

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 9 月 18 日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670859

研究課題名(和文) 骨の微小環境を利用したスキャフォールドによるiPS細胞の骨芽細胞への分化誘導促進

研究課題名(英文) Promoting differentiation of osteoblasts from induced pluripotent stem (iPS) cells using scaffolds recreating the bone tissue microenvironment.

研究代表者

宮本 洋二 (MIYAMOTO, Youji)

徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

研究者番号：20200214

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、骨の無機質の構造を微小環境としてスキャフォールドに導入することで、iPS細胞の骨芽細胞への分化を促進できると考えた。溶解析出型相変換を利用して、連続気孔を有するカーボネイトアパタイトスキャフォールドを作製した。カーボネイトアパタイト上で培養した間葉系幹細胞が骨芽細胞へ分化することが明らかとなった。また、BMPと複合化したカーボネイトアパタイトがラット背部皮下で異所性に骨を形成することが明らかとなった。iPS細胞の骨芽細胞へ分化誘導効率を改善するために、iPS細胞を一度間葉系幹細胞へ分化させ、このiPS細胞由来の間葉系幹細胞を骨芽細胞へ分化させた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we try to promote osteoblastic differentiation of human induced pluripotent stem (iPS) cells using scaffolds recreating the bone tissue microenvironment. As a result, it was revealed that 1) carbonate apatite (CAp) foam was fabricated based on compositional conversion reaction using β -tricalcium phosphate foam as a precursor, 2) low-crystalline CAp foam with 93%~96% porosity and fully interconnected porous structure was fabricated, 3) the differentiation of human iPS cells to mesenchymal stem cell-like cells was induced, 4) CAp was resorbed by osteoclast in vivo, 5) mesenchymal stem cells induced from iPS cells cultured on carbonate apatite differentiated into osteoblastic cells, 6) CAp granules combined with BMP-2 stimulated the ectopic new bone formation by promoting osteoblastic differentiation of mesenchymal cells in the surrounding tissue.

研究分野：医歯薬学

キーワード：再生医学 iPS細胞 骨再生

1. 研究開始当初の背景

iPS (induced Pluripotent Stem) 細胞はあらゆる細胞に分化可能であり、再生医療の細胞源としての期待は大きい。しかしながら、iPS 細胞を効率よく骨芽細胞へ分化させる誘導法は未だ開発されていないのが現状である。再生医療では、細胞と誘導因子(シグナル)、スキャフォールド(細胞の足場)の3要素が重要である。iPS 細胞の骨芽細胞へと分化誘導を試みている研究では、誘導因子が主なテーマとなっている。しかし、誘導因子(ascorbic acid、dexamethasone、 β -glycerophosphate など)を添加しても、全ての iPS 細胞が骨芽細胞に分化することはなく、その分化誘導効率は低いという問題点がある。申請者は、iPS 細胞を効率良く骨芽細胞に分化させるには誘導因子に加えて、より適切なスキャフォールドの開発が不可欠であると考えた。実際、Bilousova らは誘導因子として retinoic acid を用い、スキャフォールドとして gelatin form を用いることによって、iPS 細胞から骨様の石灰化組織を *in vitro*、*in vivo* で形成できることを報告した。これはスキャフォールドの重要性を示唆するものであるが、残念ながら骨様組織の誘導効率は低かった。申請者は、iPS 細胞の骨芽細胞への分化効率を上げるためには、骨の無機成分であるリン酸カルシウムの組成と骨の微小構造をスキャフォールドに導入することが必要と考えている。しかし、これまでリン酸カルシウム系材料を iPS 細胞のスキャフォールドに応用した報告はなく、さらに、骨の微小構造を模したスキャフォールドを利用した研究は全くない。

2. 研究の目的

iPS (induced Pluripotent Stem) 細胞は再生医療の細胞源として注目を浴びている。iPS 細胞による骨の再生医療では、骨芽細胞への誘導効率が低く、誘導された細胞の機能が低いことが臨床応用の課題となっている。そこで、本研究では、下記のスキャフォールドに関する3つのアイディアで、iPS 細胞の効率良い骨芽細胞への分化誘導法を確立することを目指す。

(1) 骨の無機成分であるリン酸カルシウムをスキャフォールド(足場)として利用することによって iPS 細胞の骨芽細胞への分化を促進する。

(2) 骨の微小環境を導入したスキャフォールドを利用することによって iPS 細胞の骨芽細胞への分化を促進する。

(3) 骨の微小環境を模倣したカーボネイトアパタイトの連続気孔スキャフォールドによって iPS 細胞の骨芽細胞への分化を促進する。

3. 研究の方法

(1) iPS 細胞を骨の無機質の主成分である各種のリン酸カルシウムセラミックス上で培養し、骨芽細胞への分化を検討する。

(2) 動物の骨を熱処理して有機成分を飛ばし、残った骨梁構造をスキャフォールドとして、*in vitro* で骨芽細胞への分化促進効果を検証する。

(3) このスキャフォールドの組成はハイドロキシアパタイトであるが、これを申請者が開発した溶解析出型相変換を利用して、形態はそのまま、より生体骨に近い組成のカーボネイトアパタイトに変換したスキャフォールドおよび連続気孔を有する人工合成の各種のリン酸カルシウムスキャフォールドを作成して、効率的な分化誘導条件を検討する。

(4) スキャフォールドの評価

低結晶性炭酸アパタイトの生体内での反応

炭酸アパタイト顆粒をラット背部皮下に埋植し、病理組織学的に評価する。

低結晶性炭酸アパタイトの再生医療のスキャフォールドとしての有用性の検証

iPS 細胞由来間葉系幹細胞を低結晶性炭酸アパタイト顆粒に播種してヌードマウス背部皮下への移植を行い、病理組織学的に評価する。

BMP-2 と複合化させた炭酸アパタイト顆粒の異所性骨形成

BMP-2 と複合化させた炭酸アパタイト顆粒をラット背部皮下に埋植し、病理組織学的に評価する。

(5) 得られた骨芽細胞を各種スキャフォールドに播種し、ヌードマウスの皮下にて異所性の骨再生を試みる。

4. 研究成果

(1) ヒト iPS 細胞の特性

歯の再生医療の細胞ソースとして用いる iPS 細胞の培養系を確立し、その特性について検討を行った。iPS 細胞の培養系の確立：理化学研究所から購入したヒト iPS 細胞(HPS0002)を実験に用いた。マイトマイシンC 処理したマウス胎仔線維芽細胞をフィーダー細胞として iPS 細胞を培養して継代した後、凍結保存を行った。さらに、維持培養、凍結、解凍を繰り返し行った iPS 細胞について、免疫染色とアルカリフォスファターゼ染色を行って多能性を維持していることを確認した。

(2) カーボネイトアパタイトフォームの作製

多孔質のポリウレタンフォームを α -TCP 懸濁液に浸漬乾燥させてウレタン骨格に α -TCP を付着させた後、焼成することで、 α -TCP の焼結とウレタンフォームの焼却を同時に行って、連続気孔を有する α -TCP フォームを調製した。この α -TCP フォームを炭酸塩水溶液中で水熱処理することで、溶解析出型の相変換反応を行って、連続気孔を有するカーボネイトアパタイトフォームを作製した。X 線回折装置およびフーリエ変換赤外分光光度計の分析から、作製したカーボネイトアパタイトフォームは低結晶性

のカーボネイトアパタイトであることが明らかとなった。

(3) iPS 細胞の間葉系幹細胞への分化誘導

iPS 細胞から直接骨芽細胞へ分化誘導することが困難であったため、iPS 細胞を一度間葉系幹細胞へ分化誘導することを試みた。ES 細胞からの間葉系幹細胞の分化誘導法を参考にして、iPS 細胞からの間葉系幹細胞への分化誘導を行った。コンフルエントに達した iPS 細胞をペトリディッシュ上に播種し、形成された胚様体を細胞培養用ディッシュに移してレチノイン酸を加えた DMEM-10% FCS で培養した。8 日後に、全細胞を回収し、ゼラチンコートした細胞培養用ディッシュで 1 時間培養し、接着細胞を血清低減培養液に bFGF を加えた間葉系間細胞用培地で継代培養し、iPS 細胞由来の間葉系幹細胞を得た。得られた iPS 細胞由来間葉系幹細胞の骨、軟骨、脂肪への分化能を確認した。

(4) 歯再生用の scaffold の開発

低結晶性カーボネイトアパタイトの生体内での反応

カーボネイトアパタイト顆粒をラット背部皮下に埋植し、2、4、8、12、28 週後に試料を摘出した。摘出物のマイクロ CT からカーボネイトアパタイトの顆粒径を測定したところ、顆粒径は経時的に小さくなった。さらに、脱灰切片の TRAP 染色では顆粒周囲に陽性細胞が多数みられたことから、生体内で吸収されたことが明らかとなった。

