

成熟度の高い軟骨オルガノイド作製法の開発に成功

～軟骨、骨、骨髄の発生機構解明や再生医療への貢献に期待～

ポイント

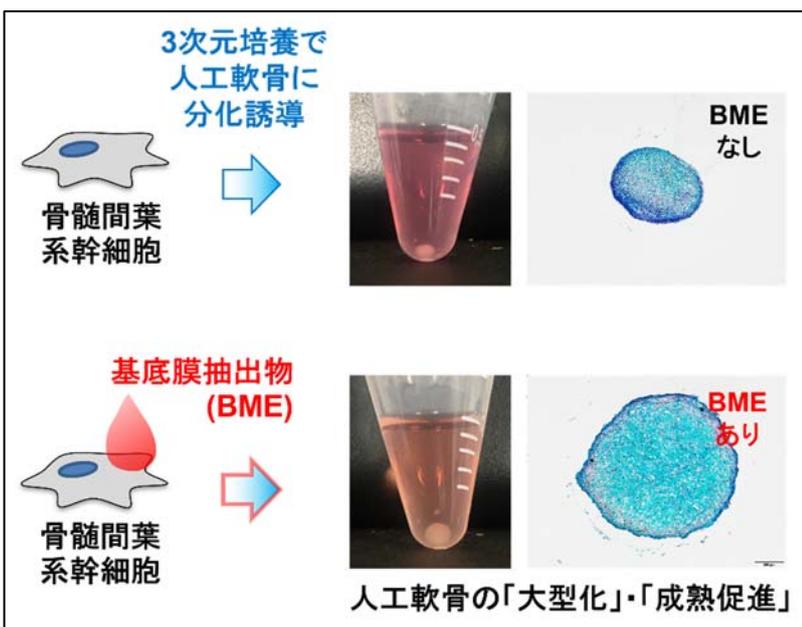
- ・ 3次元培養で骨髄間葉系幹細胞から成熟度の高い軟骨オルガノイドを作製することに成功。
- ・ 基底膜抽出混合物の混和で骨髄間葉系幹細胞から軟骨細胞への分化・成熟が促進することを解明。
- ・ 軟骨、骨、骨髄形成のメカニズム解明や再生医療マテリアルとしての発展に期待。

概要

北海道大学大学院保健科学院修士課程1年の能藤日向子氏、同大学大学院保健科学研究所の田村彰吾准教授らの研究グループは、3次元培養による骨髄間葉系幹細胞の分化誘導で軟骨オルガノイド^{*1}を作製する方法として、基底膜抽出混合物^{*2}を混和する方法を考案し、従来法に比べて大型化かつ組織成熟度の高い軟骨オルガノイドの作製に成功しました。

基底膜抽出混合物の混和は骨髄間葉系幹細胞の軟骨細胞系統への分化を促進するとともに、軟骨から骨への転換及び骨髄形成に関わる遺伝子の発現増強をもたらすことが明らかになりました。本研究成果は軟骨、骨、骨髄が形成されるメカニズムを解明する手がかりになるとともに、これらの臓器・組織に関わる疾患の病態解明や創薬研究への応用、さらには再生医療マテリアルとしての発展が期待されます。本研究は、名古屋大学医学部附属病院輸血部の松下 正教授ら、国立長寿医療研究センターの勝見 章血液内科部長らのグループも共同研究として参加しています。

なお、本研究成果は、2024年1月30日（火）オンライン公開の Biochemical and Biophysical Research Communications 誌に掲載されました。



基底膜抽出物の混和により骨髄間葉系幹細胞由来軟骨オルガノイドの大型化・成熟促進に成功。

骨髄間葉系幹細胞を3次元培養で軟骨オルガノイドに分化誘導する際に基底膜抽出物 (BME) を混和する方法を考案。BME混和軟骨オルガノイドで大型化と組織成熟の促進を認めた。オルガノイドの軟骨としての成熟は組織薄切標本の軟骨特異的染色法である Alcian Blue 染色の陽性 (青色) で示す。

