

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462246

研究課題名(和文) iPS細胞注射による低侵襲脊椎固定術の開発

研究課題名(英文) Investigation of minimum invasive fusion surgery using injection of novel induced pluripotent stem cells cell

研究代表者

鈴木 亨暢 (Suzuki, Akinobu)

大阪市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：00445016

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：当研究は、骨形成を強く促進する骨形成タンパク-2 産生遺伝子、及び、特定の薬剤投与により細胞死を起こす単純ヘルペスウイルス1型チミジンキナーゼ産生遺伝子を組み込んだ人工多能性幹細胞であるiPS細胞を作成することで、現在は高侵襲な手術でしかしない脊椎固定術を、細胞注射のみで行う事を目的とし、平成26年度より行われている研究である。3年間の研究期間内に、上記二種の遺伝子を細胞に送り込み取り込ませるベクターをいわれる塩基配列を構築し、マウス横紋筋由来細胞にて両タンパク質の発現を確認した。今後は、発現するタンパク質の量をさらに増加させる処置を加えた後に、iPS細胞へ導入する予定である。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to investigate the novel iPS cells, which can produce two types of protein; the bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) to promote the bone fusion strongly, as well as the herpes simplex virus type 1- thymidine kinase (HSV-TK) to cause apoptotic cell death by ganciclovir administration. This novel iPS cell will allow spine surgeons to perform posterolateral lumbar spine fusion only with injection, instead of with current high invasive surgery. This study had started from 2014. During 2014-2016, we created the DNA vector to deliver the nucleic acids including the gene of BMP-2 and HSV-TK into nuclear of the target cells. Additionally, we confirmed the production of BMP-2 and HSV-TK from the myoblast cell of mouse, which was introduced the genes. Hereafter, we are planning to introduce our vector to iPS cell, after the research to enhance the productivity of protein by the introduced cells.

研究分野：整形外科

キーワード：iPS細胞 ヒト人工多能性幹細胞 BMP遺伝子 骨形成タンパク HSV-TK遺伝子 単純ヘルペスウイルス1型チミジンキナーゼ 低侵襲脊椎固定術

### 1. 研究開始当初の背景

高齢者の増加、脊椎手術の技術向上などにより近年脊椎の手術件数は増加の一途をたどっており、腰椎椎間板ヘルニアや腰部脊柱管狭窄症といった疾患は、今後さらに手術件数が増加すると予想される。そのため、手術を低侵襲化させ、患者の早期社会復帰を図り、入院費や介護費を減少させることも重要課題である。脊椎手術は大きく分けて脊髄及び神経根に対する脊椎除圧手術と脊椎の安定化を目的とする脊椎固定術に分けられる。脊椎固定具の挿入に関しては低侵襲化のためのデバイスが開発・使用されているが、骨癒合に関してはその促進あるいは低侵襲化が未達成のため術後療法の短縮に直結していないのが現状である。

我々の研究室は骨形成タンパク (bone morphogenetic protein; BMP) を用いた骨再生・骨新生をテーマとして研究してきた。BMP は強力に骨誘導を起こすことの出来る蛋白質であり、海外では既に難治性骨折や脊椎固定などで実用化されている。しかし、臨床現場においては外科的移植により用いられている状況であり、BMP の注射による治療といった完全な低侵襲化には至っていない。

ヒト人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cell; iPS 細胞) は 2007 年に山中らによって見出された細胞であり、さまざまな組織の細胞に分化する能力を有し患者本人の細胞から樹立可能である特徴を持つ。遺伝疾患の基礎研究や治療薬の開発のみならず、再生医療や移植治療への応用が期待され臨床治験が始まろうとしていた。

単純ヘルペスウイルス 1 型チミジンキナーゼ (Herpes Simplex Virus - Thymidine kinase: HSV-TK) は単純ヘルペス 1 型を構成する DNA の 1 種類で、この DNA を有すると、本来は無害な薬品 (ガンシクロビル等) の投与により細胞死を惹起することが出来る。現在、腫瘍化した幹細胞の除去に HSV-TK を用いる方法が模索されている。

### 2. 研究の目的

当研究は骨形成タンパク-2 (BMP-2)、及び、単純ヘルペスウイルス 1 型チミジンキナーゼ (HSV-TK) 発現プラスミドベクターを導入した iPS 細胞を作製し、同細胞の骨形成能、及び、ガンシクロビルの添加により発現ベクター導入細胞の細胞死を確認した後に、ラットを用いて細胞注射による脊椎固定術の検証を行うことを目的とし、平成 26 年度より開始されている研究である。

