

令和 2 年 6 月 3 日現在

機関番号：12601  
研究種目：若手研究  
研究期間：2018～2019  
課題番号：18K16645  
研究課題名(和文)化合物によるヒトiPS細胞の軟骨分化誘導法を応用した軟骨の発生・再生の戦略的研究

研究課題名(英文) Strategic research on cartilage development and regeneration using the chondrocyte differentiation method of human iPS cells by small-molecule compounds

研究代表者  
河田 学 (Kawata, Manabu)  
東京大学・医学部附属病院・登録研究員

研究者番号：10803174  
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：申請者は、Wnt/ $\beta$ -cateninシグナルの活性化剤であるCHIR99021及びレチノイン酸受容体作動薬であるTTNPBという2種類の低分子化合物の組み合わせによる、簡便かつ高効率なヒトiPS細胞の軟骨細胞への分化誘導法を確立した。  
本誘導法の各分化段階における詳細な網羅的発現解析、及びATAC-seqやChIP-seqによる網羅的エピゲノム解析を通して、本誘導法の軟骨分化過程における分子メカニズムの一端を明らかにした。  
またヒトiPS細胞から本誘導法を用いて作成した分化誘導細胞を用いて、免疫不全マウスへの各種移植実験を行い、生体における良好な硝子軟骨組織の形成能を有していることを示した。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により得られた解析結果や知見をベースとして、軟骨分化過程に関わる様々なシグナルに注目した解析を実施していくことが可能である。また本誘導法を元にして、より軟骨分化能や軟骨成熟を促進する化合物や、半月板細胞等の他の運動器系統細胞への分化を促進する化合物を化合物ライブラリーを活用して同定していく研究等を発展させることが期待される。

研究成果の概要(英文)：I developed a differentiation method of human pluripotent stem cells (hPSCs) into chondrocytes by simple combination of two compounds, a glycogen synthase kinase 3 inhibitor, and a retinoic acid receptor (RAR) agonist, within 5-9 days.  
Comprehensive gene expression and open chromatin analyses at each stage of our protocol showed step-by-step differentiation toward chondrocytes. Genome-wide analysis by RAR and  $\beta$ -catenin ChIP-seq demonstrated that RA and Wnt/ $\beta$ -catenin signaling collaboratively regulated the key marker genes at each differentiation stage.  
Particles prepared from hPSC-derived cells differentiated under our protocol formed hyaline cartilaginous tissues when transplanted into knee joints and subcutaneous spaces of immunodeficient mice.

研究分野：整形外科学

キーワード：軟骨細胞 多能性幹細胞 低分子化合物

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

関節軟骨はヒトにおいて一度損傷すると殆んど再生しないため、再生医療のニーズが非常に大きい臓器である。軟骨再生医療の対象となり得る疾患として、小耳症、口唇口蓋裂による鼻変形、離断性骨軟骨炎、外傷性軟骨損傷などがあるが、なかでも変形性膝関節症は本邦の有病者数 2530 万人、有症状者数 780 万人 (Yoshimura N; J Bone Miner Metab 2009) と患者数が非常に多い変性疾患であるものの、確立された再生医療は現時点でもなく、新たな治療法の開発が待たれている状況である。

自家軟骨細胞や間葉系幹細胞を用いた関節軟骨の部分損傷に対する軟骨再生医療は臨床応用が進められているが、量的な制限などのため特に変形性関節症への応用は困難である。一方で、iPS 細胞および ES 細胞等のヒト多能性幹細胞は培養増幅に制限はなく、軟骨再生医療にとって非常に有用な cell source となるポテンシャルを有している。

ヒト多能性幹細胞の軟骨細胞への分化誘導法はこれまで何報が報告されている (Oldershaw RA; Nat Biotechnol 2010, Yamashita A; Stem Cell Reports 2015) が、いずれも多種類の recombinant protein を組み合わせる必要がある。Recombinant protein は一般に非常に高額であり、またロットによるばらつきが排除できない等、実用化を考えた場合に無視できない問題点がいくつか存在する。一方で低分子化合物はより安価に安定的に大量に製造可能であり、また他系統の細胞への誘導において recombinant protein を用いた誘導法よりも短期間で効率の良い分化誘導が可能となることが報告されている (Araoka T; PLoS One 2013)。

