

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20592104

研究課題名(和文) p53欠損マウスを用いた再生軟骨周囲の軟骨膜様組織における再生誘導機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of re-differentiation mechanism in perichondrium-like tissues around tissue-engineered cartilage using p53 knockout mice

研究代表者

中塚 貴志 (NAKATSUKA TAKASHI)

埼玉医科大学・医学部・教授

研究者番号：80198134

研究成果の概要(和文):

再生軟骨には周囲の軟骨膜様組織の機能が重要であると予想される。本研究の目的は、軟骨膜様組織の血行が軟骨再生に与える影響を解明し、再生軟骨維持法の開発に情報を提供することである。p53 遺伝子欠損マウスを用いて、再生軟骨における低酸素ストレスの影響評価を行った。その結果、再生組織周囲の血行は軟骨再生に影響を及ぼし、移植組織への血行は再生軟骨の生体内代謝・形状維持に重要な因子であることが示唆された。

研究成果の概要(英文):

It is assumed that the functions of the surrounding perichondrium-like tissues are important for cartilage regeneration. The purpose of this study was to explicate the effects of the blood circulation in the perichondrium-like tissues on cartilage regeneration and to provide the information on the development of the maintenance of regenerative cartilage. We conducted the assessments of the effects of anoxic stress on regenerative cartilage, using p53 knockout mice. As results, it was suggested that the blood circulation around the regenerative tissues influenced cartilage regeneration and the blood supply to transplants was an important factor for in vivo metabolism and maintenance of their shape.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・形成外科学

キーワード：再生医学

1. 研究開始当初の背景

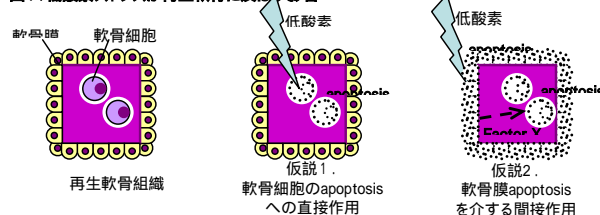
再生医療がマスコミにも盛んに取り上げられるようになって10年を経たが、現在、臨床応用されている分野は歯槽骨再生、限局的な軟骨再生、皮膚表皮再生などに止まり、い

ずれもシートあるいは細胞懸濁液といった形状であり、対象疾患も限られる。そのため、組織再建の臨床現場でしばしば遭遇する大型な組織欠損に対しては、3次元形状と十分なサイズを有する再生移植組織の作製技術

と生体内での再生組織維持技術の開発が求められている。そこで、研究代表者らは、足場素材の改善、軟骨細胞増殖・基質産生促進を実現し、3次元形状を有する再生軟骨を作製した。

一方、再生組織維持に関しては、再生組織周囲に形成される軟骨膜様組織の機能が重要な役割を果たすと予想される。元来、生理的な軟骨の周囲に存在する軟骨膜は、軟骨組織の酸素・栄養供給や軟骨細胞の恒常性維持、弾性特性の補強などを担っている。また、マイクロサージャリー遊離組織移植による移植生着率向上の経験からもわかるように、大型軟骨移植組織の生体内における代謝と形態を維持するためには、軟骨周囲（軟骨膜）の血行再建が不可欠である。申請者らが作製した3次元形状の再生軟骨周囲にも軟骨膜様組織は形成されるが、生理的な軟骨組織同様、再生軟骨の組織維持・永続的生着に重要な役割を果たすと予想される。しかし、元来軟骨組織は無血管組織であり、その中に存在する軟骨細胞は低酸素下でも生存、分化できる特異的な細胞種である（Domm et al 2002 Osteoarthritis Cartilage）。したがって、再生軟骨組織周囲の血流は、軟骨細胞に酸素などの供給することが主たる役割なのか、あるいは周囲組織（軟骨膜様組織）の生存に関与し、そこから分泌される因子を介して軟骨細胞に影響を及ぼすのか、という疑問は依然未解決である（図1）。申請者らは、再生軟骨周囲の血行減少が、周囲組織（軟骨膜様組織）のapoptosisを誘導し、軟骨膜用組織の軟骨再生因子（図1 factor X）の分泌が減少するため、軟骨細胞活性が低下するという仮説を立てた（図1 仮説2）。これが実証されれば、再生軟骨組織の生体内維持には血管という導管の再建のみではなく、周囲組織の活性化も含めた再生が必要であることになり、再生医療の概念にパラダイムシフトをもたらすことになる。

図1. 低酸素ストレスが再生軟骨に及ぼす影響



2. 研究の目的

本研究の目的は、再生組織周囲の血行が軟骨再生に影響を及ぼす機序を解明し、再生軟骨の生体内代謝・形状維持法の開発に関する貴重な情報を提供することである。

3. 研究の方法

(1) p53 遺伝子欠損マウスの軟骨細胞および線維芽細胞における低酸素ストレス感受性の評価

雄性6週齢のp53 遺伝子欠損マウス(p53^{-/-})および野生型マウス(p53^{+/+})から耳介組織および皮下組織を採取し、コラゲナーゼ処理で耳介軟骨細胞および線維芽細胞を単離する。単離した軟骨細胞および線維芽細胞に対し、低酸素ストレス(2-21% O₂)を加え、経時的にapoptosisの評価を行う。細胞死に関しては、TUNEL染色を行うほか、BAX, BCL2など各種アポトーシス関連分子の遺伝子発現および活性化をrealtime RT-PCRで評価する。

(2) マウス虚血モデルにおける再生軟骨の血行、組織構築、細胞死の検索

マウス虚血モデルを用いた再生軟骨の解析を継続する。純系マウス(C57/BL6J, 雄性6週)耳介軟骨由来の培養軟骨細胞を用いて再生軟骨組織(1x1x0.3 cm)を作製する。再生軟骨組織を、側胸壁動脈と深腸骨回旋動脈を電気焼結させたマウス虚血モデルの背部皮下へ同系移植し、移植後経時的に再生軟骨および移植部体表の3次元形状計測を行う。また、虚血モデル群および対象群の再生軟骨と周囲組織の血行、組織構築、細胞死を評価する。再生軟骨に対し、I, II型コラーゲンELISA定量、アルシアンブルーによるプロテオグリカン比色定量基質産生評価、I, II型コラーゲン、アグリカン、SOX9, RUNX2, PTH receptorや、HIF-1 α 、HIF-1 β 、p53などの遺伝子発現、一般染色(HE、トルイジンブルー)、I, II, X型コラーゲンなどの免疫組織化学的観察を行う。

(3) p53 遺伝子欠損マウスを用いた低酸素誘導apoptosisの抑制と再生軟骨に対する作用の解析

p53^{-/-}(遺伝子背景 C57/BL6J)およびp53^{+/+}から耳介軟骨組織を採取し、上記と同様に再生組織を作製する。作製したマウス由来再生軟骨組織を6週マウス(p53^{-/-}、p53^{+/+})へ移植し、移植後経時的に再生軟骨およびその周囲の血行、組織構築、細胞死を評価する。さらに、再生維持期における評価を行うため、再生軟骨移植後電気凝縮し、軟骨再生の評価を行う。虚血モデルと対照群由来の再生軟骨およびその周囲の血行、組織構築、および細胞死を比較検討する。

4. 研究成果

(1) p53 遺伝子欠損マウスの軟骨細胞および線維芽細胞における低酸素ストレス感受性の評価

p53 遺伝子欠損マウスおよび野生型マウス

から単離した軟骨細胞および線維芽細胞を低酸素下で培養し、経時的に TUNEL 染色や活性型カスパーゼ、BAX、BCL2 など各種アポトーシス関連遺伝子の発現を評価した。その結果、野性型軟骨細胞では野性型線維芽細胞に比較して、5% O₂ において低酸素ストレスに耐性を示した。p53 遺伝子欠損マウスでは、軟骨細胞における低酸素によるアポトーシスに対し更に抵抗性を示す傾向が示唆された。

