

「ヒト iPS 細胞を用いた骨再生療法の開発」

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

骨折は日常診療において頻繁に経験する外傷であり、わが国での年間骨折患者数は約 200 万人と推計されている。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（ギプス等による外固定）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、治療を行って 6~9 ヶ月を経過しても、骨癒合が得られない「偽関節」に陥り、著しい生活の質の低下を招く。また、交通事故や転落などの高エネルギー外傷による重症骨折などでは、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、追加の骨接合術や自家骨・人工骨移植術、血管柄付き骨移植術などの手術治療が通常行われる。しかし、これら現行の治療を行っても、治癒に至らず切断術などにいたるケースもあり、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、後遺症に苦しむ者も少なくない。従って、偽関節や骨欠損に対する新たな治療法の確立は、社会的・医学的急務である。

近年、細胞を用いた再生医療の研究が注目されており、幹細胞を用いた骨再生は以前から研究されている。しかし、細胞採取の侵襲性や加齢による細胞の活性の低下、対象症例が限定されるなど、臨床応用するまでにはクリアすべき課題は未だ数多く存在している。従って、より効果的で、副作用等のリスクの少ない細胞を用いた骨再生治療の研究・開発が今後も模索されるべきである。一方、2006 年、京都大学 iPS 細胞研究所の山中伸弥教授らのグループが報告した iPS 細胞は、全ての細胞に分化できる「多能性」と無限に増殖する「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多能性幹細胞である。この iPS 細胞は、患者自身の皮膚細胞などから作成可能なため ES 細胞と違い倫理的問題は生じず、拒絶反応もなく、採取の侵襲も少ないことから、再生医療の細胞資源として有望視されている。iPS 細胞の世界初の臨床研究として、加齢黄斑変性に対する自家 iPS 細胞由来網膜色素上皮移植術の第一例が、2014 年 9 月にわが国で行われたのは、記憶に新しい。偽関節や骨欠損が難治化して後遺症に苦しむ患者に対しても、iPS 細胞を用いた再生医療が応用されることが、今後、大いに期待される。しかし、骨再生領域における iPS 細胞研究は未だ萌芽期であり、臨床応用に進展可能な段階に到達するには、分化誘導技術の更なる発展や移植する iPS 細胞の安全性・有効性の確立が必要である。

本研究では、iPS 細胞による骨折治癒促進・骨再生をめざし、ヒト iPS 細胞から誘導した間葉系幹細胞 (MSC) 類似細胞を骨再生へ応用する実験を行い、ヒト iPS 細胞の骨再生能を検証することを目的とした。

2 研究方法・研究内容

山中教授によって樹立されたヒト iPS 細胞 (HPS0063 201B7 および HPS0077 454E2) を理化学研究所から供与を受け、本実験を行った。両株の iPS 細胞を、Primate ES 培地 (ReproCELL ; iPS 細胞未分化維持培地) と FGF-2 を用い、マイトマイシン C 処理された SNL 細胞を feeder 細胞として、未分化維持培養を行った。数継代後、フィーダー・フリー下で未分化な状態に維持された iPS 細胞培養への転換を行った。具体的には、培養皿を Matrigel (Corning) にて coating し、mTeSR1 培地 (STEMCELL Technologies) にて培養を行った。数継代の後、iPS 細胞の間葉系幹細胞 (MSC) 類似細胞への分化を、胚様体形成法を介さずに、

direct-plating 法にて行った。iPS colony が confluent となった時に、培地を MSC 用維持培地(DMEM + 10% FBS)に変更し、10 日間の培養を行った。得られた細胞を、coating なしの培養皿に継代し、MSC 用維持培地 + FGF-2 にて、数継代培養を行うことで、MSC 類似細胞を得た。この時点で、未分化性が失われているか、そして MSC に類似した細胞表面抗原を有しているか確認するため、FACS にて細胞表面抗原マーカーを計測定した。次に、得られた MSC 類似細胞の・軟骨・脂肪誘導を行った。各分化能は組織学的染色にて検証した。さらに骨分化能を、遺伝子レベル、蛋白レベルで評価した。

次に、上記 iPS 細胞二株より得られた MSC 類似細胞による *in vivo* での骨再生実験を行った。ラット大腿骨偽関節モデル作製し、MSC 類似細胞の偽関節部への移植実験を行った。具体的には、 1×10^7 個の MSC 類似細胞を、移植担体である Atelocollagen gel に混ぜ、移植した。移植後 12 週で骨再生能を評価した。X 線学的評価・組織学的評価を行った。

