

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 8 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591675

研究課題名（和文） 軟骨が自己修復するために必要な前初期遺伝子の同定と応用

研究課題名（英文） Detection of genes required for spontaneous cartilage repair

研究代表者

佐粧 孝久（SASHO TAKAHISA）

千葉大学・大学院医学研究院・講師

研究者番号：20312952

研究成果の概要（和文）：

軟骨部分損傷は出生後の動物では自然修復することはないとされてきた。しかし、幼若な 3 週齢のラットを用いることで軟骨部分損傷が自然修復する動物モデルを確立した。このモデルを用い、軟骨が修復することのない 16 週齢のラットと比較することで、3 週齢ラットの損傷軟骨でのみ発現上昇する遺伝子を軟骨が自己修復に必要な遺伝子として同定した。その結果 TGF-beta のシグナルを伝達する Smad3 が重要な分子であることがわかった。

研究成果の概要（英文）：

Partial thickness cartilage injury (PTI) will not heal spontaneously in post natal animals. However we have established an animal model that shows spontaneous repair of PTCI using 3 week-old rats. Comparing gene expression profile of injured cartilage of this model with that of 16 week-old rat cartilage where repair will not occur, genes required for spontaneous cartilage repair were identified. As a result, the importance of Smad3 that transmit TGF-beta signal was elucidated.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
2012 年度	300,000	90,000	390,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：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：軟骨損傷、軟骨修復、軟骨部分損傷、遺伝子発現

1. 研究開始当初の背景

軟骨は自己修復能に乏しい。軟骨全層に及ぶ損傷（full-thickness injury: FTI）と部分損傷（partial-thickness injury: PTI）で状況は多少異なるが、いずれの場合においても関節軟骨本来の硝子軟骨として修復さ

れることはほとんどないとされる。両者を比較した場合、FTI では、損傷範囲が小さければ骨髄細胞が動員されることで硝子軟骨に類似した組織での修復は期待できるとされるが、PTI では骨髄細胞の動員が望めないことから、修復の可能性はなく、特に出生後の

動物では修復は不能と考えられてきた。PTI 損傷部は経時的に軟骨の変性が進行し、周囲組織に変性が拡大し次第に変形性関節症(OA)へと進展していくことが知られている。こうした軟骨損傷が後に軟骨変性から OA へと進展していく過程は動物モデルにおいても明らかにされているが、ヒトにおいても MRI による検討などから明らかとなっており、膝 OA の大きな要因であると考えられるようになってきた。そこで OA の発症を予防すべく、軟骨損傷が軟骨変性へと進行する前に治療する方法が模索されている。これまでに再生医療を応用した幹細胞の導入、各種サイトカインの使用、様々な足場材料の導入などが試みられてきているが、確実に硝子軟骨での修復を得るという決定的な治療法は確立していない。

一方、胎児においては PTI であっても軟骨組織が修復されるとの報告は少ないながらも存在する。子宮から取り出した胎生ヒツジや胎生ラットの膝関節軟骨に PTI を作成し、子宮に戻すと出生時または出生後早期に軟骨が修復されていることが確認されている。しかし、胎生のどの時期までに修復能が存在するのか、または胎児のみならず出生から間もない幼若な動物では同様の修復能が存在するのかは今まで明らかにされていなかった。我々はこれまでに、ラットを用いて、出生からどの程度の週齢であれば PTI に対する軟骨修復能があるかを組織学的に検討してきた。その結果、3 週齢までは修復能が維持されており、9 週齢となると損傷後 6 週で明らか OA を発症することがわかった。そこでこの自然修復に関わる遺伝子を同定することで PTI の治療法の開発に結び付くと考えた。

2. 研究の目的

(1) 安定して PTI の自然治癒が観察されるような動物モデルを確立すること。

(2) 3 週齢のラットでみられる軟骨部分損傷の自己修復の早期の修復過程を組織学的に検討すること。

(3) 3 週齢のラットでみられる軟骨部分損傷の自己修復に関与する遺伝子(群)を同定すること。

3. 研究の方法

(1) 角膜手術用のメスを用いて、膝関節の運動方向に深さが一定となるような PTI を作成する。

(2) 組織学的検討：3 週齢の Sprague-Dawley ラットの膝関節軟骨に PTI を作成し、早期の組織修復反応を組織学的に検討する。これを 16 週齢のラットと比較すること。検討は損傷作成後 12, 24, 48 時間時に施行する。

