

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19645

研究課題名(和文)糖質工学技術を応用した糖鎖編集による新規軟骨再生法の基盤技術開発

研究課題名(英文)Development of novel cartilage regeneration therapy by glycotecology

研究代表者

犬伏 俊博(Inubushi, Toshihiro)

大阪大学・歯学研究科・講師

研究者番号：30550941

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文):本研究では、マウスならびにヒトiPS細胞の培養条件等の検討を行うことで、iPS細胞の多能性を維持させた状態でiPS細胞を増殖、保存させる技術確立した。これにより、当科ならびに当該研究科でのiPS細胞を用いた実験系の基盤が構築された。さらに、多糖鎖であるヘパラン硫酸糖鎖を薬剤にて修飾することで、軟骨細胞分化能が飛躍的に向上することが明らかになった。これらの研究結果は、iPS細胞表面にある糖鎖の重要性を示すだけでなく、糖鎖修飾を標的にした軟骨再生治療促進法の開発が可能であることを強く示唆している。今後、さらに糖鎖構造の網羅的解析を通して、実用化へ向けた研究開発が期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

軟骨組織は神経・血管をもたないため、損傷されると自然修復が極めて困難な組織として知られており、現在、頭蓋・顎・顔面領域の先天性奇形や、外傷による組織の変形などに対する軟骨再生医療技術の開発が大いに期待されている。本研究は、iPS細胞表面の糖鎖編集を行うことで軟骨細胞分化を著しく促進できることを示したものである。このような取り組みはこれまでになく、学術的意義がある。本研究結果により、従来の方法では困難であった軟骨損傷に対する軟骨再生治療が可能となることが期待できる。このように、本研究結果は、軟骨再生医療開発に大きく寄与するものであり、大きな社会的意義がある。

研究成果の概要(英文):In the present study, we examined the optimal cell culture condition for iPS cells. We established the protocol for the appropriate culture and storage condition of iPS cells with maintaining pluripotency. It has a great contribution for the development of the cell culture and the experimental system. In addition, the modification of heparan sulfate proteoglycan remarkably enhances the chondrogenic differentiation of iPS cells. These results suggest the importance of cell surface glycan in iPS cell differentiation and the modification of the glycan could be the potent cartilage regeneration therapy. It was expected that further glycomic approach might help developing the novel cartilage regeneration therapy by the glycotecology.

研究分野：歯科医学

キーワード：糖鎖 軟骨再生 iPS

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

軟骨組織は神経・血管をもたないため、損傷されると自然修復が極めて困難な組織として知られており、現在、頭蓋・顎・顔面領域の先天性奇形や、外傷による組織の変形などに対する軟骨再生医療技術の開発が大いに期待されている。そういったなか、特に近年、間葉系幹細胞(MSC)や人工多能生幹細胞(iPS)から軟骨細胞への分化誘導による軟骨再生法が報告されている。しかし、現在までに報告されている手法では、一定の分化誘導効果は確認されているものの、再生医療として応用できるレベルの細胞を得ることは量的・質的にも困難である。そこで、生体材料として十分な機能性を有した軟骨組織を、より効率的に作り出す安全性の高い軟骨再生法の開発が求められている。

ところで、糖鎖は我々の体を構築するすべての細胞表面を覆うことで多様性に富んだ細胞社会を作り出している。糖鎖は細胞やタンパク質を多彩に修飾することで、細胞接着、細胞間での相互作用、シグナル伝達といった細胞の高次機能の発現に重要な役割を果たしていることが分かっている。また、細胞や表面タンパク質を修飾する糖鎖は、細胞の種類や分化段階によって大きく変化することが知られており、事実、分化段階を反映する指標として糖鎖マーカー(SSEA-1抗原など)が用いられている。

