

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25350548

研究課題名(和文) PAMPSゲルが誘導する多様な細胞分化において共通する酵素発現動態と機序の解明

研究課題名(英文) Explore the molecular mechanism of cellular differentiation induced by PAMPS gels.

## 研究代表者

仙葉 慎吾 (Semba, Shingo)

北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・特任助教

研究者番号：40466496

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：PAMPSゲルは損傷軟骨の自然再生を誘導するがその機構は不明である。本研究では、ゲルに直接結合する細胞接着タンパク質としてインテグリンを同定した。また、軟骨原性細胞であるATDC5細胞をゲル上で培養すると、p38 MAPキナーゼの活性化状態が変化することを見いだした。さらに、PAMPSゲルは細胞外基質に関連した遺伝子発現を上昇させること、細胞外に分泌された細胞外基質がゲルに蓄積され、それらが軟骨分化を促進させることを明らかとした。以上の結果から、PAMPSゲルは細胞内シグナル分子を介して遺伝子発現を変化させるだけでなく、軟骨分化促進因子を蓄積するリザーバーとしても機能することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：It is known that PAMPS gel induces the spontaneous regeneration of damaged cartilage, however the detailed molecular mechanism remains unclear. In this study, we identified integrins as PAMPS-binding proteins and found that culturing on PAMPS gel drastically changed the activation of p38 MAP kinase in chondrocytic murine ATDC5 cell. It was also found that the gel enhanced the gene expression related with the extracellular matrix, and secreted extracellular matrix were accumulated in the gel, which enhanced the chondrogenic differentiation of ATDC5 cells cultured on PAMPS gel. These results suggest that PAMPS gel not only alters gene expression via intracellular signaling molecules, such as integrins and MAP kinases, but also functions as a molecular reservoir to accumulate the factors that promote cartilage differentiation.

研究分野：生化学

キーワード：再生医工材料 生体材料 ダブルネットワークゲル ハイドロゲル 軟骨再生

### 1. 研究開始当初の背景

関節軟骨障害は様々な関節疾患によってしばしば起こる障害であるが、軟骨組織は血管に乏しいことから損傷軟骨組織の自然修復はおこらないものと考えられている。合成高分子ゲルである PAMPS/PDMAAm ダブルネットワーク (DN) ゲルを家兎関節軟骨欠損部の基底に埋植すると、その欠損部に硝子軟骨が *in vivo* で自然に再生する現象が見いだされた。また、軟骨前駆細胞である ATDC5 細胞を用いた研究から、この DN ゲルが誘導する軟骨再生において構成成分の一つである PAMPS ゲルの生化学的・物理学的特性が細胞の分化誘導に重要な役割を果たしていることが示されている。また、軟骨前駆細胞のみならず、ヒト血管内皮細胞においても PAMPS ゲル上で培養すると、通常の細胞培養で用いられるポリスチレンディッシュ上の培養では発現が見られなかった糖鎖が細胞表面上に発現してくることが報告されている。しかし、DN ゲルや PAMPS ゲルからの刺激をどのようにして細胞が感知し、細胞の分化誘導へつながらせるのか、その詳細な分子メカニズムは明らかではなかった。

### 2. 研究の目的

申請者は PAMPS ゲルによってその機能に影響をうけるあらゆる細胞には、その情報伝達機構に関する共通のシグナル分子が存在するのではないかと着想した。すなわち、ゲルに直接結合する接着タンパク質とその接着タンパク質が受け取った刺激を細胞内に伝える酵素が存在するのではないかと考えた。そして、これらの分子がゲルからの刺激を細胞核内に伝え、それによって遺伝子発現が変化し細胞分化がおこるのではないかと予想した。これらの分子を同定・解析することによって、PAMPS ゲルや DN ゲルがもつ分化誘導能に関する情報伝達機構が解明され、さらには新たな人工生体材料としての多機能ゲルの開発に貢献できる可能性がある。そこで本研究では、PAMPS 結合タンパク質を同定することと、マルチキナーゼ抗体を用いた kinome 解析によりキナーゼの発現変化を網羅的に調べることによって PAMPS ゲルが誘導する細胞分化のメカニズムを明らかにしようと試みた。

### 3. 研究の方法

ゲルに結合するタンパク質を検索するために、粉碎ゲルを用いた pull-down アッセイを行った。ATDC5 細胞から調製した膜タンパク質と細かく粉碎したゲルをそれぞれ混合し、ゲル結合タンパク質を得た。結合タンパク質を SDS-PAGE によって分離し、SYPRO Ruby 染色およびウェスタンブロットを行った。

Kinome 解析は以下の手順で行った。セリン/スレオニンキナーゼやチロシンキナーゼにはアミノ酸配列の相同性が非常に高い領域 (ドメイン VIB) があり、この領域を抗原と

したモノクローナル抗体が開発されている。この抗体を用いたウェスタンブロット法で、ATDC5 細胞を PAMPS ゲル上で培養したときに発現に変動の見られるキナーゼを検出した。また、2次元電気泳動によってライセートを分離後、マルチキナーゼ抗体を用いた発現変動が見られたキナーゼの等電点と分子量を求め、TagIdent を用いたデータベース検索でキナーゼを同定した。

