

機関番号：15301

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20791040

研究課題名 (和文) 膝関節靭帯損傷に対する遺伝子導入法を応用した靭帯組織再生

研究課題名 (英文) Gene therapy in the treatment of ligament injury

研究代表者

古松 毅之 (FURUMATSU TAKAYUKI)

岡山大学・岡山大学病院・助教

研究者番号：20432651

研究成果の概要 (和文)：

成熟家兔内側側副靭帯 (MCL) 損傷モデルに対し、bFGF, GDF-5, Puramatrix を投与することで、靭帯修復を促進することが可能であった。この結果は、靭帯組織の良好なリモデリング過程において bFGF, GDF-5, かつ細胞増殖・遊走のための足場が重要であることを示唆している。また、MCL 損傷に対する Scleraxis 遺伝子導入は、I 型 collagen の発現を増強した。本研究において、靭帯損傷に対する in vivo 遺伝子導入を用いた新しい治療法の可能性が示唆された。

研究成果の概要 (英文)：

In our studies, combined treatment of bFGF, GDF-5, and peptide hydrogels stimulates the healing of rabbit MCL injury model. In addition, bFGF and GDF-5 play important roles in cellular migration and matrix synthesis of ligament-derived cells.

Scleraxis gene transduction using in vivo electroporation and sonoporation enhances the expression of type I collagen gene. Our results suggest that in vivo gene therapy might be a good candidate for the treatment of ligament injury.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2008年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1,690,000 |
| 2009年度 | 900,000 | 270,000 | 1,170,000 |
| 2010年度 | 900,000 | 270,000 | 1,170,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,100,000 | 930,000 | 4,030,000 |

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：靭帯組織再生、膝関節靭帯損傷、前十字靭帯 (ACL)、内側側副靭帯 (MCL)

遺伝子導入、Scleraxis、Sox9

1. 研究開始当初の背景

近年、整形外科学分野において、前十字靭帯

(ACL) 断裂に対する内視鏡的治療法は、世界に誇るべき日本の技術として飛躍的な進

歩を遂げてきた。しかし、断裂した ACL を早期に直接修復することは困難であるとされ、数週間後に自家筋腱を採取して膝関節鏡視下に ACL を再建する方法が一般的である。また、発生頻度の高い内側側副靭帯 (MCL) 損傷に対しては、自然治癒力に期待した保存的治療の域を出ず、一部の重症例や ACL 損傷合併例では治療に難渋する。このような臨床的背景を踏まえ、申請者は、靭帯組織を再生することにより、膝関節靭帯損傷における治療期間の短縮と自家筋腱を犠牲にしない治療法を実現することが可能になるものと考えた。

2. 研究の目的

基礎研究の分野においても、靭帯組織再生に着目したものはなく、本研究は先駆的かつ独創的な研究と位置付けられる。腱および靭帯組織に特異的な転写因子としては Scleraxis が知られているが、その機能解析はほとんどなされていない。一方で、靭帯組織への分化調節機構に、Scleraxis と軟骨細胞分化の主要転写因子である Sry-type HMG box 9 (Sox9) のバランスが関与することが示唆されており、靭帯再生には両転写因子を制御することが重要であると考えられる。また、Scleraxis による転写活性を増幅するためには、E47 と複合体を形成することが必要であると報告されている。これまでに申請者は、間葉系幹細胞を用い、Sox9 転写複合体による軟骨細胞分化制御機構および転写調節機構を検討してきた。これらの研究から、軟骨細胞分化誘導においては、主要転写因子とされる Sox9 だけでなく、その周辺因子のはたらきが重要であることが判明した。以上の研究より、靭帯細胞分化誘導においても主要転写因子 Scleraxis を中心とした転写複合体の重要性

が示唆される。

そこで申請者は、Scleraxis 転写複合体の解析を進めるとともに、Scleraxis を *in vivo* electroporation 法を用いて ACL・MCL に遺伝子導入し、靭帯組織再生を励起することを計画した。本研究は、遺伝子治療と靭帯組織再生を融合した先駆的な研究であり、靭帯細胞分化における Scleraxis 転写複合体の機能解析を進めることで、膝関節靭帯損傷に対する新たな治療法を提案することが可能であると考えられる。

