

令和 4 年 5 月 18 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02924

研究課題名(和文) 軟骨膜の機能解明 - iPS細胞由来軟骨を用いて -

研究課題名(英文) Elucidation of the function of cartilage membrane using iPSC-derived cartilage

研究代表者

山下 晃弘 (Akihiro, Yamashita)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：00636855

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：関節軟骨の再生は重要な課題である。ヒトiPS細胞由来軟骨は関節軟骨修復に有用なソースの一つである。iPS細胞由来軟骨は軟骨膜に囲まれた組織である。これらをミニマムの関節軟骨欠損へ移植すると、軟骨同士が融合し治癒を促進した。RNAseqで解析した結果、軟骨膜にはFGF18が高発現していた。in vitroにおいてFGF18添加すると融合が促進し、一方FGF阻害剤の添加は融合を阻害した。以上の結果より軟骨膜に発現するFGF18が融合において重要な機能を果たしていることを明らかにした。このiPS細胞由来軟骨の融合メカニズムを調べることは関節軟骨欠損の再生医療の実現に重要であると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

われわれはヒトiPS細胞から分化誘導して作製した軟骨を損傷部に移植する新規治療法の開発を目指している。本研究の結果、軟骨膜に発現するFGF18が軟骨組織の融合に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。iPS細胞由来軟骨による組織再生には軟骨膜を温存することが重要である。この知見をもとに大型動物への有効性試験を経て臨床応用が可能となると考えられる。またより効率の良い軟骨分化誘導法を確立できる可能性がある。よって本研究の成果は、iPS細胞由来軟骨を用いた再生治療の治癒メカニズムの一端を解明するものであり、関節軟骨損傷に対する新規治療法の開発に貢献すると考える。

研究成果の概要(英文)：New cell and tissue sources are needed for the regenerative treatment of articular cartilage damage. Hyaline cartilage tissue particles derived from human iPSCs (hiPS-Carts) are one candidate source. hiPS-Cart consists of cartilage at the center and perichondrium-like membrane that wraps around the cartilage. When transplanted to fill the defects of articular cartilage, hiPS-Carts form repair tissue by integrating with each other. RNA sequencing analysis identified a higher expression of FGF18 in the perichondrium-like membrane in hiPS-Carts compared with the central cartilage. The addition of FGF18 accelerated the integration of hiPS-Carts, whereas addition of FGFR inhibitor inhibited it. These results suggest that FGF18 secreted from the perichondrium-like membrane plays a role in the integration of hiPS-Carts. Understanding the integration mechanism of hiPS-Carts is expected to contribute to the realization of regenerative treatment for patients with articular cartilage damage.

研究分野：整形外科関連

キーワード：骨・軟骨代謝 再生医療 iPS細胞 幹細胞

## 1. 研究開始当初の背景

### 1) 有用な軟骨再生治療法の開発が望まれている。

高齢化社会の到来とともに骨格を支える骨・軟骨の再生は重要な課題の一つである。関節軟骨は自己修復能に乏しく、重度の軟骨の障害は疼痛を伴うため健康寿命を脅かす。これまで外傷などによる部分欠損に対し、骨軟骨移植法や自家軟骨細胞移植法が行われてきた。しかし、これらの方法では移植した軟骨が母床軟骨と癒合不全を起こす、強度が弱いなどの問題点があった。そのため、有用な軟骨再生治療法の開発が望まれている。そこでわれわれはヒト iPS 細胞から分化誘導し作製した軟骨を損傷部に移植する新規治療法の開発を目指している。

### 2) ヒト iPS 細胞由来軟骨は軟骨膜で覆われ、生体軟骨に近い組織である。

軟骨は骨格の原器であり発生初期の軟骨は I 型コラーゲンから成る軟骨膜で覆われている。これまで申請者らはヒト iPS 細胞から軟骨組織への誘導法を開発してきた (Yamashita et al. *Stem Cell Reports* 2015, *Nature* 2014)<sup>1),2)</sup>。この作製したヒト iPS 細胞由来軟骨は生体軟骨と酷似しており、関節軟骨の部分欠損を修復することが出来る。