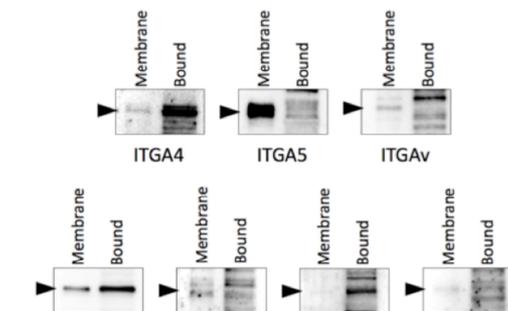
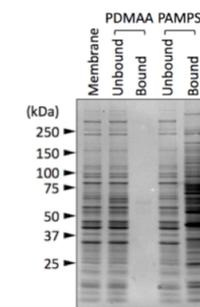
PAMPS ゲルが誘導する遺伝子発現変化を検討するために、DNA マイクロアレイを用いた網羅的解析を行い、PAMPS ゲルによって発現が変動する遺伝子群を Gene ontology 解析で抽出した。

PAMPS ゲル上で1週間 ATDC5 細胞を培養したあと細胞を完全に剥離することで、ATDC5 細胞が分泌したタンパク質をゲル内に蓄積した「conditioned-PAMPS ゲル」を作成した。このゲル上に新たに ATDC5 細胞を播種し、その軟骨分化の度合いを軟骨分化マーカー遺伝子である type II collagen と aggrecan の発現を realtime PCR で定量することで評価した。

### 4. 研究成果

粉碎ゲルを用いた pull-down アッセイの結果、DN ゲルのもう一方のコンポーネントである PDMAA ゲルを用いた場合には、タンパク質はほとんど結合しなかったのに対し、PAMPS ゲルには複数のタンパク質が結合することが明らかとなった (図中の「Bound」)。細胞と細胞

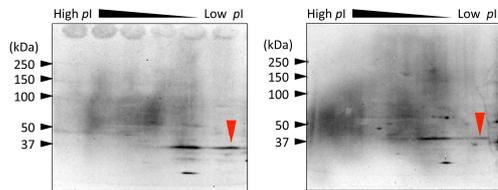
外基質の接着にはインテグリン (ITG) が重要な役割を担っていることが広く知られている。ATDC5 細胞と PAMPS ゲルの接着にも ITG が関与していると考え、PAMPS ゲル結合タンパク質中の ITG アイソフォームをウェスタンブロットで検出した。その結果、ゲル結合タンパク質には ITG 4、ITG 1、そして ITG 4 のシグナルが強く検出された (下図)。



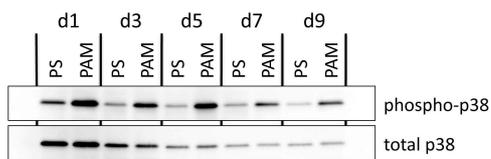
特に、ITG 4 と ITG 4 については、membrane 画分中にはごく弱いシグナルしか検出されなかったのに対し、結合タンパ

ク質中にはより強いシグナルが検出された。そこで、ITG 4 アイソフォームが ATDC5 細胞と PAMPS ゲルの接着に重要な役割を担っていると考え、ITG 4 を shRNA により恒常的に knockdown した ATDC5 細胞株を樹立し、PAMPS ゲルに播種した後のその形態変化を経時的に観察した。ゲル上に接着した細胞の面積を定量したところ、効率よく ITG 4 が knockdown された No. 1 の細胞株で野生型と比べて有意な面積の低下が見られた。以上の結果から、ITG 4 が PAMPS ゲルからの刺激を最初に受け取る細胞接着因子であると考えられた。

ATDC5 細胞を PAMPS ゲル上で培養し、2次元電気泳動とマルチキナーゼ抗体を用いたウェスタンブロットでキナーゼの発現変化を経時的に調べた。変動のあったシグナルの等電点と分子量をもとにデータベースサーチを行った結果、PAMPS ゲル上で ATDC5 細胞を培養すると p38 MAP kinase (p38 MAPK) の発現が変動していることが示された(下図)。

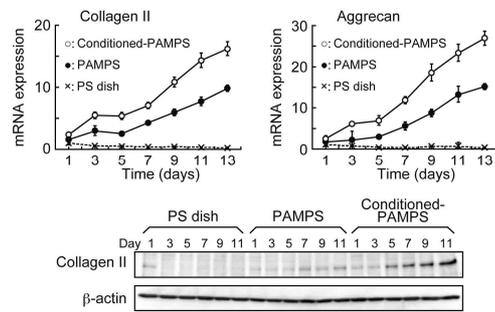


p38 MAPK の活性はそれ自身のリン酸化で調節されていることが知られているが、PAMPS ゲル上の ATDC5 細胞ではそのリン酸化が亢進していることが明らかとなった(下図)。このことから、ATDC5 細胞内において、PAMPS ゲルは p38 MAPK を介してシグナルを伝達し軟骨分化を誘導しているものと思われた。



