

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 12 月 7 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670652

研究課題名(和文) マウスiPS細胞から軟骨細胞への分化制御機能を有する糖鎖マーカーの探索

研究課題名(英文) Identification of functional glyco-biomarkers during chondrogenesis of mouse iPS cells

研究代表者

岩崎 倫政 (Iwasaki, Norimasa)

北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：30322803

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：iPS細胞から軟骨細胞への分化に伴う細胞上の糖鎖構造解析を行った。分化に伴い複数の糖鎖分子において構造変化を認めた。これらの糖鎖分子の分化における機能的な重要性が示唆された。糖鎖は生物学的多様性を規定していると考えられており、糖鎖生物学的アプローチに基づく解析によりiPS細胞をはじめとする幹細胞の癌化や脱分化といった現象の解明が期待される。本研究成果を基盤として、今後は構造や発現変化を認めた糖鎖分子の分化および軟骨細胞の恒常性維持における機能を解析していく。

研究成果の概要(英文)：Alterations in the structure of stem cell surface glycoforms were found during chondrogenesis. Based on the obtained results, several glycans are considered to play important roles in stem cell-derived chondrogenesis. The identified glycans have functional potential of chondrogenic biomarkers for the safety of cartilage regenerative medicine.

研究分野：整形外科学

キーワード：幹細胞 軟骨細胞分化 糖鎖

## 1. 研究開始当初の背景

- (1) 糖タンパク質や糖脂質などの複合糖質は、生命現象においてきわめて重要な役割を担っている。複合糖質中でタンパク質や脂質に結合した状態で存在し、それらの機能を修飾している分子がグルコースやガラクトースなどの糖が鎖状に連なって形成されている糖鎖である。そのような理由から、糖鎖機能の解明は遺伝子もしくはタンパク質レベルでは説明困難な多くの生命現象や疾患の病態解明に繋がると期待されている。
- (2) 申請者は運動器における糖鎖が有する機能に着目し、糖鎖生物学的アプローチによる運動器糖鎖解析を行ってきた。その結果、運動器細胞の機能・活性において糖鎖が重要な役割を果たしていることを明らかにしてきた。さらに、変形性関節症、関節リウマチ、骨粗鬆症の病態に糖鎖機能が深く関与していることを証明してきた。

## 2. 研究の目的

- (1) 糖鎖分子は細胞表面に豊富に存在している。したがって、外部からの細胞への刺激に対して鋭敏に反応し、signal伝達を制御していると考えられる。申請者は、この糖鎖分子が持つ特異的機能と先行研究から得られた知見より、“幹細胞から軟骨細胞への分化に伴い、細胞上の特定の糖鎖構造が変化する”という作業仮説を立てた。
- (2) 本研究の目的は、上記の作業仮説を基にマウス iPS 細胞から軟骨細胞への分化過程における細胞表面に存在する糖鎖構造と発現を解析することである。

## 3. 研究の方法

- (1) 本研究では、マウス iPS 細胞から多段階誘導ステップを経て軟骨細胞を分化誘導する。各分化過程における細胞上の糖鎖構造を解析し、定量的評価を行う。なお、糖鎖構造解析は申請者がすでに確立している手技を用いて行う。比較検討群として骨髄間葉系幹(BMSC)細胞から軟骨細胞への分化細胞を用いる。
- (2) 軟骨細胞分化過程における糖鎖構造変化の解明：各分化過程ならびに成熟軟骨細胞における糖鎖構造解析を行う。得られたデータを定量化することで分化過程間の統計学的比較検討を行う。これにより有意な構造変化を示した糖鎖分子を同定する。
- (3) 糖鎖による軟骨細胞分化制御機構の解明：同定した糖鎖の生合成に関連する酵素の発現プロファイルを評価する。同定した糖鎖の発現変化を検討し、その関連酵素を強制的に調節する。それにより、細胞分化に及ぼす影響を検証しその機能を解明する。

## 4. 研究成果

- (1) iPS 細胞から多段階誘導ステップを経て軟骨細胞への分化誘導が可能であった。明らかな腫瘍化も認めず、解析サンプルとしては十分なものが得られた。
- (2) iPS 細胞から軟骨細胞への分化に伴う細胞上の糖鎖構造の解析が可能であった。得られたデータは再現性が高く、統計学的解析が十分可能なものであった。

( 3 ) iPS 細胞から分化誘導された細胞が、軟骨細胞として機能することを確認する目的で、高純度アルギン酸ゲル内で 3 次元培養した。培養細胞では SOX9、II 型コラーゲン、アグリカンの経時的発現上昇を認めた。

