HOKKAIDO UNIVERSITY

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［全文の要約］
Author(s)	本谷, 和俊
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 配架番号：2317 他
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/2115/66130
Type	doctoral thesis
File Information	Kazutoshi_Hontani_summary.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学　位　論　文（要 約）

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）

2017 年 3 月

北　海　道　大　学

本　谷　和　俊

学　位　論　文（要約）

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）

2017 年 3 月

北　海　道　大　学

本　谷　和　俊

学位論文要約

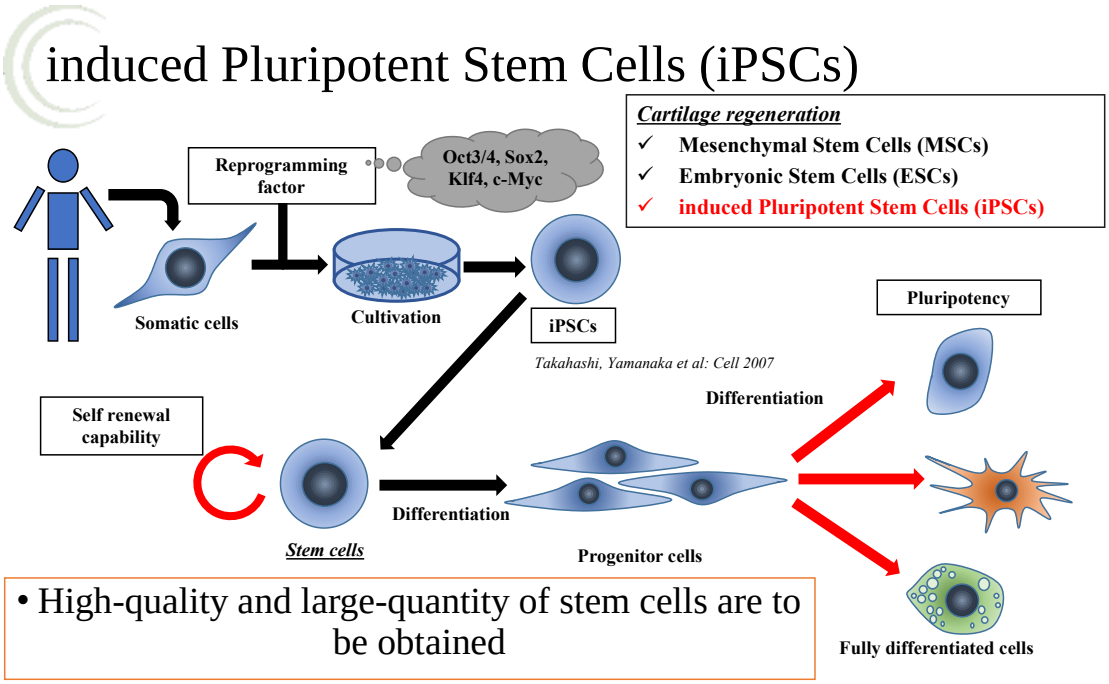
現在，わが国は人類史上類を見ない超高齢化社会に突入している．これに伴い，要介護者数は急増し，10 年間で約 2 倍の数に達している．このため，自立した生活を送れる期間の指標となる健康寿命は男性 71 歳，女性 74 歳で平均寿命との差は男性約 9 年，女性約 12 年と拡大して介護費用も含めた医療費高騰と労働力の損失がきわめて深刻化している．要介護原因となり健康寿命の延伸を阻害しているもので脳血管疾患についで多いものが，認知症と並び関節疾患である．その罹患率は国民総人口の約 20%，50 歳以上では女性 75%，男性 54%にも達し（ROAD study）[1-3]，先進諸国における関節疾患の急増に伴う経済的損失は年間国民総生産の約 2.5%に上ると推測される（WHO）．したがって，関節疾患の制圧は社会・経済的にも緊要な課題である．

