

胚様体形成を介さないマウス iPS 細胞の骨分化誘導法の確立と骨再生への応用

神戸大学医学部附属病院整形外科

李 相亮

1 研究の背景と目的

骨折はわが国での年間罹患患者が約 51 万人と非常に多い代表的な外傷性疾患である (2008 年度 厚生労働省報告)。超高齢社会を迎えている我が国では高齢者人口の増加とともに、骨粗鬆症を基盤とした大腿骨骨折、脊椎骨折、手関節骨折などは増加の一途を辿っており、今後も増え続けることが予想されている。一般的に骨折患者においては、保存的治療 (ギブス等による外固定) や骨折部の解剖学的整復と固定を行うことで、骨癒合が得られて治癒する。しかし、全体の骨折の 5-10% は治療後 6-8 ヶ月を経過しても骨癒合が得られずに難治性骨折・偽関節に陥り、著しい QOL の低下を招く。また、交通事故や転落などの高エネルギー外傷による骨折や骨腫瘍摘出術後などでは、広範な骨欠損が生じることも少なくない。このような偽関節や骨欠損が生じた場合、現在行われている治療を行っても、治癒に至らず切断術にいたるケースも少なくなく、たとえ治癒したとしても、治療期間が長期にわたり、患者に精神的肉体的苦痛をもたらし、後遺症に苦しむことも少なくない。したがって、新たな治療法の確立は、社会的・医学的急務といえる。

一方、近年、再生医療の研究が多方面で推し進められている。京都大学山中伸弥教授らのグループが報告した人工多能生幹細胞 (induced pluripotent stem cells; iPS 細胞) は、様々な細胞に分化できる「多能性」と、細胞自身で無限に増殖する「自己増殖能」を持つことを特長とし、分化した体細胞を reprogramming することにより ES 細胞とほぼ同等の性質を再獲得した細胞である。2009 年には、脊髄損傷モデルに対して iPS 細胞が治療に有効であったと報告され、整形外科領域でも注目が高まっている。

しかし、iPS 細胞研究は未だ萌芽期であり、ヒトに投与する臨床応用へ進行可能な段階に到達するには、分化誘導技術の更なる発展が必要である。iPS 細胞は、in vitro において、胚様体とよばれる細胞塊形成を介して骨・軟骨分化誘導できることが以前より報告されている。しかし、再現性が難しい点や均質な細胞を得ることが難しい点などが問題とされてきた。本研究では、iPS 細胞による骨折治癒促進・骨再生をめざし、「胚様体形成を介さない」direct-plating 法という手法を用いて、マウス iPS 細胞をより短期間に、質が高く効率的な骨芽細胞への分化誘導法を確立することを目的とした。

2 研究方法・研究内容

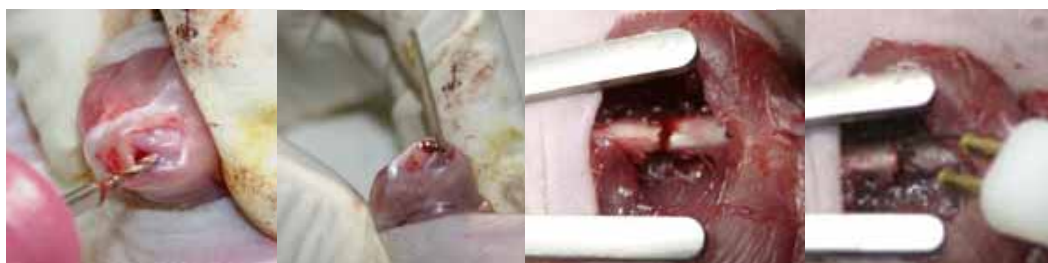
京都大学 iPS 細胞研究所の山中教授にて確立されたマウス iPS 細胞 (iPS-MEF-Ng-20D-17 および iPS-MEF-Ng-178B-5) を理研バイオリソースセンター セルバンクから提供を受け、本実験を行った。提供されたマウス iPS 細胞を DMEM + 15% FBS, NEAA, 2-mercaptoethanol からなる iPS 細胞未分化維持培地を用い、マイトマイシン C 処理されたマウス胎児由来 SNL 細胞 (LIF 産生細胞) をフィーダー細胞として、未分化維持培養を行った。数継代の後、iPS 細胞の MSC 様細胞への分化を、胚様体形成法を介さずに、direct-plating 法にて行った。具体的には、以下の通りである。未分化な iPS 細胞を trypsin-EDTA にて採取し、single cells に分離した。得られた single cells をフィーダー細胞なしのフラスコに播種し、間葉系幹細胞維持専用培地 (Mesenpro RS medium; Gibco) に FGF-2 を添加した培養液にて培養を行い、均質な fibroblastic な形態を持つ間葉系幹細胞様の細胞 (以下 direct-plated cells: DPCs) が得られるまで、継代を繰り返す。