ヒト iPS 細胞由来軟骨の具体的な特徴は、

- 1) 軟骨細胞から軟骨基質が産生され強度を有する。
- 2) 軟骨基質を取り囲む軟骨膜が存在する。

つまり、ヒト iPS 細胞由来軟骨は発生過程を再現し、現状発生初期の生体軟骨に最も近い研究材料と考えられる。

### 3) 軟骨膜特異的遺伝子が軟骨の修復に寄与する可能性がある。

ヒト iPS 細胞由来軟骨は直径約 1-4mm 大の球状 particle の組織である (以下 iPS 由来軟骨 particle と呼ぶ)。培養過程において個々の iPS 由来軟骨 particle は融合し大きな塊となる。この融合部において軟骨膜が消失し軟骨へと置換されていた。この知見から、軟骨膜が軟骨膜の融合および軟骨の再生において重要な役割を果たしている可能性が高い。しかし、その機能や再生プロセスの詳細は不明であった。

## 2. 研究の目的

以上の様に、軟骨膜、特に軟骨膜特異的に発現する遺伝子は強力な軟骨再生能を有する可能性が高い。しかしながら、その機能について十分な理解がなされていない。本研究では、軟骨膜の分子レベルでの機能解明を目的とし、将来的に軟骨膜を軟骨再生治療の新たなソースとしての利用に繋げることを目指す。本研究では2項目を検討する

### 1) in vitro ヒト軟骨膜融合モデルの構築

関節軟骨欠損に対する移植治療には移植した軟骨が荷重に耐えうる強度を有し、母床軟骨と癒合し円滑な関節運動を行う必要がある。ヒト iPS 細胞由来軟骨のミニブタ関節軟骨欠損部への移植において、iPS 細胞由来軟骨はそれ同士、およびホストの軟骨と融合して修復組織を構成することが明らかとなった。この融合部において軟骨膜が消失し軟骨へと置換していたため、軟骨膜が軟骨の融合および再生において重要な役割を果たしている可能性

が高い。しかし動物モデルではその過程を経時的に追跡することが困難であった。そこで本研究では *in vitro* においてヒト iPS 細胞由来軟骨の融合過程を詳細に調べることが出来るモデル系の構築を行う。

## 2) 軟骨膜特異的遺伝子の探索と機能解明

これまでの知見により軟骨膜に軟骨膜特異的遺伝子が存在し軟骨の融合および再生に寄与している可能性が高い。ヒト iPS 細胞由来軟骨は軟骨基質と軟骨膜とで構成され、機械的に単離することが可能である。そこで単離した組織の RNA-seq を用い、軟骨膜特異的遺伝子の網羅的探索を行うことにより候補遺伝子の抽出を行う。そして軟骨膜特異的遺伝子の軟骨の癒合および再生における機能を解明する。

## 3. 研究の方法

### 1) *in vitro* ヒト軟骨膜融合モデルの構築

2 個の独立した iPS 細胞由来軟骨 particle を丸底 96 well プレート内で共培養することにより融合を促す。経時的に組織標本を作製し軟骨膜周囲での融合過程を解析する。また既知である軟骨膜関連遺伝子 I 型コラーゲンと軟骨基質特異的遺伝子 II 型コラーゲンの免疫染色を行い融合過程での軟骨膜と軟骨基質との関連を明らかにする。

### 2) 軟骨膜特異的遺伝子の探索と機能解明

iPS 細胞由来軟骨 particle の軟骨膜を単離し RNAseq を行う。軟骨膜単離後の軟骨基質と比較することにより軟骨膜特異的遺伝子の探索を行なう。同定した新規軟骨膜遺伝子について遺伝子操作や阻害剤の添加などにより軟骨の融合および再生に対する機能解明を行う。

