

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 12 日現在

機関番号： 14101
 研究種目： 基盤研究（C）
 研究期間： 2010 ～ 2012
 課題番号： 22591684
 研究課題名（和文） テネイシン C の軟骨修復促進作用における分子機構の解明とその治療への応用
 研究課題名（英文） Molecular mechanism of cartilage repair using tenascin C and application for treatment
 研究代表者
 長谷川 正裕（HASEGAWA MASAHIRO）
 三重大学・医学部附属病院・講師
 研究者番号： 40308664

研究成果の概要（和文）：

軟骨損傷に対する新しい治療法としてテネイシン C（TNC）に着目した。ヒト関節軟骨を培養し、TNC を添加したところ軟骨細胞増殖作用、プロテオグリカン合成促進作用を認めた。TNC の関節軟骨欠損に対する治療効果を調べるために、マウスの膝関節に軟骨全層欠損を作り、TNC を局所投与した。TNC を投与すると、プロテオグリカンや II 型コラーゲンの豊富な軟骨修復が得られ、軟骨修復促進剤として有用である可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：

We used tenascin-C (TNC) to enhance cartilage repair. The treatment of human articular chondrocytes with TNC accelerated chondrocyte proliferation and stimulation of proteoglycan synthesis. Cartilage defects were created in the murine knee. Proteoglycan and type II collagen rich cartilage was regenerated after administration of TNC. Local administration of TNC could promote the cartilage repair.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
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・整形外科学

キーワード：骨・軟骨代謝学

1. 研究開始当初の背景

関節軟骨は自己修復能がほとんどないため、軟骨損傷に対する治療法はいまだに確立されたものがなく、整形外科領域において早急に解決されるべき課題のひとつである。新しい治療法に利用する候補分子として、マトリックス細胞タンパクの一つであるテネイシン C（TNC）に着目した。

2. 研究の目的

TNC は軟骨細胞に働き、軟骨細胞の増殖、プロテオグリカン合成と軟骨基質への沈着を高めることにより軟骨修復を促進していると考えている。この分子機構を明らかにするために、(1) ヒト培養軟骨細胞に TNC を作用させ、これらの現象が実際に起こっていることを確認する。他方、動物実験を行い、(2)

軟骨欠損モデルを作成し、欠損部に TNC を投与し、関節軟骨修復効果を検討する。(3) II型コラーゲンなど他の軟骨成分についても検討を行う。これらの研究により、TNC を新しい軟骨修復促進剤として治療に応用するための基盤の形成を図る。

3. 研究の方法

(1) TNC の培養軟骨細胞への作用を調べるために、変形性膝関節症に対して人工膝関節置換術を行うときに得られた関節軟骨を単層培養し、TNC を添加した。TNC 濃度は 1 µg/ml と 10 µg/ml とした。コントロールとして、TNC を加えないものも作製した。細胞増殖の変化 (ELISA・BrdU 化学発色キット) を評価し、軟骨基質であるプロテオグリカンの発現と沈着量の変化はリアルタイム PCR と Dimethylmethylene blue (DMMB) を用いて定量的に評価した。

(2) TNC の関節軟骨欠損に対する治療効果を検討するために、マウス膝関節の大腿膝蓋関節面に大きさ 0.3mm 径で、深さは軟骨下骨を貫く軟骨欠損を作製した。TNC の関節内投与方法、量による関節軟骨修復効果を検討した。TNC の濃度は 10 µg/ml、100 µg/ml 群とし、TNC を投与しないコントロール群も作製した。術後 1 週、2 週、3 週、6 週、12 週で頸椎脱臼法にて屠殺し膝関節部を採取した。HE 染色、サフラニン-O 染色を行い、modified WAKITANI score を用いて軟骨修復を定量化し、比較した。

(3) 修復組織に対して、抗 II 型コラーゲン抗体、抗アグリカン抗体を用いた免疫組織化学的検討を行う。

4. 研究成果

(1) ヒト培養軟骨細胞に TNC を作用させたところ、コントロールと TNC 1µg/ml 投与例では軟骨細胞増殖作用、プロテオグリカン合成促進作用は認めなかったが、TNC 10 µg/ml では軟骨細胞増殖作用、アグリカン mRNA の増加作用、プロテオグリカン合成促進作用を認めた(図 1)。

