



Title	人工多能性幹細胞（iPS細胞）からの軟骨細胞分化誘導と糖鎖解析を用いた新規バイオマーカーの探索〔論文内容及び審査の要旨〕
Author(s)	本谷, 和俊
Description	配架番号 : 2317
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第12576号
Issue Date	2017-03-23
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/66129
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Kazutoshi_Hontani_review.pdf, 審査の要旨



学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医 学） 氏 名 本谷 和俊

主査 教授 清野 研一郎
審査担当者 副査 教授 清水 宏
副査 教授 岩崎 倫政
副査 教授 佐邊 壽孝

学 位 論 文 題 名

人工多能性幹細胞（iPS 細胞）からの軟骨細胞分化誘導と糖鎖解析を用いた
新規バイオマーカーの探索

(Chondrogenic differentiation of mouse induced pluripotent stem cells (iPSCs) and identification of differentiation biomarkers for the chondrogenic differentiation of iPSCs using glycomics monitoring)

関節軟骨は、潤滑な関節運動や衝撃の吸収などの物理的機能を果たしている。関節軟骨は組織学的には硝子軟骨と呼ばれ、細胞密度が低く、血管・神経・リンパを欠き、細胞外マトリックス構造に富んでいる。このような特徴から関節軟骨は自然治癒能力に乏しく、一度損傷が生じると、やがて関節症を発症する。損傷した関節軟骨は硝子軟骨で修復することが望ましいが、根治的な軟骨修復法はない。このような現状に対し、新規治療法として注目を集めているのが、軟骨再生治療である。近年、最も臨床応用が進んだ領域として、軟骨細胞を用いた軟骨再生治療がある。しかし、その成績は従来の治療法の成績を凌駕するものではない。その原因として、軟骨細胞は増殖能が低く細胞数を十分に確保できないこと、軟骨細胞は培養中に容易に脱分化してしまうこと、さらに正常軟骨組織の採取と移植といった計 2 度の手術が必要なことなどが挙げられる。これに対し、iPS 細胞などの幹細胞を用いた軟骨再生医療は、これらの問題点を解決する治療戦略である。一方で、幹細胞から成熟細胞への分化過程において、一定数の細胞が脱分化やがん化が生じる危険性がある。特に、関節軟骨は非生命維持組織のため、軟骨再生医療において移植する幹細胞のがん化は絶対に克服すべき課題である。そのためには、幹細胞から軟骨細胞への分化誘導法を確立し、それに関わる分化マーカーを同定することが不可欠である。

本研究で申請者らは、第一にマウス iPS 細胞からの軟骨分化誘導法の確立した。多能性幹細胞からの軟骨細胞分化に関してはこれまでに軟骨細胞との共培養や、胚葉体を経由する方法、間葉系幹細胞様細胞を経由する方法などが紹介されている。間葉系幹細胞様細胞を経由する方法では、共培養で危惧される支持細胞の混入や胚様体形成で危惧される他胚葉への分化の危険性を回避することが可能である。一方、未分化細胞からの軟骨分化誘導では、細胞外マトリックスの三次元構造を模倣することが重要であるとされてきた。申請者らは、関節鏡視下の細胞移植が可能な高純度低エンドトキシンアルギン酸ゲル（以下、UPAL ゲル）を開発し、骨髄間葉系細胞（以下、BMSCs）を移植する軟骨再生医療に取り組んできた。この UPAL ゲルは、移植した BMSC の軟骨分化誘導能を促進することが証明されている。以上を踏まえ、本研究ではマウス iPS 細胞からの軟骨分化誘導法として、間葉系幹細胞様細胞を経由する多段階分化誘導と UPAL gel を用いた三次元培養を併用する方法を考案するに至った。その結果、申請者らは iPS 細胞由来間葉系幹細胞様細胞（iPS-MSCs）を経由する多段階分化と UPAL gel 3D culture を組み合わせることで、iPS 細胞が特使的に軟骨細胞に分化誘導されることを示した。

次に申請者らは、iPS 細胞から分化した軟骨細胞の性質を評価することを目的に、その分化過程に関連する新規分化マーカーの探索へと研究を進めた。幹細胞上の分化マーカーに関して、これまでに遺伝子やタンパク質を基盤とした探索研究が数多く行われてきたが、臨床応用が可能な分化マーカーの同定に至ったものはきわめて少ない。一方、タンパク質や脂質は翻訳後に種々の分