## 4. 研究成果

### 1) *in vitro* ヒト軟骨膜融合モデルの構築

2 個の独立した iPS 細胞由来軟骨 particle を丸底 96 well プレート内で共培養した結果、融合が確認できた。経時的に組織学的解析を行なった結果、培養 1 週後より軟骨膜の融合は開始していた。軟骨膜関連遺伝子 I 型コラーゲンによる免疫染色を行なった結果、融合部分において I 型コラーゲンが残存していた。つまり培養 1 週後での融合は膜のみの接触であった。培養 2 週目、融合部において I 型コラーゲン陽性の組織が一部消失した。培養の経過とともに軟骨膜が軟骨基質へと置き換わり、培養 8 週目軟骨膜は完全に消失し軟骨基質に置換された。つまり iPS 細胞由来軟骨 particles の融合様式は軟骨膜の接触を起点とし、軟骨基質へと置換し融合することを明らかにした。

### 2) 軟骨膜特異的遺伝子の探索

iPS 細胞由来軟骨 particle の軟骨膜を単離し、軟骨基質と比較した RNAseq を行なった。まず初めに既知遺伝子について調べた。その結果、軟骨膜関連遺伝子 I 型コラーゲンは軟骨膜にて、軟骨特異的遺伝子 II 型コラーゲンは軟骨基質にて高発現していることを確認した。つまり iPS 細胞由来軟骨 particle の軟骨膜と軟骨基質の単離が成功し解析に用いることが可能であることを明らかにした。次に軟骨膜特異的遺伝子の候補遺伝子を探索し、FGF18 を同

定した。

### 3) 軟骨膜特異的遺伝子の機能解明

FGF18 は線維芽細胞増殖因子 Fgf8 ファミリーに属する成長因子であり、骨・軟骨形成に重要な働きを担っていると考えられている。関節軟骨では表層に発現し、軟骨を保護する作用を有することが報告されている。またラットの変形性関節症(OA)モデルへ FGF18 を関節腔へ投与すると病態の進行を抑制できることが報告されている。現在 OA 治療薬として FGF18 の臨床試験が行われている。しかしながら FGF18 の軟骨膜での融合に関する知見は報告されていない。そこで *in vitro* ヒト軟骨膜融合モデルを用い、FGF18 の機能解明を行った。

FGF18 を融合過程で投与した結果、周膜の融合が促進した。一方、FGFR 阻害剤を投与した場合、培養 2 週においても融合が認められなかった。以上の結果より軟骨膜を起源とする FGF シグナルは iPS 細胞由来軟骨融合に寄与し初期過程において重要な役割を果たしていることを明らかにした。

### 4) 関節軟骨損傷に対する新規治療法の開発

われわれはヒト iPS 細胞から分化誘導して作製した軟骨を損傷部に移植する新規治療法の開発を目指している。本研究の結果、軟骨膜に発現する FGF18 が軟骨組織の融合に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。iPS 細胞由来軟骨による組織再生には軟骨膜を温存することが重要である。この知見をもとに大型動物への有効性試験を経て臨床応用が可能となると考えられる。また培養方法を改良でき、より効率の良い軟骨分化誘導法や *in vitro* にて大型の軟骨組織を作製できる可能性がある。よって本研究の成果は、iPS 細胞由来軟骨を用いた再生治療の治癒メカニズムの一端を解明するものであり、関節軟骨損傷に対する新規治療法の開発に貢献すると考える。

