

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23240070

研究課題名(和文)多機能ゲルが誘導する軟骨自然再生における間葉系細胞内情報伝達機構の解明

研究課題名(英文)Clarification of signal transmission mechanism in mesenchymal cells during spontaneous cartilage regeneration induced by multi-functional synthetic gel

研究代表者

安田 和則 (Yasuda, Kazunori)

北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：20166507

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 37,600,000円、(間接経費) 11,280,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は以下の発見・解明を行った。間葉系細胞の軟骨に分化・再生過程においては、解糖系とミトコンドリア呼吸の振動に依存するATP振動がカルシウムイオン振動に誘導されて発生し、分泌の調節を介して軟骨凝集・組織再生を制御する。DNゲルが誘導する軟骨分化時にはActin構造の改変による細胞弾性率の上昇が、Insulinと比べて有意に早期に起こる。DNゲル誘導軟骨分化時の細胞内情報伝達機構に関して、BMP/TGF- β シグナル経路が特異的に活性化されており、またInsulin非依存的にIGF依存性シグナル伝達経路が活性化されている。このゲルは液性因子のリザーバー機能を有する。

研究成果の概要(英文)：This study discovered several important phenomena and their molecular mechanisms during chondrogenic differentiation and regeneration of mesenchymal cells induced by the PAMPS/PDMAAm gel or soluble proteins:(1) ATP oscillation, which depends on oscillation of both the mitochondrial respiration and the glycolysis, was induced by calcium ion oscillation. The ATP oscillation does not control cell differentiation but controls cell aggregation and tissue formation via controlling secretion of soluble proteins. (2) Young's modulus of a chondrogenic precursor cell increased to a significantly greater degree during differentiation induced by the gel than during differentiation induced by Insulin. (3) Both the BMP-Smad signaling pathway and the IGF-dependant signaling pathway were specifically activated during the differentiation induced by DN gel in comparison with that induced by Insulin. (4) The proteomics analysis showed that the gel has a function as a reservoir of soluble factors.

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：ダブルネットワークゲル 軟骨分化 自然再生 細胞内情報伝達 光イメージング 細胞メカニクス 質量分析

1. 研究開始当初の背景

従来の医学の常識では、関節軟骨は自然再生することはないとされていた。しかし代表研究者は、新しい多機能生体材料、PAMPS / PDMAm ダブルネットワーク (DN) ゲルを関節軟骨欠損部の基底に埋植すると、その欠損部 (空隙) に関節軟骨が生体内で自然再生する現象を発見し、この常識に大きな修正を加えた。この現象は世界に類を見ない「細胞培養を必要としない軟骨再生治療」の可能性を示した。そこで代表研究者は平成 18~20 年度にこの DN ゲルが有する軟骨再生誘導効果の機序を研究し、DN ゲルの化学的および物理学的特性と細胞に作用する力学的環境の両者が重要な因子であることを明らかにした。しかし、合成ゲルが誘導する軟骨分化・再生過程の細胞内情報伝達機構は不明であった。

2. 研究の目的

先行する研究で開発したマルチ発光・蛍光プローブ群を用いる新しい光イメージング解析技術に加えて最先端の細胞内シグナル解析技術およびセルメカニクス計測技術を駆使し、この軟骨自然再生現象において、多機能 DN ゲルが間葉系細胞を軟骨細胞へ分化させる過程の遺伝子発現、代謝のダイナミクス、および単一細胞の力学的特性の変化を 1 細胞レベルで解析することにより、合成ゲルに誘導される軟骨分化の細胞内情報伝達機構を解明すること。