【背景】

軟骨は骨と骨髄の発達に不可欠な組織です。大腿骨の様な長管骨は、内軟骨性骨化と呼ばれる多段階の過程を経て形成されます。内軟骨性骨化は間葉系幹細胞という組織幹細胞が集積して高密度の細胞塊を形成することから始まり、その後の原始的な無血管軟骨形成を経て、軟骨内への血管侵入が骨形成の引き金となります。軟骨が骨に置き換わる過程で、軟骨特異的な細胞外マトリックスが徐々に分解され、骨髄血管ネットワークが広がる骨髄腔が形成されます。

細胞培養により内軟骨性骨化を再現することは、骨格や骨髄の発生・再生に関する研究の有用なツールとして応用が期待できます。しかし、内軟骨性骨化を細胞培養で再現するためには、幹細胞分化誘導性軟骨（人工軟骨、軟骨オルガノイド）を用い、完全に分化／成熟した軟骨テンプレートを作製する必要があります。そこで研究グループは、内軟骨性骨化に適した幹細胞分化誘導性軟骨テンプレートを得るために、従来の軟骨オルガノイド作製法の改良を試み、今回、基底膜抽出混合物 (basement membrane extract、BME) を混和して軟骨オルガノイドを作製する方法を考案し、その内軟骨性骨化の特性を評価しました。

【研究手法】

軟骨細胞への分化能を有するヒト骨髄間葉系幹細胞を試料とし、細胞凝集分化誘導法により3次元軟骨分化誘導を21日間行いました。分化誘導開始時の細胞凝集塊にBMEを混和し、その形態や分化・成熟度をBME非混和軟骨オルガノイドと比較しました。軟骨オルガノイドの分化・成熟度は、組織学的解析と遺伝子発現解析（トランスクリプトーム解析）で行いました。

【研究成果】

21日間の分化培養において、BME混和軟骨オルガノイドはBME非混和軟骨オルガノイドに比べて大型化することが分かりました（図1）。分化誘導7、14、21日目のBME混和及び非混和軟骨オルガノイドの薄切切片を作製し、軟骨特異的染色であるAlcian Blue染色で解析した結果、BME混和軟骨オルガノイドはより早期に軟骨の特徴を発現することが分かりました（図2）。RNA-seqによるトランスクリプトームのパスウェイ解析により、分化誘導7日目のBME混和軟骨オルガノイドは軟骨分化（Cartilage development）シグナルが増強していることが明らかになり（図3）、特にSMADシグナル経路の活性化とNF-kBシグナル経路の抑制が示されました。さらに、分化誘導完了時である21日目では、BME混和軟骨オルガノイドは軟骨分化（Cartilage development）に加えて骨格系の分化（Skeletal system development）と骨化（Ossification）に関わる遺伝子群の発現増強が認められました（図4）。

【今後への期待】

幹細胞を用いた内軟骨性骨化モデルは、骨格系（軟骨・骨）や造血系（骨髄）組織の発生メカニズム解明を目指す基盤的研究への応用が見込まれます。また、その研究マテリアルとしての適応は骨折時の骨・骨髄修復といった組織再生メカニズムの解明、軟骨・骨・骨髄関連疾患モデルの確立と創薬研究への応用、さらに移植片として再生医療マテリアルへの発展にまで広がるのが期待されます。

しかし、本研究で用いた基底膜抽出物はマウス由来の異種動物由来製剤であり、現時点ではヒトを対象にした臨床的研究にそのまま適応することはできません。本研究では、軟骨細胞の源となる骨髄間葉系幹細胞のSMAD経路とNF-kB経路を同時に制御することで、軟骨オルガノイドの大型化と内軟骨性骨化特性の発現を示しました。今後はこの知見をもとに、SMAD経路とNF-kB経路を調節できる異種成分不含有（ゼノフリー）薬剤を開発し、臨床応用を見据えた軟骨・骨・骨髄再生医療マテ

