

厚生労働科学研究費補助金（難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業
（再生医療関係研究分野））

「iPS 細胞等の安定供給と臨床利用のための基盤整備」

分担研究報告書

「iPS 細胞からの骨・軟骨系細胞への培養技術を最適化するための基盤整備」

研究分担者	吉川 秀樹	大阪大学 整形外科学教室	教授
研究協力者	名井 陽	大阪大学 整形外科学教室	准教授
研究協力者	宮本 諭	大阪大学 整形外科学教室	大学院生
研究協力者	浜口 智志	大阪大学 アドミナティブデザイン研究センター	教授

【研究要旨】

本研究では、マウス多能性幹細胞から骨芽細胞系細胞を作製するための培養条件の最適化を行なった。時間経過および分化に沿った段階的な誘導法を検討した結果、種々のサイトカインと化合物を用いた誘導培地の最適化だけでなく、低酸素培養と表面処理された培養皿の併用効果が明らかになった。今後は現在までに行っている骨軟骨再生に関する動物実験、臨床研究と十分な連携を図りながら、新規誘導因子のスクリーニングを行い、より質の高い、臨床に根差した研究の実施を目指す。

本研究は、骨芽細胞系細胞の培養誘導に関わる種々の環境因子に配慮し、ヒト幹細胞を用いる前段階の技術開発を目的としている。

A. 研究目的

外傷や切除により生じた大きな骨欠損を補うためには、インプラントに代表される人工材料が多く用いられているが、生体組織に近い組成を有するハイブリット材料の開発が望まれる。このための細胞源として iPS 細胞は、間葉系幹細胞に並ぶ生体材料として期待されているが、多能性を有するが故に細胞系譜に沿った分化誘導が極めて難しいという問題点を残している。iPS 細胞による臨床応用を目指した培養誘導技術の開発は急務であるが、均一性と安全性を兼ね備えた高効率な誘導法を確立するまでには至っていない。とくに生体内で iPS 細胞が十分な骨形成能を示したという報告はされてない。本研究は、マウス iPS 細胞か

ら EB 形成を経ずに、中胚葉系細胞、間葉系前駆細胞、骨芽細胞系細胞へと高効率に誘導可能な技術開発を目的としている。また、本誘導技術をさらに発展させるため新規誘導因子を含めた分子の探索も同時に実施する。

B. 研究方法

1. 骨芽細胞系細胞培養誘導培地の最適化

無血清下でサイトカインと化合物を組み合わせたカクテル誘導培地の最適化を行った。時間経過に沿った段階的な添加方法の検証を行うために培養誘導は、①誘導開始から day3 まで、②day4 から day6 まで、③day7 から day13 まで、④day14 から day21 まで、⑤day22 以降の 5 段階とし、フロー

サイトメトリーおよび遺伝子発現解析により最適化条件を検討した。

2. 低酸素培養と表面加工処理された培養皿の応用

骨芽細胞系細胞を作製するためのさらなる高率化を目指し、段階的な低酸素環境での培養誘導を行った。この際、表面加工処理された培養皿を併用し、最適化のための条件を検討した。

3. 培養皿の表面解析とプラズマ照射の表面改質への応用

培養皿は初期段階の検討用として加工処理された市販品を用いて、コーティング剤を併用した。培養皿の表面改質は、プラズマや熱 CVD などが施されていることが考えられるが、加工処理方法を特定することは難しい。現在、XPS および FT-IR 解析により市販品の表面解析を行い、これらのデータをもとに本学工学部で開発された N₂/H₂ プラズマ照射の表面改質への応用を試みている。

4. 低分子化合物と新規誘導因子のスクリーニング

今後の臨床応用を目指すためにサイトカインフリーの誘導培地の最適化も進めている。各種阻害剤を含めた候補化合物の絞り込みは、本培養誘導系を用いて、マイクロアレイ解析と RNA シーケンスを併用し、網羅的遺伝子解析を行い、有用な新規分子を検討中である。