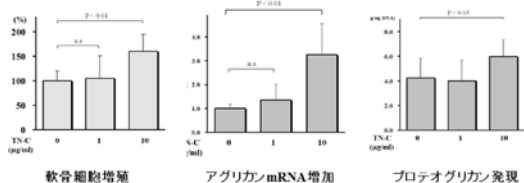


図 1. 軟骨細胞増殖、アグリカン mRNA 増加、プロテオグリカン合成促進

(2) 関節軟骨欠損に TNC を投与した結果、TNC 100 µg/ml 投与群において 3 週でサフラニン-O に染色される軟骨様組織で修復された。こ

の修復組織は 6 週で周囲正常軟骨と同程度の厚さに戻り、12 週でも維持されていた(図 2)。他の群では 3 週以降で軟骨下骨は修復されたものの、サフラニン-O に染色される軟骨様修復はわずかであった。軟骨修復の定量化において、1 週、2 週では各群に有意差は認めなかったが、3 週、6 週、12 週で TNC 100 µg/ml 投与群はコントロール群より有意に良好な結果であった。

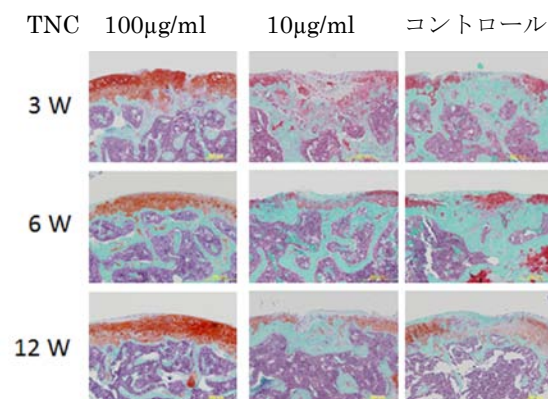


図 2. 軟骨欠損修復の組織所見(サフラニン-O 染色)

(3) 抗 II 型コラーゲン抗体を用いた免疫組織化学的検討において、TNC 100 µg/ml 投与群は 3 週、6 週、12 週で高発現していた。アグリカンの発現も同様に認めた。以上の結果より、マウス関節軟骨全層欠損部に対する TNC の局所投与は軟骨修復に有効である可能性が示唆された。軟骨修復促進剤としての応用が期待される。

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 28 件)

1) Hasegawa M, Horiki N, Tanaka K, Wakabayashi H, Tano S, Katsurahara M, Uchida A, Takei Y, Sudo A. The efficacy of rebamipide add-on therapy in arthritic patients with COX-2 selective inhibitor-related gastrointestinal events: a prospective, randomized, open-label blinded-endpoint pilot study by the GLORIA study group. Mod Rheumatol 査読有: in press.

2) Hasegawa M, Yoshida K, Wakabayashi H, Sudo A. Cutting and implanting errors in minimally invasive total knee arthroplasty using a navigation system. Int Orthop 査読有: 27-30. 2013

- 3) Hori K, Tsuji M, Iino T, Satonaka H, Uemura T, Akeda K, Hasegawa M, Uchida A, Sudo A. Protective effect of edaravone for tourniquet-induced ischemia-reperfusion injury on skeletal muscle in murine hindlimb. *BMC Musculoskelet Disord* 査読有 14: 113. 2013
- 4) Wakabayashi H, Hasegawa M, Nishioka Y, Minami Y, Nishioka K, Sudo A. Clinical outcome in patients with rheumatoid arthritis switched to tocilizumab after etanercept or infliximab failure. *Clin Rheumatol* 査読有 32: 253-259. 2013
- 5) Wakabayashi H, Sudo A, Nishioka Y, Hasegawa M, Minami Y, Nishioka K. Repeat etanercept administration restores clinical response of patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* 査読有 32: 3675-3678. 2012
- 6) Uemura T, Tsuji M, Akeda K, Iino T, Satonaka H, Hasegawa M, Sudo A. Transfection of nuclear factor kappa B decoy oligodeoxynucleotide protects against ischemia/reperfusion. *J Gene Med* 査読有 14: 623-631. 2012
- 7) Hasegawa M, Yoshida K, Wakabayashi H, Sudo A. Cobalt and chromium ion release after large-diameter metal-on-metal total hip arthroplasty. *J Arthroplasty* 査読有 27: 990-996. 2012
- 8) Hasegawa M, Yoshida K, Wakabayashi H, Sudo A. Pseudotumor with dominant B-lymphocyte infiltration after metal-on-metal total hip arthroplasty with a modular cup. *J Arthroplasty* 査読有 27: 493, e5-7. 2012
- 9) Wakabayashi H, Hasegawa M, Nishioka Y, Sudo A, Nishioka K. Which subgroup of rheumatoid arthritis patients benefits from switching to tocilizumab versus etanercept after previous infliximab failure? A retrospective study. *Mod Rheumatol* 査読有 22:116-121. 2012
- 10) Wakabayashi H, Naito Y, Hasegawa M, Nakamura T, Sudo A. A tumor endoprosthesis is useful in elderly rheumatoid arthritis patient with acute intercondylar fracture of the distal femur. *Rheumatol Int* 査読有 32:1411-1413. 2012
- 11) Yoshida K, Wada H, Hasegawa M, Wakabayashi H, Matsumoto T, Shimokariya Y, Noma K, Yamada N, Uchida A, Nobori T, Sudo A. Increased fibrinolysis increases bleeding in orthopedic patients receiving prophylactic fondaparinux. *Int J Hematol* 査読有 95:160-166. 2012
- 12) Sato A, Hiroe M, Akiyama D, Hikita H, Nozato T, Hoshi T, Kimura T, Wang Z, Sakai S, Imanaka-Yoshida K, Yoshida T, Aonuma K. Prognostic value of serum tenascin-C levels on long-term outcome after acute myocardial infarction. *J Card Fail* 査読有 18:480-486. 2012
- 13) Shiba M, Suzuki H, Fujimoto M, Shimojo N, Imanaka-Yoshida K, Yoshida T, Kanamaru K, Matsushima S, Taki W. Imatinib mesylate prevents cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage via inhibiting tenascin-C expression in rats. *Neurobiol Dis* 査読有 46:172-179. 2012
- 14) Hasegawa M, Yoshida K, Wakabayashi H, Sudo A. Minimally invasive total knee arthroplasty: comparison of jig-based technique versus computer navigation for clinical and alignment outcome. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 査読有 19: 904-910. 2011
- 15) Hasegawa M, Segawa T, Maeda M, Yoshida T, Sudo A. Thrombin-cleaved Osteopontin Levels in Synovial Fluid Correlate with Disease Severity of Knee Osteoarthritis. *J Rheumatol* 査読有 38:129-134. 2011
- 16) Wakabayashi H, Oka H, Nishioka Y, Hasegawa M, Sudo A, Nishioka K. Do biologics-naïve patients with rheumatoid arthritis respond better to tocilizumab than patients for whom anti-TNF agents have failed? A retrospective study. *Clin Exp Rheumatol* 査読有 29:314-317. 2011
- 17) Nishimura A, Hasegawa M, Kato K, Yamada T, Uchida A, Sudo A. Risk factors for the incidence and progression of radiographic osteoarthritis of the knee among Japanese. *Int Orthop* 査読有 35:839-843. 2011
- 18) Yoshida K, Wada H, Hasegawa M, Wakabayashi H, Ando H, Oshima S, Matsumoto T, Shimokariya Y, Noma K, Yamada N, Uchida A, Nobori T, Sudo A. Monitoring for anti-Xa activity for prophylactic administration of Fondaparinux in patients with artificial joint replacement. *Int J Hematol* 査読有 94:355-360. 2011
- 19) Ishigaki T, Imanaka-Yoshida K, Shimojo N, Matsushima S, Taki W, Yoshida T. Tenascin-C enhances crosstalk signaling of integrin $\alpha v \beta 3$ /PDGFR- β complex by SRC recruitment promoting PDGF-induced proliferation and migration in smooth muscle cells. *J Cell Physiol* 査読有 226:2617-2624. 2011
- 20) Ando K, Takahashi M, Yamagishi T, Miyagawa-Tomita S, Imanaka-Yoshida K, Yoshida T, Nakajima Y. Tenascin C may regulate the recruitment of smooth muscle

cells during coronary artery development. Differentiation 査読有 81:299-306. 2011

21) Okamura N, Hasegawa M, Nakoshi Y, Iino T, Sudo A, Imanaka-Yoshida K, Yoshida T, Uchida A. Deficiency of tenascin-C delays articular cartilage repair in mice. Osteoarthritis Cartilage 査読有 18: 839-848. 2010

22) Niimi R, Hasegawa M, Sudo A, Shi D, Yamada T, Uchida A. Evaluation of soluble fibrin and D-dimer in the diagnosis of postoperative deep vein thrombosis. Biomarkers 査読有 15:149-157. 2010

23) Imanishi T, Hasegawa M, Sudo A. Serum metal ion levels after second-generation metal-on-metal total hip arthroplasty. Arch Orthop Trauma Surg 査読有 130: 1447-1450. 2010