リアルの開発を目指します。

【研究費】

本研究は、科学技術振興機構創発的研究支援事業（JPMJFR2158: 田村彰吾）、日本学術振興会（17H05073: 田村彰吾、19K08853: 勝見 章）、長寿医療研究開発費（22-10: 勝見 章）、武田科学振興財団（田村彰吾）、先進医薬研究振興財団（田村彰吾）などの支援を受けて実施されました。

論文情報

論文名	Basement membrane extract potentiates the endochondral ossification phenotype of bone marrow-derived mesenchymal stem cell-based cartilage organoids（基底膜抽出混合物は骨髄間葉系幹細胞由来軟骨オルガノイドの内軟骨性骨化形質を促進する）
著者名	能藤日向子 ¹ 、山崎智司 ¹ 、鈴木伸明 ² 、鈴木敦夫 ³ 、岡本修一 ⁴ 、兼松 毅 ⁵ 、鈴木奈留子 ⁶ 、勝見 章 ⁷ 、小嶋哲人 ^{4,8} 、松下 正 ^{2,5} 、田村彰吾 ^{2,9} （ ¹ 北海道大学大学院保健科学院、 ² 名古屋大学医学部附属病院輸血部、 ³ 名古屋大学医学部附属病院医療技術部臨床検査部門、 ⁴ 名古屋大学大学院医学系研究科総合保健学専攻、 ⁵ 名古屋大学医学部附属病院検査部、 ⁶ 名古屋大学大学院医学系研究科総合医学専攻血液・腫瘍内科、 ⁷ 国立長寿医療研究センター血液内科部、 ⁸ 愛知健康増進財団、 ⁹ 北海道大学大学院保健科学研究院）
雑誌名	Biochemical and Biophysical Research Communications（生命科学の専門誌）
DOI	10.1016/j.bbrc.2024.149583
公表日	2024年1月30日（火）（オンライン公開）