一方，関節疾患の病態の首座である関節軟骨は，骨端に存在する組織であり，潤滑な関節運動や衝撃の吸収などといった高度な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，type 2 コラーゲンを主とした特有の細胞外マトリックス構造に富んでいる．このように血流が乏しいこと，および細胞周囲に密度の高いマトリックが存在していることから関節軟骨は自然治癒能力にきわめて乏しく，一度損傷が生じるとその進行を抑制することは困難である．治癒過程において損傷した軟骨は瘢痕組織である線維軟骨により置換されることがあるが，その機能は硝子軟骨に比較して劣るため，線維軟骨はやがて変性・消失し関節症を発症する [4,5]．したがって，関節軟骨は硝子軟骨で修復することが望ましく，そのためには薬物やリハビリ治療には限界があり，手術治療が唯一の根治的治療法となる [6]．

しかし，従来の drilling や microfracture といった骨髄を刺激する手術法では，関節軟骨は硝子軟骨による修復ではなく，線維軟骨での修復しか得られず，有効性と安全性を兼ね備えた絶対的な手術法とは言い難い [7,8]．このような現状を背景として，近年，臨床応用が進められている手術法が軟骨細胞を用いた軟骨再生治療である [9,10]．本治療法は最も臨床応用が進んだ再生医療領域の一つで，わが国を含めた医療先進国において広く行われているが，その成績は従来の手術法のそれを凌駕するものではない [11,12]．その主原因の一つが，軟骨細胞の使用に由来するものである．第一に，軟骨組織中に存在する軟骨細胞数は少なく，その増殖能も低いため移植に必要な軟骨細胞数を確保できない．第二に，培養中に容易に脱分化して線維芽細胞等になってしまう [13]．さらに，正常軟骨組織の採取に伴う

合併症や，計 2 度の手術（採取と移植）が必要なことなど，手術手技上の問題もある[14-16]．これに対し，iPS 細胞をはじめとする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可能性を秘めた治療戦略である．

幹細胞を用いた軟骨再生医療では，軟骨細胞の供給源として，これまでに間葉系幹細胞（Mesencymal stem cells，MSCs）[17-20] や胚性幹細胞（embryonic stem cells ，ES 細胞）[21,22] が用いられてきた．間葉系幹細胞は骨や脂肪，軟骨に分化する能力を持つ幹細胞で，骨髄 [23] や骨膜 [24]，脂肪組織 [25]，滑膜 [26]，骨格筋 [27] など体内の様々な組織から採取可能である．再生医療における有用な細胞供給源と考えられるが，その増殖能力は有限であり，生体外で増殖した場合には必ず老化し増殖を停止してしまうため，品質の標準化された細胞を十分量確保することは困難である．一方 ES 細胞は各胚葉への分化多能性を有し，かつ無限の自己複製能を有する細胞である [28,29]．事実上，無限の数の細胞を獲得することが可能であるため，品質の標準化された細胞製剤を十分に提供できるという利点がある．しかしながら，ES 細胞は受精卵を破壊して樹立されるため，生命倫理上の問題が存在し，各国によってその作成と使用に関する指針が定められてきた．2007 年に山中らにより樹立が報告された人工多能性幹細胞（induced pluripotent stem cells，iPS 細胞）[30,31] は分化した体細胞に数種類のリプログラミング因子を導入することで得られる多能性幹細胞であり，ES 細胞と同様に分化多能性と無限の自己複製能を有する細胞である．品質の標準化された細胞を十分に提供することが可能であり，ES 細胞樹立に伴う受精卵の破壊という生命倫理問題を回避することができるため，再生医療における細胞供給源としておおいに期待されている．また，iPS 細胞は将来的にバンク化されることが見込まれており，それによってドナーからの組織採取が不要となるため，非侵襲的かつ迅速に必要な品質の iPS 細胞が提供可能となることが予想される．このような背景から iPS 細胞は軟骨再生に有利である．



一方で，人工多能性幹細胞（iPS 細胞）などの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（標的細胞以外の細胞へ分化）やがん化が生じる危険性がある [32,33]．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有用な分化誘導法を確立し，それに関わる分化マーカーを同定し，軟骨細胞へ分化した細胞やその前駆細胞を選択的に回収する分化培養システムを開発することが不可欠である．そこでわれわれは，iPS 細胞から軟骨細胞への有用な分化誘導法を確立し，さらにそれに関わる分化マーカーを同定することを目的に本研究をすすめた．

