

平成 21 年 5 月 1 日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19390395
 研究課題名（和文）運動器細胞の力学刺激応答の解析：遺伝子発現と細胞骨格，メカノトランスダクション
 研究課題名（英文）Effects of mechanical stimulation on cells derived from synovial joint:
 研究代表者
 中田 研(NAKATA KEN)
 大阪大学・医学系研究科・講師
 研究者番号：00283747

研究成果の概要：運動器細胞の三次元培養組織に対し，力学刺激負荷培養を行い，細胞内伝達（メカノトランスダクション）の機序を明らかにするため，軟骨，滑膜，半月板など関節の運動器細胞の三次元培養組織を作成し，力学刺激を用いて，遺伝子発現（細胞外マトリックス，および，マトリックス分解酵素，転写因子，サイトカイン，など）とこれらの蛋白発現が変化する応答に，時間系列があること，また，生理的な力学刺激と非生理的な力学刺激（過負荷または低負荷）により細胞内骨格の再構成，再配列が起こることを明らかにした。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	9,100,000	2,730,000	11,830,000
2008年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
年度			
年度			
年度			
総計	12,600,000	3,780,000	16,380,000

研究分野：生物系 医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学 整形外科学

キーワード：三次元培養組織、力学刺激、細胞内骨格、細胞内シグナル伝達、メカノトランスダクション

1. 研究開始当初の背景

(1)細胞と力学刺激 動物の体を構成するすべての細胞は，重力による力と，移動や運動に必要な力など様々な力学刺激を受ける．細胞に対する力学刺激は細胞内で生化学的変化に変換されて，細胞活動に影響を与える．特に運動器組織では，力学刺激に応答して組織の発生，形成，維持など正常の組織発達に大きな役割をもち，また，外傷後の組織修復や再構築（リモデリング）において力学刺激

応答は重要である（Huang H et al. Cell mechanics and mechanotransduction, Am J Physiol Cell Physiol 2004）．さらに，運動器疾患（関節リウマチ，変形性関節症など）では力学的負荷により関節組織の破壊が起こるので，正常および疾患での運動器細胞の力学刺激応答機序の解明は生物学的意義，運動器疾患の病態解明の臨床医学的意義が大きい．さらに，力学刺激を利用した運動器の組織工学的的手法により再生医療の発展にも

有用性がある。

(2)力学刺激応答研究の問題点 しかし、運動器細胞の力学刺激応答機序は、未だ明らかでない。その理由は、1) 運動器組織に近似した力学的強度、形状をもつ三次元培養組織の作製、培養が困難な点、2) 三次元組織に力学刺激を定量的に与える方法が困難な点、の2つの問題点による。

(3)問題解決のこれまでの成果 申請者は上記の問題点を解決するために、ヒト運動器(軟骨、滑膜、靭帯、半月板)由来培養細胞の単離と培養方法、三次元培養組織の構築を解析し(Nakata K et al. Clinical Orthop Rel. Res 2001)、さらに、力学的強度を持つ細胞担体と生体運動器組織の形状に三次元培養組織を作製する方法を開発し特許出願を行なった(「生体形状を含んだ三次元組織の培養法」国際特許出願 PCT/JP2005/023735

「細胞培養用担体」日本国特許出願特願 2006-264188)。これら研究・開発は、前述の問題点の1)を解決するものである。

問題点2)の解決のために、申請者は力学刺激負荷培養方法、装置を開発し、特許出願を行なった。(「生体力学的刺激負荷による細胞培養方法及びその装置」日本国特許出願特願 2004-209255 CELL CULTURE ING METHOD BY BIOMECHANICAL STIMULUS LOAD AND ITS DEVICE 国際出願番号 PCT/JP2005/011045)この培養系は、圧縮、剪断応力を、定量的に頻度と強度、変形量、刺激時間で制御できるものである。

以上により、三次元培養組織に様々力学刺激を行なう系が確立したため、運動器細胞の例としてヒト軟骨および滑膜細胞を用い、三次元培養組織の力学刺激応答の解析を組織学的および遺伝子発現、蛋白発現、細胞骨格を解析しつつあり、初期研究結果を得た。すなわち、細胞外マトリックス蛋白(I型, II型, III型コラーゲン, アグリカンなど)とマトリックス分解酵素

