

オルガノイドによる内軟骨性骨髄発生メカニズムの解明

田村彰吾

北海道大学 大学院保健科学研究所

【研究の背景】

大腿骨などの長管骨において、骨髄の発生は「内軟骨性骨化」の過程で生じる。内軟骨性骨化による骨髄発生は、無血管の始原軟骨が分泌する VEGF-A による遊走作用で骨膜血管由来の血管内皮細胞が軟骨内に侵入することをきっかけとして生じる¹⁾。内軟骨性骨化による骨髄発生メカニズム解明を目的に、申請者が人工軟骨(軟骨オルガノイド)と血管内皮細胞を3次元共培養したところ、脈管が軟骨オルガノイドに接続すること、そして接続した脈管を介して血管内皮細胞が軟骨オルガノイド内に侵入することを確認した(未発表データ)。しかし、軟骨オルガノイドに侵入した血管内皮細胞は組織内に拡がってはいくものの、脈管ネットワークを形成はしなかった。また、その再現性は極めて乏しいものであった。内軟骨性骨化の骨髄発生に関わる「細胞の相互作用」や「関連分子」などは全容が解明されていない。軟骨オルガノイドと血管内皮細胞の3次元共培養による内軟骨性骨化の再現、さらには骨髄発生を達成するためには、その分子メカニズムを明らかにする必要がある。

【目的】

本研究の目的は骨髄発生のきっかけである内軟骨性骨化の理解を進めることと定める。ヒト骨髄間葉系幹細胞(BM-MSC)で作製する軟骨オルガノイドを免疫不全マウス(C.B-17 SCID)に皮下移植し、内軟骨性骨化による骨髄発生を誘導させる実験モデルを構築し、その分子メカニズムを解明する。

【方法】

① ヒト BM-MSC 由来軟骨オルガノイドの作製

ヒト BM-MSC 由来軟骨オルガノイドは MesenCult™-ACF Chondrogenic Differentiation Medium (ST-05455, Veritas) を用い、規定プロトコールに従って作製した。また、同時に我々が開発した基底膜抽出物を混和して作製する3次元細胞凝集分化誘導法(基底膜抽出物混和法)で行った²⁾。基底膜抽出物混和法は、従来の軟骨オルガノイド(以下、基底膜抽出物非混和法)に比して大型かつ成熟が進んだオルガノイドを得ることが可能である。

② 軟骨オルガノイドの免疫不全マウス皮下移植

4週齢の C.B-17 SCID 雌マウス(ジャクソンラボラトリー)の背部皮膚を切開し、皮下に軟骨オルガノイドを移植した。移植後8週の時点で皮下移植軟骨オルガノイドを摘出し、外観の確認とともに、凍結組織切片を作製して HE 染色、von Kossa 染色、Alcian Blue 染色、および CD31 抗体を用いた免疫組織化学染色を行った。

③ 内軟骨性骨化が起こった軟骨オルガノイドの遺伝子発現解析

内軟骨性骨化を起こした皮下移植後軟骨オルガノイドを対象に、バルク RNA-seq による Transcriptome 解析で骨髄発生時に生じている細胞の遺伝子発現変化や細胞相互作用による反応を分子レベルで解析する。RNA-seq は株式会社レリクサへの外部委託で実施する。

【結 果】

基底膜抽出物非混和、混和法の両方法で作製した軟骨オルガノイドを、4週齢の C.B-17 SCID 雌マウスの背部皮下に移植した。移植部位は、基底膜抽出物非混和法で作製したオルガノイドをマウス左背側部、基底膜抽出物混和法で作製したオルガノイドをマウス右背側部とし、1個体のマウスに対してそれぞれ1対移植した。軟骨オルガノイドは分化誘導開始から3週間で誘導完了とみなすことが標準であり、本研究でも分化誘導3週間経過時点を誘導完了とした。基底膜抽出物非混和軟骨オルガノイド(n = 4)および基底膜抽出物混和軟骨オルガノイド(n = 4)を8週間皮下移植した結果、基底膜抽出物非混和軟骨オルガノイドは、2例が吸収・消滅し、残り2例は外観観察上の血管侵入による骨髄発生は認められなかった(現在、組織切片の観察中)。一方、基底膜抽出物混和軟骨オルガノイドは、2例が骨髄発生を伴わない骨化を呈したが、残り2例は外観で明確な組織内への血管侵入を認めた。この血管侵入した軟骨オルガノイドに組織染色を実施したところ、Alcian Blue 染色陽性の肥大化軟骨組織内に管腔構造および管腔内赤血球を認めた。さらに血管内皮細胞マーカーの一つである CD31 に対する抗体を用いた免疫組織化学染色を実施し、軟骨オルガノイド内に認めた管腔が血管内皮細胞であることを確認した。現在、移植8週間の軟骨オルガノイドの解析数を増やすとともに、移植12週間の軟骨オルガノイドをデザインし、調査を継続している。なお、軟骨オルガノイドの分化誘導期間を3週間から短縮して皮下移植した場合、基底膜抽出物の添加・非添加に関わらず、移植4週間の時点で吸収・消滅する割合が高くなることがわかった。

【考 察】

胎生期に起こる内軟骨性骨化の分子メカニズム解明のために、軟骨オルガノイドを成獣マウスの皮下に移植して異所性内軟骨性骨化を発生させる実験モデルを構築した。我々が開発した基底膜抽出物混和法で作製する軟骨オルガノイドは定法(基底膜抽出物非混和法)で作製する軟骨オルガノイドに比して内軟骨性骨化による骨髄発生の成績が良好であった。これは、基底膜抽出物混和法で作製する軟骨オルガノイドは成熟が促進されており、VEGF-A を分泌するとされている肥大化軟骨細胞の機能的成熟によるものと考えられる。しかし、基底膜抽出物混和法で作製した軟骨オルガノイドでも全てのオルガノイドが内軟骨性骨化による骨髄発生が生じるわけではなく、その分子レベルの質的違いの解明が求められる。現在、RNA-seq による網羅的遺伝子発現解析を実施しており、内軟骨性骨化による骨髄発生の分子メカニズムの解明に取り組んでいる。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

本研究成果を応用することで、細胞培養で軟骨オルガノイドに内軟骨性骨化を起こす、骨髄を模した人工組織(骨髄オルガノイド)を開発する技術確立が期待できる。骨髄オルガノイドの開発はこれまでに人類が達成していない初めての技術創出であり、そこに造血幹細胞を生着させられれば「機能性骨髄オルガノイド作製技術」の確立となる。これは「白血病モデル骨髄」などの作製が可能となる。白血病モデル骨髄は薬剤のスクリーニングマテリアルとしてその有用性が期待でき、症例ごとに有効な薬剤の選択を実現することで、白血病の治療成績の大幅な向上に貢献できる。さらに、白血病モデル骨髄は新規薬剤の創薬マテリアルとしての活用が大いに期待できる。

【参考・引用文献】

1. Hans-Peter Gerber et al., VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. NATURE MEDICINE. 5;623-628. 1999.
2. Hinako Notoh et al., Basement membrane extract potentiates the endochondral ossification phenotype of bone marrow-derived mesenchymal stem cell-based cartilage organoids. Biochemical and Biophysical Research Communications. 701;149583. 2024.