

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 20 日現在

機関番号：14501
研究種目：若手研究（B）
研究期間：2011～2012
課題番号：23791639
研究課題名（和文） iPS 細胞を用いた椎間板再生医療と生体内 iPS 細胞バンク作成への挑戦
研究課題名（英文） Regeneration of intervertebral disc using iPS cell and application of in vivo iPS cell bank.
研究代表者： 角谷 賢一郎（KAKUTANI KENICHIRO） 神戸大学・医学部附属病院・助教 研究者番号：10533739

研究成果の概要（和文）：

①iPS 細胞から椎間板髄核細胞、線維輪細胞を分化誘導することを試み、共培養法を採用した。結果、iPS 細胞から胚様体を経由し、間葉系幹細胞(MSC)を分化誘導に成功した。この MSC には骨誘導能が確認された。今後、この iPS 細胞誘導間葉系幹細胞から椎間板細胞の分化誘導を図る予定である。②動的圧負荷が椎間板組織に与える影響について、動的圧負荷培養装置を作成し椎間板変性を誘導し、変性に関与するメカノレセプターについて、検討した。結果、1.3MPa, 1Hz, 6 日間の動的圧負荷にて椎間板変性が誘導された。この変性変化は髄核細胞に見られ線維輪には見られなかった。また、この力学的環境変化はメカノレセプターである Integrin $\alpha 5 \beta 1$ よって、細胞内へ伝導され生化学的変化を誘導しているものと考えられた。

研究成果の概要（英文）：

We employed the co-culture method with iPS cells and IVD cells to differentiate iPS cells. At first, we directly co-cultured iPS cells with IVD cells. We induced embryoid body from iPS cells, in addition embryoid body cells were treated with retinoic acid for seven days. After treatment, mesenchymal stem like cells were differentiated. Furthermore these differentiated cells were co-cultured with osteoblast inducer reagent for three weeks. We have confirmed the potential of mesenchymal stem like cells to differentiate the osteoblast cell by Alizarin red staining. The authors, for the first time, demonstrated that short-term dynamic compression induced the moderate IVD degeneration. The results of current study were considered to reflect early IVD degeneration and revealed precise mechanotransduction pathways involved with intervertebral disc degeneration.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：iPS 細胞、椎間板再生、動的圧負荷、メカノレセプター

1. 研究開始当初の背景

現在椎間板再生を目指した治療は、成長因子治療、遺伝子治療、幹細胞治療に分けられ各国で広く研究されている。現

在の椎間板に対する治療は切除を中心とした破壊的なものであり、結果的に椎間板の本来の機能を失うものである。さらに腰痛を増悪していることも少なく

ない。従って椎間板の本来の機能を温存、再生するような治療が望まれている。

現在椎間板再生を目指した治療は、成長因子治療、遺伝子治療、幹細胞治療に分けられ各国で広く研究がなされている。そこで我々は、椎間板再生を目指し椎間板変性の機序解明と治療に向けた研究を重ねている。

椎間板変性は、力学的環境変化、外傷、喫煙、遺伝的背景など様々な要因により影響を受ける。この機械的、生物学的なストレスが時間的、空間的に複雑に関与し変性が進行していくが、最終的には細胞外基質代謝の変化により椎間板の水分は失われ機械的負荷に対して脆弱となる。我々は、機械的刺激が椎間板の退行性変化の上流に位置すると考え変性機序の解明には、動的圧負荷が椎間板に与える影響について詳細に理解する必要がある。

一方、山中らが報告した iPS 細胞は人工多能性幹細胞であり、分化した細胞に数種類の遺伝子を導入することで細胞を初期化し ES 細胞とほぼ同程度の多能性を再獲得した細胞である。この iPS 細胞は ES 細胞の持つ倫理的問題を解決するものであり、この細胞を用いた研究は広く各国で行われ多方面に渡って研究成果が報告されている。

2. 研究の目的

(1) 椎間板再生医療に iPS 細胞を応用することを目指すものである。椎間板再生医療へ向けた基礎研究として、iPS 細胞の椎間板細胞への分化能の評価し、iPS 細胞の椎間板細胞への分化手法を確立し、その分化能について評価することである。