返した。この時点で、未分化性が失われているかを確認するため、FACSにて細胞表面抗原マーカーを計測定し、さらに real-time PCRにて Oct-3/4 の発現を測定した。

得られた DPCs が生体内で移植しても癌化しないかを検証するため、DPCs を免疫不全ラット(F344/nude rat, 6 週齢)の皮下に移植し、8 週間後に採取し、組織学的評価(HE 染色)を行った。

次に、得られた DPCs の骨分化誘導を行った。骨分化誘導培地には alpha-MEM・10% FBS・dexamethasone・beta-glycerophosphate・ascorbic acid を用い、二週間の培養を行った。骨分化能は、遺伝子レベル(RT-PCR)、蛋白レベル(ALP 活性)・組織学的染色(Alizarin red S)で検討した。

続いて、凍結保存した DPCs の in vivo での骨再生能を検討した。まず、ラット難治性骨折モデルを作成し。このモデルは、まず大腿骨骨折を作成して髓内釘固定した後、骨折局所を切開・展開し、周囲軟部組織を剥離、骨膜を焼灼することで、骨折が治癒せず偽関節となるモデルで、非常に再現性が高く、これまでも偽関節の研究に広く使われてきた(下図)。動物は免疫不全ラット(F344/nude rat, 6 週齢)を用いた。



次に骨折部に 14 日間骨分化誘導させた DPCs を移植した。移植 8 週後に X 線学的評価・組織学的評価を行った。

3 研究成果

Direct-plating 法にて、未分化な iPS 細胞から均質な fibroblastic な形態を持つ DPCs (図 1)を得ることができた。この direct-plated cells の細胞表面抗原を FACS にて解析したところ、マウス間葉系幹細胞と類似した表面抗原、すなわち CD29・CD44・Sca-1 が陽性であり、球系幹細胞のマーカーが陽性であることが明らかになった(表 1)。しかし、別の MSC マーカーである CD105 は弱陽性であった。また、DPCs は iPS 細胞の未分化維持時に比べ Oct-3/4 の発現は有意に低下していることが real-time PCR にて確認された(図 2)。さらに、ヌードラットを用いた皮下移植実験では、移植した DPCs の癌化を認めなかった。以上のことより DPCs が多能性を失っていることが示唆された。

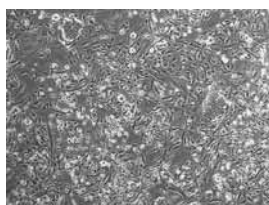


図 1

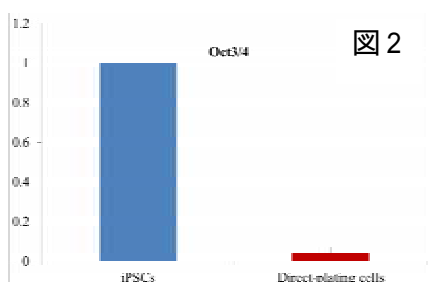


図 2

表 1

Cell surface marker	Direct-plated cells
CD29	91.7 ± 4.7
CD44	64.3 ± 13.1
Sca-1	70.0 ± 4.4
CD11b	0.2 ± 0.0
CD45	1.7 ± 0.3
CD117	3.1 ± 0.7
CD105	4.1 ± 0.7

次に DPCs を二週間、骨分化誘導培地にて培養したところ、非常に高い骨分化能を有することが Alizarin red S 染色 (図 3A)・RT-PCR (図 3B)・ALP 活性 (図 3C) にて確認された。