これらの背景を踏まえて、申請者は recombinant protein を用いた従来の分化誘導法の課題を解決し得る、低分子化合物によるヒト iPS 細胞の軟骨細胞への分化誘導法の研究に取り組んできた。その結果、2 種類の低分子化合物の組み合わせによる簡便な軟骨分化誘導法 (以下、本誘導法を 2 Compounds 法 = 2C 法と呼称する) を確立するに至った。またこの 2C 法は、従来の recombinant protein を用いた誘導法と比較して、シンプルかつ短期間の間に極めて良好な効率の分化誘導を可能にする手法であることを明らかにした。

### 2. 研究の目的

2C 法はどのような分子メカニズムでヒト iPS 細胞を軟骨細胞へと分化誘導可能しているかの詳細は不明であった。一般に、多能性幹細胞の各種系統細胞への分化誘導過程は、実際の生体における発生・分化のプロセスを模倣したものであると考えることができる。従って、2C 法の軟骨分化誘導過程における分子メカニズムの詳細を明らかにするために各分化段階の詳細な発現解析およびエピゲノム解析を行うことは、実際の軟骨発生過程においても重要な機能を有するシグナルや遺伝子群を同定することにもつながる有用な知見になり得ると、申請者は考えた。

また本誘導法の再生医療への応用の可能性を探る上では、本誘導法を用いて作成した軟骨細胞が、実際の生体内においてどの程度の硝子軟骨組織の形成能を有しているかなどを明らかにする必要がある。従って、免疫不全マウスを始めとした小動物への各種移植実験を行うことも、本研究課題の目的とした。

### 3. 研究の方法

申請者は、2C 法の各分化段階 (day 0, 2, 3, 4, 5, 9) におけるマイクロアレイ解析により、mRNA の網羅的発現解析を行い、gene ontology 解析や階層的クラスタリング解析による各分化段階の characterize、および軟骨分化誘導過程で上昇してくる遺伝子群の同定を行った。

続いて、transposase が open chromatin 領域にアクセスしやすいという性質を利用したエピゲノム解析の手法である Assay for Transposase-Accessible Chromatin using sequencing (ATAC-seq) を 2C 法の各分化段階 (day 0, 2, 3, 4, 5, 7, 9) において行い、2C 法における open chromatin 領域の継時的な推移の解明を試みた。

更には、本誘導法の各分化段階 (day 0, 2, 3, 4, 5, 7, 9) において、抗 RAR 抗体および抗  $\beta$ -catenin 抗体を用いた ChIP-seq も行い、レチノイン酸シグナル (RA) 及び Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルに注目した網羅的なエピゲノム解析を実施した。

一方で、2C 法により作成したヒト iPS 細胞由来の軟骨細胞を用いて、免疫不全マウスの膝関節や皮下組織への移植実験も行い、移植部位の組織学的評価を行った。

### 4. 研究成果

マイクロアレイ解析では、各分化段階に特徴的な遺伝子群の上昇を確認することができ、2C 法が実際の生体における軟骨細胞の発生・分化に近い分化誘導法であることが確認された。また day 9 において有意に発現上昇が見られた遺伝子群で Gene ontology 解析を行ったところ、骨格や軟骨形成に関わる term が最上位に抽出された。各分化段階の ATAC-seq では、各分化段階に特徴的な marker 遺伝子の enhancer 領域の活性化が見られた。更には RAR 及び  $\beta$ -catenin の ChIP-seq を各段階で実施した所、SOX9 を始めとした各分化段階の代表的な転写因子群の enhancer 領域に peak を認め、その中には両 ChIP-seq で共通した peak 領域も見られた、すなわち、RA 及び Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルは、各分化段階の marker 遺伝子の enhancer 領域に作用し、一部は協調しながら分化の制御に直接的に関与していることが示された。

