

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670655

研究課題名(和文) 有尾両生類の高度な関節軟骨再生能の解明と哺乳類への応用法の検討

研究課題名(英文) Analysis of the high ability of urodele amphibians to regenerate articular cartilage and application of the underlying mechanism to regeneration of mammalian cartilage

研究代表者

筑田 博隆(Chikuda, Hirotaka)

東京大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：30345219

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：有尾両生類の一種であるアホロートルは高度な組織再生能を有し、ヒトを含めた哺乳類では殆ど再生しない関節軟骨に関しても、関節軟骨全層に至る大きな欠損をも元通り修復する能力を有している事が知られている。本研究はこのアホロートルの関節軟骨再生能を司るメカニズムを解明する事を目標として行った。アホロートルの膝関節軟骨の全層切除を行い、術後4週に関節軟骨を採取してRNAを抽出し、次世代シーケンサーを用いた遺伝子発現解析を行った。それにより、アホロートルの関節軟骨の再生には、これまでに四肢全体の再生で有用な役割を果たすと知られている遺伝子と、関節軟骨再生に特異的な遺伝子の双方が関与している事が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Axolotl, a species of urodele amphibians, has very high ability to regenerate its tissues. In contrast to mammals, including humans, whose articular cartilage regenerates very poorly, axolotl is known to be able to completely regenerate defects extending the full-depth of the articular cartilage. In this study, we attempted to identify the mechanisms underlying the regenerative capacity of axolotls.

We resected full-thickness knee articular cartilage from axolotl. At 4 weeks after surgery, we harvested the cartilage and extracted its RNA. Then we analyzed gene expression profiles by next-generation sequencing. This analysis suggested that both genes previously known to be important for regeneration of whole limb and genes specific to articular cartilage regeneration are involved in the regeneration of axolotl articular cartilage.

研究分野：整形外科学

キーワード：変形性関節症 再生医療

1. 研究開始当初の背景

研究の学術的背景

高齢社会の進展に伴い、変形性関節症などの関節変性疾患の患者数は増え続けている。我々のグループは従来から軟骨変性の分子メカニズムや関節軟骨再生の研究を行い、多くの成果を挙げてきた (Arthritis Rheum 50:3561-73,2004, Nat Med 12:665-10,2006, Dev Cell 14:689-99,2008, J Clin Invest 118:2506-15,2008, Nat Med 16:678-86,2010, Arthritis Rheum 64:198-203,2012, Proc Natl Acad Sci USA 110:1875-80,2013)。軟骨代謝研究の進展に加え近年は iPS 細胞などを介した再生医療研究が進展を見せているが、ヒトを含めた哺乳類では関節軟骨細胞は元来再生能に乏しく、損傷した関節軟骨を再生させる本質的な治療技術は現在も確立されておらず、斬新な発想によるブレイクスルーが待たれる状況といえる。このような背景の元、関節変性疾患の治療法を研究する新しいアプローチを模索すべく、本研究を行った。

2. 研究の目的

有尾両生類は脊椎動物の中で最も高度な組織再生能を有する。近年の再生医療研究の進展の中で、有尾両生類の高度な再生能は、哺乳類への進化の過程で失われていると考え、有尾両生類の組織再生の分子メカニズムを知り、その知見を哺乳類に応用する研究が行われるようになってきている。(Roy et al. Exp Gerontol 43:968-973,2008, Menger et al. Ann Plast Surg 65:504-510,2010)。有尾両生類の中でもアホロートル (*Ambystoma mexicanum*) は古くから四肢を始めとした諸器官の再生の研究対象となっており、近年の研究では、広範な関節軟骨欠損も再生可能であることが示されている (Cosden et al. Osteoarthritis Cartilage 19:200-5,2011)。従来乏しかったアホロートルの分子生物学的研究ツールも、近年充実してきている。これらの背景を踏まえ、本研究は有尾両生類の高度な関節軟骨再生能を司る分子メカニズムを、我々のこれまでに培ってきた軟骨代謝や再生医療分野の技能・知見を用いて解明し、その哺乳類への応用法を探る事を目的として行った。

3. 研究の方法

(1) アホロートル関節軟骨再生モデルの作製と評価

Cosden らの先行論文において、アホロートル関節軟骨の広範な切除を行うと、まず発生段階の未分化な関節組織 (interzone) 様の組織が出現し、それが次第に分化して関節軟骨が再生する事が示されている (Osteoarthritis Cartilage 19:200-5,2011)。まず、この方法の再現を試みた。アホロートルを MS-222 で麻酔したのち、顕微鏡下に膝関節の大腿骨遠位関節面を切除した。術後継時的に膝関節を採取し、4%パラホルムアルデヒド固定し、

パラフィン包埋ののち薄切した。ヘマトキシリン-エオジン (HE) 染色を行い、顕微鏡下に観察を行った。これにより、どの時点でサンプリングすれば再生途上の関節軟骨組織が豊富に・再現性良く採取できるかを検討した。

(2) アホロートル関節軟骨再生モデルからの RNA 抽出

アホロートルに (1) で検討した膝関節切除または sham 手術を行い、術後 4 週で切除部分周囲の関節軟骨を採取した。サンプルをビーズ式ホモジナイザー (Bertin Technologies, Precellys24) で処理したのち RNeasy Micro Kit (Qiagen) で RNA 抽出した。その後、Agilent 2100 Bioanalyzer で RNA の品質と量を評価した。

(3) 次世代シーケンサーを用いた遺伝子発現プロファイル解析

得られた RNA を用いて遺伝子発現プロファイル解析を行った。アホロートルはゲノム情報が不完全であるため、次世代シーケンサーを用いた de novo RNA-seq を行った。詳細を以下に示す。

Total RNA を材料とし、SMART (Switching Mechanism At 5' end of RNA Template) 法を用いて 1st strand cDNA の両末端に特定の配列を付与した。引き続き、特定配列を認識する primer を用いて PCR による増幅を行い、AMPure XP (Beckman Coulter) を用いた磁気ビーズ法にて得られた PCR 産物を精製し、これを二本鎖 cDNA 増幅産物とした。さらに、トランスポゾンを用いたタグメンテーション反応により、二本鎖 DNA の断片化および両末端へのアダプター配列の付加を行った。アダプターを認識する検体ごとに異なるタグ配列を有する index 付きのプライマーを使用して PCR 増幅を行い、index を付加したシーケンスライブラリーを作製した。Agilent 2100 Bioanalyzer でシーケンスライブラリーの品質検定を行ったのち、シーケンスライブラリーを混合し、HiSeq 2500 (Illumina) によりシーケンス解析を行った。その後のデータ解析により、膝関節切除群で sham 手術群に比して発現量が大きい遺伝子群を同定した。

(4) アホロートル関節軟骨培養系の確立の試み

(3) で発現上昇が認められた遺伝子がどのようにアホロートルで関節軟骨再生に関与しているか、詳細な分子メカニズムを検討するため、in vitro での実験系の構築を試みた。マウスやヒトでの関節軟骨細胞培養の手法を応用し、また、アホロートルの軟骨以外の組織の初代培養を行った先行研究で用いられた手法を参考に、アホロートル初代関節軟骨細胞の培養を試みた (Zajdel et al. In Vitro Cell Dev Biol 33:677-80,1997, Gosset et al. Nat Protoc 3:1253-60,2008, Armstrong et

al. *Developmental Biology of the Axolotl*, Oxford University Press, 1989)。MS-222 で麻酔ののち、次亜塩素酸ナトリウム + エタノールでリンスしたのち顕微鏡下に関節軟骨を採取した。コラゲナーゼ処理で細胞分離し、浸透圧を調整した Leibovits L-15 溶液を加え、26°C に設定したインキュベーターで培養した。また、VSVG エンベロープを用いてパッケージングしたレトロウイルスによる不死化遺伝子の導入も試みた (Whited et al. *Development* 140:1137-46, 2013)。

4. 研究成果

(1) アホロートル関節軟骨再生モデルの作製と評価

HE 染色の結果を図 1 に示す。術直後は sharp だった関節軟骨の切除縁が術後 2 週・4 週と経過するにつれて軟骨再生により dull になっていく様子が観察でき、また、これらの時期には先行論文に示されている通り、切除部周囲が interzone 様の細胞で満たされていた。術後 6 週・8 週では更に関節軟骨再生が進んでいたが、個体差が大きく、また、正確に切除部位を同定する事も難しくなっていた。以上より、本研究では、再現性良く充分量の再生過程の軟骨組織が採取できると考えられた術後早期 (4 週) を対象を絞って研究を進める事とした。

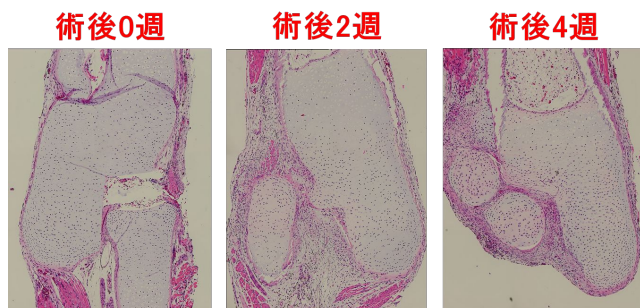


図 1 関節軟骨切除後の経時的変化

(2) アホロートル関節軟骨再生モデルからの RNA 抽出

関節切除群・sham 群ともに術後 4 週で関節軟骨を採取し RNA を抽出した。Agilent 2100 Bioanalyzer で品質検定を行った。サンプルが微小である、硬組織であり RNA 抽出が難しい等が原因で品質が不良であったサンプルもあったが、それらは解析には用いなかった。最終的に関節切除群・sham 群の品質良好な 2 サンプルずつが得られたので、それらをシーケンス解析に用いた。シーケンス解析に用いたサンプルの Agilent 2100 Bioanalyzer による品質検定の結果を図 2 に示す。

(3) 次世代シーケンサーを用いた遺伝子発現プロファイル解析

シーケンスライブラリー作製後の Agilent 2100 Bioanalyzer による品質検定の結果は良好であった。HiSeq 2500 を用い、解析塩基長

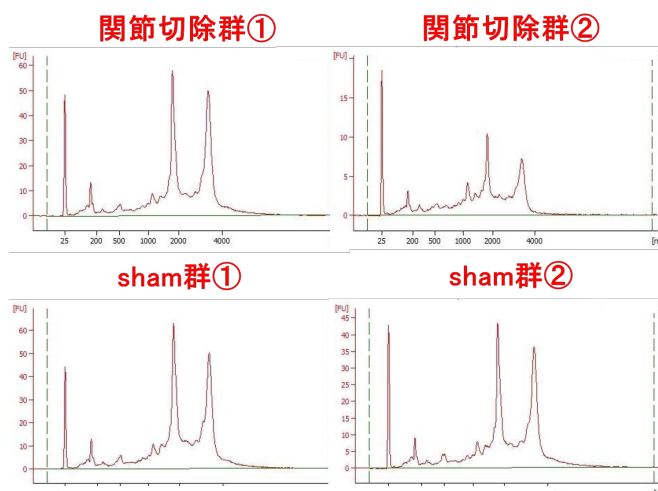


図 2 2100 Bioanalyzer による RNA の品質検定

100bp, ペアエンド法でシーケンス解析を行った。データ処理により各遺伝子の発現量を算出した。これにより、関節切除群で発現上昇している遺伝子群を多数同定できた。これらの、再生途上の関節軟骨で発現上昇している遺伝子群の中には、マトリクス分解酵素群などの有尾両生類の四肢再生で発現上昇すると知られている遺伝子がみられたほか、これまでに再生プロセスでの機能が知られていない遺伝子も多数含まれていた。これらの事から、関節軟骨の再生過程には、四肢全体の切除後の再生に関わる遺伝子の他、関節軟骨再生に特異的な遺伝子も関与している可能性が示唆された。これらの遺伝子群について、さらに発現解析や機能解析を進めていきたいと考えている。

(4) アホロートル関節軟骨培養系の確立の試み

アホロートル関節軟骨細胞の初代培養を試みたが、細胞の収量が少なく、また、培養を長期間継続しても増殖が殆ど見られなかった。レトロウイルスによる不死化遺伝子導入も試みたが、元々の細胞量が少ない等の困難があり、不死化された軟骨細胞の作製は現時点では成功していない。今後の方針としては、軟骨細胞採取・培養の手法の再検討に加え、軟骨細胞を分離せず器官培養の手法を用いた in vitro 解析を行う、CRISPR-Cas9 system により in vivo の状態で機能解析をする方法を検討する、等を考えている。

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 24 件)

Ryota Yamagami, Shuji Taketomi, (他 4 名, 1 番目, 2 番目). Myositis ossificans after navigated knee surgery: A report of two cases and

literature review. *Knee*. 2016 Mar 15. pii: S0968-0160(15)00291-4. (査読有)
DOI: 10.1016/j.knee.2015.11.023.

J Ohya, Hiroataka Chikuda, (他 6 名, 3 番目). Does the microendoscopic technique reduce mortality and major complications in patients undergoing lumbar discectomy? A propensity score-matched analysis using a nationwide administrative database. *Neurosurg Focus*. 2016 Feb;40(2):E5. (査読有)
DOI: 10.3171/2015.10.FOCUS15479.

H Inui, Shuji Taketomi, Ryota Yamagami, (他 3 名, 2 番目, 3 番目). Impingement of the Mobile Bearing on the Lateral Wall of the Tibial Tray in Unicompartmental Knee Arthroplasty. *J Arthroplasty*. 2016 Feb 27. pii: S0883-5403(16)00014-0. (査読有)
DOI: 10.1016/j.arth.2015.12.047.

K Nakajima, Shuji Taketomi, (他 4 名, 2 番目). Missed Medial Malleolar Fracture Associated With Achilles Tendon Rupture: A Case Report and Literature Review. *J Foot Ankle Surg*. 2016 Jan-Feb;55(1):169-72. (査読有)
DOI: 10.1053/j.jfas.2014.09.027.

Shuji Taketomi, Ryota Yamagami, (他 7 名, 1 番目, 4 番目). Secure fixation of femoral bone plug with a suspensory button in anatomical anterior cruciate ligament reconstruction with bone-patellar tendon-bone graft. *Joints*. 2016 Jan 28;3(3):102-8. (査読有)
DOI: 10.11138/jts/2015.3.3.102.

K Yamada, Hiroataka Chikuda, (他 5 名, 4 番目). Postoperative outcomes of major lower extremity amputations in patients with diabetes and peripheral artery disease: analysis using the Diagnosis Procedure Combination database in Japan. *Am J Surg*. 2016 Jan 6;S0002-9610(16):30013-7. (査読有)
DOI: 10.1016/j.amjsurg.2015.08.039.

S Kato, Hiroataka Chikuda, (他 7 名, 2 番目). Risk of infectious complications associated with blood transfusion in elective spinal surgery—a propensity score matched analysis. *Spine J*. 2016 Jan 1;16(1):55-60. (査読有)
DOI: 10.1016/j.spinee.2015.10.014.

H Inui, Shuji Taketomi, Ryota Yamagami, (他 2 名, 2 番目, 3 番目). Twice cutting method reduces tibial cutting error in unicompartmental knee arthroplasty. *Knee*. 2016 Jan;23(1):173-6. (査読有)
DOI: 10.1016/j.knee.2014.11.015.

T Oichi, Hiroataka Chikuda (他 8 名, 2 番目). Concurrent spinal schwannoma and meningioma mimicking a single cervical dumbbell-shaped tumor: case report. *J Neurosurg Spine*. 2015 Dec;23(6):784-7. (査読有)
DOI: 10.3171/2015.3.SPINE141315.

T Oichi, Hiroataka Chikuda (他 3 名, 4 番目). Evaluation of Comorbidity Indices for a Study of Patient Outcomes Following Cervical Decompression Surgery: A Retrospective Cohort Study. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2015 Dec;40(24):1941-7. (査読有)
DOI: 10.1097/BRS.0000000000001153.

K Watanabe, Shuji Taketomi, (他 8 名, 4 番目). Effects of Surface Modification and Bulk Geometry on the Biotribological Behavior of Cross-Linked Polyethylene: Wear Testing and Finite Element Analysis. *Biomed Res Int*. 2015;2015:435432. (査読有)
DOI: 10.1155/2015/435432.

J Ohya, Hiroataka Chikuda, (他 5 名, 2 番目). Perioperative stroke in patients undergoing elective spinal surgery: a retrospective analysis using the Japanese diagnosis procedure combination database. *BMC Musculoskelet Disord*. 2015 Oct 2;16:276. (査読有)
DOI: 10.1186/s12891-015-0743-7.

S Kato, Hiroataka Chikuda, (他 5 名, 2 番目). Phosphorylated neurofilament subunit levels in the serum of cervical compressive myelopathy patients. *J Clin Neurosci*. 2015 Oct;22(10):1638-42. (査読有)
DOI: 10.1016/j.jocn.2015.03.047.

J Ohya, Hiroataka Chikuda, (他 6 名, 2 番目). Elevated levels of phosphorylated neurofilament heavy subunit in the cerebrospinal fluid of patients with lumbar spinal stenosis: preliminary findings. *Spine J*. 2015 Jul 1;15(7):1587-92. (査読有)
DOI: 10.1016/j.spinee.2015.03.013.

J Ohya, Hiroataka Chikuda, (他 5 名, 2 番目). Risks of in-hospital death and complications after fusion surgery in patients with atlantoaxial subluxation: analysis of 1090 patients using the Japanese Diagnosis Procedure Combination database. *World Neurosurg*. 2015 Apr;83(4):603-7. (査読有)
DOI: 10.1016/j.wneu.2014.12.019.

S Sugita, Shuji Taketomi, Hiroataka Chikuda, (他 17 名, 12 番目, 13 番目). Transcription factor Hes1 modulates

- osteoarthritis development in cooperation with calcium/calmodulin-dependent protein kinase 2. Proc Natl Acad Sci U S A. 2015 Mar 10;112(10):3080-5. (査読有)
DOI: 10.1073/pnas.1419699112.
- S Kanda, Hiroataka Chikuda, (他 3 名, 3 番目). An Unusual Presentation of Adult Tethered Cord Syndrome Associated with Severe Chest and Upper Back Pain. Case Rep Orthop. 2015;2015:926185. (査読有)
DOI: 10.1155/2015/926185.
- S Kato, Hiroataka Chikuda, (他 12 名, 4 番目). Comparison of the Japanese Orthopaedic Association (JOA) score and modified JOA (mJOA) score for the assessment of cervical myelopathy: a multicenter observational study. PLoS One. 2015 Apr 2;10(4):e0123022. (査読有)
DOI: 10.1016/j.spinee.2015.10.014.
- Shuji Taketomi, (他 7 名, 1 番目). Clinical features and injury patterns of medial collateral ligament tibial side avulsions: "wave sign" on magnetic resonance imaging is essential for diagnosis. Knee. 2014 Dec;21(6):1151-5. (査読有)
DOI: 10.1016/j.knee.2014.08.019.
- S Sugita, Hiroataka Chikuda, (他 3 名, 2 番目). Progression of ossification of the posterior longitudinal ligament of the thoracic spine following posterior decompression and stabilization. J Neurosurg Spine. 2014 Nov;21(5):773-7. (査読有)
DOI: 10.3171/2014.7.SPINE131191.
- 21 Hiroataka Chikuda, (他 6 名, 1 番目). Ischemic stroke after cervical spine injury: analysis of 11,005 patients using the Japanese Diagnosis Procedure Combination database. Spine J. 2014 Oct 1;14(10):2275-80. (査読有)
DOI: 10.1016/j.spinee.2014.01.024.
- 22 Shuji Taketomi, Ryota Yamagami, (他 6 名, 1 番目, 5 番目). Remnant-preserving anterior cruciate ligament reconstruction using a three-dimensional fluoroscopic navigation system. Knee Surg Relat Res. 2014 Sep;26(3):168-76. (査読有)
DOI: 10.5792/ksrr.2014.26.3.168.
- 23 S Sugita, Hiroataka Chikuda, (他 6 名, 2 番目). Clinical characteristics of rheumatoid arthritis patients undergoing cervical spine surgery: an analysis of National Database of Rheumatic Diseases in Japan. BMC Musculoskelet Disord. 2014 Jun

13;15:203. (査読有)

DOI: 10.1186/1471-2474-15-203.

- 24 S Kato, Hiroataka Chikuda, (他 3 名, 3 番目). Morphological characteristics of cervical spine in patients with athetoid cerebral palsy and the accuracy of pedicle screw placement. Spine (Phila Pa 1976). 2014 Apr 15;39(8):E508-13. (査読有)
DOI: 10.1097/BRS.0000000000000234.

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
特記事項なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

筑田 博隆 (CHIKUDA, Hiroataka)
東京大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号： 3 0 3 4 5 2 1 9

(2) 研究分担者

山神 良太 (YAMAGAMI, Ryota)
東京大学・医学部附属病院・登録診療員
研究者番号： 0 0 7 2 2 1 9 1

武富 修治 (TAKETOMI, Shuji)
東京大学・医学部附属病院・講師
研究者番号： 7 0 5 7 0 0 1 8