

## 研究区分：H25 年度学内研究助成 重点研究（ユニット研究）

## タイトル：光る iPS 細胞による腱細胞分化誘導と移植治療

氏 名 鳴瀬 善久 【所属】自然科学ユニット

## 【目的】

スポーツ外傷で最も多いのは、足関節、手指部や膝の捻挫や骨折である。とくにその部位でみられる腱損傷・腱断裂は、治療期間も長く完治が極めて難しく、新しい治療法が望まれている。近年、再生医療研究が注目され、iPS 細胞などに代表される多能性幹細胞から腱細胞を作製することができれば、損傷した腱組織に新たに作製した腱細胞を移植し修復させ、治療に大きく貢献できると考えられる。これまで我々は、再生医療の移植実験で移植細胞がどのような細胞に分化しても特異的に追跡調査できるよう全身に EGFP を発現するマウスから多分化能を持つ EGFP-iPS 細胞株を樹立し、腱細胞へ分化誘導できることを遺伝子レベルで解析してきました。今研究では、腱損傷の治癒過程に関与すると考えられている細胞成長因子の FGF-2 や BMP や薬剤などを用いて、iPS 細胞から効率的に腱細胞へ分化誘導できるか、腱分化マーカーの MKX や TNMD タンパク質の発現レベルを指標に検討を行い、腱細胞移植治療の基盤を確立することを目的とした。

## 【方法】

## ・光 iPS 細胞株（EGFP-iPS 細胞）の培養

EGFP-iPS 細胞株は、mitomycin C 処理したフィーダー細胞の SNL76/7 の細胞上に播種し、幹細胞増殖培地に 1000units/ml LIF を加えたものを用いて培養した。コロニーがある程度の大きさになったら、0.25% trypsin/1 mM EDTA 処理により EGFP-iPS 細胞株を剥がし、 $4 \times 10^5$  cells/ $\phi$  3.5cm になるようにフィーダー細胞上に再播種した。以後この操作を繰り返し、未分化状態を維持した。

## ・EB(embryoid body)形成

未分化状態を維持した EGFP-iPS 細胞株を 96well U 底プレート 1well 中に  $2 \times 10^3$  cells ずつ播き、2 日間培養し EB 形成を行い、増殖因子による分化誘導実験を行った。

## ・腱分化誘導の検討

腱損傷の治癒過程で損傷部位から FGF-2, TGF- $\beta$ , BMP などが産生されており、腱再生に重要であることが報告されている。そのため、まず EB 形成の 2 日後、細胞の増殖分化因子である FGF-2, BMP-4 用いて分化誘導を行った。それぞれの因子を 0 ng/ml, 10 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml の濃度で 3 日間培養した。その後ゼラチンコーティングした 8 well ガラスプレートに 1 EB/well ずつ播種し、それぞれ 7 日後、17 日後、22 日後に MKX（腱細胞分化初期マーカー）、TNMD（腱細胞分化成熟マーカー）、GATA4（中胚葉マーカー）に対する抗体を用いて免疫蛍光染色を行い腱細胞の分化を検討した。

## 【結果】

iPS 細胞から EB 形成後、分化誘導因子である FGF-2 または BMP-4 を投与し、分化誘導を行い免疫蛍光染色法で細胞を観察した。その結果、中胚

葉分化マーカーの GATA4 は、培養 7 日目で多くの細胞の核に免疫陽性を示し、iPS 細胞から中胚葉系の細胞へ分化していることが分かった。腱分化マーカーにおいて、腱細胞の初期マーカーである MKX と腱細胞の成熟分化マーカーの TNMD は、培養 17 日目で免疫陽性細胞が多くなり（図 1A, B）、また、どちらの因子も濃度依存的に免疫陽性細胞が増加し、BMP-4 と FGF-2 で比較すると FGF-2 100ng/ml の濃度で免疫陽性細胞が最も多かった（図 1A）。

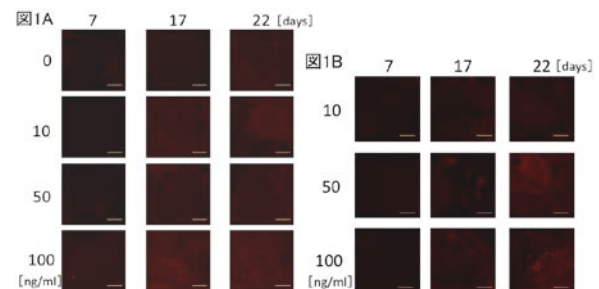


図 1. 腱細胞成熟分化マーカーの TNMD における蛍光染色像。図 1A は FGF-2、図 1B は BMP-4 での腱分化誘導。図の上段数字は培養日数、左側数字は濃度を示した。スケールは 50  $\mu$ m。

## 【考察】

以前我々は、アキレス腱組織切断端から腱再生に関わる分子が産生されていると仮定し、iPS 細胞とアキレス腱組織の共培養が腱分化に影響するか検討し、遺伝子発現レベルで腱分化マーカーの *Scx*, *Mkx*, *Col1a2*, *Col3a1* が培養 17 日目で上昇し、iPS 細胞が腱細胞へと分化誘導されている結果を得ていた。今回、腱損傷の治癒過程に関与する因子の FGF-2 や BMP-4 を用い、iPS 細胞からより効率的に腱細胞へ分化誘導できるか検討した。結果、腱組織のマーカーである MKX, TNMD の免疫陽性細胞が経時的に増加することが示された。このことから、これらの因子を用いて iPS 細胞から腱細胞へ分化誘導する事が可能であることが示された。また、FGF-2 の 100ng/ml では、低濃度に比べてより多くの TNMD 免疫陽性細胞を確認できたことから、濃度依存的に分化誘導を行っていることが示唆された。Phil Campbell らは、間葉系幹細胞株の C3H10T1/2 細胞や C2C12 細胞で FGF-2 濃度依存的に腱分化誘導することを報告したことから、我々の研究結果も妥当であると考えられた。

以上のことから、FGF-2 は iPS 細胞から腱細胞分化を積極的に誘導していることが示唆された。今後は、iPS 細胞から分化誘導された腱細胞を腱断裂部へ移植して腱再生を検討する予定である。

## 【研究発表】

- 1) 松本由加利, 安芸洗平, 谷遼典, 水田絢子, 尾崎修平, 光信明日香, 都築英明, 松浦忠夫, 鳴瀬善久: iPS 細胞における腱細胞分化誘導の検討. 平成 25 年度全学研究ポスターワークショップ, 2013. 10. 18