

Title	iPS 細胞から骨細胞様細胞への分化誘導における活性型ビタミンD3の促進作用
Author(s)	加藤, 宏
Journal	歯科学報, 117(4): 323-326
URL	<a href="http://doi.org/10.15041/tdcgakuho.117.323">http://doi.org/10.15041/tdcgakuho.117.323</a>
Right	
Description	

## 解説 (学位論文 解説)

iPS 細胞から骨細胞様細胞への分化誘導における  
活性型ビタミン D<sub>3</sub>の促進作用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加藤 宏  
Hiroshi Kato

東京歯科大学口腔顎顔面外科学講座非常勤講師，池上総合病院歯科口腔外科医員  
略歴 2010年新潟大学歯学部卒業，2015年東京歯科大学大学院歯学研究科(口腔  
外科学専攻)修了・博士(歯学)の学位取得(東京歯科大学)，同年東京歯科大学水  
道橋病院口腔顎顔面外科学講座レジデント，2016年4月より現職に至る。  
研究テーマ：ヒト iPS 細胞を用いた低侵襲骨再生療法の開発

キーワード：iPS 細胞，ビタミン D，骨芽細胞，骨細胞，創薬評価

Key words：induced pluripotent stem cells, vitamin D, osteoblasts, osteocytes, drug assessment  
(2017年3月6日受付，2017年6月23日受理，*歯科学報* 117：323-326，2017.)<http://doi.org/10.15041/tdcgakuho.117.323>

## はじめに

iPS 細胞は再生医療における材料としての利用だけでなく，疾患の解明や創薬への応用が試みられている<sup>1-4</sup>。さらに現在では患者由来の iPS 細胞から様々な細胞が誘導され，疾患に応じた治療薬の評価系への応用も報告されている<sup>5-7</sup>。われわれは，ヒト iPS 細胞から効率的に骨芽細胞・骨細胞様細胞まで分化誘導する方法を開発してきた(図1)<sup>8</sup>。近年では骨細胞の骨リモデリングにおける機能が明らかになってきており，その重要性から骨細胞が骨代謝疾患における治療薬としてのターゲットとなっている<sup>9,10</sup>。

骨代謝疾患の代表である骨粗鬆症はその患者数が世界において2億人以上とされている重大な健康問題である<sup>11</sup>。加えて，骨粗鬆症患者数は年齢層が上がるほど多くなるため，高齢化社会を迎えた我が国においては，治療薬開発は重要である<sup>12-14</sup>。骨粗鬆症は骨形成と骨吸収の不均衡により生じ<sup>15-17</sup>，治療薬としては骨形成促進剤と骨吸収阻害剤に分類され，ビスホスホネート(BP)製剤を代表とする後者が治療薬として最も多く用いられてきた<sup>14,15,18</sup>。し

かしながら，長期のBP製剤服用により，薬剤性の顎骨骨髄炎・骨壊死が生じることが報告され，特にわれわれの日々行う歯科治療がその発症リスクを高める可能性があることがわかっている<sup>19-22</sup>。そのため，骨形成促進剤の開発は必修であり，骨芽細胞・骨細胞に対するアナボリック作用を有する薬剤の開発が期待される。

ビタミンDは骨形成促進作用を有することから古くから骨粗鬆症の治療薬として用いられ，その有用性が報告されてきた<sup>23</sup>。しかしながら，細胞直接的作用については未解明な点が多く残っている<sup>24-27</sup>。そこで本研究は，われわれが報告を行ってきたヒト iPS 細胞の骨分化誘導・分離法を用い，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

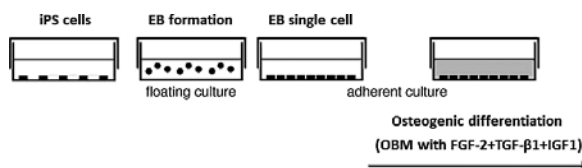


図1 ヒト iPS 細胞の骨芽細胞誘導法

Ochiai-Shino H, Kato H, Sawada T, Onodera S, Saito A, Takato T, Shibahara T, Muramatsu T, Azuma T. PLoS One, 2014 Jun, 9(6) : e99534. より改変

示すとともに、創薬応用の観点から、骨粗鬆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検討を行った。

### 材料および方法

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た(図2)。得られたTNAP陽性細胞については、非上皮系幹細胞としての形質を持つ細胞であるので、骨芽細胞マーカーの発現をreal-time PCR法により検討した。骨芽細胞マーカーはI型コラーゲン(COL1A1)、組織非特異的アルカリホスファターゼ(TNAP)、オステオカルシン(OCN)、ランクス2(RUNX2)、オステリックス(OSX)を使用した。TNAP陽性細胞は、非上皮系幹細胞かつ骨芽細胞マーカー陽性のosteolineage細胞であるので、これをiPS osteoprogenitor(iPSop)細胞と定義した<sup>8)</sup>。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。骨細胞マーカーについてはRT-PCR法により評価し、DMP-1、FGF-23、MEPE、PDPNを使用した。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。石灰化能

についてはアリザリンレッド染色を用いて評価を行った。

### 結果および考察

#### 1. iPSop細胞の誘導

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で培養することで著明にTNAPの発現が再増加することがわかった。14日間の骨芽細胞誘導期間においてCOL1A1、TNAPは経時的な発現増加を認め、一方、RUNX-2は10日目に発現がピークとなった後減少し、代わってOSXが10日目から14日目にかけて上昇した。本結果によりiPSop細胞がOBM培養にて経時的に骨芽細胞分化していることが示され、分化段階の異なる状態の骨芽細胞が得られることが分かった。

#### 2. iPSop細胞における活性型ビタミンD<sub>3</sub>の促進作用

14日間のOBM誘導により得られたiPSop細胞に活性型ビタミンD<sub>3</sub>を6日間作用させると、COL1A、OCNの発現増加とTNAP、RUNX2の発現低下を認めた。特に骨芽細胞分化後期マーカーであるOCN発現の著しい上昇は、活性型ビタミンD<sub>3</sub>がiPSop細胞を骨芽細胞分化後期へ分化促進する効果があることを示唆した。これらの作用は濃度・時間依存性に変化することが示唆された。

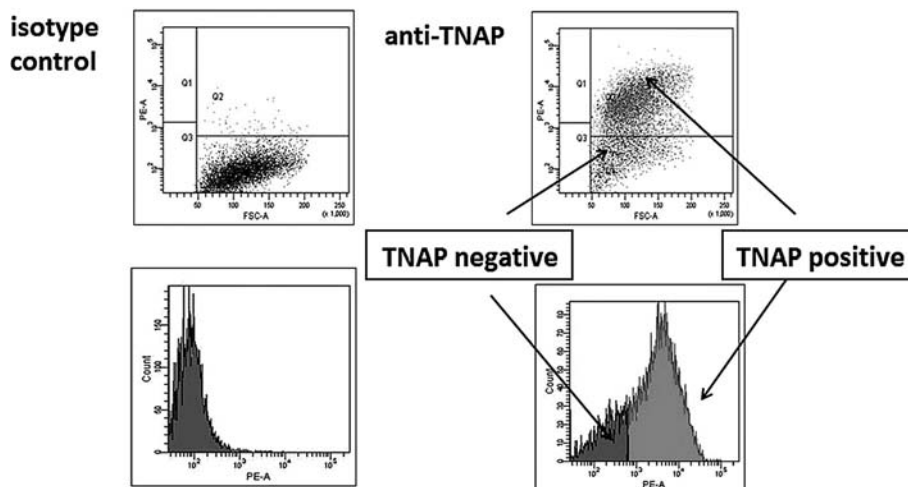


図2 フローサイトメトリーによるTNAP陽性細胞選択

### 3. iPSoP 細胞の活性型ビタミン D<sub>3</sub>に対する感受性

iPS 由来骨芽細胞 (iPSop 細胞) と MSC 由来骨芽細胞 (MSCop 細胞) を用いて、活性型ビタミン D<sub>3</sub> に対する感受性を検討したところ、骨芽細胞マーカーの発現動態により、iPSop の方が骨芽細胞分化が早いと考えられ、活性型ビタミン D<sub>3</sub> に対する感受性の良好さが示唆された。また、活性型ビタミン D<sub>3</sub> の作用時期としては誘導初期ではなく14日間誘導したもののほうが、時期として適当と考えられた。

### 4. iPSoP 細胞の活性型ビタミン D<sub>3</sub> 作用による骨細胞マーカー発現

14日間の活性型ビタミン 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 の発現を認めた。また、アリザリンレッド染色により、石灰化においても促進作用が認められた。これらは iPSoP 細胞が骨細胞として初期の状態へ移行していることを示唆している。

