

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 16 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293330

研究課題名(和文) 実用化を目指したヒトiPS細胞の軟骨分化誘導法の確立

研究課題名(英文) Development of chondrocyte differentiation method from human iPS cells

研究代表者

齋藤 琢 (SAITO, Taku)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：30456107

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,300,000円

研究成果の概要(和文)：iPS細胞は量的な制約がなく、再生医療の魅力的なツールである。本研究では化合物を用いてヒトiPS細胞から軟骨細胞を分化誘導する方法の開発に取り組み、わずか二種類の化合物を用いて一週間前後で良好な軟骨細胞を誘導することに成功した。本方法ではサイトカインを使用しないため、非常に均質な分化をもたらすことができるのが特徴で、フローサイトメトリーによる解析でも分化し損ねた細胞は全く検知されなかった。またこの方法で誘導した細胞をマウスの膝に移植したところ、良好な軟骨を形成した。

研究成果の概要(英文)：iPS cell is attractive cell source for regenerative medicine. The present study has established a novel chondrocyte induction protocol from human iPS cells by only two chemical compounds within one week. We did not find any undifferentiated cells after one week culture by the protocol, indicating the markedly high efficiency. When we implanted the differentiated cells into mouse knee joints, hyaline cartilage formation was observed.

研究分野：整形外科学

キーワード：整形外科学 変形性関節症 再生医療学

1. 研究開始当初の背景

変形性関節症は高齢者の生活の質を脅かす代表的な運動器疾患であり、申請者が属する東京大学医学部整形外科で実施している国内最大のコホート研究 (ROAD study) によると膝関節だけでも国内に 780 万人が痛みを苦しんでいる (*Osteoarthritis Cartilage* 17:1137, 2009, *Ann Rheum Dis* 68:1401, 2009, *J Bone Miner Metab* 27:620, 2009)。その治療法としては効果に乏しい対症療法か人工関節置換術などの手術療法しかないが、日本国内での年間の人工膝関節置換術はわずか 7 万件弱にとどまっており、人工関節置換術が変形性関節症の最後の治療手段であれども決して標準的な治療に成り得ていない現状が浮き上がる。膝痛で困っている患者の圧倒的多数が人工膝関節置換術を敬遠しており、その理由としては人工関節置換術自体の侵襲が大きいこと、術後は 90 度までしか膝が曲がらないといった可動域制限があること、大きな人工物で関節全体を置換してしまうため一旦感染すると膝関節機能が全廃してしまう危険があることなどが挙げられる。そのような患者に対して行える本質的な治療法はいまだに存在しないが、社会の高齢化が急速に進むことによって今後さらに患者数は増えることは確実であり、社会的にも喫緊の課題である。

このような現状を打破すべく自家軟骨細胞や自家間葉系幹細胞を用いた軟骨再生技術も以前から研究され、一部は臨床応用の段階に至っているが、その対象疾患はあくまで関節軟骨の部分損傷にとどまっている。これらのセルソースは培養増幅に制約があるため、関節軟骨のほぼ全てが変性してしまう変形性関節症への応用は困難であり、また細胞の採取のためだけに 1 回余分な手術を行う必要があるなど欠点もある。一方、2006 年に開発された人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) はあらゆる体細胞への分化が可能であるだけでなく、増殖に制約もなく、また同種移植に向けてセルバンクが整備されつつあるなど再生医療のセルソースとして抜群の魅力を有する。しかしながら iPS 細胞から軟骨細胞を分化誘導する方法は確立されておらず、現時点でも数本の論文を数える程度でしかない。

申請者はこれまで軟骨細胞の発生・分化や変形性関節症の分子病態を研究する傍ら、軟骨インジケーターマウスの胎児線維芽細胞から iPS 細胞を樹立し、これまでの研究成果の知見を活かして軟骨分化に有用と考えられるサイトカインをスクリーニングし (*PLoS ONE* 8:e74137, 2013)、5-8 種類のサイトカインの組み合わせでヒト iPS 細胞から軟骨細胞を誘導することができ、免疫不全マウス膝への移植実験でも良好な関節軟骨として生着しうることを確認した (投稿準備中)。しかしながら