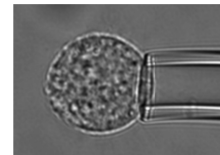
3. 研究の方法

- (1) レポーター遺伝子の作製: Actine promoter (P_{ACTIN}) を Phrixothrix hirtus luciferase (ReBl)、Renilla luciferase (AqBl)、Cypridina luciferase (CLuc) および Aequorin の各遺伝子を含むベクターのクローニングサイトへ挿入した。次にその promoter region と luciferase 遺伝子を retrovirus ベクターへ挿入した。FRET-based ATP probe 遺伝子も retrovirus ベクターへ挿入した。これらの retrovirus を用いて細胞にトランスフェクトした。
- (2) ATP 濃度の計測には ATP colorimetric assay kit を用いた。
- (3) 発光 / 蛍光プローブを用いたリアルタイムモニタリング: Luciferin を含む培地に交換した後、Kronos luminescencer を用いて発光をモニターした。PxRe (赤) と ReBl (青) または AqBl (青) の 2 色同時 monitoring は 2 つのポンプを用い、培地 (insulin, luciferin, coelenterazine 含有) を 1.0 ml/h で perfuse した。また Cypridina luciferase (CLuc) 分泌の monitoring は、1.0 ml/h の流速で培地を perfuse し、fraction を 30 分毎に集め、CLuc 分泌と PxRe 活性を Kronos で測定した。1 細胞イメージングは CellGraph を用いて行った。
- (4) FRET-ATP プローブの Dual-emission ratio イメージング: excitation filter、

dichroic mirror、および two emission filter を用いて行った。蛍光 emission は cooled charge-coupled device camera と Aquacosmos を用いて解析した。

(5) 代謝産物の解析には P_{ACTIN} -PxRe をトランスフェクトした ATDC5 細胞を用いて、ATP 振動の頂と谷で採取した試料を CE-connected ESI-TOFMS system を用いて解析した。

(6) 細胞ヤング率の測定: 培養細胞をトリプシン処理で浮遊化させ、マイクロピペット (先端内径約 8 μ m) を用い 0.5 cmH_2O で吸引した。2.5 cmH_2O まで吸引圧を増加させ、顕微鏡画像から吸引圧と吸引長さの関係を求め、ヤング率を算出した。



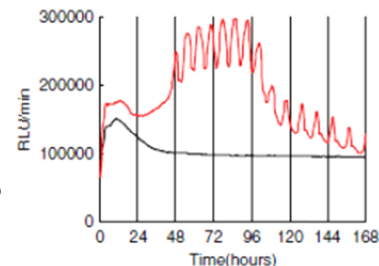
(7) 発現遺伝子の網羅的解析: ATDC5 細胞を PAMPS ゲルおよびポリスチレンディッシュ上で 1、2、3、5 日間培養し、その後 total RNA を抽出した。Cy3 標識した cRNA を調製し、SurePrint G3 Mouse GE 8x60K マイクロアレイを用いて各群における総数 55,681 の遺伝子発現の変動を Agilent C Scanner を用いて解析した。2 種の培養の比較において 2 倍以上発現増加あるいは低下している遺伝子を抽出し、GO 解析と、ConPath および David プログラムによる pathway 解析を行った。

(8) ゲル中に貯えられたタンパク分子群の網羅的解析: ゲルを Tris-Cl バッファーで洗浄後、塩濃度を上げながらゲル中に貯えられた分子群をゲルから溶出させた。溶出液中に含まれるペプチド性物質を SEP-PAK カラムで回収、脱塩後、ペプチド性物質を回収し MS/MS 解析を行った。データベースからタンパク質を同定した。

4. 研究成果

(1) 軟骨前駆細胞・間葉系幹細胞の軟骨分化・再生過程における細胞代謝動態の解明

軟骨前駆細胞 (ATDC5) の軟骨分化・組織再生過程を、ATP プローブ (P_{ACTIN} -PxRe) を用いて観察した。分化誘導 2-3 日後から 6~8 時間の周期を持つウルトラディアン振動が起こり、12~14 日に消失した (図 1: 右)。この ATP の振動現象は FRET 基盤 ATP プローブ (CMV-A team) を用いたイメージングでも証明された (図 2)。



この ATP 振動を個々の細胞レベルで 7 日間観察した。ATP 振動は軟骨分化誘導後 2-3 日後からある領域の細胞群に同期して発生し、それが 10-15 mm/h の速度で波状に遠方の領域へ伝わった (図 3)。これらの結果は、ATP 振動の発生には細胞間の情報伝達が