(3) 修復に関わる遺伝子の同定：3 週齢と 16 週齢のラットの膝関節に PTI を作成し、損傷作成後、12、24、48 時間に各々の週齢のラットより軟骨組織を摘出し、sham 手術群と比較することで、損傷に対して発現が誘導されてくる遺伝子をマイクロアレー法にて抽出する。すなわち 12 種類の RNA ソースが存在し、対応する 6 組の比較が施行される。これにより、損傷後 12、24、48 時間時に 3 週齢ラットあるいは 16 週齢ラットの軟骨細胞に PTI により発現誘導されてくる遺伝子が抽出されることになる。次いで抽出された 6 組の遺伝子群を比較することで、3 週齢のラットでのみ 12、24、48 時間時点で発現が増加してくる遺伝子群を抽出する。組織学的検討から、損傷作成後 24 時間の時点ですでに軟骨修復が観察されたことから、24 時間以前に発現上昇の見られた遺伝子が重要と考えられるため、最終的には 3 週齢ラットの損傷あり群で 12 時間時、または 12 時間と 24 時間時

に継続して発現上昇のみられた遺伝子を修復に関わる可能性の高い遺伝子と考え抽出した。この過程では上述の理由により、48時間時に発現の上昇していた遺伝子を除外することとした。こうして得られた遺伝子群について相互関連性を専用のソフトウェア Ingenuity Pathway Analysis (IPA) software (Ingenuity systems, Mountain view CA) で解析し、修復過程に重要な遺伝子ネットワークを抽出することとした。

(4) 免疫染色：抽出された遺伝子のうち主要なものに関しては免疫染色を施行し、実際に発現されていることを確認する。免疫染色の対象となるのは PYI 作成後 12, 24, 48 時間の 3 週齢ラットの膝関節である。

4. 研究成果

(1) 3 週齢のラットに関節運動の方向に線状に軟骨部分損傷 (PTI) を作成すると硝子軟骨に近い組織での修復が安定して得られるようになった。PTI が自然修復するモデルは生後動物ではこれまでに報告がない。すなわち軟骨修復が観察される新しい動物モデルを確立したといえる。

(2) 3 週齢のラットでは損傷作成後 12 時間では明らかな組織反応を認めなかったが、24 時間後には損傷部に修復組織が認められた。すなわち、損傷部に新たな細胞の出現を認め、細胞外基質の産生が認められた。一方、16 週齢のラットでは 24 時間後には損傷部は全く無反応であった。48 時間後においても無反応であった。

(3) 上述の結果に基づき、3 週齢のラットで損傷後 12 時間あるいは 24 時間の早期に発現してくる遺伝子 (群) が軟骨修復に関与する遺伝子と考えられた。12 時間時に 3 週齢群で優位に発現上昇の見られた遺伝子は 131 遺伝子であった。このうち 5 遺伝子は 24 時間時に

も発現上昇を示していた。これら 131 遺伝子の相互関連性を専用のソフトウェアを用いて解析したところ、高い関連性を示す主要な 5 つの遺伝子ネットワークが抽出された。次いでこれら遺伝子ネットワークの中心的な位置を占める分子を抽出した結果、TGF-beta に関連する遺伝子群が重要な位置を占めていること、中でもそのシグナルを伝える smad3 が重要な分子であることがわかった。

(4) リン酸化した smad3 (smad3 の活性型) を免疫染色で調べたところ、損傷部周囲および 100 μ m 程度離れた範囲までこの分子が活性化を受けていることが 12, 24 時間時の軟骨組織にて確認された。