われわれは，第一にマウス iPS 細胞からの軟骨分化誘導法の確立を行うこととした．多能性幹細胞からの軟骨細胞分化誘導に関してはこれまでに様々な方法が報告されており，軟骨細胞との共培養を行う方法 [34] や，胚葉体を経由する方法 [35]，間葉系幹細胞様細胞を経由する方法 [36,37] などが紹介されている．軟骨細胞との共培養においては支持細胞として用いる軟骨細胞からサイトカインが産生されるという利点があるが，支持細胞として用いた軟骨細胞が混入する危険性がある．また，この誘導系を用いて獲得される組織は硝子軟骨と線維軟骨が混在するという問題点がある．胚様体を経由する方法では中胚葉だけでなく，内胚葉および外胚葉へも誘導される．そのため，他の分化した細胞が混入する危険性があり，分化効率が低くなることが懸念されている．これに対し，軟骨細胞前駆細胞としての間葉系幹

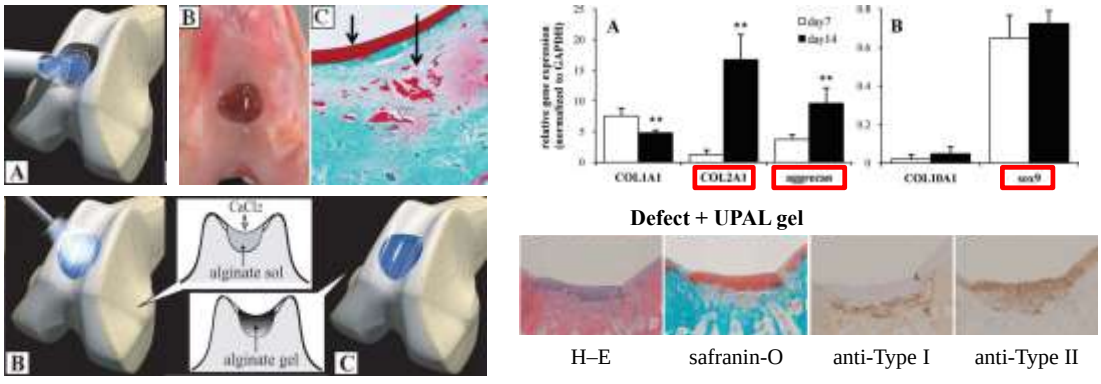
細胞様細胞を経由する方法では支持細胞の混入や他胚葉への分化の危険性を回避することが可能である. また, 間葉系幹細胞様細胞を未分化な状態で増殖可能であるという利点がある.

一方, 未分化細胞からの軟骨細胞の分化誘導および分化した軟骨細胞表現型の維持においては, 軟骨細胞外マトリックス(ECM)の三次元(three-dimensional, 3D)構造を模倣することの重要性が強調されてきた [38-40]. 軟骨再生医療において, これまでに様々な生体材料を使用した多数の 3D 軟骨形成誘導システムが開発されている [38-48]. しかしながら, 3D 生体材料システムを用いて, iPS 細胞からの軟骨形成を制御することはほとんど試みられていない. われわれは, 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(Ultra-purified Alginate Gel, UPAL ゲル)を開発し, 骨髄間葉系細胞(bone marrow stromal cell, BMSCs)を移植する軟骨再生医療に取り組んできた [49-53]. UPAL ゲルは関節鏡視下に操作が可能であり, ゲル表面を関節内で硬化させることにより, 骨膜による被覆の必要がないという利点がある. また UPAL ゲルは, 高純度化技術により, 通常のアルギン酸ゲルで問題となる細胞毒性を極限まで低下することに成功し, 移植した骨髄間葉系幹細胞の軟骨分化誘導能を促進することも証明されている.