(2) マウス虚血モデルにおける再生軟骨の血行、組織構築、細胞死の検索

純系マウス(C57BL/6J、雄性6週)の耳介軟骨組織から単離した軟骨細胞を増殖させ、回収した細胞を PLLA 足場素材 (1x1x0.3 cm)へ投与し再生軟骨組織を作製した。正常なマウスに移植した再生軟骨組織は、移植後2週から8週にかけて、軟骨成熟を生じ、移植後8週では円形な細胞が、豊富なプロテオグリカンとI型コラーゲンで構成される細胞外基質によって囲まれる、典型的な軟骨組織の組織像を呈していた。また、生化学的にもI型コラーゲンやプロテオグリカンが豊富に存在していた。作製した再生軟骨組織を、背部皮下虚血環境下のマウスモデルへ同系移植した。その結果、虚血モデルへ移植された再生軟骨組織は、移植後8週で生化学的にI型コラーゲンやプロテオグリカンなどの軟骨基質量が減少する傾向を示した。

(3) p53 遺伝子欠損マウスを用いた低酸素誘導 apoptosis の抑制と再生軟骨に対する作用の解析

p53^{-/-}および p53 マウス^{+/+}を用いて、耳介軟骨細胞を培養し、それぞれの細胞から作製した再生軟骨組織を各種条件下でマウスへ移植した。その結果、軟骨細胞における p53 発現の有無は、虚血下における軟骨成熟に影響を及ぼし、p53 遺伝子発現が欠損することにより、虚血に対する抵抗性が増強することが示唆された。

これらの実験結果より、再生組織周囲の血行は軟骨再生に影響を及ぼし、移植組織への血行を十分に維持することは再生軟骨の生体内代謝・形状維持に重要な因子であることが示唆された。

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11件)

Sato T, Hasegawa H, Sugasawa M, Yasuda M, Morita K, Nakahira M, Nakatsuka T. Free

jejunal transfer for a 15-year-old girl with synovial sarcoma of the hypopharynx. *J Plast Reconstr Aesthet Surg in press*. 査読 有

Tsuchiya S, Nakatsuka T, Sakuraba M. One-sided soft palatal reconstruction with an anterolateral thigh fasciocutaneous flap: report of two cases. *Microsurgery* 2011;31:150-4. 査読 有

Tsuchiya S, Sakuraba M, Asano T, Miyamoto S, Kimata Y, Hayashi R, Nakatsuka T. Morphologic study of mandibles in Japanese patients for mandibular reconstruction with fibula free flaps. *Head Neck* 2011;33:383-8. 査読 有

Ko EC, Fujihara Y, Ogasawara T, Asawa Y, Nishizawa S, Nagata S, Takato T, Hoshi K. Administration of the insulin into the scaffold atelocollagen for tissue engineered cartilage. *J Biomed Mater Res A* 2011;97:186-92. 査読 有

Iwata K, Asawa Y, Fujihara Y, Tanaka Y, Nishizawa S, Nakagawa T, Nagata S, Takato T, Hoshi K. The effects of rapid- or intermediate-acting insulin on the proliferation and differentiation of cultured chondrocytes. *Curr Aging Sci* 2010;3:26-33. 査読 有

Tanaka Y, Yamaoka H, Nishizawa S, Nagata S, Ogasawara T, Asawa Y, Fujihara Y, Takato T, Hoshi K. The optimization of porous polymeric scaffolds for chondrocyte/atelocollagen based tissue-engineered cartilage. *Biomaterials* 2010;31:4506-16. 査読 有

Tokioka K, Park S, Sugawara Y, Nakatsuka T. Video recording study of infants undergoing primary cheiloplasty: are arm restraints really needed? *Cleft Palate Craniofac J* 2009;46:494-7. 査読 有

Ichioka S, Yokogawa H, Sekiya N, Kouraba S, Minamimura A, Ohura N, Hasegawa H, Nakatsuka T. Determinants of wound healing in bone marrow-impregnated collagen matrix treatment: impact of microcirculatory response to surgical debridement. *Wound Repair Regen* 2009;17:492-7. 査読 有

