することである。本研究の学術的特徴は、顎骨再生にiPS細胞由来軟骨細胞の軟骨内骨化を応用する点にあり、このような試みはこれまでに国内外の報告はなく新規性および創造性が高い。骨組織の再生過程において軟骨内骨化と膜性骨化という骨化様式

の違いに焦点をあてることで、発生様式の違いおよび欠損の大きさの違いによる骨再生機序の解明にも繋がるため骨再生医療の先端的研究になり得る。また、移植細胞による VEGF 分泌増強により、移植細胞の生着率を向上し、修復・リモデリングを促進することで、骨再生効果を飛躍的に向上させる可能性を秘めている。

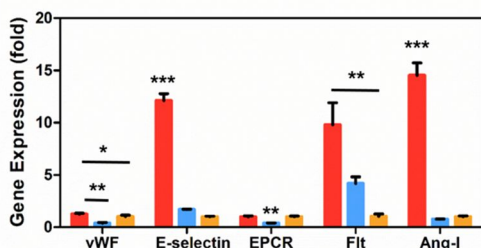
### 3. 研究の方法

- ・トランスポゾンを用いた VEGF-A 遺伝子制御マウス iPS 細胞の作製
- ・VEGF-A 遺伝子制御 iPS 細胞の VEGF 遺伝子・タンパク質の発現を評価
- ・3次元細胞外マトリックスゲル内でヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)を培養し、血管新生に関わる遺伝子発現を確認した。
- ・3次元細胞外マトリックスゲル内でヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)を培養し、ラット頭蓋骨欠損モデルに移植し、骨再生を評価した。

### 4. 研究成果

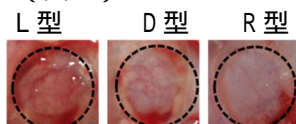
- ・トランスポゾンを用いたマウス iPS 細胞への VEGF-A 遺伝子導入実験を行なったところ、VEGF-A 遺伝子の導入効率が非常に低く、遺伝子導入 iPS 細胞の作製が困難であった。その後、遺伝子導入を確認した株を継代・増殖させ、VEGF-A の発現を遺伝子・タンパク質レベルで確認したところ、どちらにおいても VEGF-A 遺伝子の発現を確認することができなかった。
- ・そこで、細胞の分化を促進すると報告のある(V Wei, *et al.*, 2019. Adv Mater)、異なる3種類のキラリティーを有する3次元細胞外マトリックスゲル内で HUVEC を培養し、血管新生作用を有するスフェロイドの作製を行うこととした。
- ・3種類(L,D,R型)のキラリティーを有する3次元細胞外マトリックス内で HUVEC またはマウス iPS 細胞を培養し、血管マーカ遺伝子の発現を確認したところ、L型において、HUVEC、マウス iPS 細胞ともに血管マーカ遺伝子の発現が上昇したことが明らかとなった。(図1)
- ・その後、3種類のキラリティーを有する3次元細胞外マトリックス内で培養した HUVEC をラット頭蓋骨欠損モデルに移植したところ、L型の3D細胞外マトリックスで培養した HUVEC を移植したグループにおいて、血管新生と骨形成の促進を認めた。(図2)今後、L型の3D細胞外マトリックス内でマウス iPS 細胞を培養した複合体をラット頭蓋骨欠損部に移植して、骨再生、血管新生について評価していく予定である。

(図1)



赤：L型 青：D型 黄：R型を示す。  
L型において血管マーカ遺伝子の優位な発現上昇を認めた。

(図2)



点線内は、ラット頭蓋骨の欠損作製部位を示す。  
L型において血管新生促進、骨形成促進作用を認めた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------