また 2C 法により分化誘導したヒト iPS 細胞由来の軟骨細胞を用いて particle を形成、SCID

マウスの膝関節および移植した所、ヒト組織特異的抗体陽性の硝子軟骨様組織の生着を認め、一方で腫瘍形成を生じた個体は無かった。

以上のように、2C法の各分化段階における詳細な網羅的発現解析、およびATAC-seqやChIP-seqによる網羅的エピゲノム解析等を通して、本誘導法の軟骨分化過程における分子メカニズムの一端を明らかにした。さらには、本誘導法を用いて分化誘導した軟骨細胞は、実際の生体内においても良好な硝子軟骨組織の形成能を有していることを示した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kawaguchi Kohei, Inui Hiroshi, Taketomi Shuji, Yamagami Ryota, Kono Kenichi, Nakazato Keiu, Kawata Manabu, Tanaka Sakae	4. 巻 26
2. 論文標題 Meniscal bearing dislocation while rolling over in sleep following Oxford medial unicompartmental knee arthroplasty	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Knee	6. 最初と最後の頁 267 ~ 272
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.knee.2018.10.015	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 -
1. 著者名 Kawata Manabu, Sasabuchi Yusuke, Taketomi Shuji, Inui Hiroshi, Matsui Hiroki, Fushimi Kiyohide, Yasunaga Hideo, Tanaka Sakae	4. 巻 26
2. 論文標題 Atopic dermatitis is a novel demographic risk factor for surgical site infection after anterior cruciate ligament reconstruction	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy	6. 最初と最後の頁 3699 ~ 3705
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00167-018-4958-7	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 -
1. 著者名 Kawata Manabu, Sasabuchi Yusuke, Taketomi Shuji, Inui Hiroshi, Matsui Hiroki, Fushimi Kiyohide, Chikuda Hirotaka, Yasunaga Hideo, Tanaka Sakae	4. 巻 13
2. 論文標題 Annual trends in arthroscopic meniscus surgery: Analysis of a national database in Japan	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0194854
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0194854	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 Taketomi Shuji, Inui Hiroshi, Yamagami Ryota, Kawaguchi Kohei, Nakazato Keiu, Kono Kenichi, Kawata Manabu, Nakagawa Takumi, Tanaka Sakae	4. 巻 23
2. 論文標題 Surgical timing of anterior cruciate ligament reconstruction to prevent associated meniscal and cartilage lesions	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Orthopaedic Science	6. 最初と最後の頁 546 ~ 551
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jos.2018.02.006	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 -

1. 著者名 Kawata Manabu, Mori Daisuke, Kanke Kosuke, Hojo Hironori, Ohba Shinsuke, Chung Ung-il, Yano Fumiko, Masaki Hideki, Otsu Makoto, Nakauchi Hiromitsu, Tanaka Sakae, Saito Taku	4. 巻 13
2. 論文標題 Simple and Robust Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells toward Chondrocytes by Two Small-Molecule Compounds	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Stem Cell Reports	6. 最初と最後の頁 530 ~ 544
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.stemcr.2019.07.012	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 Taketomi Shuji, Inui Hiroshi, Yamagami Ryota, Kawaguchi Kohei, Nakazato Keiu, Kono Kenichi, Kawata Manabu, Nakagawa Takumi, Tanaka Sakae, Taketomi Shuji	4. 巻 -
2. 論文標題 Length of the Tendon within the Tibial Tunnel Affects Tibial Tunnel Widening following Anatomic Anterior Cruciate Ligament Reconstruction Using a Bone-Patellar Tendon-Bone Graft	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Knee Surgery	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) 10.1055/s-0039-1681064	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 -

