

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月20日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23791622

研究課題名（和文） 四肢形成、軟骨形成における B t b d 7 の機能解析

研究課題名（英文） Functional analysis of Btbd7 in limb formation and chondrogenesis

研究代表者

小野寺 智洋（ONODERA TOMOHIRO）

北海道大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：70547174

研究成果の概要（和文）： Btbd7 を中心とする遺伝子が軟骨形成において重要な役割を持つと仮定し、研究を進めた。マウス軟骨前駆細胞の軟骨分化誘導モデルにおける Btbd7・Snail2・ケモカイン SDF-1 の発現レベルを比較したところ、一過性に上昇したのちに下降するという同様の発現パターンを示した。

そこで SDF-1 に着目し、研究を推進した。SDF-1 は軟骨修復過程において一過性に上昇し、SDF-1 を含有したゲルを使用することによって、軟骨再生が誘導されることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）： We hypothesized that Gene expression of Btbd7 has an important role in limb formation and chondrogenesis. Chondrogenic differentiation model of mouse chondrocyte progenitor cell revealed that Btbd7, Snail2, and chemokine SDF-1 showed same expression pattern. These genes were transiently upregulated in chondrogenesis process. Therefore, we have driven forward our study focusing on SDF-1. We revealed that SDF-1 was transiently expressed in healing process of cartilage in vivo. In addition, we clarified that chondrogenesis was promoted by using alginate gel with SDF-1.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

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・四肢機能再建学

キーワード：軟骨再生・軟骨修復・再生医療

1. 研究開始当初の背景

軟骨細胞・軟骨マトリックスの分化・培養技術を確立し、再生医療として応用することは、運動器の機能保持のため重要な課題である。Btbd7 は、胎生期マウスの分化に極めて重要な働きを持ち、内皮細胞組織において、フィブロネクチン・Snail2 などと相互作用するタ

ンパクである。このことから、他器官での分化・形成過程にも重要な役割を持つ可能性が極めて高い。

そこで今回、Btbd7 ならびに関連遺伝子が四肢形態形成、特に軟骨形成において重要な役割を持つと仮定するに至った。本研究の目的は、四肢形態形成/軟骨形成における Btbd7 の機能解析を行い、軟骨細胞・軟骨マトリッ

クスの分化・培養技術に応用させることにより、再生医療への応用を目指すことである。

2. 研究の目的

軟骨細胞・軟骨マトリックスの分化・培養技術を確立し、再生医療として応用することは、運動器の機能保持のため重要な課題である。**Btbd7**は、胎生期マウスの分化に極めて重要な働きを持ち、内皮細胞組織において、フィブロネクチン・**Snail2**などと相互作用するタンパクである。このことから、他器官での分化・形成過程にも重要な役割を持つ可能性が極めて高い。本提案の目的は、軟骨形成における **Btbd7** 及び関連遺伝子の機能解析を行い、軟骨細胞・軟骨マトリックスの分化・培養技術に応用させることである。

3. 研究の方法

(1) **Btbd7** 並びに関連遺伝子の時間的発現パターン及び、空間的発現パターン解析
軟骨前駆細胞 ATDC5 を用いて分化過程における、**Btbd7**, **Snail2**, SDF-1 の発現様式を確認する。

(2) マウス軟骨前駆細胞 ATDC5 の通常培養時ならびに軟骨分化誘導モデルにおいて **Btbd7** 発現と同様の発現パターンを示す遺伝子の同定。

(3) 軟骨修復過程における、関連遺伝子発現パターンの解析
骨軟骨欠損部における SDF-1 蛋白の発現を免疫染色およびウエスタンブロットにて確認。骨軟骨欠損部における SDF-1 蛋白の発現を免疫染色およびウエスタンブロットにて確認しました。次に *in vivo* における SDF-1 の効果を確認するため術後 7 日目に移植ゲルを摘出し、組織学的にゲル内に浸潤した細胞数を計測し評価する *in vivo* cell homing assay を施行。そして再生した軟骨の評価として肉眼所見・組織所見をスコア化して評価した。

(4) 軟骨修復に与える効果の検討
家兎骨軟骨欠損モデルを用い実験を行った。使用家兎は日本白色家兎の 2.6kg から 2.9kg のものを使用し、大腿骨膝蓋関節溝(patella groove)に直径 4.5mm 深さ 3mm の欠損を作成した。実験群は上から何も治療しない defect ゲルに BSA を含有させた vehicle 群、SDF-1 を含有させた SDF-1 群を設定した。

4. 研究成果

Btbd7 並びに関連遺伝子の時間的発現パターン及び、空間的発現パターン解析により、ケモカイン SDF-1 が軟骨分化過程において一過性に上昇することを明らかにしたため、そちらの分子に着目した。まずは、軟骨修復過程において、SDF-1 が一過性に上昇することを明らかにした (図 1)。

次いで、SDF-1 を導入したゲルを作製し、その性質を明らかにした。具体的には、まず、SDF-1 を含有したゲルを培養液中に浸し、そこから徐放された SDF-1 量を経時的に評価した (図 2)

また、細胞浸潤試験では、SDF-1 の導入により、組織学的に内在性の骨髄間葉系細胞が軟骨欠損部に誘導されることが明らかとなった(図 3)