本研究により、活性型ビタミン D<sub>3</sub> は iPSoP 細胞由来骨芽細胞 (iPSop 細胞) に対し直接的なアナボリック作用を有することが示された。活性型ビタミン D<sub>3</sub> の作用時期としては骨芽細胞誘導初期ではなく、14日間の誘導後に作用させる方が反応が優位であることが示された。しかしながらビタミン D の作用期間・量については未だ未解明な点も多く、今後の追加検討を要する。iPSop 細胞は MSC 由来骨芽細胞と比較すると、速やかな骨芽細胞分化後期・骨細胞初期への移行を示し、活性型ビタミン D<sub>3</sub> に対する感受性の良好さが認められた。われわれの iPSoP 細胞の骨芽細胞誘導法では骨細胞マーカーが発現するのに40日間を有していたことを勘案すると、活性型ビタミン D<sub>3</sub> の有用性が示され、早期に骨細胞を得られるとことで今後の骨細胞研究の推進にも期待できる。加えて、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評価に用いることができる可能性が示唆された。特に、骨代謝疾患に対する治療薬のハイスループットスクリーニングにおけるヒト細胞を用いた *in vitro* 評価系の構築に応用されることを期待したい。

## まとめ

活性型ビタミン D<sub>3</sub> を iPSoP 細胞に作用させることで、骨芽細胞のみならず骨細胞まで分化誘導を促進することが示された。つまり活性型ビタミン D<sub>3</sub> が iPSoP 細胞由来骨芽細胞に対し細胞直接的なアナボリック作用を有することが示され、その感受性の高さが示された。

## 文献

- 1) Inoue H, Yamanaka S : The use of induced pluripotent stem cells in drug development. *Clin Pharmacol Ther*, 89 : 655-661, 2011.
- 2) Yahata N, Asai M, Kitaoka S, Takahashi K, Asaka I, Hioki H, Kaneko T, Maruyama K, Saido TC, Nakahata T, Asada T, Yamanaka S, Iwata N, Inoue H : Anti-A $\beta$  drug screening platform using human iPSoP cell-derived neurons for the treatment of Alzheimer's disease. *PLoS One*, 2011, 6 (9) : e 25788. DOI : 10.1371/journal.pone.0025788.
- 3) Saito A, Ochiai H, Okada S, Miyata N, Azuma T : Suppression of Lefty expression in induced pluripotent cancer cells. *FASEB J*, 27 : 2165-2174, 2013.
- 4) Ebert AD, Svendsen CN : Human stem cells and drug screening : opportunities and challenges. *Nat Rev Drug Discov*, 9 : 367-372, 2010.
- 5) Bilousova G, Jun du H, King KB, De Langhe S, Chick WS, Torchia EC, Chow KS, Klemm DJ, Roop DR, Majka SM : Osteoblasts derived from induced pluripotent stem cells form calcified structures in scaffolds both *in vitro* and *in vivo*. *Stem Cells*, 29 : 206-216, 2011.
- 6) Tashiro K, Inamura M, Kawabata K, Sakurai F, Yamanishi K, Hayakawa T, Mizuguchi H : Efficient adipocyte and osteoblast differentiation from mouse induced pluripotent stem cells by adenoviral transduction. *Stem Cells*, 27 : 1802-1811, 2009.
- 7) Li F, Bronson S, Niyibizi C : Derivation of murine induced pluripotent stem cells (iPS) and assessment of their differentiation toward osteogenic lineage. *J Cell Biochem*, 109 : 643-652, 2010.
- 8) Ochiai-Shino H, Kato H, Sawada T, Onodera S, Saito A, Takato T, Shibahara T, Muramatsu T, Azuma T : A novel strategy for enrichment and isolation of osteoprogenitor cells from induced pluripotent stem cells based on surface marker combination. *PLoS One*, 2014 Jun, 9(6) : e99534. DOI : 10.1371/journal.pone.0099534.
- 9) Pajevic P D : Review Article Recent Progress in Osteocyte Research. *Endocrinol Metab*, 28 : 255-261, 2013.
- 10) Bonewald L F : The amazing osteocyte. *J Bone Miner Res*, 26 : 229-238, 2011.
- 11) Cooper C, Campion G, Melton LJ 3rd : Hip fractures in the elderly : a world-wide projection. *Osteoporos Int*, 2 : 285-289, 1992.
- 12) Yoshimura N, Muraki S, Oka H, Mabuchi A, En-Yo Y, Yoshida M, Saika A, Yoshida H, Suzuki T, Yamamoto S, Ishibashi H, Kawaguchi H, Nakamura K, Akune T : Prevalence of knee osteoarthritis, lumbar spondylosis,