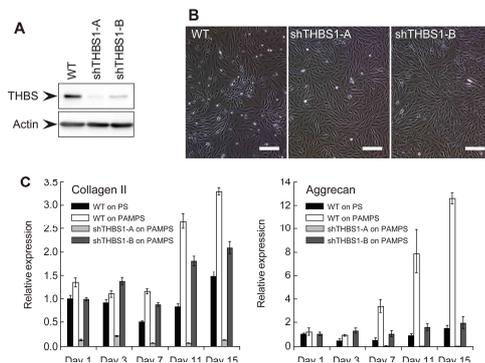
先行研究において、ATDC5 細胞を PAMPS ゲル上で培養すると特異な遺伝子発現変化を示すことが明らかとなっている。そこで、その変化を Gene ontology 解析でより詳細に検討したところ、分泌タンパク質に関連した遺伝子の発現が上昇することが明らかとなった。このことから、PAMPS ゲルの刺激によって発現が亢進した分泌タンパク質がゲルに蓄積し、蓄積されたタンパク質が ATDC5 細胞に更なる刺激を与えるために軟骨分化が促進されるのではないかと考えた。これを検証するために、分泌タンパク質が蓄積された conditioned-PAMPS ゲルを作成し、このゲル上で ATDC5 細胞を培養したときの軟骨分化の程度を検討した。その結果、conditioned-PAMPS ゲル上で培養すると、通

常の PAMPS ゲル上で培養したときに比べて、軟骨分化マーカーの発現がより早期に上昇



してることが明らかとなった(下図)。

Conditioned-PAMPS ゲルに蓄積されているタンパク質を質量分析計を用いて網羅的に同定した結果、コラーゲンとその結合タンパク質が多く蓄積されていることが明らかとなった。そこで同定したタンパク質の一つである Thrombospondin (THBS) を knockdown した ATDC5 細胞株を樹立し、この細胞を PAMPS ゲル上で培養したときの軟骨分化の程度を検討した。その結果、この細胞株は PAMPS によって誘導される軟骨分化能が抑制されていることが明らかとなった(下図)。



過去の研究において、細胞がインテグリン等の細胞接着タンパク質を介して基質の物理的・化学的性質を感知し、その遺伝子発現を変化させることが広く知られている。本研究においても PAMPS ゲルと結合する接着タンパク質の一つとしてインテグリンを同定した。インテグリンアイソフォームによっては PAMPS ゲルとの結合性が異なっていたことから、細胞間におけるアイソフォームの発現の違いが PAMPS ゲルへの接着、さらには細胞分化誘導能に違いをもたらしているのかもしれない。さらに本研究では、PAMPS ゲルには細胞が分泌したタンパク質を蓄積する「リザーバー」としての機能もあることを示し、蓄積されたタンパク質が更なる刺激を細胞に与えることを示した。つまり、PAMPS ゲルから直接の刺激(1次メカノシグナル)を受けた ATDC5 細胞は細胞外タンパク質の発現・分泌を亢進する、それによってゲルに蓄積された生体分子が新たな刺激(2次メカノシ

グナル)を細胞に与えることによって軟骨分化を促すということを示している。これらの結果は、PAMPS ゲルによる軟骨分化の制御メカニズムを明らかとただけではなく、様々な細胞分化に必要な2次メカノシグナルを模倣することによって細胞の分化機構を緻密に制御できる画期的な高機能生体材料の創製の可能性を示唆するものである。

#### 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 1件)

Goto K, Kimura T, Kitamura N, Semba S, Ohmiya Y, Aburatani S, Matsukura S, Tsuda M, Kurokawa T, Gong JP, Tanaka S, Yasuda K.

Synthetic PAMPS gel activates BMP/Smad signaling pathway in ATDC5 Cells, which plays a significant role in the gel-induced chondrogenic differentiation. *J. Biomed. Mater. Res. A.*, 104, 734-736, (2016). (学術誌論文、査読有り)  
doi: 10.1002/jbm.a.35615.

[学会発表](計 2件)

仙葉慎吾

ハイドロゲルが誘導する軟骨細胞分化における細胞内情報伝達機構の解明  
第5回北海道探索病理学研究シンポジウム、2015年10月24日、ニューオータニイン札幌(北海道・札幌市)

仙葉慎吾

PAMPS ゲルが誘導する軟骨細胞分化における細胞内情報伝達機構の解明  
ソフト&ウェットマテリアルが拓くライフイノベーション第1回研究成果報告シンポジウム、2014年6月26日、北海道大学(北海道・札幌市)

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

仙葉 慎吾 (SEMBA, Shingo)

北海道大学・医学研究科・特任助教

研究者番号: 40466496

##### (2)研究分担者

安田 和則 (YASUDA, Kazunori)

北海道大学・医学研究科・教授

研究者番号: 20166507

##### (3)連携研究者

津田 真寿美 (TSUDA, Masumi)

北海道大学・医学研究科・講師

研究者番号: 30431307