### 3. 研究の方法

#### (1) BMP2 発現ベクターの作成

まず BMP2・HSV TK 発現プラスミドベクターを作成する。プラスミドベクター作成後、マウス筋芽細胞株である C2C12 細胞にトラ

ンスフェクションし、BMP2 の発現量を ELISA で、また発現された BMP2 の骨分化誘導能を ALP 活性にて確認する。HSV TK の発現に関しては、ガンシクロビルの添加により発現ベクター導入細胞の細胞死を確認する。対照のベクターとして HSV TK のみの発現ベクターを作成する。

#### (2) iPS 細胞への DNA ベクターの導入

ヒト iPS 細胞への BMP2 添加は脂肪系の細胞への分化が誘導されるとの報告もあるため、まずは BMP2 発現ベクターの導入時期を決定する目的で以下の実験を行う。iPS 細胞を数日間浮遊培養した後、レチノイン酸を添加しさらに数日培養。そして bFGF を添加して骨芽細胞系の細胞へと分化誘導する。対照として未分化な状態を維持した iPS 細胞を用いて、それぞれに BMP2 発現ベクターを導入する。ベクターの導入効率をベクターに組み込んだマーカーをもとに FACS を用いて検討する。導入後の BMP2 発現量は ELISA を用いて測定する。また骨芽細胞系に分化させた iPS 細胞、BMP2 発現ベクターを導入した未分化 iPS 細胞、及び BMP2 発現ベクターを導入した骨芽細胞系分化 iPS 細胞の 3 群で、アルカリフォスファターゼ活性、アリザリンレッド染色、及び骨芽細胞系マーカー (osteocalcin, osteopontin, osterix) の発現量 (qPCR) を比較。骨芽細胞系分化の強いものを選択し、次の in vivo の実験に用いる。またガンシクロビル添加による細胞死を誘導できるかどうかを再確認する。

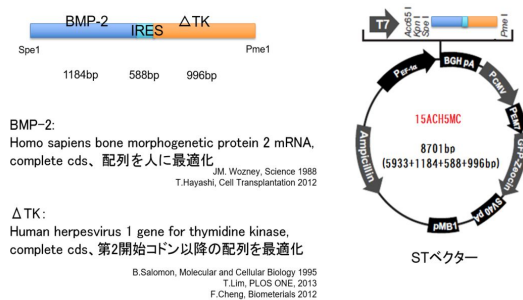
#### (3) 細胞注射による脊椎固定術の検証

ヒト iPS 細胞を用いるため無胸腺ラットを用いて実験を行う。iPS 細胞注射により横突起間脊椎固定術が可能かどうかの確認を目的に、In vitro の結果から選択された細胞を Matrigel と混合し、ラットの L4-5 椎間関節外側の傍脊柱筋内に注射 (片側の横突起間につき  $1 \times 10^6$  個/ $100 \mu\text{l}$ ) を行う。Positive control として同細胞もしくは BMP2 タンパクをしみこませたコラーゲンスポンジの外科的移植を行う群も作成する。注射後 4 週間、8 週間の時点で犠牲死させ単純 X 線にて骨新生の状態を確認する。さらに注射部分の脊椎を摘出し micro CT を用いて新生骨の骨質評価を行う。その後組織標本を作成し、組織学的に新生骨を確認した上で注入細胞生存の有無や骨新生への寄与の割合などを検討する。併せて、iPS 細胞注入後にガンシクロビルによって新生骨量をコントロール出来るかどうかの検証を行う。上述のモデルを用いて 3 倍 - 5 倍量の細胞数を注射し、あえて巨大な新生骨が出来るようなモデルを作成する。そのモデル動物を 2 群に分け、一群は無処置、残る一群はガンシクロビルを術後一週間で腹腔内投与し、新生骨量をコントロール出来るかどうかを検証する。

#### 4. 研究成果

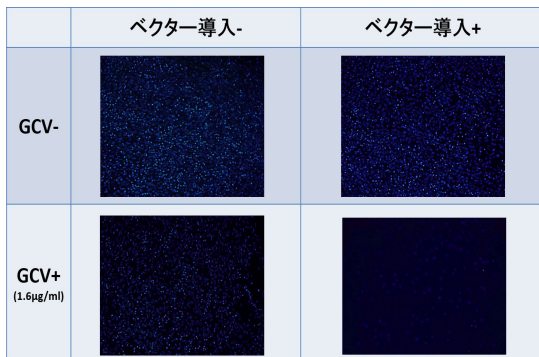
当学内における組み換え DNA 実験計画など諸審査に対する承認を取得した後に、BMP-2 遺伝子と HSV-TK 遺伝子を IRES ( internal ribosome entry site ) でつなぎ生合成開始に必要な遺伝配列を組み込んだプラスミドを作成し、GFP 遺伝子を持つベクターにクローニングした。IRES で二つの遺伝子をつなぐことで、一つのプロモーターで二種類のタンパク質の合成制御が可能となるため、二つのプロモーターを有するベクターに比して、二種類のタンパク質発現に差が無く安定した発現が期待される。プロモーターとしては EF-1 を、スクリーニングに用いる抗生剤耐性としてアンピシリンを採用している(図 1)。

