

機関番号：10101

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20240045

研究課題名（和文） ダブルネットワークゲルが生体内で誘導する関節軟骨自然再生現象の分子機序の解明

研究課題名（英文） Analyses on a molecular mechanism of spontaneous articular cartilage regeneration induced *in vivo* by double-network gel

研究代表者

安田 和則（YASUDA KAZUNORI）

北海道大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：20166507

研究成果の概要（和文）：①マイクロアレイを用いて、ダブルネットワーク（DN）ゲルが誘導した自然再生軟骨の遺伝子学的特徴を明らかにした。②DNゲルのPAMPS成分に軟骨分化誘導能があることを発見した。③多色発光プローブを用いて、軟骨分化過程における複数の分子動態を同時イメージングした結果、細胞凝集時に代謝が同期して振動する現象を発見した。④*in vivo* イメージングが可能なトランスジェニック発光マウスを開発した。⑤これらの成果は関節軟骨自然再生現象の分子機序の解明に重要な情報を与えた。

研究成果の概要（英文）：(1) We clarified genetic characteristics of the articular cartilage spontaneously regenerated by double-network (DN) gel, using microarray. (2) We found that PAMPS, a component of the DN gel, has an ability that can induces the spontaneous articular cartilage regeneration. (3) We observed marker genes in a chondrogenic differentiation process, using multi-colored bioluminescence probes. We discovered a synchronized oscillation phenomenon of cell metabolism in prechondrogenic condensation. (4) We developed the transgenic bioluminescence mouse to be used for *in vivo* imaging. (5) These results provided important information to clarify a comprehensive mechanism of the spontaneous cartilage regeneration phenomenon.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	16,000,000	4,800,000	20,800,000
2009年度	11,600,000	3,480,000	15,080,000
2010年度	11,300,000	3,390,000	14,690,000
年度			
年度			
総計	38,900,000	11,670,000	50,570,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：関節軟骨、自然再生、再生誘導材料、ダブルネットワークゲル、分子機序

1. 研究開始当初の背景

(1) 医学領域において、欠損した関節軟骨（硝子軟骨）は生体内で自然に再生することはないと信じられてきた。従って関節軟骨欠損に対する現在の最先端治療戦略は、組織工学を用いた培養自家細胞移植戦略である。しかし他の臓器と異なり、細胞自体ではなく基質がその機能を担う軟骨組織に関しては、こ

の戦略の問題点が認識されつつあり、臨床的普及の見通しは立っていない。

(2) 代表研究者は先行する研究において、新しい多機能生体材料である PAMPS/PDMAAm ダブルネットワーク（DN）ゲルを関節軟骨欠損部の基底をなす骨内に埋植すると、関節軟骨欠損部（空隙）に硝子軟骨が生体内で自然に再生する現象を発見した。従来の常識を覆

すこの現象は、今後の生体材料および再生医学の研究に大きなイノベーションを起こす可能性が高く、その機序の解明が急務であった。

2. 研究の目的

PAMPS/PDMAAm DN ゲルが生体内において硝子軟骨の自然再生を誘導する分子機序を、独自に開発した光イメージング解析技術等を用いて解明すること。

3. 研究の方法

(1) 自然再生させた再生軟骨細胞における発現遺伝子の網羅的解析

成熟家兔の四肢から軟骨を採取し、それぞれより抽出した mRNA から EST ライブラリーを構築し、DNA 配列を決定した 2153 個の発現遺伝子をデータベース化した。これに NCBI データベースから得た 6544 遺伝子を加えた総計 8697 個の単一鎖プローブが搭載されたマイクロアレイを作製した。10 羽の成熟日本白色家兔の両膝 PF 関節大腿骨側に直径 4.3mm の骨軟骨欠損を作製した後、PAMPS/PDMAAm DN ゲルを欠損部の基底に埋植し、関節軟骨表面から深さ 2 mm の空隙を残した (図 1)。