5. 本培養誘導技術の有用性および安全性の確認

最適化された条件を検証するためにヌードマウスを用いて、動物実験を行い、骨形成能および腫瘍性試験により評価、検討中である。

(倫理面への配慮)

本研究においては関連指針等を遵守し、大阪大学倫理委員会の承認を経て慎重に研究を進める。常に人権を尊重した研究を実行し、患者の不利益とならないよう最大限の配慮を行うこととする。

C. 研究結果

骨芽細胞系細胞の培養誘導には、数種類のサイトカインと化合物の混合カクテルが必要であり、day21 までに高効率な誘導が可能となる無血清培地を考案した。また、さらなる効率化と均一性を高めるためには、段階的な低酸素培養と培養皿の表面加工処理の併用が欠かせないことも明らかになった。

D. 考按

培養誘導技術の開発には、誘導培地の最適化だけでなく、中胚葉系細胞、間葉系前駆細胞を経て、骨芽細胞系細胞へ誘導することが可能となる段階的分化を遂げるために必要な環境因子を考慮に入れることが重要である。従来から広く用いられている既存の骨形成誘導培地に類似した手法ではなく、臨床応用を見据えた均一性と安全性を兼ね備えた誘導法の検討が必要である。単に種々の培養環境要因を組み合わせるだけでなく、新しい技術導入を視野に入れた解析および評価法による培養技術の開発に努めるべきと考える。

E. 結論

iPS 細胞から高効率に骨芽細胞系細胞を作製することが可能になった。これには段階的な増殖および分化を調節、修飾可能な

環境因子を考慮した培養誘導技術が必要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Morimoto T, Kaito T, Kashii M, Matsuo Y, Sugiura T, Iwasaki M, Yoshikawa H.: Effect of Intermittent Administration of Teriparatide (Parathyroid Hormone 1-34) on BoneMorphogenetic Protein-Induced Bone Formation in a Rat Model of Spinal Fusion., J Bone Joint Surg Am. 2;96(13), 2014.
2. Kaneshiro, S., Ebina, K., Shi, K., Higuchi, C., Hirao, M., Okamoto, M., Koizumi, K., Morimoto, T., Yoshikawa, H., Hashimoto, J.: IL-6 negatively regulates osteoblast differentiation through the SHP2/MEK2 and SHP2/Akt2 pathways in vitro. Journal of Bone and Mineral Metabolism, 32:378-392, 2014.
3. Minegishi, Y., Sakai, Y., Yahara, Y., Akiyama, H., Yoshikawa, H., Hosokawa, K., Tsumaki, N.: Cyp26b1 within the growth plate regulates bone growth in juvenile mice. Biochem Biophys Res Commun, 454:12-18, 2014.
4. Sugiura T, Kashii M, Matsuo Y, Morimoto T, Honda H, Kaito T, Iwasaki M, Yoshikawa H.: Intermittent administration of teriparatide

enhances graft bone healing and accelerates spinal fusion in rats with glucocorticoid-induced osteoporosis., Spine J. 15(2):298-306, 2015.

2. 学会発表

1. Dai Itsuki, Satoshi Sugimoto, Satoshi Miyamoto, Akira Myoui, Hideki Yoshikawa, Satoshi Hamaguchi: Plasma Surface Modification of Cell Culture Plates, 2nd international symposium on non-equilibrium plasma and complex-system sciences (IS-NPCS), (October 2014, Germanay)
2. 斉宮大, 杉本敏司, 宮本諭, 名井陽, 吉川秀樹, 浜口 智志: 細胞培養プレートのプラズマ表面処理, 第75回応用物理学会秋季学術講演会(2014年9月, 札幌)
3. Dai Itsuki, Tomoko Ito, Satoshi Sugimoto, Yu Moriguchi, Satoshi Miyamoto, Akira Myoui, Hideki Yoshikawa, Satoshi Hamaguchi: Modification of hydroxyapatite and polystyrene surface for cell culture by low-pressure plasmas, 5th International Conference on Plasma Medicine (ICPM5)(May 2014, Nara, Japan)

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案特許
なし
3. その他

なし