Chondrogenesis using ultra-purified alginate gel (UPAL® gel)

A cellular implantation system using an injectable ultra-purified alginate gel (UPAL gel) for repair of osteochondral defects in a rabbit model

Igarashi et al: J Biomed Mater Res A. 2010



UPAL gel enhances chondrogenesis of BMSCs

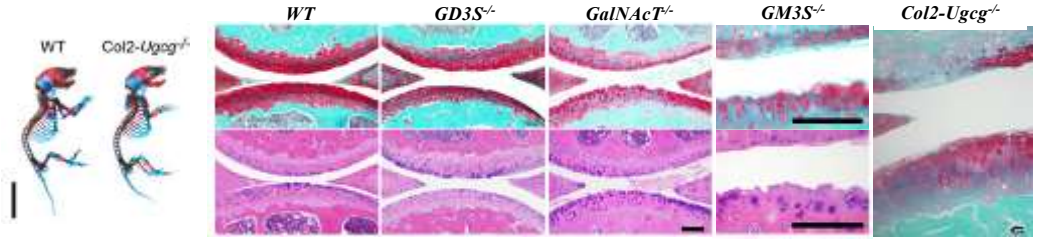
以上を踏まえ, 本研究ではマウス iPS 細胞から軟骨細胞を分化誘導する新たな培養法として, 間葉系幹細胞様細胞を経由する多段階分化誘導と UPAL ゲルを

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, われわれは UPAL ゲルを用いたマウス iPS 細胞からの軟骨分化法を確立し, UPAL ゲル 3D culture と 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を組み合わせることで, iPS 細胞が軟骨細胞に特異的に分化誘導されることを示した.

次にわれわれは, iPS 細胞から軟骨細胞へ分化した細胞やその前駆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研究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 [54-58]. 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 [59,60]. 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. 当科ではこれまで, 国内外でほぼ前例のない生体膜脂質機能研究を通した関節疾患メカニズムの解明を行い, スフィンゴ脂質(特にスフィンゴ糖脂質)が関節疾患の首座である軟骨中の軟骨細胞の増殖および脱分化制御機構を担っていることを明らかにしてきた [61-63]. さらに, ヒト変形性関節症における軟骨細胞の糖鎖構造を解析により high mannose type の N 型糖鎖が有意に減少することを観察しており, その糖鎖の合成に関連する遺伝子の発現を強制的に調整したマウスを用いた軟骨変性の実験系で, 軟骨細胞表面の糖タンパク質が変形性関節症の発症に強く関連していることも報告している [64].

Role of Glycan in articular cartilage

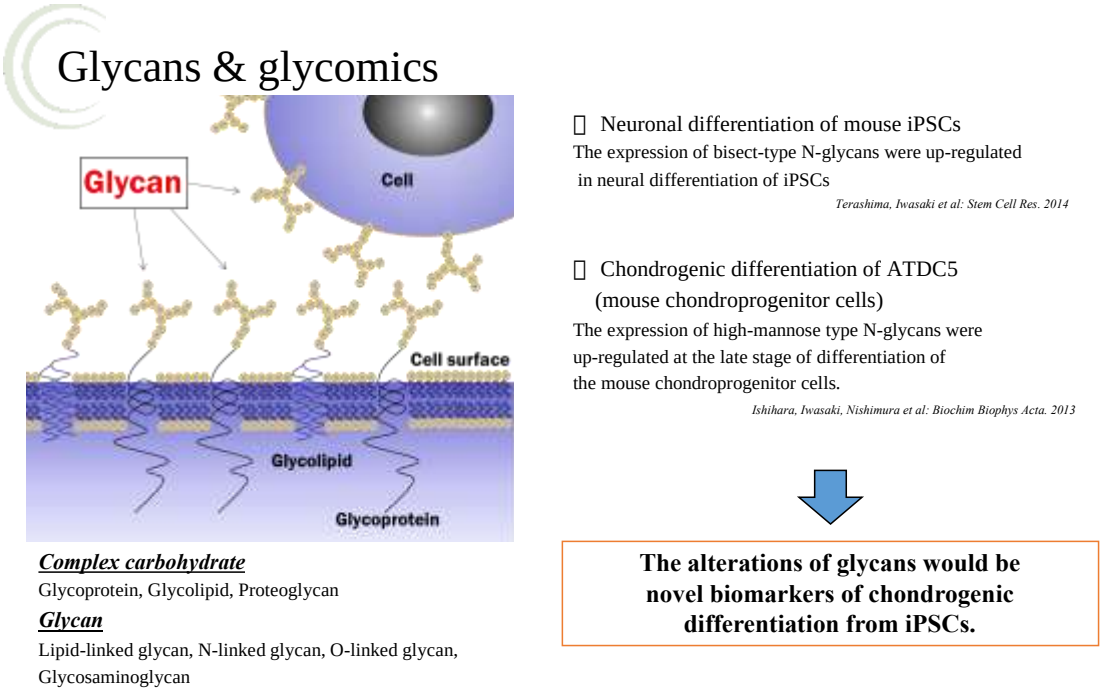
Analysis of cartilage degeneration model using 4 lines of sphingoglycolipid-deficient mice



