

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士(医学) 氏名 本谷 和俊

学位論文題名

人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) からの軟骨細胞分化誘導と糖鎖解析を用いた新規バイオマーカーの探索

(Chondrogenic differentiation of mouse induced pluripotent stem cells (iPSCs) and identification of differentiation biomarkers for the chondrogenic differentiation of iPSCs using glycomics monitoring)

【背景と目的】

本邦では急速な高齢化に伴い要介護人口が急増し、医療経済を逼迫している。わが国の目標は、健康寿命を延伸させ平均寿命との差を縮小させていくことである。健康寿命の延伸を阻害する原因の一つが関節疾患であり、この疾患の制圧は上述の目標達成に繋がる。

関節疾患の病態首座である関節軟骨は、細胞密度が低く、血管・神経・リンパを欠き、特有の細胞外マトリックスに富む組織である。このような性質のため、関節軟骨は自然治癒能力に乏しく、一度損傷が生じるとその進行の抑制は困難である。手術治療が唯一の根治的治療法となるが、従来の骨髄刺激法や軟骨細胞を用いた軟骨再生治療は、有効性と安全性を兼ね備えた絶対的な手術法とは言い難い。これに対し、人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) をはじめとする幹細胞を用いた軟骨再生医療は、これらの問題点を解決する可能性を秘めた治療戦略である。

一方で、iPS 細胞などの幹細胞から成熟細胞への分化過程において、一定数の細胞に脱分化やがん化が生じる危険性がある。特に関節軟骨は非生命維持組織であり、移植細胞のがん化は絶対に克服すべき課題である。そのためには、幹細胞から軟骨細胞への有用な分化誘導法を確立し、それに関わる分化マーカーを同定することが不可欠である。そこでわれわれは、iPS 細胞から軟骨細胞への有用な分化誘導法を確立し、さらにそれに関わる分化マーカーを同定することを目的に本研究をすすめた。

➤ iPS 細胞からの軟骨分化誘導法の確立

未分化細胞からの軟骨細胞分化および軟骨表現型の維持においては、細胞外マトリックスの三次元構造を模倣することの重要性が強調されてきた。われわれは、これまでに高純度低エンドトキシナルギン酸ゲル (UPAL ゲル) を開発し、このゲルが移植した骨髄間葉系細胞 (BMSCs) の軟骨分化誘導能を促進することを証明してきた。以上を踏まえ、本研究では iPS 細胞から軟骨細胞を分化誘導において UPAL ゲルを用いる方法を考案した。

➤ iPS 細胞からの軟骨細胞分化に関連する新規分化マーカーの探索

幹細胞上の分化マーカーに関して、これまでに遺伝子やタンパク質研究を基盤とした探索研究が行われてきたが、臨床応用が可能な分化マーカーの同定に至ったものはきわめて少ない。一方、タンパク質や脂質は翻訳後修飾によってその機能を獲得することが少なくないが、近年、この翻訳後修飾の約半数を糖鎖修飾が担っていることが明らかにされている。すなわち糖鎖の機能の解明は、これまで遺伝子研究やタンパク質研究では説明困難であった多くの生命現象や病態のメカニズムの解明に繋がると期待される。われわれは、糖鎖構造の解明がこれまで説明困難であった軟骨変性や軟骨修復のメカニズムに対する有効な解決手段になると考え、糖鎖がマウス iPS 細胞からの軟骨細胞分化過程で分化マーカーとなる可能性を見出した。

【方法】

マウス iPS 細胞を間葉系幹細胞誘導培地で平面培養・継代し、間葉系前駆細胞 (iPS-MSCs) を誘導した。UPAL ゲルの軟骨分化誘導能を評価するために、iPS-MSCs, BMSCs, iPS 細胞をそれぞれ UPAL ゲルに包埋し、軟骨分化誘導培地で誘導を行った。対照群として従来のアルギン酸ゲルおよび high density micromass culture を評価した。さらに生体内における軟骨分化能を評価するために、各細胞をゲ

