



Title	シンバスタチンがマウス iPS細胞の骨組織再生および腫瘍化に及ぼす影響
Author(s)	大川, 博子
Citation	大阪大学, 2016, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/56148
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、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 (大川 博子)	
論文題名	シンバスタチンがマウスiPS細胞の骨組織再生および腫瘍化に及ぼす影響
論文内容の要旨	
【緒言】 顎骨に広範囲の欠損を生じた症例において補綴装置による十分な機能回復を得るためには、骨組織を再生する技術の開発が重要な課題となっている。近年、幹細胞、スキャフォールド、生理活性物質を組み合わせることで組織再生を目指すTissue Engineering（生体組織工学）を基盤とした再生医学の研究が進展している。人工多能性幹細胞（Induced Pluripotent Stem Cell：iPS細胞）は、無限の増殖能や多分化能、さらには細胞の凝集体である胚様体を形成する性質を有することから、三次元の細胞・組織構造体の細胞源として期待されている。しかしながら、iPS細胞を分化誘導する過程で生じる未分化iPS細胞の残存は、移植後に生体内で奇形種（テラトーマ）を形成する可能性がある。この問題を解決するため、近年、未分化iPS細胞を除去する技術に小分子化合物を応用する研究に期待が集まっている。抗コレステロール薬として一般的に使用されているシンバスタチンは、骨形成を導くBMP-2の合成促進作用を介した骨芽細胞分化の促進作用や抗癌作用を有する。本研究では、「シンバスタチンは、iPS細胞の骨芽細胞分化を促進するとともに、iPS細胞の造腫瘍性を抑制することにより、移植に安全な骨再生を可能にする」との仮説を立案した。この仮説を検証するため、本研究ではシンバスタチンがiPS細胞の骨組織再生能および造腫瘍性に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした実験を行った。 【方法】 - シンバスタチンの骨芽細胞分化促進作用を、マウス歯肉線維芽細胞由来iPS細胞（mGF-iPSC）を用いて確認した。骨芽細胞分化の評価には、骨芽細胞特異的遺伝子（<i>Runx2</i>, <i>Collagen 1a1</i>, <i>Osterix</i>, <i>Osteocalcin</i>）の発現を対象としたReal time RT-PCR解析および石灰化基質形成を検出するアリザリンレッド染色を用いた。 - 温度応答性高分子であるNIPAAmゲルを用いてmGF-iPSCの三次元細胞構造体を作製し、シンバスタチン添加骨芽細胞分化誘導培地にて分化誘導後に構造解析を行った。 - シンバスタチンが骨芽細胞分化誘導培地中の未分化mGF-iPSCの細胞数に及ぼす影響を、抗SSEA-1抗体を用いてフローサイトメトリーにて解析後、SSEA-1陰性の細胞をソーティングし、Real time RT-PCR法を用いて<i>Osteocalcin</i>遺伝子の発現を評価した。 - シンバスタチンが未分化mGF-iPSCのアポトーシスに及ぼす影響を、AnnexinV, Caspase3/7ならびにミトコンドリア膜電位の変化を示すマーカーであるRhodamine 123の発現についてフローサイトメトリーを用いて解析した。 - mGF-iPSCの三次元細胞構造体をシンバスタチン添加骨芽細胞分化誘導培地にて分化誘導後、免疫不全マウス背皮下に移植した。飼育28日後の腫瘍抑制能および異所性の骨形成能をヘマトキシリン・エオジン（HE）染色により組織学的に評価した。 - mGF-iPSCまたはGFP恒常発現マウスiPS細胞（mGFP-iPS）から作製した三次元細胞構造体を、シンバスタチン含有骨芽細胞分化誘導培地にて分化誘導後、免疫不全ラット頭蓋骨に作製した直径5 mmの骨欠損部に移植した。術後28	

日の移植部位の組織から作製した切片を、HE染色、osteocalcinまたはsclerostinの免疫蛍光染色にて組織学的に評価した。また、移植部位の頭蓋骨を実験動物用マイクロCTで撮影し、撮影画像から欠損部に再生した骨組織の骨密度を計測した。

【結果】

1. シンバスタチン (0.1-10 μM) は、mGF-iPSCsの*Runx2*, *Collagen 1a1*, *Osterix*, *Osteocalcin*遺伝子の発現および細胞外基質の石灰化を濃度依存的に有意に促進した ($P < 0.05$) 。
2. シンバスタチンを用いて分化誘導したiPS細胞構造体の内部は石灰化し、表層部には生細胞が多く存在した。
3. 骨芽細胞への分化誘導過程で0.1および1 μM のシンバスタチンは、SSEA-1陽性を示す未分化iPS細胞の細胞数を減少させる一方で、SSEA-1陰性を示す細胞における*Osteocalcin*遺伝子の発現を濃度依存的に有意に促進した ($P < 0.01$) 。
4. 1 μM のシンバスタチンは、SSEA-1陽性細胞のCaspase3/7の活性およびミトコンドリア膜電位の消失を促進し、AnnexinV陽性アポトーシス細胞の割合を有意に増加させた ($P < 0.05$) 。
5. シンバスタチン (0.1-1 μM) を用いて作製したmGF-iPS細胞構造体を移植したマウス背皮下には腫瘍形成を認めず、移植体の周囲には骨様組織の形成を認めた。
6. ラット頭蓋骨欠損モデルにおいて、シンバスタチン (1 μM) を用いて作製したmGF-iPSCs構造体を移植した結果、移植4週後に腫瘍形成は認めず、皮質骨と同等の骨密度を有する骨組織の再生を認めた。また、シンバスタチン (10 μM) を用いて作製したmGFP-iPSCs構造体を移植した部位に形成された新生骨の辺縁には、GFPおよびosteocalcin双方に陽性を示す骨芽細胞を認めた。さらに、移植体周囲に形成された皮質骨様の再生骨にはGFPおよびsclerostin双方に陽性を示す骨細胞の存在を認めた。

【結論】

1. シンバスタチンは、マウスiPS細胞の骨芽細胞分化を促進する。
2. シンバスタチンを用いてマウスiPS細胞構造体を骨芽細胞に分化誘導することで、石灰化した領域を骨芽細胞が取り囲んだ細胞構造体の作製が可能である。
3. シンバスタチンは、マウスiPS細胞の骨芽細胞分化誘導の過程で、未分化なiPS細胞におけるアポトーシスを誘導する。
4. シンバスタチンを用いて作製したマウス石灰化iPS細胞構造体は、移植先におけるiPS細胞の造腫瘍性を抑制しながら骨欠損部の再生を可能にする。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (大 川 博 子)		
	(職)	氏 名
論文審査担当者	主 査	教授 矢谷 博文
	副 査	教授 村上 伸也
	副 査	准教授 波多 賢二
	副 査	講師 伊藤 祥作

論文審査の結果の要旨

本研究は、シンバスタチンが iPS 細胞の骨組織再生能および造腫瘍性に及ぼす影響について検討したものである。

その結果、シンバスタチンは、マウス iPS 細胞を骨芽細胞に分化誘導する過程において、未分化 iPS 細胞に対してアポトーシスを促進することで移植体への未分化 iPS 細胞の残留を減少させる一方で、分化細胞における骨芽細胞分化を促進することによって造腫瘍性を抑制した骨組織再生を可能することが示唆された。

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。