(MMP-1, -2, -3, 9, 13, ADAMs) およびその酵素阻害因子(TIMP-1, -2)や、軟骨転写因子(Sox9) 遺伝子発現量の変化がリアルタイム RT-PCR 法で明らかになり、ウエスタンブロット、ザイモグラフィにて MMPs 蛋白発現、蛋白機能が変化した(Muroi Y, Nakata K et al. 2005 ICRS 国際軟骨治療学会)、レーザー共焦点顕微鏡にて組織形態、細胞内骨格、三次元組織内細胞分布、細胞数を定量的解析すると、F-actin, Vimentin の再分布、細胞凝集が起こり(大坪英則, 中田研ら 2006 日本軟骨代謝学会)。培養組織の力学的強度は力学刺激負荷量に応じて変化していた(片貝大輔, 中田研ら 2005 日本臨床バイオメカニクス学会)。この力学刺激培養法を用いてより機能的培養組織を作製し再生医療に利用する方法を報告し(中田研ら, 2005 日本再生医療学会 優秀演題賞)。さらに、移植後の組織リモデリング過程を in vitro 解析することが可能であった(中田研ら 2005 日本整形外科基礎学術集会)。

2. 研究の目的

軟骨細胞、滑膜細胞を例にした運動器細胞の三次元培養組織と力学刺激負荷の研究結果により、「力学刺激」のインプットが、「遺伝子発現、蛋白発現の変化」のアウトプットとして一部の運動器細胞で応答が得られることがわかったためさらに発展させて、広い運動器細胞を用いインプットとアウトプットを結ぶ、細胞内伝達(メカノトランスダクション)の機序を明らかにすることを目的とした。

(1)広範な運動器細胞よりの三次元培養組織の作製および力学刺激応答の評価

軟骨細胞、骨髄細胞、滑膜細胞、筋細胞、靭帯細胞、腱細胞、半月細胞など広く運動器細胞を実験動物およびヒト外傷性および運動器疾患患者より単離、培養し、我々が既に開発した力学的強度をもつ細胞担体に

播種して三次元培養組織を作製し、力学刺激負荷による応答を、組織学的、分子生物学的に解析する。それぞれの細胞の力学刺激負荷に対する応答を検証する。

(2)力学刺激負荷による細胞骨格とメカノトランスダクションの解析

種々の運動器細胞よりなる三次元培養組織の力学刺激応答について、細胞内骨格を共焦点レーザー顕微鏡と画像解析を用いて定量的に解析する。また、細胞内骨格の阻害剤、および、細胞内シグナル伝達阻害剤を用いて力学刺激応答の変化とシグナル伝達経路の分子と伝達機序を解析し、力学刺激負荷の応答の細胞内メカニズムを検証する。

(3)力学刺激強度の違いによる応答の変化の解析

力学刺激を、生理的負荷と非生理的負荷の強度に設定し、組織のホメオスタシスと、病的破壊の状態での細胞内シグナルでの差異を解析する。これにより変形性関節症の細胞内病態の解明や治療薬開発のための知見が得られると考える。

3. 研究の方法

(1)運動器の細胞より三次元培養組織の作製と解析

軟骨細胞、骨髄細胞、滑膜細胞、筋細胞、靭帯細胞、腱細胞、半月細胞の運動器細胞を実験動物（ラット）およびヒト外傷性および運動器疾患患者より単離、培養し、我々が既に開発した力学的強度をもつ細胞担体に播種して三次元培養組織を作製し、細胞濃度による増殖、アポトーシスを DNA 量、生細胞染色などを用いて、時間的、空間的に解析する。また、細胞と細胞担体との接着様式を顕微鏡、走査電顕、透過電顕を用いて観察し、マトリックス接着分子を免疫組織化学的方法で、インテグリンファミリーを中心に同定する。

三次元培養組織の作製方法は、遠心細胞導入法を用いた、すなわち、単離した培養運動器細胞をコラーゲンゲル溶液に浮遊細胞溶液として、ポア構造（30-200nm）をもつ細胞担体の上のせて、遠心して細胞を細胞担体内に播種した。