図 1 作成したベクター



作成したベクターをマウス横紋筋由来細胞 (C2C12 細胞) に、Lipofection 法を用いた化学的方法にてトランスフェクションを行った。導入後 7 日目の GFP 陽性細胞を評価することで導入率評価を行い、併せて、BMP-2 機能評価としてアルカリフォスファターゼ活性評価 ( 遺伝子導入 4 日後、7 日後、14 日後 )、HSV-TK 機能評価として DNA 導入 4 日目よりガンシクロビル ( GCV ) との共培養による細胞数評価 ( DNA 導入 7 日後 ) を行った。その結果、導入効率は数回の検討でも 80% 前後と高水準に認め、各検討で統計学的有意差は認められなかった。また、ガンシクロビル ( 1.6 μg/ml ) との共培養により、ベクター導入を行った細胞のみ有意な細胞死も確認された。( 図 2 )

図 2 ガンシクロビル投与による細胞死

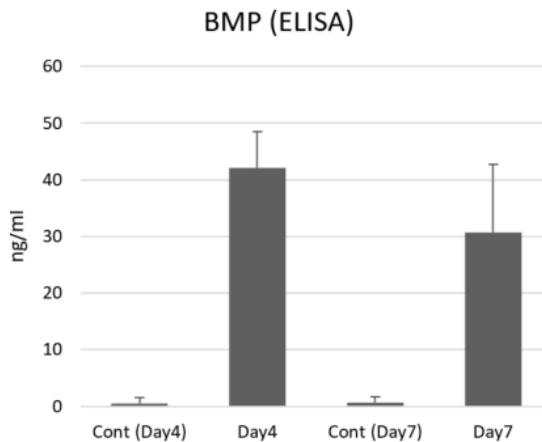


(Hoechst 核染色、100 倍)

しかし、BMP-2 機能評価としてのアルカリフォスファターゼ活性評価は、実験により結果に差があり再現性が低い点が問題であった。そのため、導入したベクターから BMP が産生されているかを直接検証する目的で、ELISA ( Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay ) 法にて BMP-2 の定量評価を行った。

その結果、プラスミドベクターを導入した C2C12 細胞は BMP-2 を産生していることは明らかになったが、DNA 導入 4 日に 40ng/ml、7 日目に 30ng/ml ( 図 3 ) と、発音量が低い事が判明した。この数値は、C2C12 細胞に対して骨分化を誘導刺激する域値と考えられる 50ng/ml に達しておらず、そのために、BMP-2 の機能評価である ALP 活性評価において、差が生じていると考えられた。

図 3 ELISA 法による BMP-2 の定量評価



以上より、Lipofection 法など化学的なトランスフェクションによるベクターの導入では、細胞の継代により導入した DNA が希釈され、有効な BMP-2 濃度に達しない可能性が高いと考えられた。当初は、ヒトへの応用を最優先に考えていたので、化学的な方法によるトランスフェクションによる DNA 導入を模索したが、いずれも同様の問題が生じることが判明した。

以上より、ウイルスベクターによる導入が必要であると考えられた。そのため、現在、デザインした塩基配列を応用して、レンチ有為する用のベクターを作成中である。今後は、作成したプラスミドを導入したレンチウイルスベクターを用いてトランスフェクションした C2C12 細胞にて十分な BMP-2 の産生が認められるかを ALP 活性と ELISA 法にて検証する。併せて、iPS 細胞から胚様体を作製しレンチノイン酸の存在下で培養することにより、間葉系細胞へ分化を方向付けた後に、骨芽細胞分化培地で培養する予定であるが、どの時点でのトランスフェクションを行うことが最も効率的に骨新生を生じるかを検討する予定である。

## 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 0 件)

〔学会発表〕 (計 0 件)

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等 0 件

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

鈴木 亨暢 (SUZUKI, Akinobu)

大阪市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号： 00445016

### (2) 研究分担者

中村 博亮 (NAKAMURA, Hiroaki)

大阪市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号： 60227931

寺井 秀富 (TERAI, Hidetomi)

大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号： 20382046