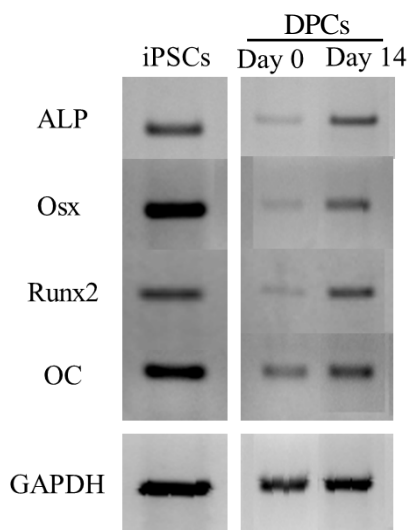


図 3A

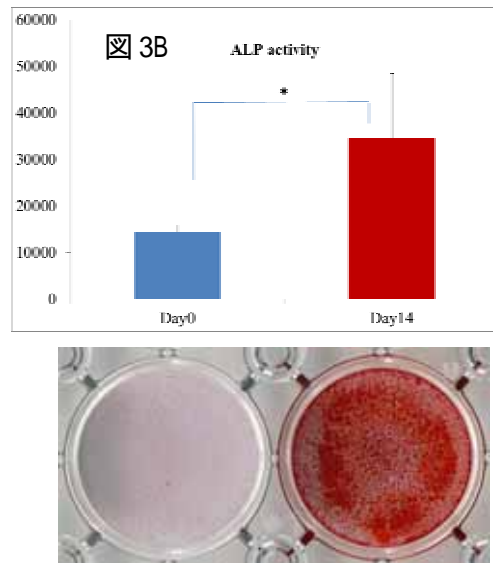


図 3C

In vivo 実験に関しては、現在進行中であるが、細胞非移植群では 8 週後で偽関節を認めるが (図 4A)、DPC 移植群では移植後 8 週後で骨癒合を認める (図 4B) 傾向があり、in vivo でも骨分化・骨再生能を有することが示唆された。しかし、凍結した DPCs の活性が不安定であり、凍結保存方法を改良することが今後の検討課題である。



図 4A



図 4B

4 研究がもたらす効果および波及効果

従来、iPS 細胞を骨に分化させる方法は、一旦、胚様体を形成させるという特殊な培養方法を行わなければいけなかった。この方法では、大量の iPS 細胞由来の骨・軟骨細胞を得ることは困難度あり、非常に煩雑であり、結果も不安定であるため、iPS 細胞を用いた骨再生への臨床応用の障壁となっていた。本研究は、胚様体形成を介さない手法を用い、効率的に iPS 細胞を骨分化誘導させた、世界初の研究である。

Direct-plating 法にて得られた、間葉系幹細胞様細胞である DPCs は、間葉系幹細胞に類似した細胞表面抗原を有し、多能性のマーカーである Oct-3/4 は失われており、さらに、ヌードラットを用いた皮下移植モデルでも癌化を起こすことはなかった。このことは、この DPCs を用いた再生医療を推し進めるに当たり、安全性が高いことを示唆している。また、DPCs を in vitro で骨分化誘導させると、非常に高い骨分化能を示すことが証

明された。In vivo における、骨分化・骨再生能に関しても、優れた能力を持つ傾向を示しており、胚様体形成を介さない”direct-plating 法”によって得られた DPCs は、優れた骨再生療法の source になりうると考えられた。

iPS 細胞による骨再生医療が将来発展すれば、重度外傷による重症骨折の治療期間は短縮され、早期の機能的な改善・社会復帰が可能となり、患者に大いなる福音をもたらすこととなる。また、骨折後に偽関節に至った患者や腫瘍切除などによる骨欠損が生じた患者への有効な治療法を開発することも可能となる。本研究により、iPS 細胞の骨分化誘導技術に関する知見が大きく広がり、ひいては臨床応用への到達が加速することが強く期待される。

なお、本研究成果は、第 1 回 AO Trauma Asia Pacific Scientific Congress (2012 年 5 月・香港) にて優秀ポスター賞を受賞し、第 3 回 TERMIS (Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society) World Congress (2012 年 9 月・ウィーン、オーストリア) にて Young investigator travel award を受賞した。