1. 著者名 Kawaguchi Kohei, Taketomi Shuji, Inui Hiroshi, Yamagami Ryota, Nakazato Keiu, Takagi Kentaro, Kage Tomofumi, Kawata Manabu, Tanaka Sakae	4. 巻 -
2. 論文標題 Chronological Changes in Anterior Knee Stability after Anatomical Anterior Cruciate Ligament Reconstruction Using Bone-Patellar Tendon-Bone and Hamstring Grafts	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Knee Surgery	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) 10.1055/s-0039-1700809	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16件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 河野 賢一, 富田 哲也, 山崎 隆治, 武富 修治, 乾 洋, 山神 良太, 川口 航平, 中里 啓佑, 河田 学, 田中 栄
2. 発表標題 正常膝における屈曲動作と伸展動作の生体内3次元動態比較
3. 学会等名 第10回日本関節鏡・膝・スポーツ整形外科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山神 良太, 乾 洋, 武富 修治, 河野 賢一, 中里 啓佑, 川口 航平, 河田 学, 田中 栄
2. 発表標題 Oxford UKAにおけるインプラント設置角度と術後脛骨側radiolucent lineの検討
3. 学会等名 第10回日本関節鏡・膝・スポーツ整形外科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 武富 修治, 乾 洋, 山神 良太, 川口 航平, 中里 啓佑, 河野 賢一, 河田 学, 田中 栄
2. 発表標題 Arthroscopic surgery for children/Arthroscopic surgery for patients under 16 years old
3. 学会等名 第10回日本関節鏡・膝・スポーツ整形外科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中里 啓佑, 武富 修治, 乾 洋, 山神 良太, 河野 賢一, 川口 航平, 河田 学, 田中 栄
2. 発表標題 解剖学的長方形骨孔前十字靭帯再建術後の脛骨骨孔拡大に影響する因子の検討
3. 学会等名 第10回日本関節鏡・膝・スポーツ整形外科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 乾 洋, 武富 修治, 山神 良太, 川口 航平, 中里 啓佑, 河野 賢一, 河田 学, 田中 栄
2. 発表標題 二顆以上の病変に対する各種ACL温存人工関節手術(BCR TKA、BiKA)の短期成績比較
3. 学会等名 第10回日本関節鏡・膝・スポーツ整形外科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 川口 航平, 乾 洋, 武富 修治, 山神 良太, 河野 賢一, 中里 啓佑, 河田 学, 田中 栄
2. 発表標題 BCR TKAとBCS TKAにおける術中回旋キネマティクスの比較
3. 学会等名 第10回日本関節鏡・膝・スポーツ整形外科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 乾 洋, 武富 修治, 山神 良太, 川口 航平, 中里 啓佑, 河野 賢一, 河田 学, 田中 栄
2. 発表標題 TKAとUKAでは患者が満足する要因が異なる
3. 学会等名 第10回日本関節鏡・膝・スポーツ整形外科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 河野 賢一, 乾 洋, 富田 哲也, 山崎 隆治, 武富 修治, 山神 良太, 川口 航平, 中里 啓佑, 河田 学, 菅本 一臣, 田中 栄
2. 発表標題 両十字靭帯機能温存型人工膝関節全置換術の荷重・非荷重深屈曲動作における生体内三次元動態解析
3. 学会等名 第91回日本整形外科学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 永田 向生, 張 成虎, 矢野 文子, 河田 学, 牧井 勇磨, 田中 栄, 齋藤 琢
2. 発表標題 Runx3は関節軟骨に保護的に作用する
3. 学会等名 第91回日本整形外科学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 永田 向生, 張 成虎, 矢野 文子, 河田 学, 牧井 勇磨, 田中 栄, 齋藤 琢
2. 発表標題 Runx3は関節軟骨に保護的に作用する
3. 学会等名 第36回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 河田 学, 齋藤 琢, 矢野 文子, 田中 栄
2. 発表標題 2種類の低分子化合物によるヒトiPS細胞の軟骨分化誘導法の確立
3. 学会等名 第34回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 河田 学, 齋藤 琢, 矢野 文子, 田中 栄
2. 発表標題 2種類の低分子化合物による、簡便で高効率なヒト多能性幹細胞の軟骨細胞への分化誘導法
3. 学会等名 第37回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 河田 学, 齋藤 琢, 田中 栄
2. 発表標題 2種類の低分子化合物によるヒト多能性幹細胞の軟骨細胞への分化誘導法の確立
3. 学会等名 第5回日本骨免疫学会
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 山神良太、武富修治、乾洋、河野賢一、中里啓佑、川口航平、高木健太郎、鹿毛智文、河田学、田中栄
2. 発表標題 骨付き膝蓋腱を用いた前十字靭帯再建術における術後2年の膝関節前方過制動と患者立脚型評価の関係
3. 学会等名 第11回日本関節鏡・膝・スポーツ整形外科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山神良太、武富修治、乾洋、河野賢一、中里啓佑、川口航平、高木健太郎、鹿毛智文、河田学、田中栄
2. 発表標題 両十字靭帯温存型人工膝関節全置換術における脛骨インプラント設置角度と術中膝関節安定性との関係
3. 学会等名 第11回日本関節鏡・膝・スポーツ整形外科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山神良太、乾洋、武富修治、河田学、川口航平、鹿毛智文、鮫島慎、高木健太郎、田中栄
2. 発表標題 人工膝関節術後の創部感染の危険因子：DPCデータを用いた解析
3. 学会等名 第50回日本人工関節学会
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
---------------------------	-----------------------	----