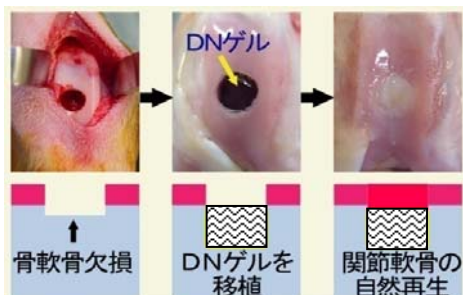


図 1. DN ゲルの欠損部の基底への埋植 (深さ 2 mm の空隙を残すことに注意)。

2 および 4 週後に骨軟骨欠損部に再生した組織 (図 2) を採取し、mRNA を抽出した。20 μ g の RNA から蛍光標識した cDNA を合成した。マイクロアレイとハイブリダイゼーションしてから洗浄し、スキャンニングおよびデータ解析を行った。

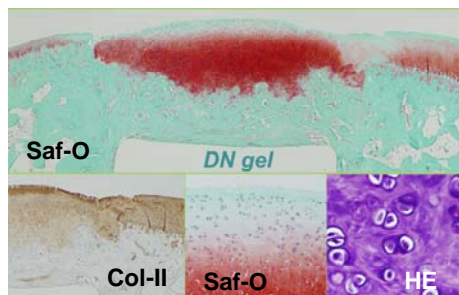


図 2. 再生軟骨 (4 週) : Saf-O : サフラニン 0 染色, Col-II : 2 型コラーゲン免疫染色, HE : ヘマトキシリン・エオジン染色。

(2) DN ゲルのコンポーネントゲルの in vivo 軟骨再生効果の解析

日本白色家兔 20 羽 40 膝を用いた。両膝 PF 関節大腿骨側に直径 4.3mm の骨軟骨欠損を作製し、40 膝を無作為に 4 群に分けた。I 群では PAMPS/PDMAAm DN ゲルを、II 群では PAMPS ゲルを、III 群では PDMAAm ゲルを欠損部の基底部に埋植し、関節軟骨表面から深さ 2 mm の空隙を残した。IV 群では何の処置も行わなかった。全て術後 4 週で屠殺し、各群 5 膝は組織学的評価 (HE、サフラニン-0、および 2 型コラーゲン (Col-2) 免疫染色) を行い、Wayne スコアを用いて定量化した。また各群残りの 5 膝からは欠損部に再生した組織を採取し、リアルタイム PCR によって 2 型コラーゲン、アグリカン、SOX9 mRNA の発現量を計測した。統計解析には分散分析を用いた。

(3) *ex vivo* 環境における DN ゲルの軟骨分化誘導能の解析

① DN ゲルおよびポリスチレン上で軟骨原性 ATDC5 細胞をインシュリン非添加培地で 7 日間培養し、アルシヤンブルー染色および 2 型コラーゲン免疫染色、リアルタイム PCR (2 型コラーゲン、アグリカン、および SOX9 mRNA) を用いて比較した。

② ATDC5 細胞を PAMPS100%ゲル、PDMAAm100%ゲル、PAMPS25%-PDMAAm75%ゲル、PAMPS50%-PDMAAm50%ゲル、および PAMPS75%-PDMAAm25%ゲル上で、インシュリン添加および非添加の条件下に培養した。培養後 7 および 14 日で細胞から mRNA を抽出し、アルシヤンブルー染色および 2 型コラーゲン免疫染色、リアルタイム PCR を用いて比較した。

③ DN ゲルおよびポリスチレン上で幹細胞由来 C3H10T1/2 細胞を、標準培養液および BMP-2 添加培養液を用いて培養した。アルシヤンブルー染色および 2 型コラーゲン免疫染色、リアルタイム PCR (2 型コラーゲン、アグリカン、および SOX9 mRNA) を用いて比較した。

(4) 多色発光プローブによる軟骨分化過程における分子動態のイメージング

軟骨原性 ATDC5 細胞を用いた。軟骨分化と関係が指摘されている時計遺伝子 Bmal1 のプロモーターと、発光甲虫緑色ルシフェラーゼ遺伝子を融合したレポーターベクター

(Bmal1-Eluc) を ATDC5 細胞に導入し、安定株を構築した。次に軟骨分化のマーカである II 型コラーゲンと SOX9 のそれぞれのプロモーター領域を、発光甲虫赤色ルシフェラーゼ遺伝子上流に挿入したレポーターベクター (Col2-SLR, SOX9-SLR) を、上記の ATDC5 細胞に導入し、時計遺伝子と軟骨マーカー遺伝子が両方安定的に発現する細胞株 (Bmal1-Eluc/Col2-SLR, Bmal1-Eluc/SOX9-SLR) を構