3. 研究の方法

「Scleraxis 転写複合体による靭帯細胞分化調節機構の解明」

本研究では、NIH3T3 もしくは HEK293 細胞に Scleraxis と Smad1/5 を co-transfection し、IP を用いて複合体形成能を検討する。同様に、co-activator として多彩な機能を発揮する p300 と Scleraxis の結合も評価する。また、Scleraxis の各種 deletion mutant を作製し、Smad や p300 との結合領域を IP により解明する。Scleraxis の DNA 結合能については、EMSA および ChIP により検討する。Scleraxis 転写複合体による COL1A1 転写活性への影響を、luciferase assay、RT-PCR を用いて検討する。

「ACL・MCL の分子生物学的特徴と Scleraxis 導入による影響」

GDF5/7 などの成長因子に対する ACL・MCL 培養細胞の反応性を proliferation assay および migration assay にて検討する。また、Scleraxis をはじめとする転写複合体の強制発現による靭帯細胞増殖効率の変化や、Colla1 および Col3a1 遺伝子発現への影響を検討する。また、*in vivo* electroporation

による MCL への Scleraxis 導入効率を検討するとともに、細胞活性と遺伝子発現の変化を解析する。

4. 研究成果

家兎 MCL 損傷モデルに対し、bFGF, GDF-5, ペプチドハイドロゲルを投与することで、靭帯修復を促進することが可能であった。この結果は、靭帯組織の良好なリモデリング過程において bFGF, GDF-5, かつ細胞増殖・遊走のための足場が重要であることを示唆している。これまでに研究代表者は、MCL 損傷に対する Scleraxis 遺伝子導入が I 型 collagen の発現を増強し、靭帯修復を促進する可能性を報告した。さらに、これらのはたらきにはメカニカルな刺激が関与していることを明らかにした。

ACL-骨軟骨接合部において特異的な CTGF 発現が認められるとともに、周期的伸張刺激により ACL interface 細胞における CTGF 発現の増強されることから、ACL-骨軟骨接合部において CTGF が局所的に重要なはたらきを担っている可能性が示唆された。

「研究目標の達成度」

本研究において、靭帯実質部損傷の修復促進には、bFGF および GDF-5 の組み合わせが有効であり、靭帯-骨軟骨接合部損傷の修復には、CTGF およびメカニカルストレスが重要な役割を担うことが明らかとなった。これらの結果は、当初の研究目標を上回る研究成果であり、靭帯修復促進を目指した遺伝子治療に併用可能な技術であると考えられる。

「研究成果の学術的意義・発展性・貢献度」

靭帯組織への遺伝子導入、成長因子投与、および機械的刺激による靭帯修復効果をも

れぞれ明らかにした。また、本研究により、靭帯損傷修復への新しい治療法が開発される可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 10 件)

1. Furumatsu T, Asahara H. Histone acetylation influences the activity of Sox9-related transcriptional complex. *Acta Med Okayama* 2010, 64, 351-357.
2. Saiga K, Furumatsu T, Yoshida A, Masuda S, Takihira S, Abe N, Ozaki T. Combined use of bFGF and GDF-5 enhances the healing of medial collateral ligament injury. *Biochem Biophys Res Commun* 2010 402, 329-334.
3. Furumatsu T, Ozaki T. Epigenetic regulation in chondrogenesis. *Acta Med Okayama* 2010, 64, 155-161.
4. Furumatsu T, Hachioji M, Saiga K, Takata N, Yokoyama Y, Ozaki T. Anterior cruciate ligament-derived cells have high chondrogenic potential. *Biochem Biophys Res Commun* 391, 1142-1147, 2010.
5. Furumatsu T, Shukunami C, Amemiya-Kudo M, Shimano H, Ozaki T. Scleraxis and E47 cooperatively regulate the Sox9-dependent transcription. *Int J Biochem Cell Biol* 42, 148-156, 2010.
6. Date H, Furumatsu T, Sakoma Y, Yoshida A, Hayashi Y, Abe N, Ozaki T. GDF-5/7 and bFGF activate integrin $\alpha 2$ -mediated cellular migration in rabbit ligament fibroblasts. *J Orthop Res* 28, 225-231, 2010.
7. 古松毅之、尾崎敏文、浅原弘嗣. TGF- β -Smad3経路と転写因子Sox9による

軟骨細胞分化調節. 岡山医学会雑誌

Journal of Okayama Medical Association
2010, 122, 95-99.