(2)三次元培養組織への力学刺激応答

力学刺激は、三次元培養組織に繰返し圧縮および剪断応力負荷を、定量的に加えることのできる培養装置を用いて行なった。

0.5Hz 1 h/日で、10kPa または30kPaの非拘束鉛直負荷で、三次元組織の10%以下または20%程度の変形量で5日間の力学刺激により、細胞増殖、アポトーシスに影響を与えない力学刺激条件で細胞外マトリックス(I型, II型, III型コラーゲン, アグリカン), マトリックス分解酵素(MMP-1, -2, -3, ADMSTS4, 5)の遺伝子発現を RT-PCR法にて解析した。細胞外マトリックスマトリックス, Calcein AM染色F-ACTIN細胞内骨格の力学刺激下での発現を解析した。

4. 研究成果

(1)力学刺激負荷による運動器細胞のメカノトランスダクション

軟骨、滑膜、半月板など関節の運動器細胞の三次元培養組織を作成し、力学刺激を用いて、遺伝子発現（細胞外マトリックス、および、マトリックス分解酵素、転写因子、サイトカイン、など）とこれらの蛋白発現が変化する応答に、時間系列があった。

(2)生理的力学刺激および、非生理的力学刺激による細胞内シグナルの解析

運動器細胞を用いて、生理的な力学刺激と非生理的な力学刺激（過負荷または低負荷）を与えると、細胞内骨格であるActin, Vimentinの再構成、再配列が起こり、これら細胞内骨格の変化が力学刺激で見られることを見いだした。この三次元力学刺激培養系が、定量的に組織の変形を伴う力学負荷をあたえ、

負荷量により細胞応答が異なることが再現性よく評価できる有効な培養システムであることがわかった。

以上の結果は、変形性関節症を引き起こすと言われる肥満や下肢変形による力学的負荷による関節破壊の細胞生物学的メカニズムと、関節固定や寝たきりなど廃用性運動器機能不全の病態、細胞内メカニズムの解明に意義があり、これら疾患の予防、治療戦略を与えるうえで重要である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計10件)

- 1) 中田研: スポーツ整形の活動と膝関節治療の再生医学 大阪臨床整形外科医会会報 34:99-103, 2008 (査読無)
- 2) 中田研, 室井悠里, 大坪英則, 岩橋武彦, 田中 美成, 鈴木智之, 天野大, 中村憲正, 菅本一臣, 吉川秀樹: 半月板の再生医療: 臨床応用への関門 日本整形外科学会誌 82:647-653, 2008 (査読無)
- 3) 橋本美津代, 前達雄, 中田研: 関節のスポーツ障害に対するサプリメント効果 Functional Food 2:282-288, 2008 (査読無し)
- 4) Nakata K, Shino K, Horibe S, Tanaka Y, Toritsuka Y, Nakamura N, Koyanagi M, Yoshikawa H: Arthroscopic anterior cruciate ligament reconstruction using fresh-frozen bone plug-free allogeneic tendons: 10-year follow-up. Arthroscopy. 24(3):285-291. 2008 (査読有)
- 5) Iwashita T, Shino K, Nakata K, Nakamura N, Yamada Y, Yoshikawa H, Sugamoto K: Assessment of the "functional length" of the three bundles of the anterior cruciate ligament. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc. 16(2):167-174. 2008(査読有)
- 6) Mae T, Shino K, Nakata K, Toritsuka Y, Otsubo H, Fujie H. Optimization of graft fixation at the time of anterior cruciate ligament reconstruction. Part I: effect of initial tension. Am J Sports Med. 36(6):1087-1093. 2008(査読有)
- 7) Mae T, Shino K, Nakata K, Toritsuka Y, Otsubo H, Fujie H. Optimization of graft fixation at the time of anterior cruciate ligament reconstruction. Part II: effect of knee flexion angle. Am J Sports Med. 36(6):1094-1100. 2008(査読有)
- 8) Shino K, Nakata K, Nakamura N, Toritsuka Y, Horibe S, Nakagawa S, Suzuki T. Rectangular tunnel double-bundle anterior cruciate ligament reconstruction with bone-patellar tendon-bone graft to mimic natural fiber arrangement. Arthroscopy. 24(10):1178-83. 2008(査読有)
- 9) Tateishi K, Ando W, Higuchi C, Hart DA, Hashimoto J, Nakata K, Yoshikawa H, Nakamura N. Comparison of human serum with fetal bovine serum for expansion and differentiation of human synovial MSC: potential feasibility for clinical applications. Cell Transplant. 17(5):549-57. 2008 (査読有)
- 10) Ando W, Tateishi K, Katakai D, Hart DA, Higuchi C, Nakata K, Hashimoto J, Fujie H, Shino K, Yoshikawa H, Nakamura N. In vitro generation of a scaffold-free tissue-engineered construct (TEC) derived from human synovial mesenchymal stem cells: biological and