存在することを示した。

図 2

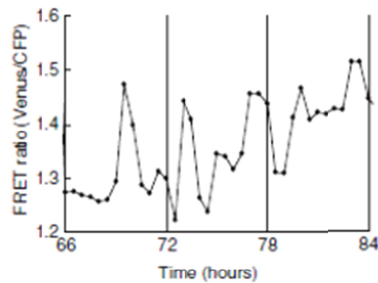
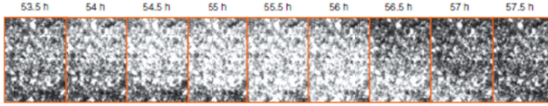


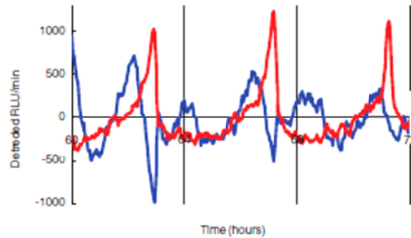
図 3



ATP リズムの頂と谷において、解糖系や TCA 回路に関係する代謝物質の量を比べると、有意差が存在した。また $P_{ACTIN-PxRe}$ (赤色) と酸素プローブ ($P_{ACTIN-ReBI}$: 青色) を用いて 2 色同時モニタリングを行った結果、酸素は ATP 振動とカップリングしつつ、1/2 の周期で振動

していた (図 4)。

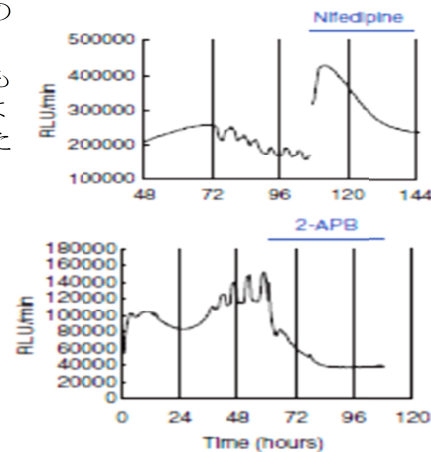
図 4



以上の結果は、軟骨分化・再生過程においては解糖系とミトコンドリア呼吸の振動が誘導する代謝の振動現象が存在することを示した。

Nifedipine および 2-APB の投与により、voltage-依存および store-operated Ca^{2+} チャンネルのいずれを阻害しても ATP 振動は抑制された (図 5)。

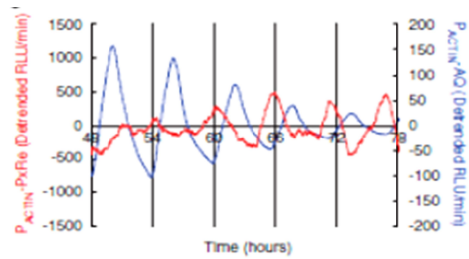
図 5



そこで、 Ca^{2+} プローブ ($P_{ACTIN-AqBI}$) と ATP プローブを用いて、軟骨分化過程の細胞を 2 色同時モニタリングした。その結果、軟骨分化を誘導すると、約 6 時間の周期を持つ Ca^{2+} 振動が先に始まり、その後同じ周期で逆位相の ATP 振動が誘導された (図 6)。この事実は Ca^{2+} の ATP レベルに与える抑制効果を介して、 Ca^{2+} 振動が ATP 振動を発生させることを示唆した。

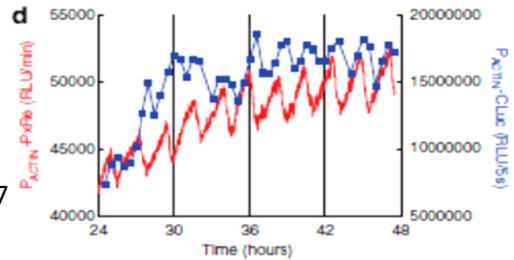
発光タンパク (CLuc) 分泌活性と ATP 振動との関係を 2 色同時モニタリングした結