( 4 ) iPS 細胞から軟骨細胞への分化に伴い、N 結合型糖鎖において (Man)<sub>5</sub> + (GlcNAc)<sub>2</sub> および (Man)<sub>9</sub> + (GlcNAc)<sub>2</sub> に有意な変化を認めた。またスフィンゴ糖脂質糖鎖においては、(Hex)<sub>3</sub>(HexNAc)<sub>1</sub>(Fuc)<sub>1</sub>(Neu5Ac)<sub>1</sub>、(Hex)<sub>3</sub>(HexNAc)<sub>1</sub>(Fuc)<sub>1</sub>、(Hex)<sub>3</sub>(HexNAc)<sub>2</sub>(Fuc)<sub>1</sub>(Neu5Ac)<sub>1</sub>、(Hex)<sub>3</sub>(HexNAc)<sub>2</sub>(Fuc)<sub>1</sub>、(Hex)<sub>4</sub>(HexNAc)<sub>1</sub>(Fuc)<sub>1</sub>(Neu5Ac)<sub>1</sub>、(Hex)<sub>4</sub>(HexNAc)<sub>1</sub>(Fuc)<sub>1</sub> などフコースを有する糖脂質糖鎖の有意な増加が認められた。

( 5 ) 同定した糖鎖分子の構造変化ならびに発現変化より、同定した分子が iPS 細胞から軟骨細胞の分化制御機能を有する可能性が示された。

( 6 ) 今後は、同定した糖鎖分子の iPS 細胞から軟骨細胞への分化制御機構における機能をさらに検証していく予定である。また、同定した糖鎖が結合しているタンパク質などを決定することで、複合糖質としての機能解析も行う方針である。本研究成果の臨床応用へ向けて、生体内 ( in vivo ) での幹細胞から軟骨細胞への分化過程における糖鎖構造解析を行う予定である。

## 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 1 件 )

Hontani K, Onodera T, Momma D, Matsuoka M, Baba R, Joutoku Z, Matsubara S, Homan K, Hishimura R, Kim WY, Iwasaki N: Chondrogenic Differentiation Of Mouse Induced Pluripotent Stem Cells (iPSCs) Using The Three Dimensional Culture With Ultra-purified Alginate Gel (UPAL Gel). ORS Transaction 査読有, 41:1376, 2016

[ 学会発表 ] ( 計 7 件 )

ORS 2016 Annual Meeting (March 5-8, 2016, Orlando FL)

Chondrogenic Differentiation Of Mouse Induced Pluripotent Stem Cells (iPSCs) Using The Three Dimensional Culture With Ultra-purified Alginate Gel (UPAL Gel).

Hontani K, Onodera T, Momma D, Matsuoka M, Baba R, Joutoku Z, Matsubara S, Homan K, Hishimura R, Kim WY, Iwasaki N

第 29 回 日本軟骨代謝学会 (平成 28 年 2 月 19 ~ 20 日、広島)

Ultra-purified alginate gel (UPAL gel) と多段階分化誘導法を併用したマウス iPS 細胞の生体内における軟骨分化誘導.

本谷和俊、小野寺智洋、寺島理代、門間太輔、松岡正剛、馬場力哉、上徳善太、松原新史、宝満健太郎、菱村亮介、岩崎倫政

第 30 回 日本整形外科学会基礎学術集会 (平成 27 年 10 月 22 ~ 23 日、富山) 高純度アルギン酸ゲルと多段階分化誘導法を併用したマウス iPS 細胞軟骨分化誘導法の確立.

本谷和俊、小野寺智洋、寺島理代、門間太輔、松岡正剛、馬場力哉、上徳善太、

松原新史、宝満健太郎、岩崎倫政

Biomaterials International 2015 (June 1-5, 2015, Kenting, Taiwan)

An acellular cartilage tissue repair technique using an ultrapurified alginate gel for the treatment of rabbit osteochondral defects.

Iwasaki N, Baba R, Momma D, Matsuoka M, Hontani K, Onodera T

International Cartilage Repair Society 2015 (May 8-11, 2015, Chicago IL, USA)

Chondrogenic differentiation of mouse Induced pluripotent stem cells (iPSCs) using ultra-purified alginate gel (UPAL gel).

Hontani K, Onodera T, Momma D, Matsuoka M, Baba R, Iwasaki N

第 28 回 日本軟骨代謝学会 (平成 27 年 3 月 6~7 日、東京)

ultra-purified alginate gel (UPAL gel) を用いたマウス人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) からの軟骨細胞分化誘導.

本谷和俊、小野寺智洋、寺島理代、門間太輔、松岡正剛、馬場力哉、岩崎倫政

Sapporo Orthopaedic Seminar 2015

(平成 27 年 11 月 28 日、札幌市 京王プラザホテル)

「軟骨再生医学の臨床応用 - 基礎から臨床へ向けて -」.

岩崎倫政

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

産業種別：特許権

名称：iPS 細胞から軟骨細胞への分化判定方法および iPS 細胞から軟骨細胞への分化誘導を判定するための分化マーカー

発明者：岩崎 倫政、小野寺 智洋、古川 潤一、本谷 和俊

特許出願人 (権利者)：国立大学法人北海道大学

番号：2016-156291

出願年月日：平成 28 年 8 月 9 日

国内外の別：国内

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等 なし

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

岩崎 倫政 (IWASAKI, Norimasa)

北海道大学・医学研究科・教授

研究者番号：30322803

### (2)研究分担者

小野寺智洋 (ONODERA, Tomohiro)

北海大学・大学病院・講師

研究者番号：70547174