mechanical properties and further chondrogenic potential. Tissue Eng Part A.14(12):2041-9. 2008(査読有)

[学会発表](計29件)

- 1) 武 靖浩, 中田研, 坪井秀規, 吉川秀樹, 越智隆弘 RA滑膜細胞表面のオステオポンチンはB細胞の抱き込み現象とIL-6の産生を刺激する 第23回日本整形外科基礎学術集会 平成20年10月23日 京都
- 2) 天野大, 中田研, 岩橋武彦, 鈴木智之, 中村憲正, 菅本一臣, 吉川秀樹, 史野根生 半月板の三次元動態解析:MRによる内側半月板正常例と水平断裂例の検討 第23回日本整形外科基礎学術集会 平成20年10月23日 京都
- 3) 赤峯勇哲, 武田, 名倉 温雄, 樋口周久, 神田秀之, 藤江 裕道, 吉川秀樹, 中田研 軟骨移植用の強度を持つコラーゲンスキャフォールド開発とヒト体性幹細胞を用いた三次元培養組織の作成 日本運動器移植再生医学研究会 平成20年9月27日 岐阜
- 4) 中田研 治療の困難な半月板縫合術 第21回大阪スポーツ傷害研究会 平成20年9月13日 大阪
- 5) 中田研 半月板損傷の治療 第26回関節鏡セミナー 平成20年8月22日 鎌倉
- 6) 鈴木智之 史野根生 大坪英則 前達雄 中田研 吉川秀樹 藤江裕道 ロボティクスを用いたACL3線維束の生体力学的解析-Part2 pivot shift 模倣荷重時における各線維束の張力分布 第33回日本膝関節学会 平成20年6月13日 東京
- 7) 岩橋武彦, 中田研, 天野大, 中村憲正, 鈴木智之, 菅本一臣, 吉川秀樹, 史野根生 正常半月板の辺器:MRによる深屈曲までの三次元解析 第34回日本関節鏡学会学術集会 平成20年6月13日 東京
- 8) 天野大, 中田研, 岩橋武彦, 中村憲正, 鈴木智之, 菅本一臣, 吉川秀樹 損傷半月板の変位と変形:MRによる三次元解析 第34回日本関節鏡学会学術集会 平成20年6月13日 東京
- 9) 中田研, 中村憲正, 堀部秀二, 史野根生, 吉川秀樹 半月板はどこまで修復可能か? 第34回日本関節鏡学会学術集会シンポジウム 平成20年6月12日 東京
- 10) 鈴木智之 史野根生 中村憲正 中川滋人 衣笠和孝 天野大 中田研 膝蓋腱を用いた長方形骨トンネルACL再建術における膝伸展、屈曲時の移植腱の長さ変化 第34回日本関節鏡学会学術集会 平成20年6月12日 東京
- 11) 武 靖浩, 中田研, 吉川秀樹, 越智隆弘 RA滑膜細胞発現のオステオポンチン:B細胞の抱き込み減少とIL-6産生刺激 第40回日本結合組織学会学術大会 平成20年5月29日 東京
- 12) 中田研, 中村憲正, 吉川秀樹 骨髓刺激法の有効性と限界 第81回日本整形外科学会 パネルディスカッション 整形外科の未来を拓くー軟骨損傷に対する手術治療の限界と挑戦 平成20年5月22日 北海道
- 13) 佐藤 睦美, 井上 悟, 中田研, 中村憲正, 堀部秀二, 小柳 磨毅, 自家半腱様筋腱を用いた膝半月再建術後の理学療法 術後早期アプローチとスポーツ復帰時筋力 日本理学療法士学会 平成20年4月5日 東京
- 14) 天野大, 中田研, 鈴木智之, 中村憲正, 吉川秀樹 膝関節の大きな骨軟骨片遊離とロッキングを伴う若年生骨壊死に対する関節再建 第110回日本中部整形災害外科学会 平成20年4月4日 大津
- 15) 中田研 半月再生のためのバイオメカニカルアプローチと機能的組織工学 第2