サイトカインは高額であり、ロット間によって効果も異なることから、将来の再生医療への応用を考えると出来るだけサイトカインへの依存度を抑える必要がある。

2. 研究の目的

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研究が進んでいるが、量的な制限などのため変形性関節症には応用できていない。近年開発された iPS 細胞は培養増幅に制限がなく様々な疾患への応用を目指して研究されており、膨大な細胞数を要する変形性関節症への応用には有望と考えられるが、軟骨への高率的な分化誘導法は現在も開発されていない。本研究では、申請者がこれまでに絞り込んだサイトカインの組み合わせを総合的に検討して、軟骨分化誘導法を一旦最適化する。次に蛍光インジケーター iPS 細胞を用いて間葉系分化、軟骨分化を誘導する化合物、遺伝子をスクリーニングし、ヒト iPS 細胞においてサイトカイン、化合物、遺伝子導入の組み合わせを再度最適化することにより、サイトカインへの依存を最小にした、廉価で再現性の高い、実用に堪え得る軟骨細胞分化誘導法の確立を目指す。

3. 研究の方法

まずこれまでに絞り込んだ既存のサイトカインの組み合わせの最適化を行う。これと平行して二重インジケーター iPS 細胞 (Col2a1-EGFP; Prx1-DsRED-iPSC) を用いて、間葉系分化、軟骨分化誘導能を示す化合物や遺伝子を広くスクリーニングし、有用なものを選定する。そしてこれらの化合物、遺伝子を可及的に活用してサイトカインの依存度を減らし、大量培養を伴った臨床応用にも堪え得る安定的かつ高率的な軟骨分化誘導法を開発する。さらに免疫不全マウスの膝関節への移植実験を行い、有効性と安全性を評価して実用に堪えうる軟骨分化誘導法を確立する。

4. 研究成果

初年度は複数の hiPS 細胞株を用いてサイトカインによる基礎検討を行った。初期胚からの中胚葉分化過程を Wnt, BMP, FGF シグナルによって誘導し、その組み合わせとタイミングをスクリーニングした。さらに後半の軟骨分化過程を GDF5, FGF, インスリンシグナルを中心にその組み合わせとタイミングを検討した。最適化した方法で軟骨細胞を誘導し、さらにこの分化した細胞がどの程度の軟骨組織形成能を有するかを確認するため、内径 3mm のモールドに入れてディスクを形成し、それを免疫不全マウスの膝関節軟骨の大腿骨溝に作成した 1mm 径の欠損孔に移植した。8 週間の経過で、iPS 細胞由来軟骨細胞はサフラニン 0 強陽性の軟骨組織を形成したが、正常軟

骨組織との境界には脱分化した組織が観察された。移植後 8 週間では腫瘍化は観察されなかったが、移植後 16 週間まで観察すると、6.7%の確率で腫瘍が発生した。組織学的に観察すると、腫瘍組織には外胚葉、中胚葉、内胚葉由来の組織が混在しており、テラトームであることが判明した。このことから、未分化な細胞が残存したことが原因と考えられた。

次に化合物を用いた誘導法の開発に移った。様々なスクリーニングの結果、初期分化には物質 X を用いた。X の濃度と作用させる日数を詳細に検討し、中胚葉分化に至る最適条件を絞り込んだ。中胚葉分化から軟骨分化を誘導する因子として、こちらも様々な化合物を検討し、物質 Y を選んだ。Y を開始するタイミング、使用する濃度、培養日数についても詳細に検討し、フィーダーフリーで未分化の状態に維持したヒト iPS 細胞から軟骨細胞マーカーである SOX9、COL2A1 が著明に上昇するまで 5 日間、さらに COL11A2 などの成熟軟骨マーカーが上昇するまで 9 日間、というプロトコルを確立することに成功した。詳細な条件は今後発表される論文を参照されたい。

たった 2 種類の化合物を用いてヒト iPS 細胞から軟骨細胞を分化誘導することから、この方法を two compounds (2C)法と命名した。この 2C 法は、従来の 7 - 9 種類のサイトカインを用いる方法と比べて、軟骨細胞分化誘導に有する期間が短かった。またフローサイトメトリーを用いて解析したところ、サイトカイン法ではどうしても分化し損ねた Nanog 陽性の未分化細胞がごく少数混じってしまうのに対し、2C 法では 0%と、極めて優れた分化誘導法であることが分かった。今後はこの分化誘導法を用いた軟骨再生医療の技術開発のほか、軟骨がどのように誘導されるのかを調べるツールとしても活用していく計画である。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 14 件)