Tokioka K, Obana K, Ishida K, Nakatsuka T. Wavy line closure for revision of abdominal scars with suture marks in children. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg* 2009;43:137-41. 査読 有

Ichioka S, Watanabe H, Sekiya N, Shibata M, Nakatsuka T. A technique to visualize wound bed microcirculation and

the acute effect of negative pressure.
Wound Repair Regen 2008;16:460-5. 査読
有

Ichioka S, Ando T, Shibata M, Sekiya N,
Nakatsuka T. Oxygen consumption of keloids
and hypertrophic scars. Ann Plast Surg
2008;60:194-7. 査読 有

〔学会発表〕(計 13 件)

星 和人. 自家軟骨細胞移植の現状と足
場素材導入による新しい展開. つくば再生医
療研究会. 2011/2/15. つくば.

Hoshi K. Human cultured chondrocytes
and tissue stem cells for tissue
engineering of permanent cartilage. ICRS
2010 Stem Cells for Cartilage Repair.
2010/9/27. Barcelona, Spain.

Nakatsuka T et al. Factors influencing
postoperative complications and
functional outcome in mandibular
reconstruction. The 10th Korea-Japan
Congress of Plastic and Reconstructive
Surgery. 2010/6/16-18. Korea.

中塚 貴志 ほか. 下顎再建に関する多
施設共同研究. 第 34 回日本頭頸部癌学会.
2010/6/10-11. 東京.

中塚 貴志 ほか. 当院における遊離組
織移植による頭頸部再建手術の検討. 第 53
回日本形成外科学会. 2010/4/7-9. 金沢.

中塚 貴志 ほか. Posteromedial thigh
flap による坐骨部褥瘡の再建. 第 53 回日本
形成外科学会. 2010/4/7-9. 金沢.

中塚 貴志 ほか. 坐骨・大転子部の広
範囲褥瘡に対してハムストリング筋皮弁を
利用した治療経験. 第 53 回日本形成外科学
会. 2010/4/7-9. 金沢.

星 和人, 高戸 毅. 生分解性ポリマー
足場素材を用いた 3 次元再生軟骨の研究開発.
第 9 回日本再生医療学会総会 2010/3/18. 広
島.

藤川由美子, 五十嵐健夫, 星 和人, 高
戸 毅. 3 次元形状評価による再生軟骨の移植
方法の検討. 第 9 回日本再生医療学会総会.
2010/3/18. 広島.

Nakatsuka T et al. Free jejunal
transfer for a 15-year-old girl with
synovial sarcoma of the hypopharynx. The
10th Congress of the International
Confederation for Plastic Reconstructive
and Aesthetic Surgery -Asian Pacific
Section. 2009/10/8-10. Tokyo, Japan.

中塚 貴志 ほか. 側方唇の赤唇弁を用
いた両側唇裂二次修正術. 第 52 回日本形成
外科学会. 2009/4/22-24. 横浜.

中塚 貴志 ほか. 濃厚血小板由来バイ
オマテリアルを用いた難治性潰瘍の治療経
験. 第 52 回日本形成外科学会.

2009/4/22-24. 横浜.

中塚 貴志 ほか. 頭蓋骨および頭皮欠
損の術後に合併症により治療の苦慮した 3 例.
第 52 回日本形成外科学会. 2009/4/22-24.
横浜.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中塚 貴志 (NAKATSUKA TAKASHI)
埼玉医科大学・医学部・教授
研究者番号: 8 0 1 9 8 1 3 4

(2) 研究分担者

星 和人 (HOSHI KAZUTO)
東京大学・医学部附属病院・特任准教授
研究者番号: 3 0 3 4 4 4 5 1

(3) 連携研究者(H20 H21)

市岡 繁 (ICHIOKA SHIGERU)
埼玉医科大学・医学部・教授
研究者番号: 6 0 3 0 6 2 7 2
時岡 一幸 (TOKIOKA KAZUYUKI)
埼玉医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 7 0 3 3 2 6 1 6