築した、その細胞から出る赤色と緑色の発光量をクロノス (ATTO) およびセルグラフ (ATTO) を用いて同時にリアルタイムで測定した。

(5) トランスジェニック発光マウスの開発と評価

GFP およびルシフェラーゼを発現する骨髄細胞を持つキメラマウスを開発した。その有用性を評価するため、リボポリサッカライドを注入した脳炎症モデルを用い、細胞浸潤動態を蛍光イメージング および発光イメージングのシグナル強度の変化による *in vivo* イメージング能を比較した。

4. 研究成果

(1) 自然再生軟骨における発現遺伝子の網羅的解析 (学会発表 1)

明らかな発現を示す遺伝子は正常軟骨で 8488、処置後 2 および 4 週の再生軟骨でそれぞれ 8479 および 8625 であった。これらの遺伝子を機能的に 7 つのカテゴリーに分類すると、処置後 2 および 4 週の再生軟骨における各カテゴリーの比率は完全に一致し、それらは正常軟骨のそれと巨視的には極めて近似した。しかしいくつかの興味深い差異が発見された。すなわち、Cell growth and/or maintenance 関連遺伝子の比が再生軟骨において正常軟骨より高かった。

またコラーゲン関連遺伝子では 2 型、1 型、および 10 型コラーゲン遺伝子が、プロテオグリカン関連遺伝子では decorin および fibromodulin 遺伝子が、非コラーゲン/非プロテオグリカン分子関連遺伝子では secreted protein acidic and rich in cysteine、procollagen-lysine 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2、chondroaderin、cartilage transformation growth factor、および cartilage oligomeric matrix protein 遺伝子が、それぞれ再生軟骨において正常軟骨より明らかに高く発現していた。再生軟骨において正常軟骨に対する発現比が 5 倍以上である遺伝子は 2 および 4 週でそれぞれ 307 および 270 個であった。それらを機能分類すると metabolism 関連遺伝子 (26%)、cell growth and maintenance 関連遺伝子 (20-21%)、Cell communication/Signal transduction 関連遺伝子 (10-11%) の比率が高かった。

これらの結果は第一に、我々の開発した方法による再生軟骨が遺伝子学的にも硝子軟骨であることを証明した。第二に、本研究で得られた膨大な遺伝子データは、今後軟骨自然再生のメカニズムの本質となる遺伝子群を発見するために有用であると考えられた。

(2) DN ゲルのコンポーネントゲルの *in vivo* 軟骨再生効果の解析 (学会発表 2)

I 群の欠損部は、2 型コラーゲンおよびプロテオグリカンに富んだ軟骨組織が再生していた (図 3)。II 群では軟骨様組織 (辺縁) と線維性組織 (中央) が混在していた。III 群の欠損部再生組織は IV 群欠損部における組織と同様で、ほとんどが線維性組織と骨組織であった。Wayne の総スコアに関しては、I および II 群が III および IV 群に比べて有意に高値であった ($p < 0.0001$)。組織学的スコアは、I 群が、II 群 ($p = 0.0408$) を含むいずれの群より高値であった。

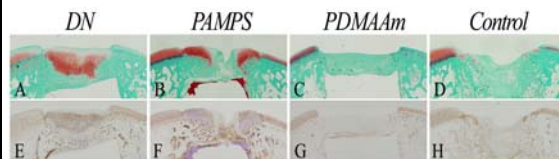


図 3. 組織学的評価: Safranin-O 染色 (A-D), collagen-II 免疫染色 (E-H)

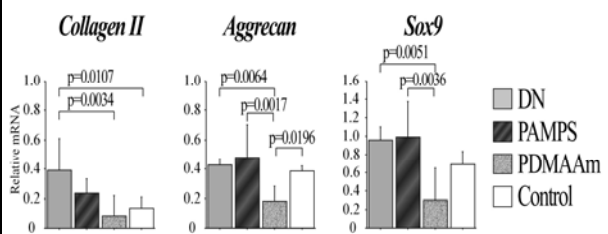


図 4. Real time PCR 解析

PCR 解析では 2 型コラーゲン、プロテオグリカン、および Sox9 mRNA の高い発現は、I および II 群において認められた (図 4)。

本研究は *in vivo* における関節軟骨自然再生誘導能が PAMPS ゲルにもあること、およびその関節軟骨自然再生誘導能は DN ゲルよりも劣ることを明らかにした。一方、PDMAAm ゲルに関節軟骨自然再生誘導能はないが、DN ゲルにおいては高弾性化への貢献によって PDMAAm ゲルの再生誘導能を増強していることが考えられた。PAMPS ゲルは極めて脆弱であり、臨床応用には不利なゲルである。DN ゲルはその高い強度によっても臨床応用に有利である。