8. Tetsunaga T, Furumatsu T, Abe N, Nishida K, Naruse K, Ozaki T. Mechanical stretch stimulates integrin α V β 3-mediated collagen expression in human anterior cruciate ligament cells. J Biomech 42, 2097-2103, 2009
9. Furumatsu T, Ozaki T, Asahara H. (2009) Smad3 activates the Sox9-dependent transcription on chromatin. Int J Biochem Cell Biol 41, 1198-1204.
10. 古松毅之, 迫間巧将, 伊達宏和, 阿部信寛, 尾崎敏文. 前十字靭帯-骨軟骨接合部におけるScleraxisとSox9の役割-遺伝子導入による靭帯断裂部修復を目指して- 膝 33, 7-10, 2008

[学会発表] (計31件)

1. 古松毅之, 高田直樹, 横山裕介, 金澤智子, 阿部信寛, 尾崎敏文. 前十字靭帯細胞における軟骨細胞分化能の検討 日本軟骨代謝学会 福岡市 2011/3/4-5
2. Furumatsu T, Saiga K, Takata N, Yokoyama Y, Abe, N, Ozaki T. Anterior cruciate ligament-derived cells have high chondrogenic potential. ORS 2011/1/13-16 Long Beach, USA.
3. Saiga K, Furumatsu T, Yoshida A, Masuda S, Takihira S, Ozaki T. Combined use of bFGF and GDF-5 enhances the healing of medial collateral ligament injury. ORS 2011/1/13-16 Long Beach, USA.
4. Miyake Y, Furumatsu T, Kubota S, Takigawa M, Ozaki T. Cyclic tensile strain stimulates CTGF/CCN2 expression in human anterior cruciate

ligament-derived cells. ORS
2011/1/13-16 Long Beach, USA.

5. 古松毅之, 尾崎敏文. Sox9, Scleraxis, E47 による軟骨細胞分化制御 日整会基礎 京都市 2010/10/14-15
6. 高田直樹, 古松毅之, 永井祐介, 鉄永智紀, 横山裕介, 阿部信寛, 成瀬恵治, 尾崎敏文. ヒト前十字靭帯細胞における3次元培養下メカニカルストレスの影響 日整会基礎 京都市 2010/10/14-15
7. 三宅由晃, 古松毅之, 久保田聡, 青山絵理子, 滝川正春, 尾崎敏文. ヒト前十字靭帯細胞におけるCTGF/CCN2の発現と周期的伸張刺激付加の効果 日整会基礎 京都市 2010/10/14-15
8. 雑賀建多, 古松毅之, 吉田晶, 増田真, 梶平将太, 阿部信寛, 尾崎敏文. bFGF/GDF-5含有ペプチドハイドロゲルは膝内側側副靭帯損傷の修復を促進する 日本運動器移植・再生医学研究会 京都市 2010/9/25
9. 三宅由晃, 古松毅之, 久保田聡, 青山絵理子, 滝川正春, 尾崎敏文. 前十字靭帯細胞におけるCTGF/CCN2の発現と周期的伸張刺激付加の効果 機能再生・再建科学専攻系ミニシンポジウム 岡山市 2010/8/24
10. 古松毅之, 宿南知佐, 雨宮三千代, 島野仁, 尾崎敏文. Scleraxis-E47複合体Sox9を介した軟骨細胞分化調節機構の解明 日本結合組織学会 秋田市 2010/8/19-20
11. 三宅由晃, 古松毅之, 久保田聡, 青山絵理子, 滝川正春, 尾崎敏文. 前十字靭帯細胞におけるCTGF/CCN2の発現と周期的伸張刺激付加の効果 日本結合組織学会 秋田市 2010/8/19-20
12. 雑賀建多, 古松毅之, 吉田晶, 増田真,

