

軟骨基質と血管内皮細胞の相互作用を再現した軟骨内骨髄脈管発生システムの開発

田村彰吾

北海道大学大学院 保健科学研究所 病態解析学分野

【研究の背景】

長管骨において、骨髄の発生は軟骨内骨化によって生じる¹⁾。軟骨内骨化では、無血管の始原軟骨に骨膜血管由来の血管内皮細胞が侵入し、軟骨組織の脈管化で骨髄が発生する。我々はこの軟骨内骨化を *in vitro* で再現することで人工骨髄(骨髄オルガノイド)の開発を進めている。

【目 的】

軟骨内骨化を再現するために、本研究では骨髄間葉系幹細胞から分化誘導した軟骨細胞塊(軟骨オルガノイド)を生体始原軟骨のモデルとして用いる。今回、軟骨オルガノイドが分泌する血管形成サイトカインのスクリーニングを行い、さらに血管内皮細胞との共培養によって、軟骨内骨化で生じる始原軟骨への血管侵入の再現技術、すなわち骨髄脈管発生システムの開発に取り組んだ。

【方 法】

1. ヒト軟骨オルガノイドの作製:ヒト骨髄間葉系幹細胞(hMSC-BM, PromoCell)を細胞凝集分化誘導法で軟骨オルガノイドに分化誘導した。分化誘導培地は MesenCult-ACF Chondrogenic differentiation Medium (Stemcell Technologies)を用いた。
2. サイトカインの網羅的検出:Proteome profiler ヒト XL サイトカインアレイキットおよびヒト血管新生アレイキット(R&D)を用いてサイトカインの検出を行った。
3. 軟骨オルガノイドと血管内皮細胞の共培養:HUVEC (PromoCell)を EGM2 (PromoCell)で維持培養し、軟骨オルガノイドと共培養した。HUVEC monolayer の上に軟骨オルガノイドを静置後、マトリゲルを滴下して3次元共培養を構築した。
4. 免疫組織化学染色:組織を4% パラホルムアルデヒドで24時間固定し、凍結保護処理後にOCTコンパウンドを用いて凍結切片を作製した。組織切片を抗X型コラーゲン抗体と抗CD31抗体で2重染色し、それぞれ軟骨基質と血管内皮細胞を検出した。また、軟骨特殊染色である Alcian Blue 染色も実施した。

【結 果】

軟骨オルガノイド分化誘導完了時の培養上清について136種類のサイトカインをスクリーニングしたところ、20種類のサイトカインの含有を認めた(Angiogenin, Chitinase3-like1, Dkk-1, DPPIV, Emmprin, ENA-78, GDF-15, IL-8, MCP-1, MIF, Pentraxin3, PAI-1, TSP-1, Endostatin, IGFBP-2, IGFBP-3, PEDF, TIMP-1, uPA, VEGF)。軟骨オルガノイドとHUVECを共培養すると、培養4日目ごろからHUVECが軟骨オルガノイド周囲に集まり始める像が確認された。その後、HUVECは軟骨オルガノイドに向かって立体的な遊走挙動を示した。免疫蛍光染色の結果、軟骨オルガノイドはX型コラーゲン陽性CD31陰性を示す一方、HUVECと共培養を行った軟骨オルガノイドはHUVECとの接着面およびその近傍(HUVECとの非接着面)でCD31陽性を示した。

【考 察】

軟骨オルガノイドはVEGFなどの血管新生関連因子を分泌し、HUVECとの共培養では軟骨オルガノイドに向かうHUVECの遊走を観察した。しかし、現時点では生体の軟骨内骨化で認められる軟骨基質への血管内皮細胞の侵入は認めるには至らなかった。現在、本研究に用いる軟骨オルガノイドの性能評価を進めており、より生体に近く軟骨内骨化に適した軟骨オルガノイドの作製方法を樹立する。また軟骨への血管侵入を惹起する因子として、サイトカインなどの化学誘引因子に加え、種々の機械的刺激(メカニカルストレス)などに着目することで軟骨内骨髄脈管発生システムの開発を達成したい。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

オルガノイドは多能性幹細胞、もしくは組織固有の体性幹細胞から作製する自己組織化3次元構造体である。オルガノイドは生体内に存在する組織の構造、機能、生理環境を再現することができるため、創薬や再生医療等の様々な研究への応用が期待される²⁾。現在、オルガノイドの開発は「肝臓」、「肺」、「腎臓」や「腸管」などで目覚ましい進捗がみられるが、「骨髄」の開発はほとんど進んでいない³⁾。骨髄は各種血液細胞を作り出す造血組織であり、骨髄オルガノイドを開発することができれば、骨髄の発生・細胞生物学領域における研究マテリアルとしての応用、白血病などの血液腫瘍や再生不良性貧血などの造血不全疾患の疾患モデル、さらには骨髄移植に代替しうる新たな再生医療マテリアル開発の革新的シーズとして発展することが大いに期待できる。

【参考・引用文献】

1. Kronenberg, H. M. Developmental regulation of the growth plate. *Nature* 423, 332–6 (2003)
2. Dutta, D., Heo, I., & Clevers, H. Disease Modeling in Stem Cell-Derived 3D Organoid Systems. *CellPress* 23, 393–410 (2017)
3. Rossi, G., Manfrin, A., & Lutolf, M. P. (2018). Progress and potential in organoid research. *Nature Reviews Genetics*, 19(11), 671–687.