お問い合わせ先

北海道大学大学院保健科学研究院 准教授 田村彰吾（たむらしょうご）

T E L 011-706-3384 メール stamura@hs.hokudai.ac.jp

U R L <https://www.hs.hokudai.ac.jp/>

配信元

北海道大学社会共創部広報課（〒060-0808 札幌市北区北8条西5丁目）

T E L 011-706-2610 F A X 011-706-2092 メール jp-press@general.hokudai.ac.jp

【参考図】

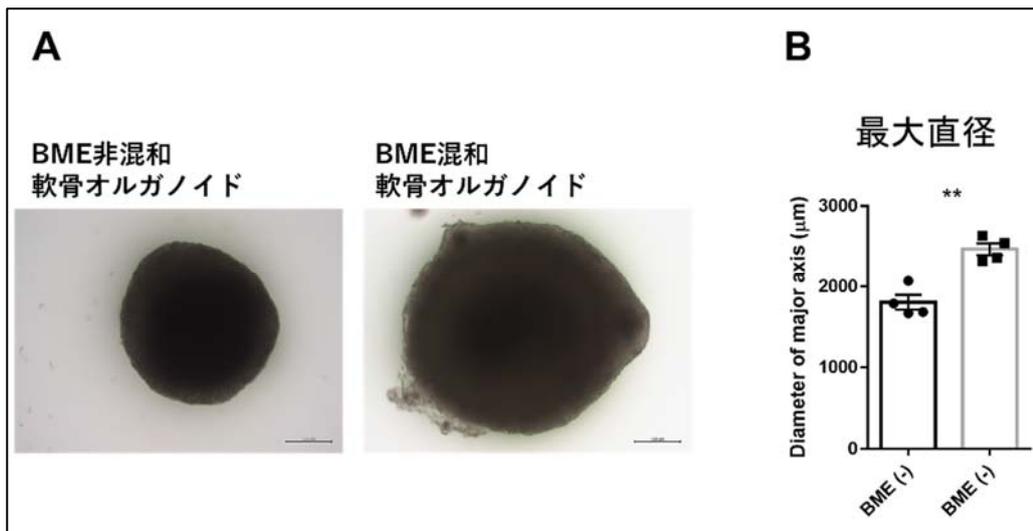


図 1. BME 混和による軟骨オルガノイドは大型化する。A) BME 非混和及び混和軟骨オルガノイドの光学顕微鏡像。B) BME 非混和及び混和軟骨オルガノイドの最大直径計測結果。** $p < 0.01$ (unpaired t test)。

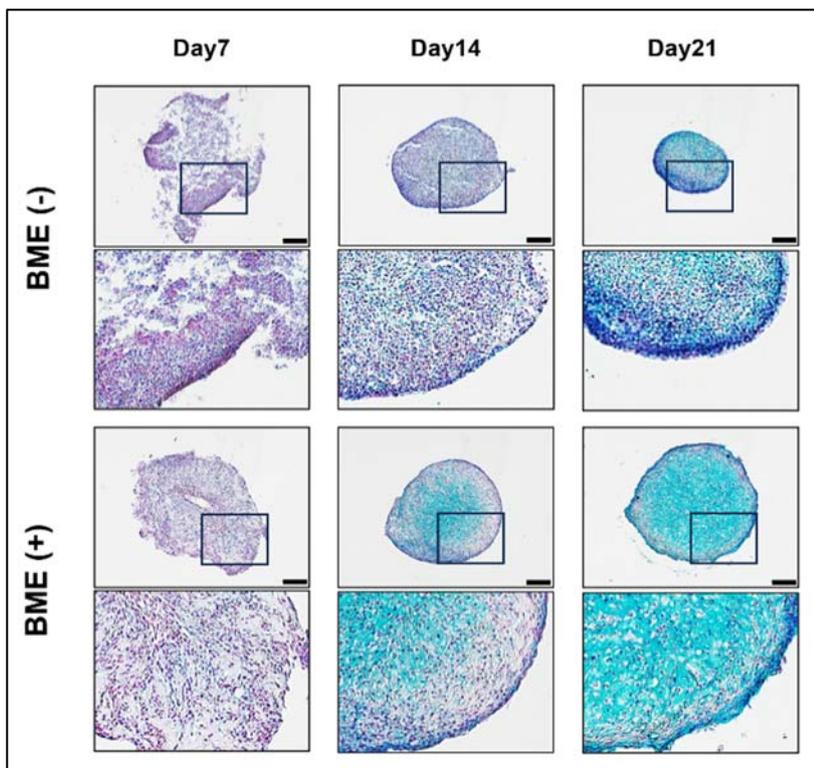


図 2. BME 混和軟骨オルガノイドは組織学的に軟骨形成促進を示す。Alcian blue は軟骨組織内の酸性ムコ多糖類を青色に染色する（青色の染色領域は軟骨であることを示す）。各画像のスケールバーは $200 \mu\text{m}$ を示す。