(2) 力学的環境変化が椎間板変性に与える影響について、詳細に理解することである。

3. 研究の方法

(1) iPS細胞から椎間板髄核、線維輪細胞を分化誘導する。

マウス iPS 細胞から椎間板細胞を分化誘導する手法は未だ確立されていない。従って、iPS 細胞と椎間板髄核細胞、線維輪細胞を共培養することで分化誘導を図る。この際、iPS 細胞から直接椎間板細胞の分化を行う実験を計画した。さらに、分化効率を高めるために iPS 細胞から胚葉体形成を促し、胚葉体から間葉系幹細胞を誘導、最終的に

この間葉系幹細胞と椎間板髄核細胞、線維輪細胞を共培養することで分化誘導を図る。

(2) 動的圧負荷培養装置を用いて、椎間板変性を誘導し組織学的、遺伝子学的に評価し機序解明を深める。メカノレセプターである Integrin $\alpha 5 \beta 1$ に注目し実験を計画した。

以下の 4 群を作成した。

C 群 (静置、Integrin $\alpha 5 \beta 1$ 阻害剤なし)、T 群 (静置、Integrin $\alpha 5 \beta 1$ 阻害剤あり)、L 群

(動的圧負荷、Integrin $\alpha 5 \beta 1$ 阻害剤なし)、TL 群 (動的圧負荷、Integrin $\alpha 5 \beta 1$ 阻害剤あり)とし、動的圧負荷に対する Integrin $\alpha 5 \beta 1$ の役割について検討した。

4. 研究成果

(1) iPS 細胞から SFEB (Serum-free Floating culture of Embryoid Body-like aggregates) 法にて胚葉体を作成した。すなわち、iPS 細胞を浮遊培養することでやがて散乱した iPS 細胞が集簇し胚細胞に似た胚葉体を形成した。この行程には約 7 日間が必要であった。



図1 胚葉体

この作成された胚葉体は間葉系細胞への分化誘導に優れていることが知られており、レチノイン酸を負荷し接着培養を行うことで約 3 週間後に間葉系幹細胞への分化が形態的に観察された。

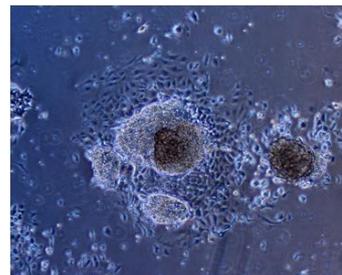


図2 間葉系幹細胞

この間葉系幹細胞の評価として、まずは骨分化誘導能の評価を行った。骨分化誘導能は骨分化誘導培地で約3週間培養すると間葉系幹細胞は形態が変化しアリザリン染色にてCa沈着を確認した。

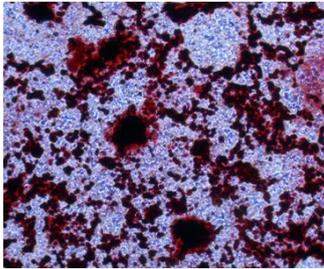


図3 アリザリン染色

本研究によって、iPS細胞から胚葉体形成、さらに間葉系幹細胞が安定的に分化誘導可能であることが明らかとなった。また、このiPS細胞誘導間葉系幹細胞には、骨分化誘導能が確認された。

(2) 動的負荷培養装置(1.3MPa, 1Hz, 6日間)にて、軽度の椎間板変性を誘導することが可能であった。

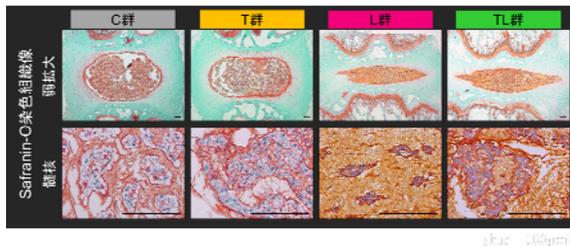


図4 椎間板組織像

L群で椎間板変性が誘導されていることが明らかとなり、L群に比してTL群で変性が弱いことも明らかである。また、変性所見は主に髄核で見られ線維輪では見られていなかった。