3 研究成果

<in vitro 実験>

201B7 株・454E2 株を解凍し、フィーダーありの培養を経て (図 1)、フィーダー・フリー下での維持培養を行った。iPS 細胞特有の典型的な colony が形成され (図 2)、培養の維持は良好であり、direct-plating 法へ向け、継代を繰り返し、培養皿を増やしていった。その後、direct-plating 法を行い、継代を続けることで、fibroblastic で homogeneous な形態を持つ接着細胞、すなわち MSC 類似細胞 (図 3) を得ることができた。

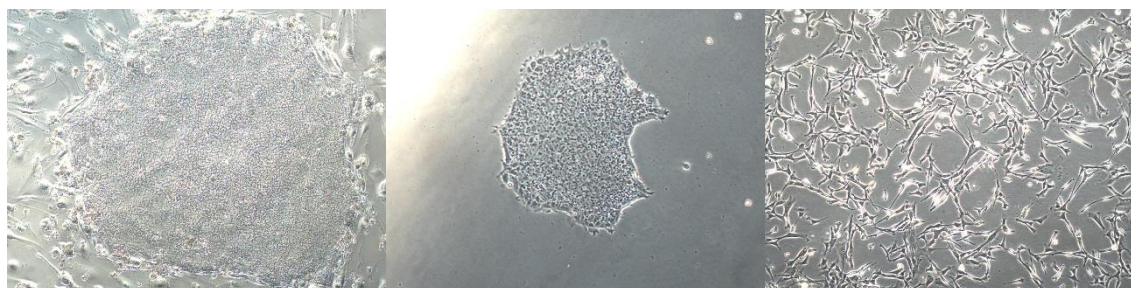


図 1

図 2

図 3

この MSC 類似細胞の表面抗原解析を FACS にて行ったところ、MSC 関連マーカーである CD29、CD44、CD105、CD166 は強陽性であり、血球系マーカーである CD31、CD34、CD45、CD133 は陰性であった (右表)。一方、iPS 細胞に特有の pluripotent marker である TRA-1-60 および TRA-1-81 はともに陰性であることから、iPS 細胞の特性である多能性はこの時点で失われていることが示唆された。次いで、同細胞の骨・軟骨・脂肪分化誘導をそれぞれ 3 週間行い、組織学的検討を行った。その結果、Alizarin red S 染色 (図 4)・Toluidine blue 染色 (図 5)・Oil-red O 染色 (図 6) で全てが強陽性であり、この MSC 類似細胞が多分化能を持つ MSC 細胞に非常に似た特性を持つ細胞であることが証明された。

Cell-surface markers	陽性率
CD29	97.6%
CD44	98.7%
CD105	96.2%
CD166	87.6%
CD31	0.7%
CD34	0.5%
CD45	0.5%
CD133	0.5%

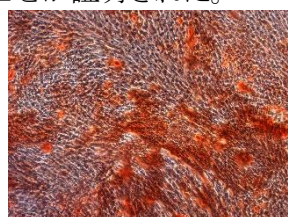


図 4

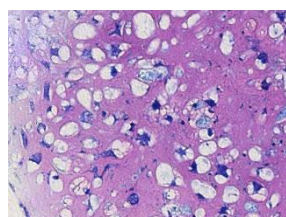


図 5

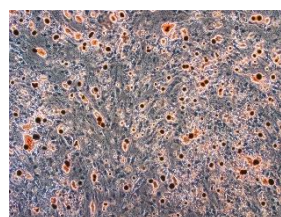


図 6

さらに骨分化能を、遺伝子レベル、蛋白レベルで評価したところ、骨分化誘導 3 週後に RT-PCR にて、骨関連遺伝子である alkaline phosphatase (ALP)・osteopontin (OPN)・bone sialoprotein (BSP)・osteocalcin (OC) いずれも強発現を呈した (図 7)。さらに、ALP 活性では培養後 14・21 日目で活性値の有意な上昇を認めた (図 8)。以上より、MSC 類似細胞が強力な骨分化能を持つことが *in vitro* で示された。