#### 参考文献

- 1) **Yamashita A**, Morioka M, Yahara Y, Okada M, Kobayashi T, Kuriyama S, Matsuda S, Tsumaki N. 「Generation of scaffoldless hyaline cartilaginous tissue from human iPSCs」『Stem Cell Reports』 4(3), 404-418. (2015) doi: 10.1016/j.stemcr.2015.01.016.
- 2) **Yamashita A**, Morioka M, Kishi H, Kimura T, Yahara Y, Okada M, Fujita K, Sawai H, Ikegawa S, Tsumaki N. 「Statin treatment rescues FGFR3 skeletal dysplasia phenotypes.」『Nature』 513(7519), 507-11. (2014) doi: 10.1038/nature13775.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Chen Xike, Yamashita Akihiro, Morioka Miho, Senba Toshika, Kamatani Takashi, Watanabe Akira, Kosai Azuma, Tsumaki Noriyuki	4. 巻 25
2. 論文標題 Integration Capacity of Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cartilage	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Tissue Engineering Part A	6. 最初と最後の頁 437 ~ 445
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/ten.TEA.2018.0133	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Yamashita Akihiro, Tamamura Yoshihiro, Morioka Miho, Karagiannis Peter, Shima Nobuyuki, Tsumaki Noriyuki	4. 巻 38
2. 論文標題 Considerations in hiPSC-derived cartilage for articular cartilage repair	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Inflammation and Regeneration	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s41232-018-0075-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kosai Azuma, Horike Nanao, Takei Yoshiaki, Yamashita Akihiro, Fujita Kaori, Kamatani Takashi, Tsumaki Noriyuki	4. 巻 516
2. 論文標題 Changes in acetyl-CoA mediate Sik3-induced maturation of chondrocytes in endochondral bone formation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 1097 ~ 1102
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.06.139	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Takei Yoshiaki, Morioka Miho, Yamashita Akihiro, Kobayashi Tomohito, Shima Nobuyuki, Tsumaki Noriyuki	4. 巻 10
2. 論文標題 Quality assessment tests for tumorigenicity of human iPS cell-derived cartilage	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-69641-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yamashita Akihiro, Yoshitomi Hiroyuki, Kihara Shunsuke, Toguchida Junya, Tsumaki Noriyuki	4. 巻 10
2. 論文標題 Culture substrate-associated YAP inactivation underlies chondrogenic differentiation of human induced pluripotent stem cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Stem Cells Translational Medicine	6. 最初と最後の頁 115 ~ 127
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/sctm.20-0058	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tam Wai Long, Freitas Mendes Luis, Chen Xike, Lesage Raphaelle, Van Hoven Inge, Leysen Elke, Kerckhofs Greet, Bosmans Kathleen, Chai Yoke Chin, Yamashita Akihiro, Tsumaki Noriyuki, Geris Liesbet, Roberts Scott J., Luyten Frank P.	4. 巻 12
2. 論文標題 Human pluripotent stem cell-derived cartilaginous organoids promote scaffold-free healing of critical size long bone defects	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Stem Cell Research & Therapy	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13287-021-02580-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Okutani Yuki, Abe Kengo, Yamashita Akihiro, Morioka Miho, Matsuda Shuichi, Tsumaki Noriyuki	4. 巻 28
2. 論文標題 Generation of Monkey Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cartilage Lacking Major Histocompatibility Complex Class I Molecules on the Cell Surface	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Tissue Engineering Part A	6. 最初と最後の頁 94 ~ 106
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/ten.TEA.2021.0053	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yamashita Akihiro, Tsumaki Noriyuki	4. 巻 63
2. 論文標題 Recent progress of animal transplantation studies for treating articular cartilage damage using pluripotent stem cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Development, Growth & Differentiation	6. 最初と最後の頁 72 ~ 81
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/dgd.12706	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 山下 晃弘, 妻木 範行
2. 発表標題 ヒトiPS細胞由来軟骨を用いた限局した関節軟骨治療法の開発
3. 学会等名 第38回日本骨代謝学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yamashita A, Tsumaki N
2. 発表標題 Application of iPS cell technologies to treat skeletal disease
3. 学会等名 第68回国際歯科研究学会日本部会（JADR）総会・学術大会（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yamashita A, Kuriyama S, Kobayashi T, Okutani Y, Morioka M, Shima N, Matsuda S, Tsumaki N.
2. 発表標題 Repair of focal articular cartilage defect with human iPSC-derived cartilage in a mini-pig model treated with immunosuppressor.
3. 学会等名 TERMIS-WC
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	妻木 範行	京都大学・iPS細胞研究所・教授	
	(Tsumaki Noriyuki)	(14301)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	陳 暫可  (Chen Xike)	京都大学・iPS細胞研究所・大学院生    (14301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関