低結晶性カーボネイトアパタイトの再生医療のスキヤフォールドとしての有用性の検証

iPS 細胞由来間葉系幹細胞を低結晶性カーボネイトアパタイト顆粒に播種してヌードマウス背部皮下への移植を行い、再生医療のスキヤフォールドとしての有用性を組織学的に評価した。背部皮下での異所性骨形成は観察できなかったが、顆粒表面には iPS 細胞由来間葉系幹細胞と考えられる細胞が接着していることが確認できた。

BMP-2 と複合化させたカーボネイトアパタイト顆粒の異所性骨形成

BMP-2 と複合化させたカーボネイトアパタイト顆粒をラット背部皮下に埋植し、2、4、8、12、28 週後に試料を摘出した。HE 染色による組織学的評価では、異所性の硬組織形成が BMP 50 μ g と複合化したカーボネイトアパタイト埋植したラットでカーボネイトアパタイト顆粒を取り囲むようにみられた。Osterix と Runx2 の免疫染色の結果では、埋植後 2~4 週でカーボネイトアパタイト顆粒の周囲に多数の発現細胞を認め、Osterix 発現細胞は、28 週まで顆粒周囲や新生骨周囲に存在したが、Runx2 発現細胞は 8 週以降は減少したことから、異所性の骨形成は 4~8 週までに活発に行われていると考えられた。

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. Effects of low crystalline carbonate apatite on proliferation and osteoblastic differentiation of human bone marrow cells. Hirokazu Nagai, Masako Kobayashi-Fujioka, Kenji Fujisawa, Go Ohe, Natsumi Takamaru, Kanae Hara, Daisuke Uchida, Tetsuya Tamatani, Kunio Ishikawa, Youji Miyamoto. J Mater Sci Mater Med., 26(2), 99, 2015. 査読あり.

〔学会発表〕(計 8 件)

1. 炭酸アパタイト被覆炭酸カルシウムを用いたハイブリッド型骨補填材料による骨再生の試み 小林真左子 永井宏和, 藤澤健司, 都留寛治, 石川邦夫, 山中克之, 熊谷知弘, 宮本洋二. 第 36 回日本バイオマテリアル学会大会 2014 年 11 月 17 日, タワーホール船堀(東京都・江戸川区)
2. 炭酸アパタイト被膜炭酸カルシウムを用いた新規骨置換材料による骨再生の試み 小林真左子 永井宏和 原 香苗, 鎌田久美子, 工藤隆治, 藤澤健司, 宮本洋二. 第 59 回(公社)日本口腔外科学会総会・学術大会 2014 年 10 月 18 日, 幕張メッセ(千葉県・千葉市)
3. Application of Low Crystalline Carbonate Apatite Combined With BMP-2 to Bone Reconstruction. Hirokazu Nagai, Kanae Hara, Masako Kobayashi, Go Ohe, Tetsuya Tamatani, Kenji Fujisawa, Youji Miyamoto., American association of Oral Maxillofacial Surgeons (aaoms) 96th Annual Meeting, scientific Sessions & Exhibition, September 11, 2014, Hawaii Convention center, Hilton Hawaiian Village, Hawaii (USA).
4. Nobel Bone Regeneration System Using Carbonate Apatite-coated Carbonate Calcium in Vivo. Masako Kobayashi, Hirokazu Nagai, Kanae Hara, Kenji Fujisawa, Daisuke Uchida, Tetsuya Tamatani, Youji Miyamoto., American association of Oral Maxillofacial Surgeons (aaoms) 96th Annual Meeting, scientific Sessions & Exhibition., September 11, 2014, Hawaii Convention center, Hilton Hawaiian Village, Hawaii (USA).
5. 低結晶性炭酸アパタイトの顎骨再建への応用に関する基礎的研究 第 6 報

BMP-2 との併用効果：永井宏和，原香苗，小林真左子，藤澤健司，都留寛治，山本克史，石川邦夫，宮本洋二．第 35 回日本バイオマテリアル学会大会 2013 年 11 月 25 日，タワーホール船堀（東京都・江戸川区）．

6. BMP2 の骨誘導に対する FGF ファミリーの併用効果：小林真左子，宮本洋二，井関祥子．第 67 回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会 2013 年 5 月 24 日，栃木県総合文化センター（栃木県・宇都宮市）．

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮本 洋二 (MIYAMOTO, Youji)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス
研究部・教授
研究者番号：20200214

(2) 研究分担者

永井 宏和 (NAGAI, Hirokazu)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス
研究部・准教授
研究者番号：50282190

玉谷 哲也 (TAMATANI, Tetsuya)
徳島大学・病院・講師
研究者番号：30274236
内田 大亮 (UCHIDA, Daisuke)
獨協医科大学・医学部・准教授
研究者番号：20335798

(3) 連携研究者
なし