Glycan deletion causes cartilage degeneration

Glycan plays an important role in chondrocyte function

加えて，糖鎖は炎症の惹起や疾患の発症，細胞の分化などに深く関わっていることが知られている．当科ではこれまでにマウス iPS 細胞からの神経細胞分化誘導系において各段階の細胞の糖鎖構造を経時的に解析し，その過程で bisect type の構造を有する特徴的なN型糖鎖が顕著に増加することを確認し，糖鎖構造が神経細胞分化を経時的に評価するマーカーとなりうることを報告している [65]．また，軟骨再生研究においては，マウス軟骨細胞前駆細胞のセルラインである ATDC5 からの軟骨細胞分化誘導系において糖鎖解析を行い，その過程で high mannose type N-glycan が増加することを確認し，糖鎖構造が軟骨細胞分化を経時的に評価するマーカーとなりうることを報告している [66]．



これらの成果を基に， われわれは，ポストゲノム研究に位置づけられる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，われわれは iPS 細胞から間葉系幹細胞様細胞を経由して軟骨細胞を分化誘導し，その過程におけるそれぞれの細胞表面の糖鎖構造を網羅的に解析することで，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．

われわれは，現在，UPAL ゲルを用いた軟骨再生治療の臨床治験を実施中である．しかしながら，適応となる骨軟骨欠損のサイズは限られており，大欠損に対する新たな治療法が求められている．本研究では，UPAL ゲル culture と iPS-MSCs を経由する多段階分化の組み合わせにより， iPS 細胞が軟骨細胞に特異的に分化誘導されることが示された．この成果の臨床応用として，生体外で iPS 細胞から iPS-MSCs を誘導し，それを UPAL ゲルに包埋して骨軟骨欠損部に移植する戦略が考えられる．これによって，より大きな骨軟骨欠損に対して治療の適応が広がることが期待される．

さらにわれわれは iPS 細胞から軟骨細胞への分化過程で構造変化を示すいくつかの糖鎖を同定するに至った．将来的には，本研究で同定された分化マーカー

を基に，軟骨分化能が高い前駆細胞を選択・回収し，成熟軟骨組織を再生するといった新たな軟骨再生治療の開発が予想される．これにより，現行の再生医療の限界とされる高齢者関節疾患など治癒条件の悪い症例にも適応が広がり，健康寿命の延伸にも繋がることが期待される．

また，本研究では iPS 細胞由来細胞に特徴的に発現する糖鎖構造が確認された．このことは糖鎖解析を用いた幹細胞由来細胞の生体内同定・追跡の可能性を示した．これにより再生医療が潜在的に抱える移植細胞の脱分化・がん化などといったリスクの回避が可能となり，軟骨再生医学研究の飛躍的発展すると考えられる．

本研究成果は，iPS 細胞等の幹細胞を利用した軟骨再生医療の安全性や臨床成績の向上に繋がる．これにより，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，移植細胞の脱分化やがん化等－ の解決が可能となり，幹細胞による新たな軟骨再生医療の展開が期待される．

謝辞

本論文は，筆者が北海道大学大学院医学研究科 医学専攻 機能再生医学講座 整形外科学分野博士課程在学中に行った研究をまとめたものです．本研究に関して終始ご指導ご鞭撻を頂きました整形外科学分野教授 岩崎倫政先生，名誉教授 三浪明男先生に心より感謝いたします．

本研究を行うにあたり，高純度アルギン酸ゲルのご提供並びに使用に関するご助言を頂きました持田製薬株式会社の清水賢様をはじめ，多くの職員の方々に深い感謝の意を表します．また，糖鎖解析に関してご指導いただいた北海道大学大学院先端生命科学研究院 先端生体制御科学分野 特任教授 篠原康郎先生および医学研究科整形外科学分野 特任助教 古川潤一先生に深く御礼申し上げます．

これまでの研究課程において数々のご指導を賜りました北海道大学医学部機能再生医学講座整形外科学分野講師の小野寺智洋先生をはじめ，整形外科学分野の諸先生方，研究にご助力頂きました皆様に心よりの感謝を申し上げます．

引用文献

1 Yoshimura, N. [epidemiology of osteoarthritis in japan : The road study]. *Clin. Calcium* 21, 821-825 (2011).

2 Yoshimura, N. [progress of research in osteoarthritis. Epidemiolgy of osteoarthritis in japanese population. ~ the road study ~]. *Clin. Calcium* 19, 1572-1577 (2009).