図 6



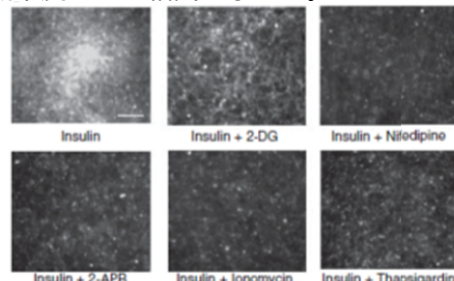
果、両者はほぼ同じ周期と位相で振動した (図 7)。この結果は、ATP 振動が軟骨分化に関与する分子 (N-cadherin の振動を確認) の分泌を調節することを示した。

図 7



4 種の ATP 振動抑制薬の投与は細胞凝集と軟骨マーカー遺伝子の発現を抑制した。しかし、ATP 振動を抑制するが軟骨分化は抑制しない 2-deoxyglucose の投与は、細胞凝集を抑制するが軟骨マーカー遺伝子の発現を抑制しなかった (図 8)。この結果は、ATP 振動が軟骨分化ではなく、細胞凝集に必要であることを示した。一方、ATP 振動の周波数と細胞凝集度は正の相関を示した。

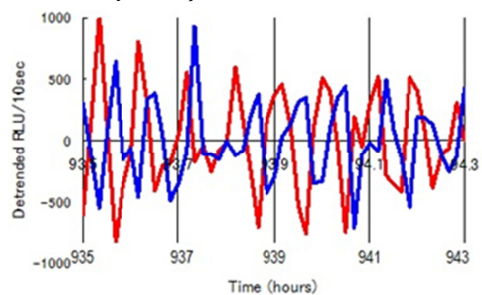
図 8



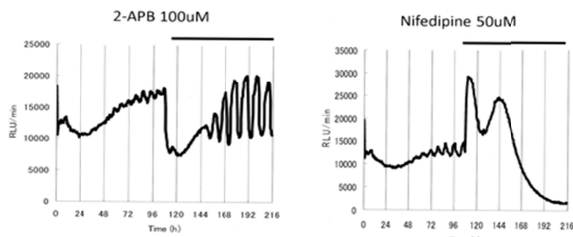
以上の結果は、ATP 振動が分泌過程の調節を介して軟骨凝集を誘導して、組織の形成に重要な役割を行うことを示した。

一方、骨髄由来間葉系幹細胞の軟骨分化・組織再生における代謝の振動を調べるため、マウス骨髄由来間葉系幹細胞 (C3H10T1/2) に上記と同じ発光レポーターを導入した 2 色発光間葉系幹細胞を開発した。マイクロマスカルチャー法を用いた間葉系幹細胞の軟骨分化過程において、 Ca^{2+} 振動、ATP 振動、酸素振動、軟骨分化および細胞凝集に関する同様の結果を得た (図 9)。

図 9



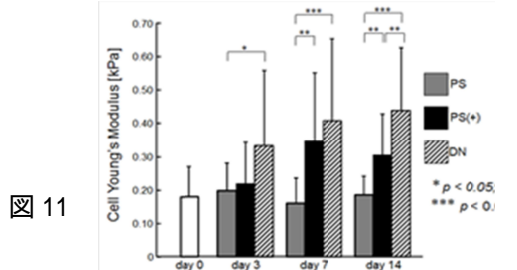
多機能ゲルが誘導する軟骨分化・組織再生における代謝の振動：維持培地（Insulin 非添加）を用いて ATDC5 細胞を合成 PAMPS ゲル上で培養すると、分化培地（Insulin 添加）を用いたポリスチレン（PS）上の培養と同様の ATP 振動が観察された（図 10：右）



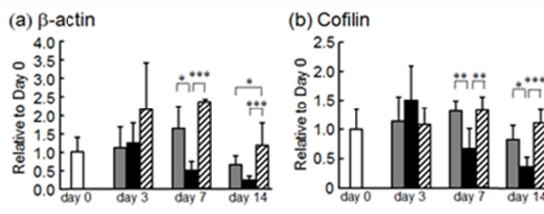
しかし Ca²⁺チャンネル阻害薬の効果には違いがみられた（図 10：上）。この結果は、合成ゲルの表面と Insulin 等のタンパクが誘導した軟骨分化では、その後の細胞代謝活性や組織形成能が同等であるという重要な事実を示した。