(3) *ex vivo* 環境における DN ゲルの軟骨分化誘導能の解析

① DN ゲルおよびポリスチレン上で ATDC5 細胞を 7 日間培養した。グリコサミノグリカン (アルシャンブルー染色) と 2 型コラーゲン (免疫染色) の発現は DN 上でのみ、認められた (図 5 A-F)。リアルタイム PCR でも 2 型コラーゲン、アグリカン、および SOX9 mRNA の発現は DN 上でのみ認められた (図 5 G-I)。

(発表論文 13)

②PAMPSゲルとPDMAAmゲルからなる種々のコポリマーゲル上でATDC5細胞をインシュリン添加および無添加培地で培養し、軟骨マーカーの発現を比較した。その結果、インシュリン非存在下でPAMPSゲルに強力な軟骨への分化誘導能があることが解った。またインシュリン存在下ではPDMAAmゲルに分化促進能があることが解った(図6)。(発表論文6)

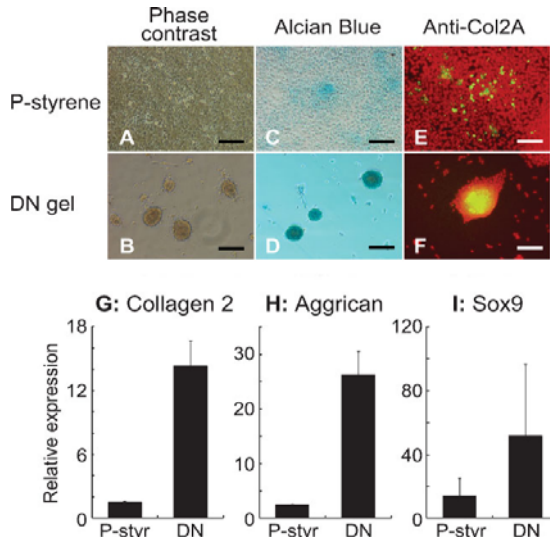


図5. DNゲルおよびポリスチレン上でのATDC5細胞の培養 (G-I: mRNA発現)

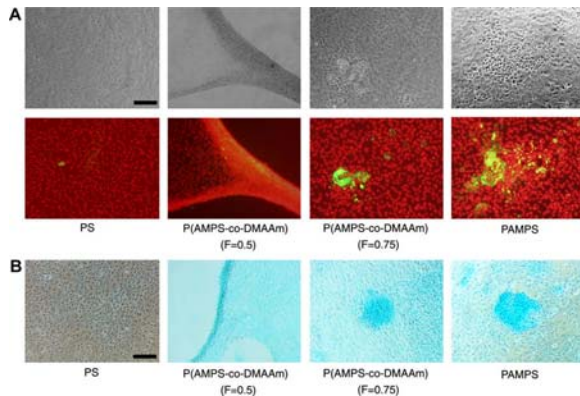


図6. Polystyrene, PAMPS-PDMAAmゲル2種、PAMPSゲル上におけるATDC5の培養(インシュリンなしで2週間)、(A)2型コラーゲン(免疫染色)(B)プロテオグリカン(アルシヤンブルー染色)

③間葉系幹細胞由来C3H10T1/2細胞を、標準培養液およびBMP-2添加培養液を用いて培養した。DNゲル上の培養ではいずれの培養液を用いても7日目にゲルから遊離しつつ細胞塊を形成し、リアルタイムPCR解析で2型コラーゲン(Co12)、アグリカン、およびSOX9 mRNAの高発現を認め(図7)免疫蛍光染色でもCo12が染色された。ポリスチレン上では

いずれの培養液を用いても細胞は単層で増殖を続け、細胞の凝集やCo12の発現を認めなかった。

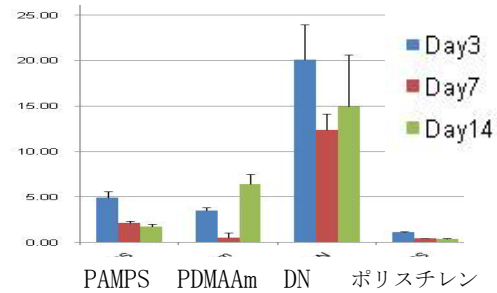


図7. C3H10T1/2細胞におけるSOX9 mRNAの発現

(4)多色発光プローブによる軟骨分化過程における分子動態のイメージング(投稿中)細胞株(Bmal1-Eluc/Col2-SLR, Bmal1-Eluc/SOX9-SLR)の赤色と緑色の発光量を同時にリアルタイムで測定した。分化誘導前では維持培地に交換すると時計遺伝子(Bmal1)の発現は約24時間周期のサーカディアンリズムを示し、その時に軟骨マーカー遺伝子(2型コラーゲン, SOX9)の発現は増加せずにはほぼ一定のレベルを維持した。次にインシュリンを加えた分化培地へ交換して分化を誘導すると、分化誘導後の1日目~2日目までは時計遺伝子が約24時間周期で振動するが、その後約8時間周期のウルトラディアンリズムが生じ、その時に軟骨マーカー遺伝子の発現は増加し、時計遺伝子とほぼ同じ位相を持つウルトラディアンリズムの発生が観察された(図8)。

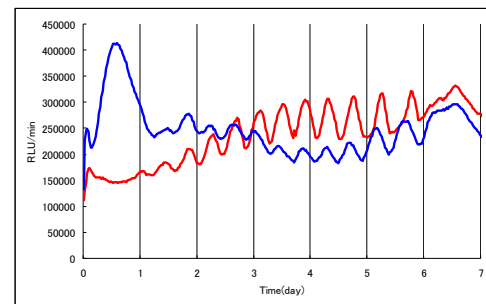


図8. 軟骨分化時の多色リアルタイムモニタリング(Bmal1-緑/Sox9-赤)

そこで、細胞内に安定的に発現するアクチン-SLRをリアルタイムモニタリングした。その結果、アクチン-SLRもウルトラディアンリズムを持って振動することが観察された(図9)。これらの結果から、これらのウルトラディアンリズムはプロモーターによるのではなく、発光反応に影響を与える代謝の振動を反映していると考えられた。

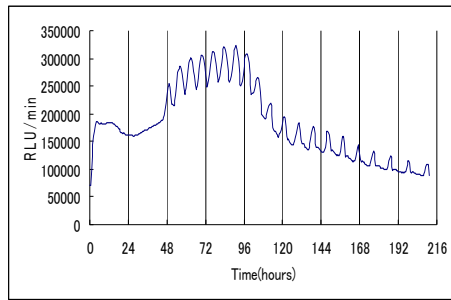


図9. 軟骨分化時のアクチンの発現

この代謝振動の意義を探るために、分化誘導培地に BMP-2 を加えて軟骨のノジュールの形成を抑制すると、遺伝子発現のウルトラディアンリズムが抑えられることが分かった。さらに、軟骨のパターン形成に関係しているノッチシグナリングを N-[N-(3,5-difluorophenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester (DAPT) 投与によって抑制するとウルトラディアンリズムが抑えられることが分かった。これらの結果からウルトラディアンリズムは軟骨のパターン形成に必要なことであると考えられた。

(5) トランスジェニック発光マウスの作成と評価 (発表論文 14)

発光イメージングでは細胞浸潤の増加が光強度の増加としてリアルタイムにモニターできた (図 10)。

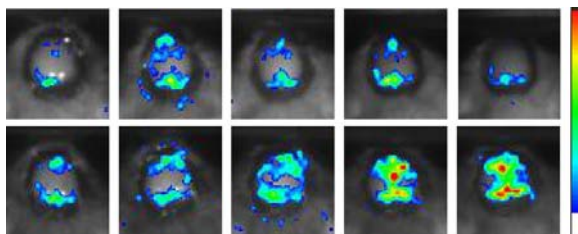


図 10. 骨髄由来細胞の病変部への集積 in vivo イメージング (上列: 生食注入、下列: LPS 注入)

この増加は炎症モデルの病変部におけるルシフェラーゼ活性の増加と一致した。免疫組織学的評価では、この細胞が脳へ浸潤し microglia へ分化することが確認された。一方、蛍光イメージングではこの細胞浸潤動態をモニターすることはできなかった。ルシフェラーゼを発現する骨髄細胞を持つトランスジェニック発光マウスは、軟骨自然再生の機序を研究するための in vivo 発光イメージングに有用と考えられた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 32 件: すべてインパクトフ

ァクターのある英文雑誌に掲載)

1. Saito J, Furukawa H, Kurokawa T, Kuwabara R, Kuroda S, Hu J, Tanaka Y, Gong JP, Kitamura N, Yasuda Y: Robust bonding and one-step facile synthesis of tough hydrogels with desirable shape by virtue of the double network structure. *Polym Chem*, 2, 2011, 575-580, <http://pubs.rsc.org>, doi:10.1039/COPY00272K, 査読有
2. Yokota M, Yasuda K, Kitamura N, Arakaki K, Onodera S, Kurokawa T, Gong JP: Spontaneous hyaline cartilage regeneration can be induced in an osteochondral defect created in the femoral condyle using a novel double-network hydrogel. *BMC Musculoskeletal Disorders*, 12:49. (10 pages) 2011, <http://www.biomedcentral.com/1471-2474/12/49> (Published on 22 February, 2011), doi:10.1186/1471-2474-12-49, 査読有
3. Kawaguchi Y, Kondo E, Kitamura N, Arakaki K, Tanaka Y, Munekata M, Nagai N, Yasuda K: In vivo effects of isolated implantation of salmon-derived crosslinked atelocollagen sponge into an osteochondral defect. *J Mater Sci Mater Med*, 22(2), 2011, 397-404, 査読有
4. Arakaki K, Kitamura N, Kurokawa T, Onodera S, Kanaya F, Gong JP, Yasuda K: Joint immobilization inhibits spontaneous hyaline cartilage regeneration induced by a novel double-network gel implantation. *J Mater Sci Mater Med*, 22(2), 2011, 417-425, 査読有
5. Kitamura N, Yasuda K, Ogawa M, Arakaki K, Kai S, Onodera S, Kurokawa T, Gong JP. Induction of Spontaneous Hyaline Cartilage Regeneration Using a Double-Network Gel: Efficacy of a Novel Therapeutic Strategy for an Articular Cartilage Defect. *Am J Sports Med*, 2011 Apr 1. [Epub ahead of print], 査読有
6. Kwon HJ, Yasuda K, Ohmiya Y, Honma KI, Chen YM, Gong JP: In vitro differentiation of chondrogenic ATDC5 cells is enhanced by culturing on synthetic hydrogels with various charge densities. *Acta Biomater*, 6 (2), 2010, 494-501, 査読有
7. Kobayashi Y, Yasuda K, Kondo E, Katsura T, Tanabe Y, Kimura M, Tohyama H.: Implantation of autogenous meniscal fragments wrapped with a fascia sheath enhances fibrocartilage regeneration in vivo in a large harvest site defect. *Am J Sports Med*, 38(4), 2010, 740-8, 査読有
8. Arakaki K, Kitamura N, Fujiki H, Kurokawa T, Iwamoto M, Ueno M, Kanaya F, Osada Y, Gong JP, Yasuda K: Artificial cartilage made from a novel double-network hydrogel: In vivo effects on the normal cartilage and ex vivo evaluation of the friction property. *J Biomed Mater Res A*, 93(3), 2010, 1160-1168, 査読有