子により修飾されて、はじめてその機能を獲得することが少なくないが、近年、この翻訳後修飾の約半数を糖鎖による修飾が担っていることが明らかにされている。すなわち糖鎖の機能を解明することは、これまで遺伝子研究やタンパク質研究では説明困難であった多くの生命現象や疾患の病態のメカニズムの解明に繋がると期待されている。申請者らは、生体膜糖鎖構造の解明が、これまで説明困難であった軟骨変性や軟骨修復のメカニズムに対する有効な解決手段になると考え、糖鎖がマウス iPS 細胞から軟骨細胞への分化過程で分化マーカーとなる可能性を見出した。その結果、申請者らは軟骨細胞への分化過程で特徴的な構造変化を示すいくつかの糖鎖を同定するに至った。

審査にあたり、まず副査の佐邊教授から細胞培養では、抗生物質を恒常的に使用するべきではないとの助言があった。その最大の理由として、マイコプラズマ感染や他の潜在性の感染を隠蔽する可能性があることがあげられた。また、副査の佐邊教授からは、研究成果を臨床に応用することを最終目標として定める研究においては、ヒトを対象にした研究を行うべきであるとの助言があった。申請者らは本研究の結果を踏まえ、同様の実験系でヒト iPS 細胞からの軟骨分化誘導へと研究を展開しており、今後、ヒト iPS 細胞においても有用な軟骨分化誘導法の確立や分化マーカーの同定が行われることが期待される。

副査の清水教授から iPS 細胞を軟骨再生医療に用いる際の免疫拒絶反応への対策、自家移植との比較について質問があり、申請者は iPS 細胞バンク化構想では免疫拒絶反応が起きにくい品質の標準化された細胞をストックする計画が進められていること、および軟骨組織自体が血管やリンパを欠く組織であるために免疫拒絶が起きにくいことを回答した。さらに、iPS 細胞バンク化により予め安全性が高く高品質な iPS 細胞が保存され、それを必要に応じて迅速に提供できるようになることが期待され、自家移植と比べると格段に時間も費用も抑えられ、手術侵襲という点でも、患者の負担を減らすことが可能となるなどの利点が考えられる。

副査の岩崎教授から、未分化な状態で iPS 細胞を UPAL ゲルに包埋した群でも、軟骨分化誘導を行うことにより細胞がアルシアンブルーに濃染されることについて質問があった。申請者は、未分化な iPS 細胞からの軟骨分化誘導でも、軟骨への分化は起こっていると考えられるが、RT-PCR の結果から、その分化は軟骨方向に限られたものではなく、骨芽細胞や脂肪細胞への分化も起こっていると回答した。iPS-MSCs を経由する多段階分化では、骨芽細胞分化マーカーや脂肪細胞分化マーカーの発現は減少しており、軟骨特的な分化が起こったことが示された。

主査の清野教授から、アルギン酸を軟骨分化に用いることの利点について質問があり、申請者は、アルギン酸は細胞外マトリックスに似た糖鎖構造を有し、scaffold マテリアル、あるいは細胞を包埋する carrier として用いることで軟骨再生を促進することが知られていると回答した。更に本研究で用いた UPAL ゲルがエンドトキシン含有量を低減化することにより、生体内での炎症惹起を起こさない点にも言及し、従来のアルギン酸ゲルでは困難であった臨床での応用が可能となったと回答した。さらに清野教授から、幹細胞を用いた軟骨再生医療に関して、現在臨床応用が試みられている方法について質問があり、申請者は BMSCs を用いた軟骨再生医療について回答した。BMSCs は軟骨再生医療において有用性が報告されているが、その増殖能力は有限であり、十分量の細胞を確保することが難しいという問題がある。iPS 細胞は分化多能性と無限の自己複製能力を有する細胞であり、細胞を十分に確保できる。さらにバンク化によりドナーからの組織採取が不要となれば、非侵襲的かつ迅速に iPS 細胞が提供可能となる。このような背景から iPS 細胞は軟骨再生に有利である。また、BMSCs を用いた細胞シートの移植が試みられており、ある程度良好な成績を残しているが、その構造配列は不均一であり、正常軟骨組織に比較して物理的に脆弱であることがわかっている。アルギン酸などのバイオマテリアルを、幹細胞を用いた軟骨再生医療に併用することで、構造的な脆弱性を改善することが報告されており、UPAL ゲルと iPS 細胞を併用する軟骨再生医療はこれらの問題点を解決する治療戦略である。

本研究で得られた成果により、幹細胞由来軟骨細胞を用いた現行の再生治療の抱える問題点（細胞採取のための正常軟骨組織の犠牲、軟骨細胞の低い活性等）の解決が可能となり、がん化リスクのない安全な軟骨再生医療の臨床応用が加速化する。これにより、根治的治療法が存在しない関節疾患の制圧も期待され、将来的には健康寿命の延伸にも繋がることが期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。