

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 3月31日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22591693

研究課題名（和文） ヒトiPS細胞からの軟骨細胞の分化誘導

研究課題名（英文） Induction of chondrocyte from human induced pluripotent stem cells

研究代表者

福田 寛二（FUKUDA KANJI）

近畿大学・医学部・教授

研究者番号：50201744

研究成果の概要（和文）：

本研究では、ヒトiPS細胞からの効率的な軟骨細胞誘導法の開発と誘導軟骨細胞の特性解析を実施した。1) iPS細胞から間葉系幹細胞（MSCs）を誘導し、段階的に軟骨細胞を誘導することで、効率的な軟骨細胞の獲得を試みた。誘導環境を低酸素状態とすることで、高率にMSC-like性質を有する細胞が得られることを見出した。2) 誘導したMSCsについて発現解析を実施し、誘導MSCsが骨髄由来MSCsに類似した発現パターンを示すこと、骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞への誘導が可能であることを示した。また、3) 未分化iPS細胞およびiPS由来軟骨細胞に機械的ストレスを加え、未分化維持分子機構に及ぼす影響を検討し、機械的ストレスの負荷は未分化性の制御に影響しうることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Induction of chondrocyte from iPS cells is an important to treat osteoarticular disorders. We performed 1) induction of the chondrocyte from iPS cells via MSC production from iPS cells; 2) detailed characterization of the MSCs; 3) observation of cellular responses to mechanical stresses. These experiments elucidated that 1) hypoxic treatment during in vitro differentiation is a positive factor for induction of the MSCs, 2) induced MSCs possess typical MSC characteristics and 3) loading of the mechanical stress induce decreasing of the genes controlling undifferentiation of the cells. The present series of studies suggest an effective method to furnish the chondrocyte from iPS cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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： 軟骨・iPS細胞・分化誘導・再生医療

1. 研究開始当初の背景

高齢社会の到来に伴い変形性関節症の有病率が増加しており、その治療は大きな社会的問題となっている。再生医療は新たな治療戦略として、脳卒中をはじめ様々な領域で注目されている。変形性関節症においても、軟骨欠損部に対する培養自家軟骨移植が確立されたが、健常部の軟骨採取を必要とするとともに、培養軟骨細胞脱分化の問題が解決されていない。近年、体細胞に未分化維持因子を導入する事により人工的に多能性幹細胞を誘導できることが示された。このiPS細胞は、胚の破壊を必要とせず、自己の体細胞より作製できることより再生医療の理想的な材料である。これまでもiPS細胞から神経細胞や心筋細胞などの誘導が報告されているが、軟骨細胞への誘導に関する報告は少ない。

2. 研究の目的

本研究では、1) ヒトiPS細胞から軟骨細胞を誘導し、2) 誘導された軟骨細胞の特性を検討することを目的とした。また、軟骨細胞の最も特徴的な形質は機械的ストレスに対する細胞応答であるが、iPS細胞由来軟骨細胞について機械的ストレスに対する細胞応答を観察し、生理学的な特性を明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

正常な生理的状态において、軟骨細胞は間葉系の前駆細胞（間葉系幹細胞、MSCs）より発生する。そこで、まずヒトiPS細胞からMSC様の性質を有する前駆細胞の誘導を行った。ヒトiPS細胞を非接着ディッシュに移し、震盪培養を行うことで胚様体（EB）を得た。次にEBをマトリゲルコートをした培養皿へ播種し、10%FCS- α MEMにて、酸素2%の条件下で分化誘導培養を行った。誘導細胞よりCD105/CD44抗体を用いてMSCs分画を得た。誘導したMSCsについては、間葉系（骨、軟骨、脂肪）への分化能力やRealtimePCR、Western blot解析によるMSCマーカーの観察など、MSCsとしての評価を行った。その後、未分化iPS細胞、分化誘導細胞を検体としてFX-3000™による牽引負荷、FX-4000™による圧迫負荷を行い、物理的ストレスに対する細胞応答を観察した。

4. 研究成果

本研究において、3つの結果が得られた。**1) iPS細胞からはMSC様の性質を有する細胞を分化誘導することが可能である。**震盪培養により、高率にEBを得ることが可能であった。EBをマトリゲルに播種後、

4~6日程度でEB周辺に紡錘体状の細胞が出現した。低酸素培養により紡錘体状の細胞を効率よく増殖させることが可能であった。これらの細胞はCD271、CD105、Vimentinの発現を示し、高い増殖能力を有することから、間葉系前駆細胞としての性質を有するという仮説を立てた。これらの紡錘形間葉系細胞はCD105、CD44抗体を用いて分取することが可能であった。

2) 誘導した間葉系細胞はMSCと同様の性質を示す。次に、FACSとその後の培養により得られた間葉系細胞の幹細胞機能について解析を行った。分化誘導したMSCsはCD29、CD44、CD73、CD105、CD106、CD140b、VimentinといったMSCマーカーを発現し、その発現量はヒト正常骨髄由来MSCsと同程度あるいは高値であった。Oct4、Nanogなどの未分化マーカーについては発現量が低下していた。i誘導間葉系細胞について間葉系細胞への分化能力を検討したところ、分化誘導3週目においてアリザリンレッド陽性骨芽細胞、オイルレッドO陽性脂肪細胞、サフラニンO陽性軟骨細胞が得られた。このことから、誘導細胞はMSC様の細胞（iPS-MSC）であると考えられた。