9. Kwon HJ, Enomoto T, Shimogawara M, Yasuda K, Nakajima Y, and Ohmiya Y: Bioluminescence imaging of dual gene expression at the single-cell level. *BioTechniques*, 48(6), 2010, 460-462, 査読有
10. Yang JJ, Chen YM, Kurokawa T, Gong JP, Onodera S, Yasuda K: Gene expression, glycocalyx assay, and surface properties of human endothelial cells cultured on hydrogel matrix with sulfonic moiety: Effect of elasticity of hydrogel. *Journal of Biomedical Materials Research: Part A*, 95(2), 2010, 531-42, 査読有
11. Chen YM, Kurokawa T, Tominaga T, Yasuda K, Osada Y, Gong JP, Yamamoto K, Ando J: Study on the sliding friction of endothelial cells cultured on hydrogel and the role of glycocalyx on friction reduction. *Advanced Engineering Materials* 12(11), 2010, B628-B636, 査読有
12. Chen YM, Gong JP, Tanaka M, Yasuda K, Yamamoto S, Shimomura M, Osada Y: Tuning of cell proliferation on tough gels by critical charge effect. *J Biomed Mater Res: Part A*, 88(1), 2009, 74-83, 査読有
13. Yasuda K, Kitamura N, Gong JP, Arakaki K, Kwon HJ, Onodera S, Chen YM, Kurokawa T, Kanaya F, Ohmiya Y, Osada Y: A novel double-network hydrogel induces spontaneous articular cartilage regeneration *in vivo* in a large osteochondral defect. *Macromol Biosci*, 9(4), 2009, 307-316, 査読有
14. Akimoto H, Kwon HJ, Ozaki M, Yasuda K, Honma K, Ohmiya Y: In vivo bioluminescence imaging of bone marrow-derived cells in brain inflammation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 380(4), 2009, 844-849, 査読有
15. Tanabe Y, Yasuda K, Azuma C, Taniguro H, Onodera S, Suzuki A, Chen YM, Gong JP, Osada Y: Biological responses of novel high-toughness double network hydrogels in muscle and the subcutaneous tissues. *J Mater Sci Mater Med*, 19(3), 2008, 1379-1387, 査読有
16. Kwon HJ, Akimoto H, Ohmiya Y, Honma K, Yasuda K: Gene expression profile of rabbit cartilage by expressed sequence tag analysis. *Gene*, 424(1-2), 2008, 147-152, 査読有

[学会発表] (計 16 件 : 海外 11、国内 5)

1. Imabuchi R, Kwon HJ, Kitamura N, Kurokawa T, Gong JP, Ohmiya Y, Yasuda K: Gene profiles of the regenerated cartilage tissue induced by implantation of a novel double-network hydrogel, 9th World Congress of the International Cartilage Repair Society, Sitges, Spain September 26-29 2010
2. Ogawa M, Kitamura N, Arakaki K, Onodera S,

Kurokawa T, Gong JP, Tanaka Y, Takakura Y, Yasuda K: A Negatively Charged PAMPS Gel Component Plays A Significant Role in The InVivo Spontaneous Cartilage Regeneration Induced by Implantation of PAMPS/PDMAAm Double-network Gel, 56th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society, New Orleans, Louisiana March 6-9, 2010

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称 : 骨充填型軟骨組織再生誘導剤
発明者 : 安田和則、長田義仁、龔劍萍、北村信人

権利者 : 国立大学法人 北海道大学

種類 : 特許

出願番号通理 : PCT/JP2009/64888 (特願 2008-217253)

出願年月日 : 平成 21 年 8 月 26 日 (国内 20 年 8 月 26 日)

国内外の別 : 国際

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安田 和則 (YASUDA KAZUNORI)
北海道大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号 : 2 0 1 6 6 5 0 7

(2) 研究分担者

- ・近江谷 克裕 (OHMIYA YOSHIHIRO)
産業技術総合研究所・副研究部門長
研究者番号 : 2 0 2 2 3 9 5 1
- ・北村 信人 (KITAMURA NOBUTO)
北海道大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号 : 8 0 4 4 7 0 4 4
- ・小野寺 伸 (ONODERA SHIN)
北海道大学・大学院医学研究科・
客員准教授
研究者番号 : 0 0 3 5 9 4 8 1
- ・権 赫準 (KWON HYUCK JOON)
北海道大学・大学院医学研究科・特任助教
研究者番号 : 2 0 4 5 5 6 2 9
- ・黒川 孝幸 (KUROKAWA TAKAYUKI)
北海道大学・大学院先端生命科学研究院・
特任助教
研究者番号 : 4 0 4 5 1 4 3 9

(3) 連携研究者

- ・長田 義仁 (OSADA YOSHIHITO)
理化学研究所基幹研究所・副所長
研究者番号 : 6 0 0 0 7 8 0 4
- ・龔 劍萍 (GONG JIAN PING)
北海道大学・大学院先端生命科学研究院・
教授
研究者番号 : 2 0 2 5 0 4 1 7