



Title	iPS細胞由来骨補填材料の開発
Author(s)	山本, 治毅
Citation	大阪大学, 2016, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/56129
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 ＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed >大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏 名 (山 本 治 毅)

論文題名 iPS細胞由来骨補填材料の開発

論文内容の要旨

【緒言】

近年の歯科インプラント治療の普及に伴い、骨増生術に用いる骨補填材の需要は高まっている。しかしながら、既存の骨補填材は非自己由来、非吸収性であり、十分な骨誘導能をもたない等の問題点が残されている。近年、効率的に骨再生を導く技術として幹細胞を用いた骨増生術が注目されており、期待されている幹細胞源の一つに iPS 細胞がある。しかしながら、iPS 細胞は移植先で腫瘍化してしまう危険性を抱えていることが問題となっている。本研究では、iPS 細胞が有する無限の増殖能および骨基質の産生能に着目し、iPS 細胞を培養増幅した上で骨芽細胞に分化誘導し、骨再生を促す成分を人為的に産生させるツールとして用いる技術を着想した。また、生きた iPS 細胞による腫瘍化を回避するため、骨成分を産生した細胞を凍結乾燥することにより不活化し、これを iPS 細胞由来骨補填材として利用することを試みた。

本研究の目的は、骨基質成分を大量に産生する iPS 細胞の培養方法を検討し、これを不活化したものを骨補填材として利用可能か否かを評価することである。

【方法】

マウス歯肉由来 iPS 細胞から誘導した胚様体を、静置培養あるいはシーソー型バイオリアクターを用いて振盪しながら骨芽細胞分化誘導培地中で 40 日間培養した。

1. 得られた iPS 細胞凝集体の大きさおよび乾燥質量を測定した。
2. 骨芽細胞特異的遺伝子 (*Runx2*, *Collagen-1a1*, *Osteocalcin*, *BSP*) の発現をリアルタイム RT-PCR 法により解析した。
3. 培養上清中に抽出された蛋白質 (IGF-1, FGF-2, VEGF-A) を ELISA 法により定量した。
4. 細胞が産生したカルシウム量を MXB 法で定量した。
5. iPS 細胞凝集体の成分をフーリエ変換型赤外分光 (FT-IR) で解析した。

また、マウス歯肉由来 iPS 細胞の胚様体を上記と同様の方法で 30 日間培養し、得られた iPS 細胞凝集体を凍結乾燥して不活化することにより iPS 細胞由来骨補填材を作製した。

6. この iPS 細胞由来骨補填材の含有成分が、マウス骨髄由来間葉系幹細胞 (BMSCs) の石灰化に及ぼす影響を Alizarin Red 染色により評価した。
7. この骨補填材に含有される蛋白質 (IGF-1, FGF-2, VEGF-A) の定量評価を ELISA 法により定量した。
8. 走査型電子顕微鏡 (SEM) を用いて、iPS 細胞由来骨補填材の表面形態を観察し、エネルギー分散型元素分析 (EDX) を用いて表層と内部の元素解析を行った。
9. iPS 細胞由来骨補填材をラット頭蓋骨に形成した直径 5 mm の欠損部に填入し、10 週間後の骨組織再生をマイクロ CT 画像解析および組織切片観察 (HE 染色) により評価した。

【結果】

1. iPS 細胞を振盪培養下で骨芽細胞へ分化誘導した結果、iPS 細胞凝集体の大きさと乾燥質量は、静置培養した場合と比較して培養 40 日間で有意に増加した (ANOVA : $P < 0.01$)。
2. 振盪培養下で骨芽細胞へ分化誘導した iPS 細胞胚様体は、静置培養した場合と比較して骨芽細胞特異的遺伝子、

特に *Runx2* と *Osteocalcin* の発現を経時的に促進した。

3. ELISA 解析の結果、iPS 細胞を振盪培養下で骨芽細胞へ分化誘導した場合には、培養上清中に分泌された IGF-1, FGF-2, VEGF-A のタンパク質量は、静置培養した場合と比較して有意に増加した (ANOVA : $P < 0.01$)。
4. 振盪培養下で骨芽細胞へ分化誘導した iPS 細胞凝集体が産生したカルシウム量は、静置培養した場合と比較して有意に増加した (ANOVA : $P < 0.01$)。
5. FT-IR 解析の結果、30 日間以上振盪培養した iPS 細胞凝集体は、骨組織に特異的な FT-IR の赤外線吸収スペクトルパターンを示した。
6. Alizarin Red 染色の結果、骨芽細胞へ 14 日間分化誘導したマウス BMSCs の石灰化は、iPS 細胞由来骨補填材の含有成分を添加することで濃度依存的に促進された。
7. ELISA 解析の結果、iPS 細胞由来骨補填材は IGF-1, FGF-2, VEGF-A の蛋白質を内部に多く含有していた。依存的に増加した。
8. SEM 観察の結果、iPS 細胞由来骨補填材の表層や内部には多くの間隙を認めた。EDX 解析の結果、iPS 細胞由来骨補填材の表層より内部の方に、より多くのリン酸カルシウムの存在が確認された。
9. ラット頭蓋骨欠損モデルの実験の結果、術後 3 週間で欠損部には iPS 細胞由来骨補填材を取り囲む新生骨の形成を認め、術後 8 週間で皮質骨様の骨組織再生が観察された。また術後 10 週間にわたり、いずれの組織切片においても腫瘍化を示す所見は認めなかった。マイクロ CT 画像解析の結果、iPS 細胞由来骨補填材を填入した骨欠損部の骨密度は経時的に増加し、術後 10 週間でラット頭蓋骨の骨密度と同等の値を示した。

【結論】

iPS 細胞を振盪培養下で骨芽細胞へ分化誘導することで、骨組織に近い成分を有する細胞凝集体を得ることができた。これを不活化した材料は、骨欠損部のボリュームを維持しながら骨置換を可能にする骨補填材として有用である可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (山 本 治 毅)			
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	大阪大学教授	矢谷 博文
	副 査	大阪大学教授	今里 聡
	副 査	大阪大学准教授	北村 正博
	副 査	大阪大学講師	高橋 雄介

論文審査の結果の要旨

本研究は、骨基質成分を大量に産生する iPS 細胞の培養方法を検討し、これを不活化したものの骨補填材としての可能性を評価したものである。

その結果、iPS 細胞を振盪培養下で骨芽細胞へ分化誘導することで、骨組織に近い成分を有する細胞凝集体を得ることができた。また、これを凍結乾燥により不活化した材料は、骨補填材として有用である可能性が示唆された。

以上の研究成果は、iPS 細胞を用いた安全な再生医療技術の発展に繋がるものと期待され、本研究は博士（歯学）の学位に値するものと認める。