(2) 多機能ゲルが誘導する軟骨分化過程における軟骨前駆細胞の力学的特性および Actin 構造の変化

分化培地（Insulin 添加）を用いた PS 上での培養細胞（PS/Ins+群）のヤング率は、7日目以後に有意の上昇を見た。一方、維持培地を用いて DN ゲル上で培養された ATDC5 細胞（DN/Ins-群）のヤング率は、培養3日以前に有意の上昇を見た（別の実験で培養後6時間であることを確認）。7および14日目において DN/Ins-群のヤング率は PS/Ins+群より有意に大きかった（図 11）。



PS/Ins+群における Actin 修飾タンパク質の mRNA 発現量は7日目以後に低下したが、DN/Ins-群では有意の変化を示さなかった（図 12：下図）。軟骨分化過程における細胞の Actin 骨格に関する蛍光観察では、ストレ



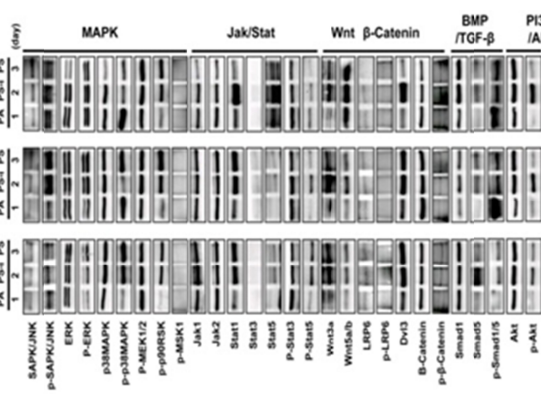
スファイバーの消失とコーティカルレイヤーの形成が認められた。Actin 構造の変化がヤング率の上昇をもたらすと考えられた。

この研究によって、軟骨分化中の細胞には Actin の再構築現象を伴うヤング率の上昇が起こることが発見された。またこの動態には DN/Ins-群と PS/Ins+群間で有意差があったという事実は、合成ゲルの表面が誘導する軟骨分化機序と Insulin 等のタンパクが誘導する軟骨分化機序では、異なる細胞内情報伝達機構が存在する可能性を示した。

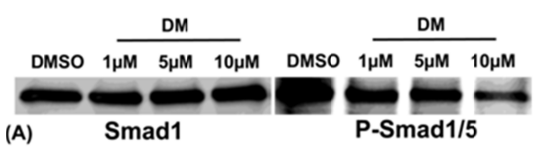
(3) 多機能ゲルが誘導する軟骨分化における細胞内情報伝達機構の解明

ATDC5 細胞を、維持培地を用いて PAMPS ゲル上で、また維持培地および分化培地の各々を用いて PS 上で培養し、1、2、3、5 日後に全 RNA を抽出してマイクロアレイ解析を行い、発現する遺伝子の網羅的解析（GO および pathway 解析）を行って3培養条件間で比較した。その結果、PAMPS ゲル上の培養では TGF-β/BMP シグナル伝達系および IGF 依存性シグナル伝達系が特異的に活性化されていることを発見した。

そこで TGF-β/BMP シグナル伝達系に関して、培養後1および3日における BMP4 遺伝子の発現量がゲル上培養で他よりも有意に高いことを、qPCR を用いて確認した。またウエスタンブロット法を用いて軟骨分化に関連する情報伝達系（TGF-β/BMP、MAPK、Jak/Stat、Wnt/β-cat、PI3K）の主要分子群の発現量及びリン酸化状態を比較した結果、Smad1/5（BMP4 の下流）のリン酸化が、PAMPS ゲル上培養の2および3日において特異的に亢進していることを発見した（図 13：下図）。