申請者は、グリコサミノグリカンの一種であるヘパラン硫酸が欠失した未分化幹細胞では、軟骨細胞分化と軟骨基質の合成が著しく促進することで、自律的な軟骨組織形成が誘導されることを見出した(Inubushi T *et al.*, *JCI Insight*. 2017)。さらに近年のゲノム解析技術の進歩により、糖鎖の合成/分解に関わる酵素の遺伝子異常を持つ患者の多くが軟骨形成に重篤な障害を持っていることが明らかになってきた(Mizumoto S *et al.*, *Biomed Res Int*. 2014)。これらのことから、細胞のもつ糖鎖および糖鎖構造の変化が未分化幹細胞の軟骨細胞分化や軟骨基質合成の制御に関わっている可能性は極めて高いと考えられる。しかし、糖鎖によるその制御機構については、ほとんど明らかになっていない。

### 2. 研究の目的

本研究では、軟骨細胞分化や軟骨基質合成過程における糖鎖の変化を解析し、それらを制御する機構を解明することで、糖質工学技術を応用した新規軟骨再生法の基盤技術を構築することを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### iPS細胞の培養法の確立

マウス iPS 細胞ならびにヒト iPS 細胞を樹立し、細胞培養の至適条件を検討する。また、iPS 細胞の多分化能が維持されていることを確認する。

#### 糖鎖編集による iPS 細胞の軟骨細胞分化・軟骨基質合成への影響の検討

iPS 細胞の軟骨分化誘導過程においてヘパラン硫酸酵素の糖鎖編集を行い、糖鎖編集が軟骨細胞分化へ与える影響を検討する。

#### iPS 細胞の軟骨細胞分化・軟骨基質合成過程における糖鎖変化の網羅的解析

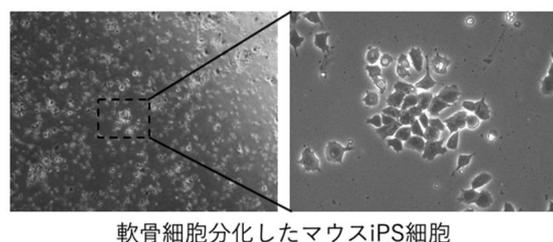
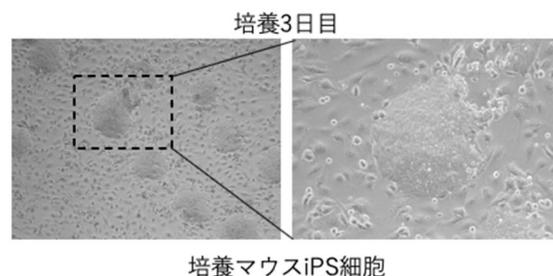
iPS 細胞を軟骨細胞分化誘導法により分化誘導を行い、経時的に細胞を回収しグライコミックス解析にて網羅的に糖鎖構造を解析する。これにより、軟骨細胞分化過程において重要な糖鎖構造の変化を絞り込む。その結果を踏まえ、特定した糖鎖構造を糖鎖編集にて改変し、iPS 細胞の軟骨細胞分化への影響を明らかにする。

### 4. 研究成果

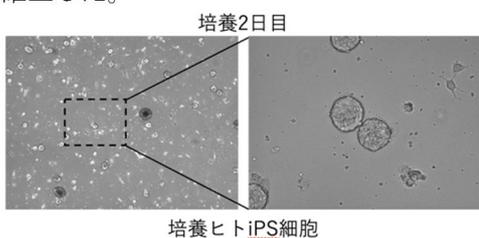
マウス iPS 細胞の培養には SNL フィーダー細胞を用いた。SNL フィーダー細胞を播種し、コンフルエントになった状態で iPS 細胞を共培養し、iPS 細胞が増殖しコロニーを形成させる。コロニーが一定の大きさになった時点で、コロニーを回収し懸濁して継代することで増殖させることができた。この作業を数十回繰り返し、30 以上の iPS 細胞ストックを作成した。