3) iPS細胞、iPS由来軟骨細胞に対する機械的ストレス負荷は未分化関連遺伝子の発現量を低下させる。関節軟骨は常に荷重環境下にある組織である。即ち、iPS細胞による再生医療が実現された際、移植細胞は同様の環境に曝されることになるため、iPS細胞およびiPS由来分化細胞について、物理的機械的（メカニカル）ストレスと細胞応答について検討することは極めて重要な課題である。

本研究では、まず、iPS細胞に対する牽引負荷を行い、メカニカルストレスが幹細胞の未分化性に与える影響について検討した。iPS細胞をコラーゲンコートシリコンメンブレン状に播種しFX-3000™にて周期的な牽引負荷を加えたところ、Aktのリン酸化レベルの低下と未分化関連遺伝子の発現低下が認められた。この反応は低分子量GTPaseRhoにより活性化されるROCKを阻害することで抑制され、さらに、ドミナント・ポジティブ型Rhoの導入により再現されたことから、iPS細胞に対するメカニカルストレスの負荷はRho-ROCK経路の活性化を誘導し、Aktのリン酸化レベルの抑制と未分化関連遺伝子発現の低下を誘引

することが明らかとなった。次に、生体内で生じる現象をより適切に再現するため、iPS-MSCをI型コラーゲンスポンジに包埋し、軟骨分化培地で分化誘導した能後にFX-4000CTMにて周期的な圧迫負荷を加えた。その結果、非圧迫群と比べSox9の発現量が有意に低下することが明らかとなった。このことから、iPS細胞、iPS由来分化細胞ともに、メカニカルストレスの負荷によってより分化に傾倒する可能性が考えられた。

本研究により、ヒトiPS細胞から軟骨細胞の誘導方法が開発され、ヒトiPS細胞の物理的ストレスに対する応答が初めて明らかになった。また、実際にiPS細胞から誘導した軟骨細胞に対し、生体で生じるストレスを模した周期的圧迫負荷を加え、遺伝子発現の変化を検出することにも成功した。しかし、その詳細な制御メカニズムは依然不明である。また、今回観察対象とした遺伝子以外の変化については、今後さらに解析を進め、全体として考察する必要があると考えられる。今後は、様々な分化段階の軟骨で同様の実験を行うこと、マイクロアレイや次世代シーケンサー (NGS) を用いて細胞に起こる変化を網羅的にとらえること、使用するiPS細胞の株数を増やし普遍性を確認すること、in vivoでの安定性、安全性について検討することが必要であると考えている。

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6件)

- ① Teramura T, Sugimoto H, Frampton J, Kida Y, Nakano M, Kawakami M, Izumi H, Fukunaga N, Onodera Y, Takehara T, Fukuda K, Hosoi Y. Generation of Embryonic Stem Cell Lines from Immature Rabbit Ovarian Follicles. Stem Cells Dev. 2013 Mar 15;22(6):928-38. 査読：有
- ② Teramura T, Onodera Y, Takehara T, Frampton J, Matsuoka T, Ito S, Nakagawa K, Miki Y, Hosoi Y, Hamanishi C, Fukuda K. Induction of Functional Mesenchymal Stem Cells from Rabbit Embryonic Stem Cells by Exposure to Severe Hypoxic Conditions. Cell Transplant. 2013;22(2):309-29. 査読：有

③ Nakagawa K, Teramura T, Takehara T, Onodera Y, Hamanishi C, Akagi M, Fukuda K. Cyclic compression-induced p38 activation and subsequent MMP13 expression requires Rho/ROCK activity in bovine cartilage explants. Inflamm Res. 2012 Oct;61(10):1093-100. 査読：有

④ Teramura T, Takehara T, Onodera Y, Nakagawa K, Hamanishi C, Fukuda K. Mechanical stimulation of cyclin tensile strain induces reduction of pluripotent related gene expressions via activation of Rho/ROCK and subsequent decreasing of AKT phosphorylation in human induced pluripotent stem cells. Biochem Biophys Res Commun. 2012 Jan 13;417(2):836-41. 査読：有

⑤ Takehara T, Teramura T, Onodera Y, Hamanishi C, Fukuda K. Reduced Oxygen Concentration Enhances Conversion of Embryonic Stem Cells to Epiblast Stem Cells. Stem Cells Dev. 2012 May 20;21(8):1239-49. 査読：有

⑥ Fukunaga N, Teramura T, Onodera Y, Takehara T, Fukuda K, Hosoi Y. Leukemia inhibitory factor (LIF) enhances germ cell differentiation from primate embryonic stem cells. Cell Reprogram. 2010 Aug;12(4):369-76. 査読：有

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称：免疫不全動物を用いた細胞の製
発明者：寺村岳士、福田寛二
権利者：学校法人近畿大学

種類：特願

番号：2010-274147(P2010-274147)
出願年月日：平成22年12月8日
国内外の別：国際

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.kindai.ac.jp/stemcell/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福田 寛二 (FUKUDA KANJI)

近畿大学・医学部・教授

研究者番号： 50201744

(2) 研究分担者

西尾 和人 (NISHIO KAZUTO)

近畿大学・医学部・教授

研究者番号： 10208134

寺村 岳士 (TERAMURA TAKESHI)

近畿大学・医学部・講師

研究者番号： 40460901

(3) 連携研究者

()