3 Yoshimura, N. [epidemiology of bone and joint disease - the present and future - . Epidemiology of lumbar spondylosis in japan : The road study]. *Clin. Calcium* 24, 665-668 (2014).

4 Newman, A. P. Articular cartilage repair. *Am. J. Sports Med.* 26, 309-324 (1998).

5 Hayes, D. W., Jr., Brower, R. L. & John, K. J. Articular cartilage. Anatomy, injury, and repair. *Clin. Podiatr. Med. Surg.* 18, 35-53 (2001).

6 Bedi, A., Feeley, B. T. & Williams, R. J., 3rd. Management of articular cartilage defects of the knee. *J. Bone Joint Surg. Am.* 92, 994-1009 (2010).

7 Kaul, G., Cucchiarini, M., Remberger, K., Kohn, D. & Madry, H. Failed cartilage repair for early osteoarthritis defects: A biochemical, histological and immunohistochemical analysis of the repair tissue after treatment with marrow-stimulation techniques. *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.* 20, 2315-2324 (2012).

8 Steadman, J. R., Rodkey, W. G., Briggs, K. K. & Rodrigo, J. J. [the microfracture technic in the management of complete cartilage defects in the knee joint]. *Orthopade* 28, 26-32 (1999).

9 Brittberg, M. *et al.* Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N. Engl. J. Med.* 331, 889-895 (1994).

10 Brittberg, M., Peterson, L., Sjogren-Jansson, E., Tallheden, T. & Lindahl, A. Articular cartilage engineering with autologous chondrocyte transplantation. A review of recent developments. *J. Bone Joint Surg. Am.* 85-A Suppl 3, 109-115 (2003).

11 Nehrer, S., Spector, M. & Minas, T. Histologic analysis of tissue after failed cartilage repair procedures. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, 149-162 (1999).

12 Peterson, L. *et al.* Two- to 9-year outcome after autologous chondrocyte transplantation of the knee. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, 212-234 (2000).

13 Holtzer, H., Abbott, J., Lash, J. & Holtzer, S. The loss of phenotypic traits by

differentiated cells in vitro, i. Dedifferentiation of cartilage cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 46, 1533-1542 (1960).

14 Samsudin, E. Z. & Kamarul, T. The comparison between the different generations of autologous chondrocyte implantation with other treatment modalities: A systematic review of clinical trials. *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.* (2015).

15 Bartlett, W. *et al.* Autologous chondrocyte implantation versus matrix-induced autologous chondrocyte implantation for osteochondral defects of the knee: A prospective, randomised study. *J. Bone Joint Surg. Br.* 87, 640-645 (2005).

16 Zeifang, F. *et al.* Autologous chondrocyte implantation using the original periosteum-cover technique versus matrix-associated autologous chondrocyte implantation: A randomized clinical trial. *Am. J. Sports Med.* 38, 924-933 (2010).

17 Prockop, D. J. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 276, 71-74 (1997).

18 Sekiya, I. *et al.* Expansion of human adult stem cells from bone marrow stroma: Conditions that maximize the yields of early progenitors and evaluate their quality. *Stem Cells* 20, 530-541 (2002).

19 Chen, F. H. & Tuan, R. S. Mesenchymal stem cells in arthritic diseases. *Arthritis Res. Ther.* 10, 223 (2008).

20 Ahmed, T. A. & Hincke, M. T. Mesenchymal stem cell-based tissue engineering strategies for repair of articular cartilage. *Histol. Histopathol.* 29, 669-689 (2014).

21 Cheng, A., Hardingham, T. E. & Kimber, S. J. Generating cartilage repair from pluripotent stem cells. *Tissue Eng Part B Rev* 20, 257-266 (2014).