- 梶平将太, 阿部信寛, 尾崎敏文.
bFGF/GDF-5 含有ハイドロゲルは膝内側側副靭帯損傷の修復を促進する 日本結合組織学会 秋田市 2010/8/19-20
13. 古松毅之. 軟骨細胞分化とクロマチン人工関節の機能高度化研究会 岡山市 2010/07/24
14. 古松毅之. Smad3 による Sox9 を介したエピジェネティックな軟骨細胞分化調節機構. 岡山医学会総会 岡山市 2010/6/5
15. 古松毅之, 宿南知佐, 雨宮三千代, 島野仁, 尾崎敏文. Scleraxis と E47 による軟骨細胞分化調節 日本軟骨代謝学会 鹿児島市 2010/4/2-3
16. 三宅由晃, 古松毅之, 久保田聡, 青山絵理子, 滝川正春, 尾崎敏文. 前十字靭帯細胞における CTGF/CCN2 の発現 日本軟骨代謝学会 鹿児島市 2010/4/2-3
17. Furumatsu T, Abe N, Asahara H, Ozaki T. Scleraxis and E47 cooperatively regulate the Sox9-dependent transcription. ORS 2010/3/6-9. New Orleans, USA.
18. Tetsunaga T, Furumatsu T, Abe N, Nishida K, Naruse K, Takata N, Ozaki T. Mechanical stretch stimulates integrin α V β 3-mediated collagen expression in human anterior cruciate ligament cells. ORS 2010/3/6-9. New Orleans, USA.
19. Date H, Furumatsu T, Sakoma Y, Yoshida A, Hayashi Y, Abe N, Ozaki T. GDF-5/7 and bFGF Activate Integrin α 2-mediated Cellular Migration in Rabbit Ligament Fibroblasts. ORS 2010/3/6-9. New Orleans, USA.
20. 古松毅之, 尾崎敏文, 浅原弘嗣. TGF- β -Smad3 経路による軟骨細胞分化調節とクロマチンリモデリング 日本整形外科学会基礎学術集会 横浜市 2009/11/5-6
21. 伊達宏和, 古松毅之, 迫間巧将, 雑賀建多, 横山裕介, 高田直樹, 阿部信寛, 尾崎敏文. GDF-5 と bFGF は家兎靭帯細胞の α 2 integrin を介した細胞遊走能を活性化する 日本整形外科学会基礎学術集会 横浜市 2009/11/5-6
22. 雑賀建多, 古松毅之, 梶平将太, 伊達宏和, 阿部信寛, 尾崎敏文. MCL の bFGF と GDF-5 に対する反応 in vivo および in vitro における検討 日本整形外科学会基礎学術集会 横浜市 2009/11/5-6
23. 鉄永智紀, 古松毅之, 阿部信寛, 尾崎敏文. 前十字靭帯一骨軟骨接合部における細胞生物学的特徴 メカニカルストレスによる細胞接着と collagen 発現変化の検討 日本整形外科学会基礎学術集会 横浜市 2009/11/5-6
24. 古松毅之, 尾崎敏文, 浅原弘嗣. TGF- β -Smad3 経路によるエピジェネティックな軟骨細胞分化調節とクロマチンリモデリング 中部日本整形外科災害外科学会 神戸市 2009/10/2-3
25. 鉄永智紀, 古松毅之, 阿部信寛, 尾崎敏文. 前十字靭帯一骨軟骨接合部における細胞生物学的特徴—メカニカルストレスによる細胞接着と collagen 発現の変化 2009/6/25-27 JOSKAS 札幌市
26. 古松毅之, 尾崎敏文, 浅原弘嗣. Sox9 と Smad3 によるクロマチンからの転写制御機構の解明 2009/3/6-7 日本軟骨代謝学会 名古屋市
27. Furumatsu T, Ozaki T, Asahara H. Smad3 activates the Sox9-dependent transcription on chromatin. ORS 2009/2/22-25. Las Vegas, USA.

28. 古松毅之 靱帯組織修復・再生を目指して 岡山大学大学院機能再生・再建科学専攻ミニシンポジウム 2008/12/16 岡山市
29. 古松毅之、迫間巧将、吉田晶、伊達宏和、鉄永智紀、雑賀建多、阿部信寛、宿南知佐、雨宮三千代、島野仁、尾崎敏文 Scleraxis と Sox9 による軟骨細胞分化調節 日本整形外科学会基礎学術集会 京都市 2008/10/23-24
30. 伊達宏和, 林優子, 迫間巧将, 八王子元美, 吉田晶, 阿部信寛, 尾崎敏文, 古松毅之. ACL 及び MCL 細胞の各種成長因子に対する細胞増殖能, 遊走能の検討 日本整形外科学会基礎学術集会 京都市 2008/10/23-24
31. 古松毅之、伊達宏和、迫間巧将、雑賀建多、阿部信寛、尾崎敏文. 前十字靱帯細胞における軟骨細胞分化能 JOSKAS 2008/6/13-14 東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古松 毅之 (FURUMATSU TAKAYUKI)
岡山大学・岡山大学病院・助教
研究者番号：20432651

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし