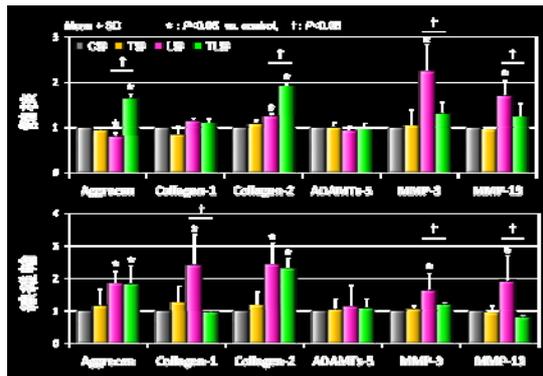


図5 遺伝子発現(mRNA expression)

遺伝子発現は、髄核では同化抑制と異化亢進が、線維輪では同化亢進と異化亢進が見られた。Integrin $\alpha5\beta1$ 阻害剤を投与した群では、髄核の同化は亢進され異化が抑制された。また、線維輪では同化亢進は維持され、異化は抑制された。

以上から、1.3MPa, 1Hzの動的負荷培養は髄核を中心とした椎間板変性を誘導し、線維輪での変性は殆ど見られなかった。この動的圧負荷誘導椎間板変性は、メカノレセプターである Integrin $\alpha5\beta1$ が髄核の同化抑制、異化亢進といった生化学的変化に関与していることが示唆され、椎間板細胞を取り巻く力学的環境変化を椎間板細胞内に伝達し椎間板変性を惹起していることが予想された。

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1件)

- ① 蔵川拓外、角谷賢一郎、森田有亮、前野耕一郎、黒坂昌弘、西田康太郎。骨・関節のバイオメカニクス-最近の進歩【脊椎椎間板の力学的特性 動的負荷培養装置を用いた機械受容体の検討。整形災害外科、55: 815-819, 2012

〔学会発表〕(計6件)

- ① 蔵川拓外、宮本裕史、金山修一、鷲見正敏、金村在哲、宇野耕吉、西田康太郎、頰椎後方再建固定術後に発生する分節性上肢麻痺のリスクファクター(頰椎後弯矯正角度の危険域についての検討) 第42回日本脊椎脊髄病学会、2013年4月26日、沖縄
- ② Kurakawa T, Kakutani K, Morita Y, Takada T, Maeno K, Yurube T, Yamamoto J, Hirata H, Miyazaki S, Doita M, Kurosaka M, Nishida K.; The Role of $\alpha5\beta1$ Integrin in the Mechanically Initiated Intervertebral Disc Degeneration, Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society, 2013.1. 26-29(Poster), Texas, USA
- ③ 蔵川拓外、角谷賢一郎、森田有亮、前野耕一郎、由留部崇、張鐘穎、山本潤哉、平田裕亮、高田徹、黒坂昌弘、西田康太

郎 , 動的圧迫負荷が椎間板細胞のメカノレセプター発現に及ぼした影響,第 27 回日本整形外科学会基礎学術集会 2012 年 10 月 26 日-27 日 (ポスター)、名古屋

- ④ Kurakawa T, Kakutani K, Morita Y, Takada T, Maeno K, Yurube T, Zhang Z, Yamamoto J, Hirata H, Doita M, Kurosaka M, Nishida K.; Biologic responses of rat intervertebral discs to mechanical loading using a dynamic organ culture system. International Society for the Study of the Lumbar Spine, 2012.5.28-6.1(Poster), Amsterdam, Netherlands
- ⑤ 蔵川拓外、角谷賢一朗、森田有亮、前野耕一郎、由留部崇、張鐘穎、山本潤哉、平田裕亮、高田徹、黒坂昌弘、西田康太郎 , 動的圧迫負荷がラット椎間板に及ぼす影響 , 第 41 回日本脊椎脊髄病学会, 2012 年 4 月 20 日、福岡
- ⑥ Kurakawa T, Kakutani K, Morita Y, Takada T, Maeno K, Yurube T, Zhang Z, Yamamoto J, Hirata H, Doita M, Kurosaka M, Nishida K.; Biologic Response of Rat Intervertebral Disc to Dynamic Compression -Analysis of Mechanoreceptors in Dynamic Organ Culture System. The 58th Annual Meeting of Orthopedics Research Society , 2012.2.4-7(Poster), San Francisco, California, USA

6. 研究組織

(1) 研究代表者

角谷 賢一朗 (KAKUTANI KENICHIRO)
神戸大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：10533739