さらに PAMPS ゲル上の培養におけるドルソモルフィン（BMP type I レセプター特異的阻害剤）の投与は、Smad1/5 のリン酸化を抑制し（図 14：下図）また細胞凝集（nodule 形成）



および2型コラーゲンおよびアグリカン遺伝子の発現を抑制した（図 15）。

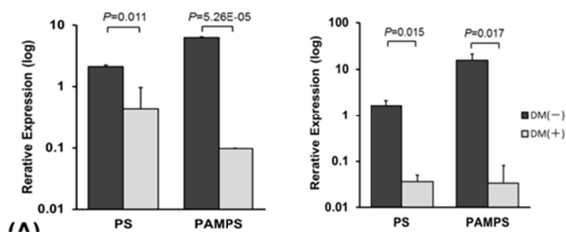
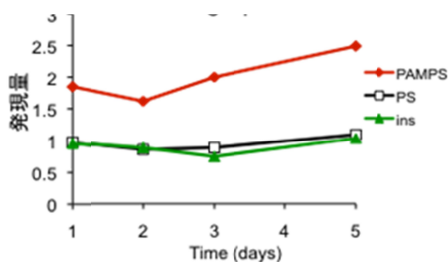


図 15 2型コラーゲン アグリカン

IGF 依存性シグナル伝達系に関しては、Igf-1 mRNA が PAMPS ゲル上培養 2 日後に発現量が亢進し、5 日目まで上昇し続けたのに対し、インシュリン刺激下(PS-i)では培養 5 日後に初めて有意な発現亢進を認めた。さらに IGF シグナル伝達系の調節分子 Igfbp6 が PAMPS ゲル上培養後 1 ~ 5 日目まで一貫した発現増加を認めた (図 16)。

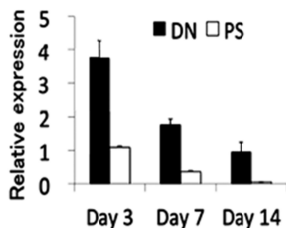
図 16



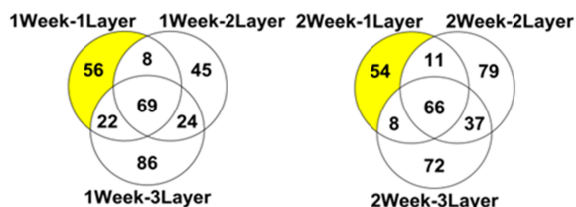
以上の研究成果は、多機能ゲルが誘導する軟骨分化・再生における間葉系細胞内情報伝達機構を初めて明らかにした。

(4) 多機能ゲルが有する機能の多角的評価

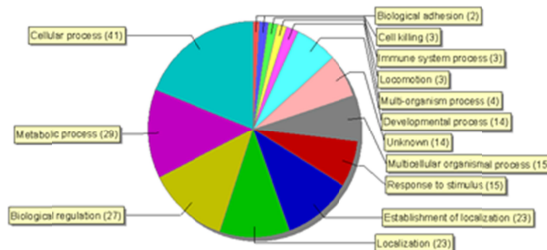
DN ゲルが間葉系幹細胞に与える効果：マウス間葉系幹細胞株 (C3H10T1/2) 1.0×10^5 個を、DN ゲル上および比較対照のポリスチレン上で 2 週間培養した。DN ゲル上で培養した細胞は培養 7 日目に免疫染色 2 型コラーゲンの発現が認められたがポリスチレン上の細胞には認められなかった。3 ~ 14 日目までの 2 型コラーゲン、アグリカン、Sox9 の遺伝子発現は、DN ゲル上での培養でポリスチレンと比較して有意な上昇を示した (図 17：右図)。この結果は、DN ゲルが間葉系幹細胞の軟骨分化をも in vitro で誘導することを示した。



DN ゲルのリザーバー機能の評価：DN ゲルをウサギに埋植後、1 および 2 週間後に取り出し、ゲル上部から均等に 3 等分し、それぞれのゲルからタンパク群を抽出して質量分析を中心としたプロテオミクス解析法によって解析した (図 18：下図)。その結果、