さらに、分化誘導法等の条件検討を行うことで至適条件の絞り込み、効率的な分化誘導法を確立した。また、ストックしたマウス iPS 細胞が少なくとも脂肪分化、骨分化、軟骨分化することができる多分化能を維持していることを確認した。

次に、ヒト iPS 細胞についても同様の検討を行ない、培養法、細胞ストック等の作製法を



確立した。



培地交換方法

- 1.培地交換に必要なヒトiPS用培地をチューブに分取し、FGF-2を入れる。
- 2.37°Cウォーターバスで培地を温める。
- 3.細胞の状態を顕微鏡でチェック。
- 4.温めた培地を取り出す。
- 5.フラスコの培地を吸引。
- 6.温めた培地を入れる。
- 7.細胞の状態をチェック。
- 8.CO<sub>2</sub>インキュベーターに入れて、培養。
- 9.基本的に毎日培地交換を行う

継代方法

- 1.培地を吸引する。
- 2.Trypsin-EDTAを1ml入れる。
- 3.1-3分間、37°C・CO<sub>2</sub>インキュベーターに入れてインキュベーション。
- 4.Trypsin-EDTA液を吸引。
- 5.ヒトiPS細胞用培地10mlを入れて、10mlピペットをつけたピペットエイドで培地を吹きかけるようにしてコロニーをはがす。
- 6.顕微鏡でコロニーの分散状態を確認する。
- 7.15mlチューブに細胞浮遊液を入れて、2分間、300rpmにて遠心(大きいコロニーのみを回収する)。
- 8.新しいヒトiPS細胞用培地を入れて細胞浮遊液とする(ピペッティングはしない)。
- 9.フィーダー細胞の培地を吸引。
- 10.各フラスコに細胞浮遊液を入れる。
- 11.顕微鏡でコロニーの分散状態を確認。
- 12.24時間、CO<sub>2</sub>インキュベーターに入れて培養。

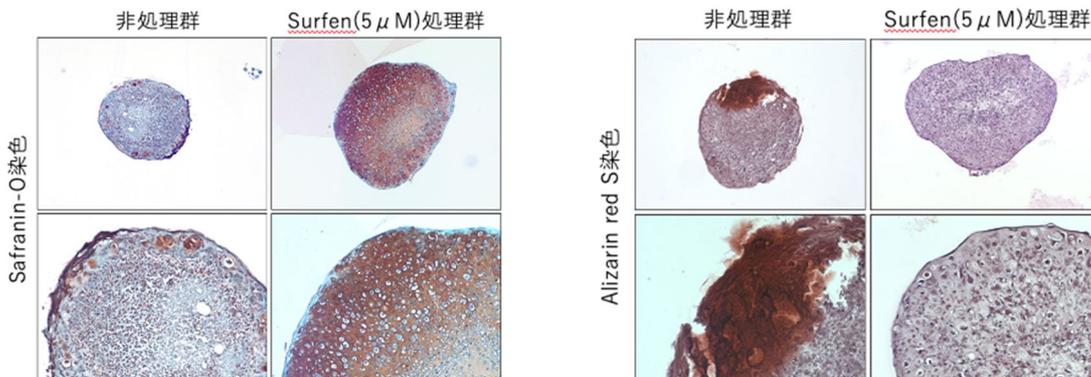
本実験では Surfen(Schuksz *et al*, PNAS 2008)を用いてヘパラン硫酸の機能の抑制をおこなった。下記の手順に従って軟骨細胞分化を行い、Surfen (5 μM)処理群と非処理群で軟骨細胞分化への影響を検討した。

Table 1 Protocol for stages 1-3 of the differentiation regime for hESCs

| Stage | Day | Culture area (cm <sup>2</sup> ) | Plating density (cells cm <sup>-2</sup> ) | Matrix substrate | WNT3A (ng ml <sup>-1</sup> ) | Activin-A (ng ml <sup>-1</sup> ) | FGF2 (ng ml <sup>-1</sup> ) | BMP4 (ng ml <sup>-1</sup> ) | Follistatin (ng ml <sup>-1</sup> ) | GDF5 (ng ml <sup>-1</sup> ) | NT4 (ng ml <sup>-1</sup> ) |
|-------|-----|---------------------------------|---|------------------|------------------------------|----------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|------------------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| 1     | 1   | 9.62                            | 100,000                                   | FN               | 25                           | 50                               |                             |                             |                                    |                             |                            |
| 1     | 2   | 9.62                            |   | FN               | 25                           | 25                               | 20                          |                             |                                    |                             |                            |
| 1     | 3   | 9.62                            |   | FN               | 25                           | 10                               | 20                          | 40                          |                                    |                             |                            |
| 2     | 4   | 9.62                            |   | FN               |                              |                                  | 20                          | 40                          | 100                                |                             | 2                          |
| 2     | 5   | 48.11                           | 46,500                                    | FN               |                              |                                  | 20                          | 40                          | 100                                |                             | 2                          |
| 2     | 6   | 48.11                           |   | FN               |                              |                                  | 20                          | 40                          | 100                                |                             | 2                          |
| 2     | 7   | 48.11                           |   | FN               |                              |                                  | 20                          | 40                          | 100                                |                             | 2                          |
| 2     | 8   | 192.44                          | 46,500                                    | FN-gel           |                              |                                  | 20                          | 40                          |                                    |                             | 2                          |
| 3     | 9   | 192.44                          |   | FN-gel           |                              |                                  | 20                          | 20                          |                                    | 20                          | 2                          |
| 3     | 10  | 192.44                          |   | FN-gel           |                              |                                  | 20                          | 20                          |                                    | 20                          | 2                          |
| 3     | 11  | 192.44                          |   | FN-gel           |                              |                                  | 20                          |                             |                                    | 40                          | 2                          |
| 3     | 12  | 288.66                          | 34,000                                    | Gel              |                              |                                  | 20                          |                             |                                    | 40                          | 2                          |
| 3     | 13  | 288.66                          |   | Gel              |                              |                                  | 20                          |                             |                                    | 40                          | 2                          |
| 3     | 14  |                                 |   |                  |                              |                                  |                             |                             |                                    |                             |                            |

HESCs were fed daily in base medium supplemented with growth factors at the stated concentrations. Differentiating cultures were expanded by passage with trypsin. Passage and cell expansion is shown as the increase in culture area, based on starting with a single 35-mm dish. Tissue culture dishes were coated with fibronectin, fibronectin/gelatin mixed at a ratio of 50:50 or gelatin. FN, fibronectin; gel, gelatin; NT4, neurotrophin-4.

その結果、Surfen 処理群では、非処理群に対して短い培養期間にて Safranin-O 染色陽性細胞の増加や細胞塊の増加を認めた。また、細胞塊中の軟骨細胞は増殖軟骨細胞、肥大軟骨細胞を認め多ことから、正常な軟骨細胞会であることを確認した。これらのことから、ヘパラン硫酸の機能を抑制することで、iPS 細胞の軟骨細胞分化が促進されることが明らかになった(下図左)。次に、骨芽細胞分化に対する Surfen 処理(5 μM)の影響を検討した。その結果、Surfen 処理群では alizarin red 染色により染色される石灰化成分の増加が認められた。これらの結果より、Surfen 処理によるヘパラン硫酸の機能抑制により、骨芽細胞分化が抑制されることが明らかになった(下図右)。