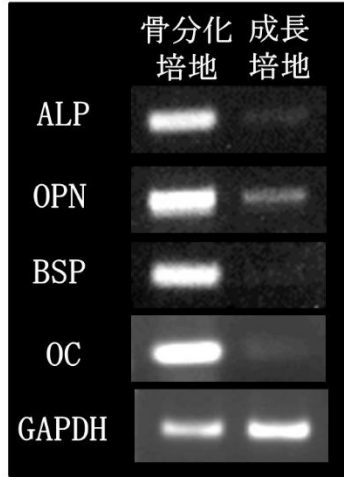


図 7

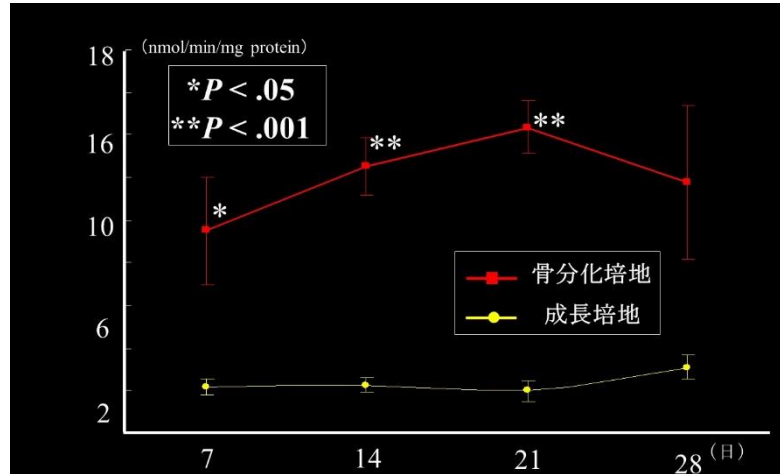


図 8

< *in vivo* 実験 >

ラット大腿骨偽関節モデルを作製後、MSC 類似細胞を Atelocollagen gel と混和し、偽関節切部に移植し、12 週間後に骨再生能を評価した。X 線評価では、細胞移植群では骨再生を認める傾向を示したが、非移植群では認めなかった (図 9)。



図 9

一方、組織学的検討においては、細胞移植群で骨の再生が確認され、remodeling が終了している傾向にあったが、非移植群では線維性組織が偽関節部に存在し骨再生は不十分であった (図 10)。なお、移植群において、癌化は認めなかった。

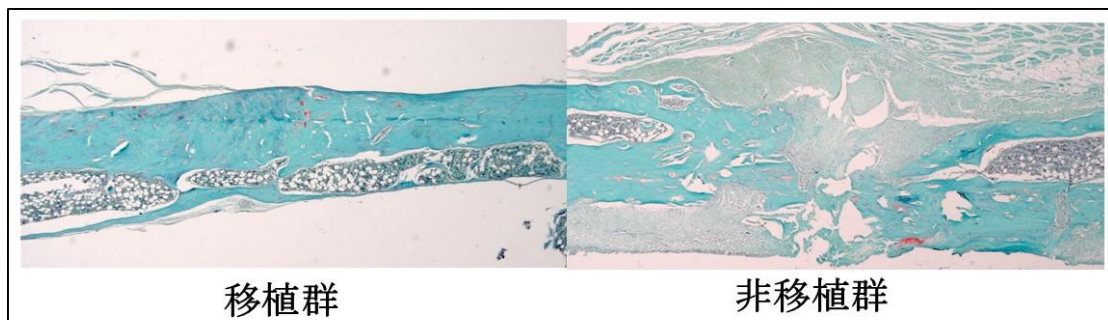


図 10

今後は動物数を増やし再現性の確認および力学的評価を行っていく予定である。

4 生活や産業への貢献および波及効果

本研究は、従来から使用されてきたが非常に煩雑である胚様体形成という手法を用いずに、direct-plating 法という手法を用いて効率的にヒト iPS 細胞を骨分化誘導させ、骨再生が生体内で可能であることを示した研究である。本研究で得られた、MSC 類似細胞は、MSC に類似した細胞表面抗原を有し、多能性のマーカーは失われており、*in vitro* で優れた骨分化能を有していた。また、ラットを用いた移植実験で癌化を起こすことはなく、偽関節部における骨再生能が示された。このことは、iPS 細胞を用いた骨再生医療を臨床で推し進めるに当たり、この iPS 細胞由来の MSC 類似細胞が、高い安全性と効率性、有効性を持つことを示唆している。

ヒト iPS 細胞による骨再生療法が確立されれば、難治性偽関節や外傷による重度骨欠損患者における骨再生が可能となり、早期の機能的な改善・社会復帰が促進され、患者に大いなる福音をもたらすこととなる。本研究結果によって、ヒト iPS 細胞の骨再生応用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期待される。