22 Toh, W. S., Lee, E. H. & Cao, T. Potential of human embryonic stem cells in cartilage tissue engineering and regenerative medicine. *Stem Cell Rev* 7, 544-559 (2011).

23 Van Damme, A., Vanden Driessche, T., Collen, D. & Chuah, M. K. Bone marrow stromal cells as targets for gene therapy. *Curr. Gene Ther.* 2, 195-209 (2002).

24 Ferretti, C. & Mattioli-Belmonte, M. Periosteum derived stem cells for regenerative medicine proposals: Boosting current knowledge. *World J Stem Cells* 6, 266-277 (2014).

25 Zuk, P. A. *et al.* Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol. Biol. Cell* 13, 4279-4295 (2002).

26 Yokoyama, A. *et al.* In vitro cartilage formation of composites of synovium-derived mesenchymal stem cells with collagen gel. *Cell Tissue Res.* 322, 289-298 (2005).

27 Pavyde, E. *et al.* Skeletal muscle-derived stem/progenitor cells: A potential strategy for the treatment of acute kidney injury. *Stem Cells Int* 2016, 9618480 (2016).

28 Evans, M. J. & Kaufman, M. H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292, 154-156 (1981).

29 Martin, G. R. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 78, 7634-7638 (1981).

30 Takahashi, K., Okita, K., Nakagawa, M. & Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from fibroblast cultures. *Nat. Protoc.* 2, 3081-3089 (2007).

31 Takahashi, K. & Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663-676 (2006).

32 Bhattacharjee, M. *et al.* Tissue engineering strategies to study cartilage development, degeneration and regeneration. *Adv Drug Deliv Rev* 84, 107-122 (2015).

33 Peterson, S. E., Garitaonandia, I. & Loring, J. F. The tumorigenic potential of pluripotent stem cells: What can we do to minimize it? *Bioessays* 38 Suppl 1, S86-95 (2016).

34 Vats, A. *et al.* Chondrogenic differentiation of human embryonic stem cells: The effect of the micro-environment. *Tissue Eng.* 12, 1687-1697 (2006).

35 Koay, E. J., Hoben, G. M. & Athanasiou, K. A. Tissue engineering with chondrogenically differentiated human embryonic stem cells. *Stem Cells* 25, 2183-2190 (2007).

36 Barberi, T., Willis, L. M., Socci, N. D. & Studer, L. Derivation of multipotent mesenchymal precursors from human embryonic stem cells. *PLoS Med.* 2, e161 (2005).

37 Hwang, N. S. *et al.* In vivo commitment and functional tissue regeneration using human embryonic stem cell-derived mesenchymal cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 20641-20646 (2008).

38 Guo, J. F., Jourdian, G. W. & MacCallum, D. K. Culture and growth

characteristics of chondrocytes encapsulated in alginate beads. *Connect. Tissue Res.* 19, 277-297 (1989).

39 Sechriest, V. F. *et al.* Gag-augmented polysaccharide hydrogel: A novel biocompatible and biodegradable material to support chondrogenesis. *J. Biomed. Mater. Res.* 49, 534-541 (2000).

40 Suh, J. K. & Matthew, H. W. Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: A review. *Biomaterials* 21, 2589-2598 (2000).

41 Chung, C. & Burdick, J. A. Influence of three-dimensional hyaluronic acid microenvironments on mesenchymal stem cell chondrogenesis. *Tissue Eng Part A* 15, 243-254 (2009).

42 Dickhut, A., Gottwald, E., Steck, E., Heisel, C. & Richter, W. Chondrogenesis of mesenchymal stem cells in gel-like biomaterials in vitro and in vivo. *Front. Biosci.* 13, 4517-4528 (2008).

43 Jork, A. *et al.* Biocompatible alginate from freshly collected laminaria pallida for implantation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 53, 224-229 (2000).

44 Lim, J. J. & Temenoff, J. S. The effect of desulfation of chondroitin sulfate on interactions with positively charged growth factors and upregulation of cartilaginous markers in encapsulated mscs. *Biomaterials* 34, 5007-5018 (2013).

45 Mauck, R. L., Yuan, X. & Tuan, R. S. Chondrogenic differentiation and functional maturation of bovine mesenchymal stem cells in long-term agarose culture. *Osteoarthritis Cartilage* 14, 179-189 (2006).