1. Taniguchi Y, Kawata M, Chang SH, Mori D, Okada K, Kobayashi H, Sugita S, Hosaka Y, Inui H, Taketomi S, Yano F, Ikeda T, Akiyama H, Mills AA, Chung UI, Tanaka S, Kawaguchi H, and Saito T. Regulation of Chondrocyte Survival in Mouse Articular Cartilage by p63. *Arthritis Rheumatol*. 69:598-609, 2017. doi: 10.1002/art.39976.
2. Kobahashi H, Chang SH, Mori D, Itoh S, Hirata M, Hosaka Y, Taniguchi Y, Okada K, Mori Y, Yano F, Chung UI, Akiyama H, Kawaguchi K, Tanaka S, and Saito T. Biphasic regulation of chondrocytes by Rela through induction of anti-apoptotic and catabolic target genes. *Nat Commun*. 7:13336, 2016. doi: 10.1038/ncomms13336.
3. Aini H, Itaka K, Fujisawa A, Uchida H, Uchida S, Fukushima S, Kataoka K, Saito T, Chung UI, Ohba S. Messenger RNA delivery of a cartilage-anabolic transcription factor as a disease-modifying strategy for osteoarthritis treatment. *Sci Rep*. 6:18743, 2016. doi: 10.1038/srep18743.
4. Chang SH, Yasui T, Taketomi S, Matsumoto T, Kim-Kaneyama J, Omiya T, Hosaka Y, Inui H, Omata Y, Yamagami R, Mori D, Yano F, Chung UI, Tanaka S, Saito T. Comparison of mouse and human ankles and establishment of mouse ankle osteoarthritis models by surgically-induced instability. *Osteoarthritis Cartilage*. 24:688-97, 2016. doi: 10.1016/j.joca.2015.11.008.
5. Saito T, Yano F, Mori D, Kawata M, Hoshi K, Takato T, Masaki H, Otsu M, Eto K, Nakauchi H, Chung UI, Tanaka S. Hyaline Cartilage Formation and Tumorigenesis of Implanted Tissues Derived from Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Biomed Res*. 36:179-86, 2015. doi: 10.2220/biomedres.36.179.
6. Sugita S, Hosaka Y, Okada K, Mori D, Yano F, Kobahashi H, Taniguchi Y, Mori Y, Okuma T, Chang SH, Kawata M, Taketomi S, Chikuda H, Akiyama H, Kageyama R, Chung UI, Tanaka S, Kawaguchi H, Ohba S, Saito T. Transcription factor Hes1 modulates osteoarthritis development in cooperation with calcium/calmodulin-dependent protein kinase 2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 112:3080-5, 2015. doi: 10.1073/pnas.1419699112.
7. Okuma T, Hirata M, Yano F, Mori D, Kawaguchi H, Chung UI, Tanaka S, Saito T. Regulation of Mouse Chondrocyte Differentiation by CCAAT/Enhancer-binding Proteins. *Biomed Res*. 36:21-9, 2015. doi: 10.2220/biomedres.36.21.
8. Okada K, Fukai A, Mori D, Hosaka Y, Yano F, Chung UI, Kawaguchi H, Tanaka S, Ikeda T and Saito T. Identification of SCAN domain zinc-finger gene ZNF449 as a novel factor of chondrogenesis. *PLoS One*. 9:e115169, 2014. doi: 10.1371/journal.pone.0115169.
9. Fujiwara S, Hoshikawa S, Ueno T, Hirata M, Saito T, Ikeda T, Kawaguchi H, Nakamura K, Tanaka S, Ogata T. SOX10 Transactivates S100B to Suppress Schwann Cell Proliferation and to Promote Myelination. *PLoS One*. 9:e115400, 2014. doi: 10.1371/journal.pone.0115400.
10. Mori Y, Chung UI, Tanaka S, Saito T. Determination of differential gene expression profiles in superficial and deeper