- 1 回日本軟骨代謝学会 平成20年3月
22日 京都
- 16) 室井悠里, 赤峯勇哲, 覚道健治, 吉川秀樹, 中田研 メカニカルストレスに対する滑膜細胞の応答 日本生体電気物理刺激研究会 平成20年3月8日 新潟
- 17) 中田研 スポーツ傷害に対する診断と治療 日本理学療法士協会現職者講習会 平成20年1月13日 大阪
- 18) 中田研 軟骨損傷に対する治療 第24回膝関節フォーラム 平成19年12月9日 東京
- 19) 中田研 半月板の修復, 再建と再生 第1回関西アスレティックトレーナーフォーラム 平成19年11月23日 西宮
- 20) 中田研 スポーツ整形の活動と膝関節治療の再生医学: 半月板の再生 大阪臨床整形外科医会学術研修会 平成19年11月10日 大阪
- 21) 中田研, 室井悠里, 中村憲正, 吉川秀樹 ヒト体性幹細胞の三次元培養組織に対する力学刺激とヒアルロン酸による組織リモデリング, 再生 第35回日本リウマチ・関節外科学会 平成19年11月9日 東京
- 22) 大坪英則, 室井悠里, 中村憲正, 山下敏彦, 吉川秀樹, 中田研 三次元培養組織に対する繰り返し圧縮力学刺激がヒト滑膜由来幹細胞のヒアルロン酸産生に及ぼす影響 第22回日本整形外科学会基礎学術総会 平成19年10月26日 浜松
- 23) 武靖浩, 中田研, 坪井秀規, 橋本淳, 吉川秀樹, 越智隆弘 カスタムメイドリアルタイムPCRを用いた関節リウマチ患者由来滑膜間質細胞(ナース様細胞)での遺伝子発現解析 第22回日本整形外科学会基礎学術総会 平成19年10月26日 浜松
- 24) 中田研, 中村憲正, 室井悠里, 大坪英則, 岩橋武彦, 吉川秀樹 半月板・軟骨の再

- 生治療をめざした力学刺激三次元培養
第22回日本整形外科学会基礎学術総会
平成19年10月26日 浜松
- 25) 中田研 スポーツ整形・膝関節治療の再生医学と課題 第5回骨関節修復・再建フォーラム 平成19年9月15日 大阪
- 26) 中田研 関節鏡視下軟骨修復術: 手技とコツ 第25回関節鏡セミナー 平成19年8月22日 大阪
- 27) 岩橋武彦, 史野根生, 中田研, 中村憲正, 田中美成, 鈴木智之, 中川滋人 前十字靭帯大腿骨付着部位の組織学的検討 第32回日本膝関節学会 平成19年6月13日 札幌
- 28) 大坪英則, 中田研, 中村憲正, 室井悠里, 山下 吉川秀樹 三次元培養組織に対した力学刺激の効果 第113回北海道整形災害外科学会 平成19年6月6日 札幌
- 29) 室井悠里, 鈴木智之, 岩橋武彦, 中村憲正, 覚道健治, 吉川秀樹, 中田研 ヒト滑膜由来細胞を用いた三次元培養組織の鉛直繰返し圧縮負荷による影響 cyclic load bioreactorを用いた長期的観察 第39回日本結合組織学会 平成19年5月29日 東京

〔図書〕(計1件)

- 1) 中田研, 金本隆司: 膝軟骨・半月板損傷を防ぐポイント 臨床スポーツ医学
25:127-134, 2008

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中田 研(NAKATA KEN)
大阪大学・医学系研究科・講師
研究者番号: 00283747

(2) 研究分担者

吉川 秀樹(YOSHIKAWA HIDEKI)
大阪大学・医学系研究科・教授
研究者番号: 60191558
中村 憲正(NAKAMURA NORIMASA)
大阪大学・医学系研究科・講師
研究者番号: 50273719

(3) 連携研究者