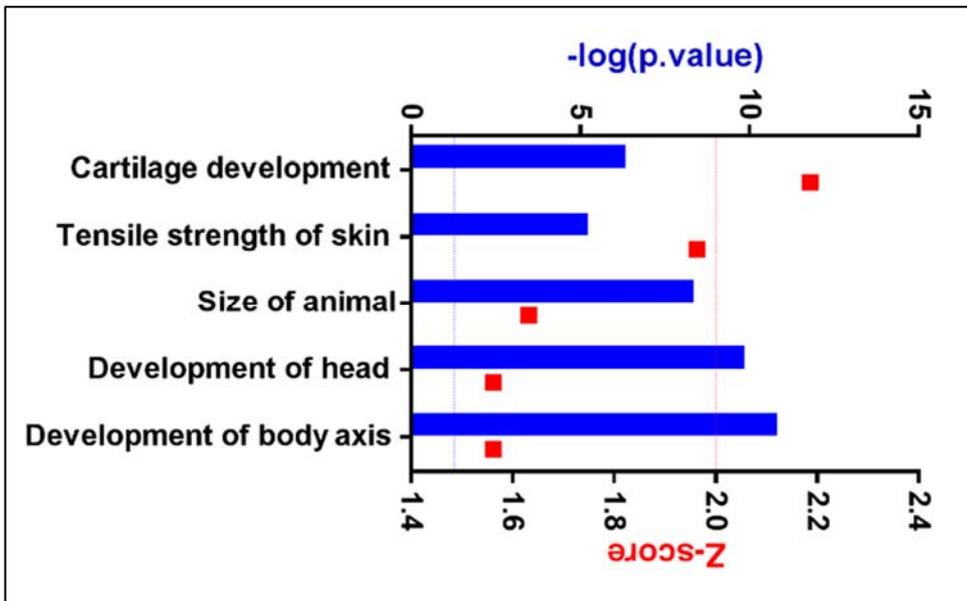


図 3. 分化誘導 7 日目の軟骨オルガノイドデータセットを用いたパスウェイ解析のチャート図。BME 混和軟骨オルガノイドに認められた生物学的活性を示す。 $-\log(p.value)$ は統計学的有意性を、Z-score は生物学的活性の強度を示す。データの有意性は $p < 0.05$ かつ Z スコア > 2 で判定した。

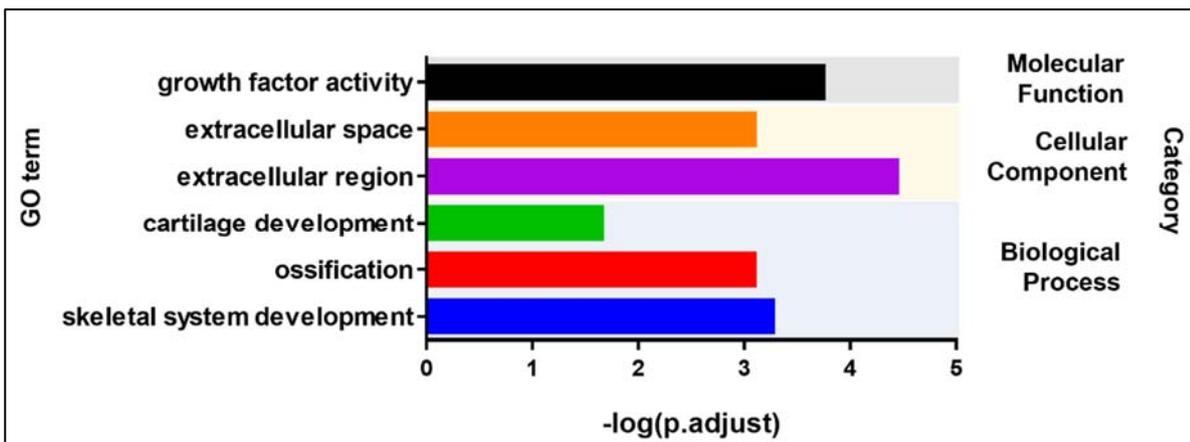


図 4. 分化誘導 21 日目における BME 混和／非混和軟骨オルガノイドの遺伝子群 (Gene ontology, GO) 解析。三種の category (生物学的プロセス、細胞構成要素、及び分子機能) において BME 混和軟骨オルガノイドで発現増強が認められた遺伝子群 (GO term) を示す。 $-\log(p.adjust)$ は統計学的有意性を示し、データの有意性は $p < 0.05$ で判定した。

【用語解説】

- *1 オルガノイド … 細胞培養で作製した人工臓器のこと。
- *2 基底膜抽出混合物 … 細胞外タンパク質など成る薄い層 (基底膜) から分離抽出したタンパク質混合物のこと。