1 週目では 310 種、2 週目では 327 種の分子が同定され、層間で差が認められた。特に軟骨再生の起こる第 1 層でのみ発見されたタンパク質群は 1 週目で 56 種、2 週目では 54 種であった。この内、両方の条件下で存在するタンパク質類 71 種を同定した。この 71 種のタンパク質の機能について分析した結果、細胞内プロセス、代謝過程、生物学的制御機構に働く分子が多く見出された (図 19：下図)。



この中では、軟骨増殖促進因子として知られている Phospholipase A2 や F-actin-capping protein が注目され、重要な database を得た。PAMPS ゲルの中性化が In vivo 軟骨誘導効果に与える効果：PAMPS/PDMAAm DN ゲルの構成・構造を変えることなく、PAMPS の H⁺ を Na⁺ で置換した中性 DN ゲルを作製し、家兔関節軟骨再生実験系を用いて両ゲルの In vivo 軟骨誘導効果を比較した結果、効果に有意差はなかった。この結果は硫酸基の存在が効果の本質であることを示した。

(5) 一連の研究成果は、今後軟骨自然再生誘導治療法の開発のために重要である。成果の多くは、既に下記の一国際誌に発表され、当該領域に大きなインパクトを与えた。さらに今後にも発表を予定している。本研究の開始時に立てた目標は十分に達成できた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 27 件：すべて査読とインパクトファクターのある英文雑誌)

- (1) Kwon HJ, Ohmiya Y (4 番), Yasuda K (最後), 他 2 名. Analysis of proteins showing differential changes during ATP oscillations in chondrogenesis. Cell Biochem Funct. 2014 Feb 28 [Epub ahead of print], doi: 10.1002/cbf.3033
- (2) Kwon HJ, Yasuda K, Gong JP, Ohmiya Y: Polyelectrolyte hydrogels for replacement and regeneration of biological tissues. Macromol Res, 22:227-235, 2014
- (3) Fukui T, Kitamura N (2 番), Yasuda K (最後), 他 7 名. Intra-articular administration of hyaluronic acid increases the volume of the hyaline cartilage regenerated in a large osteochondral defect by implantation of a DN gel. J Mater Sci Mater Med, 25: 1173-82, 2014
- (4) Zhao Y, Kurokawa T (4 番), Yasuda K (10 番), 他 12 名; Proteoglycans and glycosaminoglycans improve toughness of biocompatible double network hydrogels. Adv Mater, 26:

436-42. 2014

(5) Kwon HJ, Ohmiya Y, Yasuda K: Simultaneous monitoring of intracellular ATP and oxygen levels in chondrogenic differentiation using a dual-color bioluminescence reporter. *Luminescence*, 2013 Oct 22 [Epub ahead of print], doi: 10.1002/bio.2598

(6) Kwon HJ, Yasuda K: Chondrogenesis on sulfonate-coated hydrogels is regulated by their mechanical properties. *J Mech Behav Biomed Mater*, 17:337-46, 2013

(7) Matsuda H, Kitamura N (2 番), Yasuda K (最後), 他 4 名: Influence of the gel thickness on in vivo hyaline cartilage regeneration induced by double-network gel implanted at the bottom of a large osteochondral defect: Short-term results. *BMC Musculoskelet Disord*, 14:50-59, 2013, doi: 10.1186/1471-2474-14-50

(8) Yoshikawa K, Kitamura N (2 番), Yasuda K (最後), 他 6 名: Hyaluronic acid affects the in vitro induction effects of synthetic PAMPS and PDMAAm hydrogels on chondrogenic differentiation of ATDC5 cells, depending on the level of concentration. *BMC Musculoskelet Disord*, 14: 56-63, 2013, doi: 10.1186/1471-2474-14-56

(9) Ogawa M, Kitamura N (2 番), Yasuda K (最後), 他 4 名: Poly (2-acrylamido-2-methylpropanesulfonic acid) gel induces articular cartilage regeneration in vivo: Comparisons of the induction ability between single- and double-network gels. *J Biomed Mater Res*, 100: 2244-51, 2012