- zones of mature rat articular cartilage using RNA sequencing of laser microdissected tissue specimens. *Biomed Res.* 35:263-70, 2014.
11. Mori Y, Mori D, Chung UI, Tanaka S, Heierhorst J, Buchou T, Baudier J, Kawaguchi H, Saito T. S100A1 and S100B are dispensable for endochondral ossification during skeletal development. *Biomed Res.* 35:243-50, 2014.
 12. Yano F, Ohba S, Hosaka Y, Saito T, Chung UI. Disease-modifying effects of TD-198946 on progressed osteoarthritis in a mouse model. *Ann Rheum Dis.* 73:2062-4, 2014. doi: 10.1136/annrheumdis-2014-205672.
 13. Kanke K, Masaki H, Saito T, Komiyama Y, Hojo H, Nakauchi H, Lichtler AC, Takato T, Chung UI, Ohba S. Stepwise Differentiation of Pluripotent Stem Cells into Osteoblasts Using Four Small Molecules under Serum-free and Feeder-free Conditions. *Stem Cell Reports.* 2:751-60, 2014. doi: 10.1016/j.stemcr.2014.04.016.
 14. Mori Y, Saito T, Chang SH, Kobayashi H, Ladel CH, Guehring H, Chung UI, Kawaguchi H. Identification of fibroblast growth factor-18 as a molecule to protect adult articular cartilage by gene expression profiling. *J Biol Chem.* 289:10192-200, 2014. doi: 10.1074/jbc.M113.524090.
全て査読あり
- [学会発表](計 38件)
- 1) 齋藤琢：変性性関節症の制御メカニズム 愛媛大学分子病態医学セミナー、愛媛大学(愛媛県松山市) 2017.2.6.
 - 2) 齋藤琢：過剰な力学的ストレス負荷による関節軟骨変性の分子メカニズム 第39回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市) 2016.12.2
 - 3) 齋藤琢：変性性関節症の制御メカニズム Orthopedic Research Club、かずさアカデミアパーク(千葉県木更津市) 2016.11.19
 - 4) Taku Saito: Regulation of Articular Cartilage Homeostasis and Osteoarthritis Development by the NF-kappaB signaling. 2016 Cold Spring Harbor Asia Conference on Bone & Cartilage, Suzhou Dushu Lake Conference Center, Suzhou, China, 2016.10.26.
 - 5) 齋藤琢：Notch・Hes1による軟骨細胞の制御機構 第31回日本整形外科学会基礎学術集会、福岡国際会議場(福岡県福岡市) 2016.10.13
 - 6) 齋藤琢：過剰な力学的ストレスによる関節軟骨異化のメカニズム 第34回日本骨代謝学会学術集会、大阪国際会議場(大阪府大阪市) 2016.7.21
 - 7) Taku Saito: Perspective of disease-modifying osteoarthritis drugs 第3回アジア太平洋骨代謝学会議、大阪国際会議場(大阪府大阪市) 2016.7.20
 - 8) 齋藤琢：分子生物学からみた変性性関節症の背景と病態 第35回 Kyoto Orthopaedic Seminar、京都大学(京都府京都市) 2016.4.12
 - 9) 齋藤琢：転写因子を起点とした変性性関節症のメカニズム 第29回日本軟骨代謝学会、広島大学(広島県広島市) 2016.2.19
 - 10) Taku Saito: Roles of Notch signaling in skeletal development and osteoarthritis. 第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学会大会 合同大会、神戸ポートピア(兵庫県神戸市) 2015.12.2
 - 11) 齋藤琢：変性性関節症の分子治療への展望 第43回日本関節病学会、札幌コンベンションセンター(北海道札幌市) 2015.11.5
 - 12) 齋藤琢：Roles of HIF and Notch signaling in articular cartilage 12th Meeting of the Bone Biology Forum, 幕張メッセ(千葉県千葉市), 2015.08.21
 - 13) 齋藤琢：Notch/Rbpj/Hes1経路による変性性関節症の制御機構 第33回日本骨代謝学会、京王プラザホテル(東京都新宿区) 2015.7.23
 - 14) 齋藤琢：分子生物学からみた変性性関節症の背景と病態 第47回ひむか運動器セミナー、宮崎大学(宮崎県宮崎市) 2015.7.6
 - 15) 齋藤琢：変性性関節症の分子メカニズム 第15回日本抗加齢医学会総会、福岡国際会議場(福岡県福岡市) 2015.5.30
 - 16) Soma K, Saito T, et al. Roles Of R-spondin2; The Susceptibility Gene For Ossification Of Posterior Longitudinal Ligament. Annual meeting of the Orthopaedic Research Society. San Diego Convention Center, San Diego, CA. 2017.3.19
 - 17) 河田学、齋藤琢、他：p63 transcript variantsによる四肢発生の多様な制御機構 第31回日本整形外科学会基礎学術集会、福岡国際会議場(福岡県福岡市) 2016.10.14
 - 18) 尾市健、齋藤琢、他：腰椎椎間関節切除によるマウス椎間板変性モデルの樹立、第31回日本整形外科学会基礎学術総会、福岡国際会議場(福岡県福岡市) 2016.10.14
 - 19) 矢野文子、齋藤琢、他：Runx1による軟骨分化制御機構 第31回日本整形外科学会基礎学術集会、福岡国際会議場(福岡県福岡市) 2016.10.13
 - 20) 相馬一仁、齋藤琢、他：後縦靭帯骨化症の疾患感受性候補遺伝子RSPO2の検討 第31回日本整形外科学会基礎学術集会、福岡国際会議場(福岡県福岡市) 2016.10.13

- 21) 牧井勇磨、齋藤琢、他：転写因子 HIF-2 α は関節軟骨最表層に発現し、関節軟骨に保護的に作用する 第 31 回日本整形外科学会基礎学術集会、福岡国際会議場（福岡県福岡市）、2016.10.13
- 22) 張成虎、齋藤琢、他：軟骨に対するメカニカルストレスの作用 第 17 回運動器科学研究会、大阪国際会議場（大阪府大阪市）2016.9.3
- 23) 矢野文子、齋藤琢、他：Runx1 による軟骨分化制御機構 第 34 回日本骨代謝学会学術集会、大阪国際会議場（大阪府大阪市）2016.7.22
- 24) 相馬一仁、齋藤琢、他：後縦靭帯骨化症の疾患感受性候補遺伝子 RSPO2 の検討 第 34 回日本骨代謝学会学術集会、大阪国際会議場（大阪府大阪市）2016.7.21
- 25) 尾市健、齋藤琢、他：腰椎椎間関節切除によるマウス椎間板変性モデルの樹立、第 34 回日本骨代謝学会学術総会、大阪国際会議場（大阪府大阪市）2016.7.20-23（ポスター）
- 26) 河田学、齋藤琢、他：p63 transcript variants による四肢発生の多様な制御機構 第 34 回日本骨代謝学会学術集会、大阪国際会議場（大阪府大阪市）2016.7.21
- 27) 牧井勇磨、齋藤琢、他：転写因子 HIF-2 α は関節軟骨最表層に発現し、関節軟骨に保護的に作用する 第 34 回日本骨代謝学会学術集会、大阪国際会議場（大阪府大阪市）2016.07.21
- 28) 河田学、齋藤琢、他：p63 transcript variants による四肢発生の多様な制御機構 第 2 回日本骨免疫学会、ホテルモントレ沖縄（沖縄県恩納村）2016.7.6
- 29) 相馬一仁、齋藤琢、他：後縦靭帯骨化症の疾患感受性候補遺伝子 RSPO2 の検討 第 2 回日本骨免疫学会、ホテルモントレ沖縄（沖縄県恩納村）2016.7.6
- 30) 牧井勇磨、齋藤琢、他：転写因子 HIF-2 α は関節軟骨最表層に発現し、関節軟骨に保護的に作用する 第 2 回日本骨免疫学会、ホテルモントレ沖縄（沖縄県恩納村）、2016.7.8
- 31) 尾市健、齋藤琢、他：腰椎椎間関節切除によるマウス椎間板変性モデルの樹立、第 2 回日本骨免疫学会、ホテルモントレ沖縄（沖縄県恩納村）2016.7.6（ポスター）
- 32) 矢野文子、齋藤琢、他：Runx1 による軟骨分化制御機構 第 2 回骨免疫学会、ホテルモントレ沖縄（沖縄県恩納村）2016.7.6
- 33) Kawata M, Saito T, et al. Different regulation of limb development by p63 transcript variants. Annual meeting of the

Orthopaedic Research Society. Disney Coronado Springs Resort, Orlando, FL 2016. 3. 8

- 34) 河田学、齋藤琢、他：p63 transcript variants による四肢発生の多様な制御機構 第 29 回日本軟骨代謝学会、広島大学（広島県広島市）2016.2.19
- 35) 尾市健、齋藤琢、他：腰椎椎間関節切除によるマウス椎間板変性モデルの樹立 第 29 回日本軟骨代謝学会、広島大学（広島県広島市）2016.2.19
- 36) 河田学、齋藤琢、他：p63 transcript variants による四肢発生の多様な制御機構 第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会、神戸ポートピア（兵庫県神戸市）2015.12.2
- 37) 張成虎、齋藤琢、他：マウス変形性足関節症モデルの確立 第 30 回日本整形外科学会基礎学術集会 富山国際会議場（富山県富山市）2015.10.22-23
- 38) 河田学、齋藤琢、他：p63 transcript variants による四肢発生の多様な制御機構 第 30 回日本整形外科学会基礎学術集会 富山国際会議場（富山県富山市）2015.10.22-23

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：軟骨細胞の製造方法
 発明者：齋藤 琢、他 2 名
 権利者：国立大学法人 東京大学
 種類：特許
 番号：特願 2016-163872
 出願年月日：2016 年 8 月 24 日
 国内外の別：国内

取得状況(計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 取得年月日：
 国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
 東京大学医学部整形外科
<http://www.u-tokyo-ortho.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齋藤 琢 (SAITO Taku)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：30456107

(2)研究分担者

矢野 文子 (YANO Fumiko)

東京大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：80529040