

京都大学	博士（医科学）	氏名	鎌倉 武史
論文題目	Collagen X is dispensable for hypertrophic differentiation and endochondral ossification of human iPSC-derived chondrocytes (X型コラーゲンはヒト iPSC 細胞由来軟骨細胞の肥大化および内軟骨性骨化に必須ではない)		
(論文内容の要旨)			
<p>成長板は長管骨の骨端と骨幹端の間に存在する軟骨組織であり、長管骨の伸長に重要である。成長板は休止層、増殖層、前肥大層、肥大層の4つの層に区分され、増殖層から肥大層にかけて細胞が柱状構造を形成し、徐々に肥大化していく。これらの軟骨細胞は層ごとに特有のシグナルや細胞外マトリックスを発現・産生し、層間の移行は厳格に制御されている。肥大層の終末期にはマトリックスが石灰化され、血管が侵入することで内軟骨性骨化が生じる。</p> <p>X型コラーゲン(COL X)は <i>COL10A1</i> 遺伝子によってコードされる非線維性コラーゲンであり、肥大軟骨細胞特異的に産生され、成長板軟骨の石灰化過程に関与していると考えられている。しかし、マウスでは <i>Col10a1</i> 遺伝子をホモに欠損しても、成長板の構造や骨格形成に顕著な異常は認められず、COL X の機能に関しては不明な点が残されており、ヒトにおいても必須ではないのについても解析されていない。そこで Dual sgRNA CRISPR/Cas9 を用いて <i>COL10A1</i> 遺伝子がヘテロ欠損またはホモ欠損したヒト iPSC 細胞を樹立し、研究室で樹立した肥大軟骨分化誘導法を用いて、ヒト軟骨細胞における COL X の機能的意義を解析した。</p> <p>まず、iPS 細胞から2次元培養で硬節細胞を誘導し、更に3次元培養で肥大軟骨細胞を誘導し、その過程での形態学的変化や遺伝子発現パターンを比較した。結果として正常細胞ペレットとホモ欠損細胞ペレットとの間で分化過程に顕著な差は見られず、いずれも肥大軟骨細胞様細胞に分化し、COL X はヒト軟骨細胞の肥大化には必須ではないことが示唆された。</p> <p>次に、軟骨細胞ペレットを免疫不全マウスに皮下移植し、COL X 欠損の内軟骨性骨化への影響を解析した。分化誘導14日目の増殖層に相当する細胞ペレットを移植すると成長板様の層状構造を呈する組織が形成されるが、ホモ欠損細胞由来でも同様の組織が形成され、細胞株によってはホモ欠損細胞由来組織の方が骨化が促進されていることが判明した。また分化誘導28日目の前肥大層に相当する細胞ペレットを移植すると不定形な骨梁構造を呈する骨組織が形成されるが、やはり正常細胞由来とホモ欠損細胞由来の組織の間で明確な相違は検出されなかった。これらの結果は、COL X はヒト軟骨細胞の内軟骨性骨化過程において必須ではないことを示唆する。</p> <p>最後に、肥大軟骨細胞様細胞ペレットでの網羅的遺伝子発現解析を行ない、より詳細に遺伝子発現パターンを比較した。正常細胞ペレットよりもホモ欠損細胞ペレットの方が石灰化関連遺伝子群の発現量が高く、分化過程が促進されていることを示唆する結果が得られ、in vivo での骨化促進の結果と合致していた。</p> <p>以上のヒト iPSC 細胞由来軟骨細胞を用いた in vitro 及び in vivo のデータより、ヒトにおいても COL X は軟骨細胞の肥大化およびその後の内軟骨性骨化に必須ではないと考えられる。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

X型コラーゲン(COL X)は肥大軟骨細胞特異的に産生され、成長板軟骨の石灰化過程に関与していると考えられている。しかし *Col10a1* 遺伝子欠損マウスの骨格形成に顕著な異常は認められないとの報告もあり、COL X の詳細な機能は明らかでない。本研究では *COL10A1* 遺伝子欠損ヒト iPSC 細胞を作製し、軟骨細胞の肥大化および内軟骨性骨化における COL X の機能的意義を解析した。2箇所切断する方法により *COL10A1* 遺伝子座全長をヘテロ及びホモに欠損したヒト iPSC 細胞を作製し、肥大軟骨細胞に誘導したところ、その過程での形態や遺伝子発現パターンに顕著な影響は認められなかった。次に増殖層および前肥大層に相当する軟骨細胞を免疫不全マウスに移植し形成された組織を比較した。その結果、前者では成長板様構造の組織が形成され、ホモ欠損細胞由来の組織において骨化促進の傾向が認められた。後者では不定形な骨梁構造を呈する組織が形成され、正常細胞由来の組織との間に顕著な差は認められなかった。これらの結果より、ヒト iPSC 細胞由来軟骨細胞の肥大化および内軟骨性骨化において COL X が必須ではないことが示唆された。最後に肥大軟骨細胞における遺伝子発現の詳細を比較したところ、ホモ欠損細胞において石灰化関連遺伝子群の発現量が高く、in vivo の骨化促進の結果と一致する結果が得られた。以上の研究は、内軟骨性骨化過程における COL X の機能的意義の解明に貢献し、ヒトにおける骨軟骨形成機構の理解に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士（医科学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、令和5年5月29日実施の論文内容とそれに関連

した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日： 年 月 日以降