(10) Kwon HJ, Ohmiya Y, Yasuda K. Dual-color system for simultaneously monitoring intracellular Ca²⁺ and ATP dynamics. *Analytical Biochemistry*, 430: 45-47, 2012

(11) Kwon HJ, Ohmiya Y (2 番), Yasuda K (最後), 他 4 名: Synchronized ATP oscillations have a critical role in prechondrogenic condensation during chondrogenesis. *Cell Death Dis*, 3: e278, 2012, doi:10.1038/cddis.2012.20

(12) Saito J, Kurokawa T (3 番), Yasuda Y (最後), 他 7 名: Robust bonding and one-step facile synthesis of tough hydrogels with desirable shape by virtue of the double network structure. *Polym Chem*, 2: 575-580, 2011

(13) Imabuchi R, Ohmiya Y (2 番), Yasuda K (最後), 他 5 名: Gene expression profile of the cartilage tissue spontaneously regenerated in vivo by using a novel double-network gel: Comparisons with the normal articular cartilage. *BMC Musculoskelet Disord*, 12:213, 2011, doi:10.1186/1471-2474-12-213

(14) Yokota M, Yasuda K (2 番), Kitamura N (3 番), 他 4 名: Spontaneous hyaline cartilage regeneration can be induced in an osteochondral defect created in the femoral condyle using a novel DN hydrogel. *BMC Musculoskelet Disord*, 12:49, 2011, doi:10.1186/1471-2474-12-49

(15) Arakaki K, Kitamura N (2 番), Yasuda K (最

後), 他 4 名: Joint immobilization inhibits spontaneous hyaline cartilage regeneration induced by a novel DN gel implantation. *J Mater Sci Mater Med*, 22: 417-425, 2011

(16) Kitamura N (1 番), Yasuda K (2 番), Kurokawa T, 他 5 名: 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*, 39: 1160-1169, 2011

〔学会発表〕(計 23 件: 海外 10、国内 13)

(1) Maeda E, Yasuda K (6 番), Ohashi T. (最後): 他 4 名 Biomechanical characterization of rapid chondrogenic differentiation of ATDC5 cells cultured on PAMPS/PDMAAm DN gel. The 60th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society, Hyatt Regency, New Orleans, Louisiana, March 15-18, 2014.

(2) Fukui T, Kitamura N (2 番), Yasuda K (最後): 他 4 名. In vivo effects of intraarticular hyaluronic acid administration on hyaline cartilage regeneration induced by PAMPS-PDMAAm DN hydrogel. Orthopaedic Research Society, Gonzalez Convention center, San Antonio, Texas, Jan. 26-29, 2013

(3) Kitamura N (1 番), Yasuda K (最後): 他 5 名. Hyaluronic acid enhances the effect of the PAMPS/PDMAAm double-network hydrogel on chondrogenic differentiation of ATDC5 Cells, The 58th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society, Moscone Center, San Francisco, CA, February 4-7, 2012

6 . 研究組織

(1)研究代表者

安田 和則 (YASUDA, Kazunori)
北海道大学・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 (OMIYA, Yoshihiro)
独立行政法人産業技術総合研究所・バイオメ
ディカル研究部門・研究部門長
研究者番号: 2 0 2 2 3 9 5 1

大橋 俊朗 (OHASHI, Toshiro)
北海道大学・工学研究院・教授
研究者番号: 3 0 2 7 0 8 1 2

黒川 孝幸 (KUROKAWA, Takayuki)
北海道大学・先端生命科学研究院・准教授
研究者番号: 4 0 4 5 1 4 3 9

北村 信人 (KITAMURA, Nobuto)
北海道大学・医学研究科・准教授
研究者番号: 8 0 4 4 7 0 4 4

田中 伸哉 (TANAKA, Shinya) (H23, 24 年度)
北海道大学・医学研究科・教授
研究者番号: 7 0 2 6 1 2 8 7

仙葉 慎吾 (SEMBA, Shingo) (H25 年度)
北海道大学・医学研究科・特任助教
研究者番号: 4 0 4 6 6 4 9 6