さらに、Surfen による軟骨細胞分化メカニズムを明らかにするために RNA-seq 解析による遺伝子発現プロファイリング解析を行なった。その結果を以下に示す。

|                                     | Control VS <u>Surfen Stage1</u> |                   | Control VS <u>Surfen Stage2</u> |            |
|-------------------------------------|---------------------------------|-------------------|---------------------------------|------------|
|                                     | Expression                      | P value           | Expression                      | P value    |
| HALLMARK_PROTEIN_SECRETION          | -0.97202903                     | 0.5294118         | 0.53540385                      | 0.7647059  |
| <b>HALLMARK_REACTIVE_OXIGEN_SPE</b> | <b>0.41011673</b>               | <b>0.942029</b>   | <b>-2.9281142</b>               | <b>0</b>   |
| HALLMARK_SPERMATOGENESIS            | <b>-1.6526716</b>               | <b>0.04761905</b> | 0.58159375                      | 0.66233766 |
| HALLMARK_TGF_BETA_SIGNALING         | 1.1071777                       | 0.22972973        | 0.9177445                       | 0.5070422  |
| HALLMARK_TNFA_SIGNALING_VIA_NF      | 1.6804858                       | 0.101123594       | 1.9098026                       | 0.05376344 |
| HALLMARK_UNFOLDED_PROTEIN_RES       | -0.8335431                      | 0.15789473        | 0.4665252                       | 0.85882354 |
| HALLMARK_UV_RESPONSE_DN             | 0.620393                        | 0.5609756         | 0.5253501                       | 0.7752809  |
| HALLMARK_UV_RESPONSE_UP             | 0.75484985                      | 0.47619048        | 1.271476                        | 0.31868133 |
| HALLMARK_WNT_BETA_CATENIN_SIGI      | -0.60461706                     | 0.9310345         | <b>-1.7723978</b>               | <b>0</b>   |
| HALLMARK_XENOBIOTIC_METABOLISM      | 1.2667147                       | 0.17777778        | 1.0117217                       | 0.38636363 |

次に、iPS 細胞の軟骨細胞分化過程の Stage1, 2, 3 における細胞を回収しグライコミックス解析用の試料とした。現在、解析をすすめている。

これらの結果より、本研究成果により糖鎖編集により iPS 細胞の軟骨細胞分化を促進できることが明らかとなった。さらに現在、軟骨細胞分化過程における糖鎖構造変化の網羅的解析を行っており、糖鎖編集技術を応用した新規軟骨細胞分化手法確立に向けた研究を継続中である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

|  |                         |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Sarper Safiye E., Inubushi Toshihiro, Kurosaka Hiroshi, Ono Minagi Hitomi, Murata Yuka, Kuremoto Koh-ichi, Sakai Takayoshi, Taniuchi Ichiro, Yamashiro Takashi | 4. 巻<br>12              |
| 2. 論文標題<br>Anterior cleft palate due to Cbfb deficiency and its rescue by folic acid   | 5. 発行年<br>2019年         |
| 3. 雑誌名<br>Disease Models & Mechanisms  | 6. 最初と最後の頁<br>dmm038851 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1242/dmm.038851  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>-               |

|   |                 |
|---|-----------------|
| 1. 著者名<br>Aoyama Gozo, Kurosaka Hiroshi, Oka Ayaka, Nakatsugawa Kohei, Yamamoto Sayuri, Sarper Safiye Esra, Usami Yu, Toyosawa Satoru, Inubushi Toshihiro, Isogai Yukako, Yamashiro Takashi | 4. 巻<br>10      |
| 2. 論文標題<br>Observation of Dynamic Cellular Migration of the Medial Edge Epithelium of the Palatal Shelf in vitro  | 5. 発行年<br>2019年 |
| 3. 雑誌名<br>Frontiers in Physiology   | 6. 最初と最後の頁<br>- |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.3389/fphys.2019.00698   | 査読の有無<br>有      |
| オープンアクセス<br>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<br>-       |

|  |                 |
|--|-----------------|
| 1. 著者名<br>Murata Yuka, Kurosaka Hiroshi, Ohata Yasuhisa, Aikawa Tomonao, Takahata Sosuke, Fujii Katsunori, Miyashita Toshiyuki, Morita Chisato, Inubushi Toshihiro, Kubota Takuo, Sakai Norio, Ozono Keiichi, Kogo Mikihiro, Yamashiro Takashi | 4. 巻<br>6       |
| 2. 論文標題<br>A novel PTCH1 mutation in basal cell nevus syndrome with rare craniofacial features   | 5. 発行年<br>2019年 |
| 3. 雑誌名<br>Human Genome Variation   | 6. 最初と最後の頁<br>- |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1038/s41439-019-0047-9   | 査読の有無<br>有      |
| オープンアクセス<br>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<br>-       |

