

Title	Promoting effect of 1,25(OH) <sub>2</sub> vitamin D <sub>3</sub> in osteogenic differentiation from induced pluripotent stem cells to osteocyte-like cells
Author(s)	加藤, 宏
Journal	歯科学報, 116(5): 414-415
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10130/4152">http://hdl.handle.net/10130/4152</a>
Right	
Description	博士(歯学)・第2088号(甲第1301号)・平成27年3月31日

氏名(本籍)	加藤 宏 (静岡県)
学位の種類	博士(歯学)
学位記番号	第 2088 号(甲第 1301 号)
学位授与の日付	平成27年3月31日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	Promoting effect of 1, 25(OH) <sub>2</sub> vitamin D <sub>3</sub> in osteogenic differentiation from induced pluripotent stem cells to osteocyte-like cells
掲載雑誌名	Open Biology doi : 10. 1098/rsob. 140201
論文審査委員	(主査) 齋藤 淳教授 (副査) 柴原 孝彦教授 片倉 朗教授 東 俊文教授 山本 仁教授

## 論文内容の要旨

### 1. 研究目的

iPS細胞は無限増殖能および多能性を有することから再生医療における材料としての利用だけでなく、創薬への応用が期待されている。現在ではiPS細胞から様々な細胞が誘導され、薬剤の評価系に応用されている。われわれは、ヒトiPS細胞から均一な骨芽細胞を分化誘導・分離する効率的な方法を開発し、報告を行ってきた。ビタミンDは古くから骨粗鬆症の治療薬として用いられてきたが、細胞への直接的な作用については未解明な点が多く残っている。本研究ではヒトiPS細胞から分化段階が異なる骨芽細胞を得られることを示し、それらに対し骨粗鬆治療薬である活性型ビタミンD<sub>3</sub>を作用させ、その薬効を評価した。

### 2. 研究方法

iPS細胞は理研の201B7細胞株を使用し、培地は骨分化誘導培地(OBM)を用いた。試薬には活性型ビタミンD<sub>3</sub>製剤を用いた。iPS細胞より胚様体(EB)を形成した後、酵素処理にてシングルセル化した。その後OBMにて培養を開始し、フローサイトメトリーにより組織非特異的アルカリホスファターゼ(TNAP)陽性細胞を選択的に回収し、骨芽細胞マーカーの発現を評価した。TNAP陽性細胞はosteolineageな細胞であり、我々はiPS osteoprogenitor (iPSop)細胞と定義している。回収したiPSop細胞には活性型ビタミンD<sub>3</sub>製剤を作用させ、骨芽細胞・骨細胞分化マーカーの評価を行った。また、比較対象として骨髄間葉系幹細胞(MSC)においても、同方法を用い、評価を行った。

### 3. 研究成績および結論

TNAPは通常のiPS細胞・EBで高発現しているが、EBを酵素処理により単離、接着培養すると発現の低下を認めた。その後単離・接着させた細胞をOBMで培養を開始するとTNAPの発現が徐々に増加し、14日間の培養にて約80%ものiPSop細胞が得られることがわかった。iPSop細胞のOBM培養期間における骨芽細胞分化マーカーの発現については、培養14日目にてTNAPの有意な発現上昇を認めた。RUNX2の発現は10日目に発現のピークを認め、Osterixに関しては、培養14日目に発現の上昇を認めた。これらにより、OBMによる誘導にて、iPSop細胞が経時的に骨芽細胞分化誘導されていることが示唆された。分化段階が異なる状態での活性型ビタミンD<sub>3</sub>への反応性の検討では、OBM培養を14日行ったiPSop細胞では、活性型ビタミン

D<sub>3</sub>投与によりタイプIコラーゲン、Osteocalcin(OCN)の発現上昇を認め、TNAP、RUNX 2については発現の低下を認めた。骨芽細胞分化後期マーカーであるOCNの著明な発現は、iPSop細胞が活性型ビタミンD<sub>3</sub>により、速やかに骨芽細胞分化後期へ分化促進されたことが示唆された。MSCと比較するとiPSopではTNAP、RUNX 2について発現低下を認めるため、より骨芽細胞分化が早いと考えられた。また、活性型ビタミンD<sub>3</sub>による誘導にてiPSop細胞では骨細胞マーカーであるDMP-1、FGF-23、MEPEの発現を認め、石灰化においても促進作用が認められることより骨細胞初期への移行も示唆された。

iPSop細胞は活性型ビタミンD<sub>3</sub>投与により速やかな骨芽細胞分化後期・骨細胞初期への移行を示した。iPS細胞はMSCと比較すると活性型ビタミンD<sub>3</sub>に対する反応性が良好である可能性が示唆された。iPSop細胞は骨芽細胞・骨細胞への分化を促進あるいは抑制する薬剤のスクリーニングに用いることができる可能性が示唆された。

### 論 文 審 査 の 要 旨

iPS細胞は再生医療のみならず創薬への応用が期待され、近年その有用性が報告されている。われわれはiPS細胞から骨芽細胞への分化誘導方法を確立し、本論文はそれらに対し骨代謝疾患治療薬である活性型ビタミンD<sub>3</sub>製剤を作用させ、細胞への直接的な作用について報告したものである。ビタミンDは未だに骨系統細胞への直接的な作用については未解明な点が多いが、本研究において細胞に対する直接的なアナボリック作用が示され、活性型ビタミンD<sub>3</sub>投与により分化段階としては骨細胞初期までの速やかな移行が示された。

本審査委員会では、(1)骨芽細胞の分化段階表現について、(2)なぜMSCを比較対象として選択したのか、(3)薬剤の作用期間の設定、(4)iPSとMSCでの活性型ビタミンD<sub>3</sub>への反応性の違いはどのようなメカニズムが想定されるか、について質疑がなされた。

(1)について本論文では骨芽細胞の分化段階としてearly phase, late phase, さらに分化が進んだ状態としてmatureという表現を使用している。(2)については骨欠損に対する再生医療においては古くからMSC(骨髄間葉系幹細胞)が用いられているため、比較対象とした。また、MSCは年齢とともに細胞数、増殖能が低下することが知られており、その代替材料としてiPS細胞が着目されている。(3)については過去の文献を参照しつつ、先行実験において活性型ビタミンD<sub>3</sub>作用期間を3, 6, 9, 12日と作用させ、反応が著明であった6, 12日の2点を設定した。(4)についてはiPS細胞とMSCにおけるメチレーション等のエピジェネティクスな変化の違いに起因することが想定され、今後、ビタミンD受容体の発現の違いやゲノム上のビタミンD応答配列の変化についても評価を行いたい、との回答を得た。また、英文表記、図表の修正等についての指摘が行われた。論文内容及びその質疑により概ね妥当な回答が得られたことにより、本研究は今後の歯学の進歩、発展に寄与するところ大であり、学位授与に値すると判定した。