46 Salinas, C. N. & Anseth, K. S. The enhancement of chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells by enzymatically regulated rgd functionalities. *Biomaterials* 29, 2370-2377 (2008).

47 Zimmermann, H. *et al.* Towards a medically approved technology for alginate-based microcapsules allowing long-term immunoisolated transplantation. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 16, 491-501 (2005).

48 Zimmermann, U. *et al.* A novel class of amitogenic alginate microcapsules for long-term immunoisolated transplantation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 944, 199-215 (2001).

49 Baba, R. *et al.* A novel bone marrow stimulation technique augmented by administration of ultrapurified alginate gel enhances osteochondral repair in a rabbit model. *Tissue Eng Part C Methods* 21, 1263-1273 (2015).

50 Igarashi, T., Iwasaki, N., Kasahara, Y. & Minami, A. A cellular implantation system using an injectable ultra-purified alginate gel for repair of osteochondral defects in a rabbit model. *J Biomed Mater Res A* 94, 844-855 (2010).

51 Igarashi, T. *et al.* Repair of articular cartilage defects with a novel injectable in situ forming material in a canine model. *J Biomed Mater Res A* 100, 180-187 (2012).

52 Igarashi, T. *et al.* Therapeutic effects of intra-articular ultrapurified low endotoxin alginate administration on experimental osteoarthritis in rabbits. *Cartilage* 3, 70-78 (2012).

53 Sukegawa, A. *et al.* Repair of rabbit osteochondral defects by an acellular technique with an ultrapurified alginate gel containing stromal cell-derived factor-1. *Tissue Eng Part A* 18, 934-945 (2012).

54 Evans, C. *et al.* An insight into itraq: Where do we stand now? *Anal Bioanal Chem* 404, 1011-1027 (2012).

55 Karp, N. A. *et al.* Addressing accuracy and precision issues in itraq quantitation. *Mol. Cell. Proteomics* 9, 1885-1897 (2010).

56 Altelaar, A. F. *et al.* Benchmarking stable isotope labeling based quantitative proteomics. *J. Proteomics* 88, 14-26 (2013).

57 Jadaliha, M. *et al.* Quantitative proteomic analysis of human embryonic stem cell differentiation by 8-plex itraq labelling. *PLoS One* 7, e38532, (2012).

58 Novak, A. *et al.* Proteomics profiling of human embryonic stem cells in the early differentiation stage. *Stem Cell Rev* 8, 137-149 (2012).

59 Taniguchi, N. *et al.* A glycomic approach to the identification and characterization of glycoprotein function in cells transfected with glycosyltransferase genes. *Proteomics* 1, 239-247 (2001).

60 Bennun, S. V. *et al.* Systems glycobiology: Integrating glycogenomics, glycoproteomics, glycomics, and other 'omics data sets to characterize cellular glycosylation processes. *J. Mol. Biol.* 428, 3337-3352 (2016).

61 Sasazawa, F. *et al.* Depletion of gangliosides enhances cartilage degradation in mice. *Osteoarthritis Cartilage* 22, 313-322 (2014).

62 Tsukuda, Y. *et al.* Ganglioside gm3 has an essential role in the pathogenesis and progression of rheumatoid arthritis. *PLoS One* 7, e40136 (2012).

63 Seito, N. *et al.* Interruption of glycosphingolipid synthesis enhances osteoarthritis development in mice. *Arthritis Rheum.* 64, 2579-2588 (2012).

64 Urita, A. *et al.* Alterations of high-mannose type n-glycosylation in human and mouse osteoarthritis cartilage. *Arthritis Rheum.* 63, 3428-3438 (2011).

65 Terashima, M., Amano, M., Onodera, T., Nishimura, S. & Iwasaki, N. Quantitative glycomics monitoring of induced pluripotent- and embryonic stem cells during neuronal differentiation. *Stem Cell Res* 13, 454-464 (2014).

66 Ishihara, T. *et al.* Discovery of novel differentiation markers in the early stage of chondrogenesis by glycoform-focused reverse proteomics and genomics. *Biochim. Biophys. Acta* 1840, 645-655 (2014).