24) Yamaguchi T, Hasegawa M, Niimi R, Sudo A. Incidence and time course of asymptomatic deep vein thrombosis with fondaparinux in patients undergoing total joint arthroplasty. Thromb Res 査読有 126:e323-326. 2010

25) Nakoshi Y, Hasegawa M, Akeda K, Iino T, Sudo A, Yoshida T, Uchida A. Distribution and role of tenascin-C in human osteoarthritic cartilage. J Orthop Sci 査読有 15:666-673. 2010

26) Nakazora S, Matsumine A, Iino T, Hasegawa M, Kinoshita A, Uemura K, Niimi R, Uchida A, Sudo A. The cleavage of N-cadherin is essential for chondrocyte differentiation. Biochem Biophys Res Commun 査読有 400:493-499. 2010

27) Wakabayashi T, Matsumine A, Nakazora S, Hasegawa M, Iino T, Ota H, Sonoda H, Sudo A, Uchida A. Fibulin-3 negatively regulates chondrocyte differentiation. Biochem Biophys Res Commun 査読有 391:1116-1121. 2010

28) Nishioka T, Onishi K, Shimojo N, Nagano Y, Matsusaka H, Ikeuchi M, Ide T, Tsutsui H, Hiroe M, Yoshida T, Imanaka-Yoshida K. Tenascin-C may aggravate left ventricular remodeling and function after myocardial infarction in mice. Am J Physiol Heart Circ Physiol 査読有 298:H1072-1078. 2010

[学会発表] (計 24 件)

1) Matsui Y, Hasegawa M, Ikemura S, Iino T, Imanaka-Yoshida K, Yoshida T, Sudo A. Cartilage repair using tenascin-C in mice. Orthopaedic Research Society 2013 Annual Meeting, 2013.1.26-29, San Antonio

2) Hasegawa M, Yoshida K, Wakabayashi H, Miyamoto N, Sudo A. Prevalence of

pseudotumors following large-diameter metal-on-metal total hip arthroplasty. metal ion study and screening with magnetic resonance imaging. Orthopaedic Research Society 2013 Annual Meeting, 2013.1.26-29, San Antonio

3) Iino T, Tsujii M, Hasegawa M, Uemura T, Kokubu N, Satonaka H, Asanuma K, Sudo A. Involvement of thrombin and osteopontin in the pathophysiology of Dupuytren's contracture. Orthopaedic Research Society 2013 Annual Meeting, 2013.1.26-29, San Antonio

4) Hori K, Tsujii M, Iino T, Uemura T, Nishimura A, Akeda K, Hasegawa M, Sudo A. Effect of free radical scavenger in ischemia-reperfusion injury muscle crush wound. Orthopaedic Research Society 2013 Annual Meeting, 2013.1.26-29, San Antonio

5) Ikemura S, Hasegawa M, Iino T, Akeda K, Miyamoto K, Imanaka-Yoshida K, Yoshida T, Sudo A. Effect of tenascin-C on the repair of full-thickness osteochondral defects of articular cartilage in rabbits. Orthopaedic Research Society Annual Meeting 2012, 2012.2.4-7, San Francisco

6) Hasegawa M, Iino T, Yoshida K, Ikemura S, Wakabayashi H, Sudo A. Serum metal ion levels in patients with a large-diameter metal-on-metal total hip arthroplasty. Orthopaedic Research Society Annual Meeting 2012, 2012.2.4-7, San Francisco

7) Iino T, Wakabayashi T, Tsujii M, Uemura T, Satonaka H, Hasegawa M, Sudo A. Distribution of ADAMTS5 and tenascin-C in the synovial tissues around the tendon in the rotator cuff injury. Orthopaedic Research Society Annual Meeting 2012, 2012.2.4-7, San Francisco

8) Hasegawa M, Yoshida K, Wakabayashi H, Sudo A. Steady-state wear rates of highly cross-linked polyethylene against zirconia heads at a mean seven-year follow-up. 13th EFORT Congress, 2012.5.23-25, Berlin

9) Hasegawa M, Tanaka K, Horiki N, Wakabayashi H, Uchida A, Takei Y, Sudo A. Prevention of celecoxib-induced endoscopic upper gastrointestinal ulcers by concomitant therapy with rebamipide, an anti-ulcer agent. Combined 33rd SICOT & 17th PAAO Orthopaedic World Conference, 2012.11.28-30, Dubai

10) Wakabayashi H, Hasegawa M, Yoshida K, Nishioka K, Sudo A. Hip score and disease activity correlation in patients with rheumatoid arthritis after total hip

arthroplasty. Combined 33rd SICOT & 17th PAAO Orthopaedic World Conference, 2012. 11. 28-30, Dubai