(5) 今後の展望

本研究によって PTI が修復する際に必要となる遺伝子群が同定され、これを応用することで外傷の早期に治療介入をすることで、将来的に発症してくる関節症を予防できることが示唆される。今後はさらに PTI が自然治癒しない 16 週齢のラットなどを用いて、治療介入の効果を進める予定である。

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 2 件)

(1) Saito M, Sasho T, Yamaguchi S, Ikegawa N, Akagi R, Muramatsu Y, Mukoyama S, Ochiai N, Nakamura J, Nakagawa K, Nakajima A, Takahashi K. Angiogenic activity of subchondral bone during the progression of osteoarthritis in a rabbit anterior cruciate ligament transection model. *Osteoarthritis and Cartilage* 2012 Dec;

20(12):1574-82. 査読有

doi:10.1016/j.joca.2012.08.023.

(2) Tsuruoka H, Sasho T, Yamaguchi S, Ikegawa N, Saito M, Akagi R, Ochiai N, Nakagawa K, Nakajima A, Fallouh L, Takahashi K. Maturation-dependent spontaneous healing of partial thickness cartilage defects in infantile rats. Cell Tissue Res 2011(346) 263-271. 査読有 doi: 10.1007/s00441-011-1259-6.

[学会発表] (計 7 件)

(1) 佐粧 孝久、池川 直志、齋藤 雅彦、村松 佑太、向山 俊輔、落合 信靖、山口 智志、高橋 和久 第 27 回日本整形外科基礎学術集会 シンポジウム「軟骨部分損傷が自己修復するために必要な遺伝子の同定」 2012. 10. 26 (名古屋市)

(2) 佐粧 孝久 シンポジウム「真の OA 治療を目指した薬物療法とその評価」MR I を用いた変形性膝関節症に対する薬物療法の評価 第 5 回日本軟骨代謝学会 2012. 3. 10 (名古屋市)

(3) 佐粧 孝久、齋藤 雅彦、村松 佑太、赤木 龍一郎、向山 俊輔、大鳥 精司、宮城 正行、山口 智志 シンポジウム「関節機能におけるヒアルロン酸研究 up to date」 歩行解析によるマウス変形性膝関節症モデルに対するヒアルロン酸製剤の効果 第 5 回日本軟骨代謝学会 2012. 3. 9 (名古屋市)

(4) Saito M, Sasho T, Yamaguchi S, Ikegawa N, Akagi R, Muramatsu Y, Mukouyama S, Takahashi K. Gait Analysis of Model Mouse of Knee Osteoarthritis Induced by Surgical Destabilization of Medial Meniscus using Catwalk System. Orthopaedic Research Society Annual Meeting 2012, 2012. 3. 5 San

Francisco, CA, USA

(5) 池川 直志 週齢差によるラット膝関節軟骨部分損傷の早期遺伝子発現の検討 - 続報- 第 1229 回 千葉医学会整形外科例会 2011. 12. 3 千葉市

(6) Ikegawa N, Sasho T, Akagi R, Saito M, Tsuruoka H, Yamaguchi S, Matsuki K, Nakagawa K, Takahashi K. Difference in Age-Dependent Gene Expressions in the Early Stage of Partial-Thickness Articular Cartilage Defect in Rat. Orthopaedic Research Society 2011, 2011. 3. 15 Long Beach, CA, USA

(7) 小林 達也、鈴木 昌彦、佐粧 孝久、中川 晃一、鶴岡 弘章、高橋 和久. 関節軟骨欠損の修復に対する人工コラーゲンの効果 第 25 回日本整形外科基礎学術集会 2010. 10. 4 国立京都国際会館 (京都)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐粧 孝久 (SASYO TAKAHISA)
千葉大学・大学院医学研究院・講師
研究者番号：20312952

(2) 研究分担者

鶴岡 弘章 (TSURUOKA HIROAKI)
千葉大学・大学院医学研究院・大学院生
研究者番号：30533327

(3) 連携研究者

齋藤 雅彦 (SAITO MASAHIKO)
千葉大学・大学院医学研究院・大学院生

池川 直志 (IKEGAWA NAOSHI)
千葉大学・大学院医学研究院・大学院生
研究者番号：70466697