- and osteoporosis in Japanese men and women: the research on osteoarthritis/osteoporosis against disability study. *J Bone Miner Metab*, 27 : 620–628, 2009.
- 13) Yoshimura N, Muraki S, Oka H, Kawaguchi H, Nakamura K, Akune T : Cohort profile : research on Osteoarthritis/Osteoporosis Against Disability study. *Int J Epidemiol*, 39 : 988–995, 2010.
  - 14) Sambrook P, Cooper C : Osteoporosis. *Lancet*, 367 : 2010–2018, 2006.
  - 15) Rachner TD, Khosla S, Hofbauer LC : Osteoporosis : now and the future. *Lancet*, 377 : 1276–1287, 2011.
  - 16) Yoshimura N, Hashimoto T, Sakata K, Morioka S, Kasamatsu T, Cooper C : Biochemical markers of bone turnover and bone loss at the lumbar spine and femoral neck : the Taiji study. *Calcif Tissue Int*, 65 : 198–202, 1999.
  - 17) Iki, M, Akiba T, Matsumoto T, Nishino H, Kagamimori S, Kagawa Y, Yoneshima H : Reference database of biochemical markers of bone turnover for the Japanese female population. Japanese Population-based Osteoporosis (JPOS) Study. *Osteoporos Int*, 15 : 981–991, 2004.
  - 18) Black DM, Thompson DE, Bauer DC, Ensrud K, Musliner T, Hochberg MC, Nevitt MC, Suryawanshi S, Cummings SR : Fracture risk reduction with alendronate in women with osteoporosis : the Fracture Intervention Trial. FIT Research Group. *J Clin Endocrinol Metab*, 85 : 4118–4124, 2000.
  - 19) Gupta S, Gupta H, Mandhyan D, Srivastava S : Bisphosphonates related osteonecrosis of the jaw. *Natl J Maxillofac Surg*, 4 : 151–158, 2013.
  - 20) Sharma D, Ivanovski S, Slevin M, Hamlet S, Pop TS, Brinzaniuc K, Petcu EB, Miroiu RI : Bisphosphonate-related osteonecrosis of jaw (BRONJ) : diagnostic criteria and possible pathogenic mechanisms of an unexpected anti-angiogenic side effect. *Vasc. Cell*, 5(1) : 1, 2013. DOI : 10.1186/2045–824X–5–1.
  - 21) Marx RE : Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws : a growing epidemic. *J Oral Maxillofac Surg*, 61 : 1115–1117, 2003.
  - 22) Khosla S, Burr D, Cauley J, Dempster DW, Ebeling PR, Felsenberg D, Gagel RF, Gilsanz V, Guise T, Koka S, McCauley LK, McGowan J, McKee MD, Mohla S, Pendrys DG, Raisz LG, Ruggiero SL, Shafer DM, Shum L, Silverman SL, Van Poznak CH, Watts N, Woo SB, Shane E ; American Society for Bone and Mineral Research : Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw : report of a task force of the American Society for Bone and Mineral Research. *J Bone Miner Res*, 22 : 1479–1491, 2007.
  - 23) Das S, Crockett JC : Osteoporosis – a current view of pharmacological prevention and treatment. *Drug Des Devel Ther*, 7 : 435–448, 2013.
  - 24) van Driel M, Pols HA, van Leeuwen JP : Osteoblast differentiation and control by vitamin D and vitamin D metabolites. *Curr Pharm Des*, 10 : 2535–2555, 2004.
  - 25) Geng S, Zhou S, Bi Z, Glowacki J : Vitamin D metabolism in human bone marrow stromal (mesenchymal stem) cells. *Metabolism*, 62 : 768–777, 2013.
  - 26) Zhou S, LeBoff MS, Glowacki J : Vitamin D metabolism and action in human bone marrow stromal cells. *Endocrinology*, 151 : 14–22, 2010.
  - 27) Woeckel VJ, Bruedigam C, Koedam M, Chiba H, van der Eerden BCJ, van Leeuwen JPTM : 1 $\alpha$ , 25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and rosiglitazone synergistically enhance osteoblast-mediated mineralization. *Gene*, 512 : 438–443, 2013.

本論文は、下記学位論文の内容を解説した。

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. Kato H, Ochiai-Shino H, Onodera S, Saito A, Shibahara T, Azuma T. *Open Biol*. 2015 Feb ; 5 (2). pii : 140201. Doi : 10.1098/rsob.140201.

連絡先 : 〒101-0061 東京都千代田区三崎町2-9-18  
東京歯科大学口腔顎顔面外科学講座 加藤 宏