11) 長谷川正裕, 池村重人, 岡村直樹, 吉田利通, 湊藤啓広. テネインCの軟骨修復促進作用とその治療への応用. 第27回日本整形外科学会基礎学術集会, 2012. 10. 26-27, 名古屋

12) 長谷川正裕, 池村重人, 瀬川辰也, 前田雅弘, 今中-吉田恭子, 吉田利通, 湊藤啓広. トロンピン切断型オステオポンチンの変形性膝関節症における発現. 第101回日本病理学会総会, 2012. 4. 26-28, 東京

13) 池村重人, 長谷川正裕, 飯野隆大, 明田浩司, 宮本啓一, 今中-吉田恭子, 吉田利通, 湊藤啓広. テネインCを用いた家兔関節軟骨全層欠損の修復. 第101回日本病理学会総会, 2012. 4. 26-28, 東京

14) Hasegawa M, Ikemura S, Iino T, Segawa T, Maeda M, Yoshida T, Sudo A. Thrombin-cleaved osteopontin in aseptic loosening after total hip arthroplasty. 2011 Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society, 2011. 1. 13-16, Long Beach

15) Ikemura S, Hasegawa M, Muraki M, Yoshida T, Sudo A. Presence and distribution of large variants of tenascin-C in the knees with osteoarthritis. 2011 Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society, 2011. 1. 13-16, Long Beach

16) Tsujii M, Hasegawa M, Iino T, Iida R, Satonaka H, Hori K, Uemura T, Asanuma K, Sudo A. Immunohistochemical analysis of osteopontin expression in palmer fascia of Dupuytren's contracture. 2011 Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society, 2011. 1. 13-16, Long Beach

17) Hori K, Tsujii M, Iino T, Satonaka H, Uemura T, Nishimura A, Akeda K, Hasegawa M, Sudo A. Protective effect of edaravone for tourniquet-induced ischemia-reperfusion injury on skeletal muscle in murine hindlimb. 2011 Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society, 2011. 1. 13-16, Long Beach

18) Hasegawa M, Yoshida K, Wakabayashi H, Sudo A. Metal ion levels in metal-on-metal total hip arthroplasty with large-diameter head. SICOT 2011 XXV Triennial World Congress, 2011. 9. 6-9, Prague

19) Yoshida K, Hasegawa M, Wakabayashi H, Sudo A. Long-term results of second generation cementless total hip arthroplasty. SICOT 2011 XXV Triennial

World Congress, 2011. 9. 6-9, Prague

20) Nishimura A, Hasegawa M, Wakabayashi H, Yoshida K, Kato K, Uchida A, Sudo A. Prevalence and characteristics of unilateral knee osteoarthritis. SICOT 2011 XXV Triennial World Congress, 2011. 9. 6-9, Prague

21) Wakabayashi H, Sudo A, Hasegawa M, Nishioka K. Which subgroup of rheumatoid arthritis patients benefits from switching to tocilizumab versus etanercept after previous infliximab failure? SICOT 2011 XXV Triennial World Congress, 2011. 9. 6-9, Prague

22) Hasegawa M, Tanaka K, Horiki N, Wakabayashi H, Takei Y, Uchida A, Sudo A. Prevention of celecoxib induced gastrointestinal events by concomitant therapy with rebamipide, gastro-protective drug. ACR/ARHP Scientific Meeting, 2011. 11. 5-9, Chicago

23) 池村重人, 長谷川正裕, 飯野隆大, 明田浩司, 宮本啓一, 今中-吉田恭子, 吉田利通, 湊藤啓広. テネインCを用いたウサギ関節軟骨全層欠損の修復. 第26回日本整形外科学会基礎学術集会, 2011. 10. 20-21, 前橋

24) 長谷川正裕, 岡村直樹, 名越豊, 今中-吉田恭子, 吉田利通, 湊藤啓広. 関節軟骨の変性・修復におけるテネインCの作用. 第42回日本結合組織学会学術大会, 2010. 8. 19-20, 秋田

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.medic.mie-u.ac.jp/seikeigeka/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長谷川 正裕 (HASEGAWA MASAHIRO)

三重大学・医学部附属病院・講師

研究者番号： 40308664

(2) 研究分担者

湊藤 啓広 (SUDO AKIHIRO)

三重大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号： 60196904

辻井 雅也 (TUJII MASAYA)

三重大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号： 40444442

吉田 利通 (YOSHIDA TOSHIMICHI)

三重大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号： 80166959