ルに包埋し、ヌードマウスの皮下に移植した。分化の評価には qRT-PCR, 組織染色, flow cytometry を用いた。さらに iPS-MSCs, BMSCs の軟骨分化過程において, glycoblotting 法を用いて網羅的かつ定量的な糖鎖構造のモニタリングを行った。

【結果】

軟骨分化後の組織学的評価では, UPAL ゲル 3D culture は従来のアルギン酸ゲル 3D culture と比較して, 細胞外基質が濃染した。high density micromass culture においても強い染色が観察されたが, その分布は 3D 培養と比較して不均一であった。軟骨分化誘導により iPS 細胞は軟骨マーカー遺伝子の経時的な発現上昇を認めたものの, 骨芽細胞マーカー遺伝子および脂肪細胞マーカー遺伝子も同時に発現が上昇した。一方, iPS-MSCs および BMSCs では軟骨マーカーが経時的に発現上昇し, 骨芽細胞マーカー・脂肪細胞マーカーは発現が低下した。以上より, UPAL ゲル 3D culture と iPS-MSCs を経由する多段階分化を組み合わせるにより, iPS 細胞が軟骨細胞に特異的に分化誘導されることを示した。

さらに分化マーカーの同定のために, iPS-MSCs, BMSCs の軟骨分化過程における, 糖鎖構造の変化を解析した。その結果, N 型糖鎖では, の両細胞で, 軟骨分化に伴い, Hex5(HexNAc)2 (HM5) の発現が増加し, Hex9(HexNAc)2 (HM9) の発現が減少した。糖脂質では, BMSCs および軟骨細胞では認められなかった $C_{31}H_{52}N_2O_{23}$ 糖鎖が, iPS-MSCs で認められた。さらに, iPS-MSCs 上の $C_{31}H_{52}N_2O_{23}$ 糖鎖は, 軟骨分化に伴い劇的に増加した。

【考察】

われわれは, 現在, UPAL ゲルを用いた軟骨再生治療の臨床治験を実施中である。しかしながら, 適応となる骨軟骨欠損のサイズは限られており, 大欠損に対する新たな治療法が求められている。本研究では, UPAL ゲル culture と iPS-MSCs を経由する多段階分化の組み合わせにより, iPS 細胞が軟骨細胞に特異的に分化誘導されることが示された。この成果の臨床応用として, 生体外で iPS 細胞から iPS-MSCs を誘導し, それを UPAL ゲルに包埋して骨軟骨欠損部に移植する戦略が考えられる。これにより, より大きな骨軟骨欠損に対して治療の適応が広がることが期待される。

さらにわれわれは iPS 細胞から軟骨細胞への分化過程で構造変化を示すいくつかの糖鎖を同定するに至った。将来的には, 本研究で同定された分化マーカーを基に, 軟骨分化能が高い前駆細胞を選択・回収し, 成熟軟骨組織を再生するといった新たな軟骨再生治療の開発が予想される。これにより, 現行の再生医療の限界とされる高齢者関節疾患など治癒条件の悪い症例にも適応が広がり, 健康寿命の延伸にも繋がることを期待される。

また, 本研究では iPS 細胞由来細胞に特徴的に発現する糖鎖構造が確認された。このことは糖鎖解析を用いた幹細胞由来細胞の生体内同定・追跡の可能性を示した。これにより再生医療が潜在的に抱える移植細胞の脱分化・がん化などといったリスクの回避が可能となり, 軟骨再生医学研究の飛躍的発展すると考えられる。

【結論】

われわれは UPAL ゲルを用いたマウス iPS 細胞からの軟骨分化法を確立した。さらにわれわれは iPS 細胞からの軟骨細胞分化過程で特徴的な構造変化を示すいくつかの糖鎖を同定するに至った。

本研究で得られた成果により, 幹細胞を用いた現行の軟骨再生医療の抱える問題点の解決が可能となり, がん化リスクのない安全な軟骨再生治療法の臨床応用が加速化する。これにより, 根治的治療法が存在しない関節疾患の制圧も期待され, 将来的には健康寿命の延伸にも繋がることを期待される。