図 1 : 軟骨損傷後の SDF-1 発現パターン

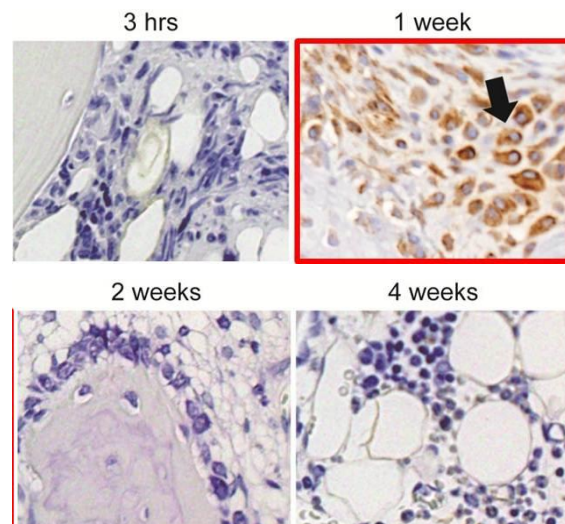


図 2 : SDF-1 含有ゲルの徐放性

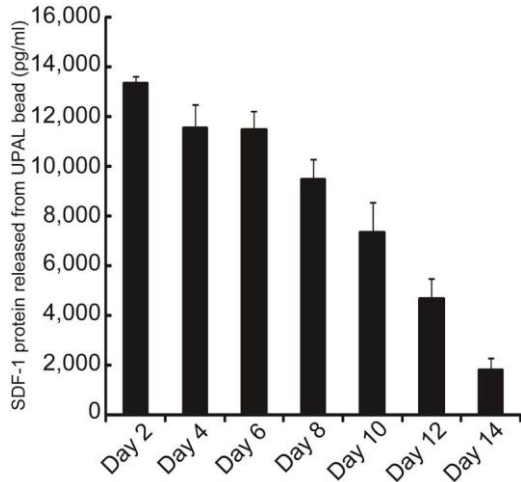
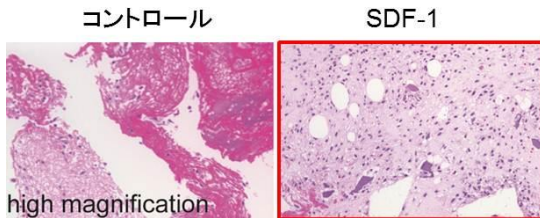


図 3 : 軟骨修復における SDF-1 の細胞導入効果



また、SDF-1 を含有したゲルをウサギ軟骨損傷モデルに使用することによって、軟骨再生が肉眼的 (図 4) に誘導されることが明らかとなった。
 更に、SDF-1 導入群においては、欠損部はグリコサミノグリカンとタイプ II コラーゲンを含む硝子様軟骨組織により修復されていました。(図 5)

図 4: 軟骨修復における SDF-1 の細胞導入(肉眼所見)

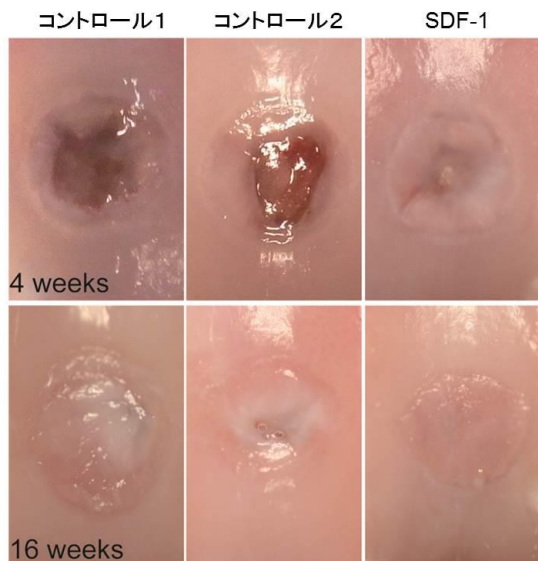
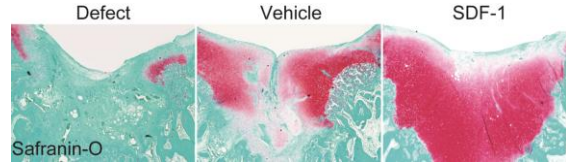


図 5 : 軟骨修復における SDF-1 の効果



これらの結果より、ゲルを用いて SDF-1 を投与することで、良好な軟骨修復が獲得できた。損傷部周囲の骨髄間葉系幹細胞を効率良く集積させることで、軟骨損傷に対する無細胞移植治療の可能性が示唆された。

Btbd7 の発現パターンを追うことで、ケモカイン SDF-1 が軟骨修復に関わる重要な遺伝子の一つであることを明らかにすることができた。SDF-1 は、他の組織においても損傷組織に発現し、局所細胞を誘導することは知られていたが、関節軟骨組織における挙動は明らかにされていなかった。今回の我々の研究結果により、SDF-1 は軟骨組織修復における重要な標的分子として認識されることとなった。

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 2 件)

1. 小野寺智洋, 岩崎倫政, 五十嵐達弥, 佃幸憲, 祐川敦, 関節疾患に対する新規注射用治療剤, 化学工業 第 64 巻 1 月号 (P46-50) (2013) : 査読無し
2. Sukegawa A, Iwasaki N, Kasahara Y, Onodera T, Igarashi T, Minami A. Repair of rabbit osteochondral defects by an acellular technique with an ultrapurified alginate gel containing stromal cell-derived factor-1 Tissue Eng Part A. 2012 May;18(9-10):934-45. : 査読有

[学会発表] (計 1 件)

A. Sukegawa, N. Iwasaki, Y. Kasahara, T. Onodera, T. Igarashi, A. Minami : Repair of Rabbit Osteochondral Defects by an Acellular Technique with an Ultrapurified Alginate Gel Containing Stromal Cell-Derived Factor-1, 10th World Congress of the International Cartilage Repair Society, 2012年05月12日, Fairmont the Queen Elizabeth(Canada)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小野寺 智洋 (ONODERA TOMOHIRO)
北海道大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：70547174

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし