

平成 22 年 4 月 10 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2009

課題番号：19591770

研究課題名（和文） 関節軟骨移植の力学的環境に関する研究

研究課題名（英文） Mechanical stress loaded on articular cartilage explant

研究代表者

福田 寛二（FUKUDA KANJI）

近畿大学・医学部・教授

研究者番号：50201744

研究成果の概要（和文）：関節軟骨移植（ACI）は運動器疾患に対する代表的な再生医療である。本研究では、ACI の力学的環境に関する検討を行なった。培養軟骨片への圧迫負荷により、プロテオグリカン（PG）合成の抑制と活性酸素量の増加を認めた。そこで、酸化ストレスの緩和を目的にヒアルロン酸（HA）の添加を検討した。HA は活性酸素を抑制し、PG 産生量を回復させた。このことから、ACI の環境改善における HA 投与の有用性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：**Introduction:** To repair the articular cartilage defect, cartilage explant is useful method. The key leading to the success of this regenerative medicine is to regulate the mechanical stress loaded on articular cartilage explant. Intraarticular hyaluronan (HA) injection is an effective treatment for cartilage degeneration. The purpose of this study is to determine the effect of mechanical stress loaded on the cartilage explant and possible usefulness of HA in this system.

**Methods:** Mechanical compression was loaded on the bovine cartilage using the Biopress system. Proteoglycan (PG) and reactive oxygen species (ROS) synthesis were measured with [<sup>35</sup>S] incorporation and fluorescent dye, respectively. Accumulation of peroxynitrite was determined with western blotting using nitrotyrosine antibody.

**Results:** Mechanical compression inhibited PG synthesis and enhanced ROS. Externally added HA reversed stress-inhibited PG synthesis and attenuated ROS synthesis. HA also significantly decreased the expression of nitrotyrosine.

**Conclusions:** Mechanical stress is essential factor to degradate the explanted cartilage and ROS play an important role. HA neutralized stress-enhanced ROS synthesis and resulted in the reverse of PG synthesis. These data suggest that HA plays anabolic effect as an antioxidant.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	3,300,000	990,000	4,290,000
2008年度	200,000	60,000	260,000
2009年度	200,000	60,000	260,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

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：軟骨・ストレス・活性酸素

1. 研究開始当初の背景

軟骨欠損や変性軟骨に対する軟骨移植は、運動器疾患に対する代表的な再生医療である。近年種々の方法による軟骨移植が試みられてきた。これらはコラーゲンゲルなどのscaffoldの開発や、移植片の縫着などの技術面への検討が主であった。しかし、実際の臨床現場で問題とされる移植母床とは荷重部における大きな軟骨欠損である。このような場所では、移植軟骨が大きな機械的ストレスを受け、これが軟骨の脱分化や線維化、最終的には脱落といった軟骨再生の阻害へと導かれるものと考えられる。したがって、この機械的ストレスによる軟骨代謝の変化を検討することは、軟骨再生を促進させる環境を考える上で、重要な課題である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、この荷重部に移植された軟骨の機械的ストレスに対する応答を検討することである。福田はこれまでに活性酸素と軟骨変性の関連を検討してきた。そこで、本研究でも軟骨移植部でその生着を阻害する因子としての活性酸素の関与に注目し、機械的ストレスによる活性酸素の変動を検討することとした。

3. 研究の方法

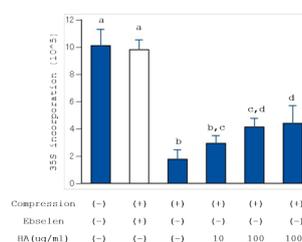
ウシの関節軟骨を前足部 MP 関節より無菌的に採取した。この軟骨を FX-4000C™専用の各ウェルに1個入れ圧迫を加えた。このシステムは本科研により購入した機材である。具体的にはコンピューター制御の空気圧にてシリコンの膜を押し上げ、検体にピストンとプレート (Biopress™ culture plates) 間で任意の圧力と周期の圧迫を加えるシステムである (Flexcell International, Hillsborough, NC)。プロテオグリカン合成能は<sup>35</sup>S]硫酸で評価した。活性酸素の測定には蛍光色素 (H2DCFDA) を使用した。ニトロチロシンは、生体内タンパク質のチロシン残基がニトロ化されたものであり、活性酸素の

中でも NO の産生と関連する。活性酸素の組織学的証明として、抗ニトロチロシン抗体を利用した免疫組織化学、およびウェスタンブロッティングを行なった。

4. 研究成果

圧迫負荷により軟骨のプロテオグリカン合成は明らかに抑制された。抗酸化薬 (ebselen) は圧迫負荷によって生じたプロテオグリカン合成抑制を回復させた。したがって、圧迫負荷によって生じるプロテオグリカン合成抑制には活性酸素が関与していることが示唆された。このことは関節軟骨移植の力学的環境として活性酸素の調節が重要であることを示している。

ヒアルロン酸の関節内注入療法は現在臨床で広く行なわれている変形性関節症に対する治療法である。軟骨移植症例への応用も考えられることより、圧迫負荷に対するヒアルロン酸の作用をこの実験系を用いて検討した。ヒアルロン酸は圧迫負荷によって生じるプロテオグリカン合成抑制を濃度依存性に回復させた。

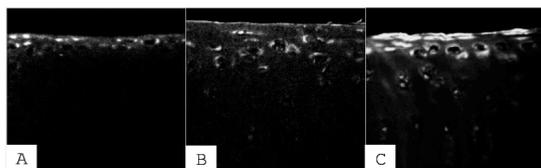


プロテオグリカン合成能。ウシ関節軟骨に圧迫負荷 (2MPa, 0.5Hz) を24時間加えた。抗酸化薬 (ebselen, 100 μM) ・ヒアルロン酸を同時に添加した。p<0.01, a-d; Tukey-Kramer multiple comparison test and Dunnett test.

このことは、ヒアルロン酸が圧迫負荷によって発生した活性酸素を中和している可能

性を示唆している。我々は既にヒアルロン酸が分子サイズに依存して抗酸化作用を発揮することを報告した。そこで、同様の条件で培養液中の活性酸素を計測した。圧迫負荷は活性酸素を明らかに増加させ、これは抗酸化薬により中和された。ヒアルロン酸は圧迫負荷によって増加した活性酸素を濃度依存性に抑制した。

しかしながら、外因性に添加したヒアルロン酸が軟骨細胞周囲に進入し、機械的負荷という条件下で長時間その作用を有するかの疑問がある。蛍光標識を行なったヒアルロン酸を軟骨片に添加して、その分布の変化を検討した。機械的負荷のない条件では、ヒアルロン酸は軟骨表面にとどまり、内部に進入しない。機械的負荷によりヒアルロン酸は軟骨に進入し、細胞外周囲に再分布した。12時間の機械的負荷によってもヒアルロン酸の分布に変化がなかった。したがって、外因性に添加したヒアルロン酸が *in situ* において軟骨保護作用を発揮したことが示唆された。



蛍光標識ヒアルロン酸の軟骨内への進入。対照では、ヒアルロン酸(1%)は軟骨表面にとどまり内部に進入しない (A)。機械的負荷によりヒアルロン酸は軟骨深部に進入し、細胞外周囲に再分布した (B)。12時間の機械的負荷によってもヒアルロン酸の分布に変化がなかった (C)。

我々は、活性酸素によるプロテオグリカン合成抑制にパーオキシナイトライトが関与することを証明した。ニトロチロシンはパーオキシナイトライト (ONOO<sup>-</sup>) がアミノ酸のチロシン残基をニトロ化することにより生成される。抗ニトロチロシン抗体を使用した免疫染色を行なうと、圧迫負荷によってニトロチロシンの染色性が亢進することが明らかにされた。ヒアルロン酸添加はニトロチロシンの染色性を低下させた。以上の結果は、機械的ストレスは活性酸素を増加させ、パーオキシナイトライトの発現を亢進させたことを示している。ヒアルロン酸は活性酸素を中和することにより、パーオキシナイトライトの産生を低下させたものと思われる。

ニトロチロシンは酸化ストレスの組織学的指標であり、関節軟骨におけるニトロチロシンの染色性が加齢とともに増加することが報告されている。これが増殖因子に対する反応性低下の原因になっており、酸化ストレスが MAP kinase をはじめとする細胞内情報伝達機構に影響を与えることも報告されている。さらに、軟骨細胞に対する酸化ストレスが細胞老化を引き起こし、老化のマーカーを増幅させることも示されている。

したがって、ヒアルロン酸は活性酸素の調節作用を有することより、関節軟骨移植の際

に有用な薬剤となる可能性が示唆された。

現在は、以上の結果をふまえて再生医療としての細胞材料開発に着手している。

## 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9件)

1. Teramura, T, Onodera, Y, Mihara, T, (他3名, 6番目): Induction of mesenchymal progenitor cells with chondrogenic property from mouse induced pluripotent stem cells. Cellular Reprogramming, 2010 (in press). (査読: 有)
2. Onodera, Y, Teramura, T, Ozawa, M, (他7名, 10番目): Differentiation diversity of mouse parthenogenetic embryonic stem cells in chimeric mice. Theriogenology, 2010 (in press). (査読: 有)
3. Miki, Y, Teramura, T, Tomiyama, T, (他4名, 2番目): Hyaluronan reversed proteoglycan synthesis inhibited by mechanical stress: possible involvement of antioxidant effect. Inflamm Res, 2009 (in press). (査読: 有)
4. Takehara, T, Teramura, T, Onodera, Y, (他6名, 2番目): Potential existence of stem cells with multiple differentiation abilities to three different germ lineages in mouse neurospheres. Stem Cells Dev 18:1433-1440, 2009. (査読: 有)
5. Teramura, T, Onodera, T, Murakami, T, (他12名, 1番目): Mouse androgenetic embryonic stem cells differentiated to multiple cell lineages in three embryonic germ layers *in vitro*. J Reprod Dev 55:283-292, 2009. (査読: 有)
6. Takehara, T, Teramura, T, Onodera, Y, (他7名, 2番目): Rho-associated kinase inhibitor Y-27632 promotes survival of cynomolgus monkey embryonic stem cells. Mol Hum Reprod 14:627-634, 2008. (査読: 有)
7. Kakegawa, R, Teramura, T, Takehara, T, (他8名, 2番目): Isolation and culture of rabbit primordial germ cells. J Reprod Dev 54:352-357, 2008. (査読: 有)
8. Teramura, T, Fukuda, K, Kurashimo, S, (他5名, 1番目, 2番目): Isolation and characterization of side

population stem cells in articular synovial tissue. BMC Musculoskeletal Disord 9:86, 2008. (査読：有)

9. Tomiyama, T, Fukuda, K, Yamazaki, K, (他 5 名, 2 番目) : Cyclic compression loaded on cartilage explants enhances the production of reactive oxygen species. J Rheumatol 34:556-562, 2007. (査読：有)

[学会発表] (計 1 件)

1. 寺村岳士. 多能性幹細胞からの軟骨細胞分化誘導とウサギを用いた移植モデルの開発 (シンポジウム). 日本整形外科学会基礎学術集会. 平成 21 年 11 月 5 日. パシフィコ横浜.

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

名称：間葉系幹細胞または軟骨細胞の製法ならびに発癌性の抑制方法.

発明者：寺村岳士、福田寛二、小野寺勇太.

権利者：学校法人 近畿大学

種類：特願

番号：2009-164182

出願年月日：平成 21 年 7 月 10 日

国内外の別：国外

名称：滑膜組織由来の幹細胞および細胞株ならびにその濃縮培養方法

発明者：寺村岳士、福田寛二、朝田滋貴.

権利者：学校法人 近畿大学

種類：特開

番号：2009-55866 (P2009-5586A)

出願年月日：平成 19 年 8 月 31 日

国内外の別：国外

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

福田 寛二 (FUKUDA KANJI)

近畿大学・医学部・教授

研究者番号：50201744

### (2) 研究分担者

大谷 和裕 (OTANI KAZUHIRO)

近畿大学・医学部・講師

研究者番号：20258031

野中 藤吾 (NONAKA TOGO)

近畿大学・医学部・講師

研究者番号：70268407

朝田 滋貴 (ASADA SHIGEKI)

近畿大学・医学部・講師

研究者番号：00330283

西坂 文章 (NISHISAKA FUMIAKI)

近畿大学・医学部・講師

研究者番号：80330314

寺村 岳士 (TERAMURA TAKESHI)

近畿大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40460901

(3) 連携研究者 ( )

研究者番号：