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 4件）

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Morita C, Inubushi T, Tanikawa C, Yamashiro T  |
| 2. 発表標題<br>A case report of Ehlers-Danlos syndrome patient with craniofacial anomaly and severe enamel hypoplasia |
| 3. 学会等名<br>Scientific meeting on the rarer types of Ehlers-Danlos syndromes (国際学会)                                |
| 4. 発表年<br>2019年～2020年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Kusano S, Inubushi T, Murata Y, Sasaki J, Itoh S, Imazato S, Yamashiro T                        |
| 2. 発表標題<br>The role of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in osteocyte differentiation                        |
| 3. 学会等名<br>The 4th meeting of the international Association for Dental Research Asia Pacific Region (国際学会) |
| 4. 発表年<br>2019年～2020年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Morita C, Inubushi T, Yamaguchi Y, Yamashiro T  |
| 2. 発表標題<br>Osteocyte specific hyaluronic acid disruption reduced bone density in mice model                |
| 3. 学会等名<br>The 4th meeting of the international Association for Dental Research Asia Pacific Region (国際学会) |
| 4. 発表年<br>2019年～2020年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Nakanishi Y, Inubushi T, Matsumoto Y, Yamaguchi Y, Yamashiro T  |
| 2. 発表標題<br>Elucidation of the regulatory mechanisms of heparan sulfate on the craniofacial and tooth morphogenesis |
| 3. 学会等名<br>The 4th meeting of the international Association for Dental Research Asia Pacific Region (国際学会)         |
| 4. 発表年<br>2019年～2020年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>犬伏俊博、廣瀬 匠、吉田尚起、黒坂 寛、杉山 弘、山城 隆    |
| 2. 発表標題<br>新規遺伝子抑制法を用いた口蓋形成の制御機構解明への新たな取り組み |
| 3. 学会等名<br>第61回歯科基礎医学会学術大会                  |
| 4. 発表年<br>2019年～2020年                       |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>犬伏俊博、松本 和、入江敏文、山城 隆、山口 祐                      |
| 2. 発表標題<br>コンドロイチン硫酸合成酵素 1 ノックアウトマウスを用いた変形性関節症の発症機構解明の試み |
| 3. 学会等名<br>第37回日本骨代謝学会学術集会                               |
| 4. 発表年<br>2019年～2020年                                    |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>森田知里、犬伏俊博、伊藤慎将、宇佐美 悠、豊澤 悟、山口 祐、山城 隆 |
| 2. 発表標題<br>骨細胞特異的ヒアルロン酸合成酵素ノックアウトマウスの解析        |
| 3. 学会等名<br>第61回歯科基礎医学会学術大会                     |
| 4. 発表年<br>2019年～2020年                          |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>草野慎之介、犬伏俊博、村田有香、伊藤慎将、黒坂 寛、佐々木淳一、山城 隆 |
| 2. 発表標題<br>骨細胞分化や分化段階の維持におけるWnt- カテニン経路の役割      |
| 3. 学会等名<br>第61回歯科基礎医学会学術大会                      |
| 4. 発表年<br>2019年～2020年                           |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|           | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                        | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                | 備考 |
|-----------|--|--------------------------------------|----|
| 研究<br>分担者 | 佐々木 淳一<br><br>(SASAKI Junichi)<br><br>(50530490) | 大阪大学・歯学研究科・講師<br><br><br><br>(14401) |    |

