

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20791493  
 研究課題名 (和文) 再生軟骨周囲に高発現するペリオスチンの機能解析と軟骨再生医療への応用  
 研究課題名 (英文) Biological functions of periostin expressed in tissue-engineered cartilage and its application for cartilage regeneration.  
 研究代表者  
 藤原 夕子 (FUJIHARA YUKO)  
 東京大学・医学部附属病院・特任助教  
 研究者番号：50466744

研究成果の概要 (和文)：再生軟骨周囲の軟骨膜様線維組織に高発現しているペリオスチンに関して、軟骨細胞や再生軟骨組織に対する生物学的作用を検討した。ペリオスチンは、ヒト耳介軟骨細胞への増殖効果は示さなかったが、3次元包埋培養された軟骨細胞の分化誘導を促す傾向を示した。また、ペリオスチンノックアウトマウス由来の耳介軟骨細胞とポリ乳酸足場素材で構築される再生軟骨組織を、野生型マウスへ同系移植したところ、基質産生の低下が観察されたことから、ペリオスチンが軟骨再生に促進的に作用する可能性が示唆された。

研究成果の概要 (英文)：In this study, biological functions of periostin, which was expressed in surrounding areas of tissue-engineered cartilage, was investigated to clarify its effects on chondrocytes and tissue-engineered cartilage. While periostin did not induce proliferation in human auricular chondrocytes cultured in monolayer, it increased the expression of type II collagen in chondrocytes embedded in 1% atelocollagen gel. Furthermore, when tissue-engineered cartilage, which consisted of chondrocytes of periostin knockout mice and PLLA, were syngeneically transplanted in the back of wild type mice, the constructs demonstrated reduced accumulation of proteoglycan, suggesting periostin possibly promoted the maturation of tissue-engineered cartilage constructs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000円
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000円
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：再生医療、軟骨再生、移植、ペリオスチン

## 1. 研究開始当初の背景

軟骨再生医療は、再生医療の中でも比較的臨床応用が進んでいる領域で、口腔・顎顔面領域では隆鼻シリコンインプラント再置換やオトガイ形成に対し、患者自身の軟骨組織を分離・増殖させた軟骨細胞を移植する方法が臨床応用されている (Yanaga et al *Plast Reconstr Surg* 2006)。この治療法では、生体外で軟骨細胞を増殖培養した後、得られた細胞を生体内の欠損部へ移植するという方式が採られている。その際、組織から単離・培養された軟骨細胞は、増殖培養中に軟骨特性を失って脱分化するため基質産生能を喪失するが (von der Mark et al. *Nature* 1997)、生体内に移植されると再び活性化され (再分化)、基質産生を再開することが知られている。現行の軟骨再生医療は、脱分化した軟骨細胞が生体内では自然と再分化する現象を活用して軟骨再建を行うものであるが、その分子機構の詳細は不明である。

われわれのこれまでの検討で、純系マウス C57BL/6J の耳介軟骨から単離・培養した軟骨細胞に、アテロコラーゲンゲルとポリ乳酸 (PLLA) 多孔体を併用して作製した再生軟骨を背部皮下へ同系移植したところ、再生軟骨の周囲に軟骨膜様線維組織が形成されていることが観察された。生理的環境下において、軟骨膜が血行維持、物質交換や軟骨細胞のターンオーバーに関与し、軟骨組織の恒常性維持に欠かせない機能を担っていることを鑑みると、再生軟骨周囲に認められた軟骨膜様線維組織も、生理的軟骨膜と同様、軟骨細胞の分化や増殖を誘導している可能性が推測される。生理的軟骨膜に発現している因子 (ペリオスチン、OB-cadherin、Indian hedgehog など) の軟骨膜様組織における発現を免疫組織化学的に検討したところ、ペリオスチンの局在が確認された。

## 2. 研究の目的

近年、心筋における細胞増殖や組織構築での重要性が指摘されているペリオスチンに焦点を当て、軟骨細胞や再生軟骨に対する増殖・分化能を検証し、新しい軟骨再生技術の確立に反映させていくことを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) マウス軟骨再生モデルにおける組織形成の経時的観察とペリオスチンの発現・局在解析

純系マウス C57BL/6J の耳介軟骨から単離・培養した軟骨細胞とアテロコラーゲンゲルを混和して、ポリ乳酸 (PLLA) 多孔体に播

種して再生軟骨を作製し、同系マウス皮下へ移植した。再生軟骨およびその周囲組織を経時的に採取し、組織学的観察 (HE 染色、トルイジンブルー染色)、免疫組織化学的観察 (I, II 型コラーゲン、ペリオスチン) を行い、マウス軟骨再生モデルにおける組織形成の経時的变化、ならびにペリオスチンの発現・局在変化を追跡した。

(2) ペリオスチンによるマウス培養軟骨細胞に対する支持機能の解析

軟骨膜様線維組織に発現するペリオスチンの軟骨細胞に対する支持機能を評価するため、ヒト耳介軟骨細胞の平面増殖培養においてペリオスチンを添加し、細胞増殖や軟骨分化に関する検討を行った。軟骨分化に関しては II 型コラーゲン、アグリカンなどの発現を検討した。また、ペリオスチンが細胞外基質であることを考慮し、ペリオスチンを表面コートした培養皿上で軟骨細胞を培養し、同様の評価を行った。

(3) 線維芽細胞との共培養系における軟骨細胞増殖・分化の検討

耳介軟骨細胞と線維芽細胞の相互作用を検討するため、マウス皮膚由来線維芽細胞とヒト耳介軟骨細胞を 20:0、10:10、0:20 の割合で 1%アテロコラーゲンゲルに混和し、ペレットを作製した ( $2 \times 10^5$  cells/ペレット)。軟骨分化誘導培地 (Liu, Hsohi et al. 2007 *J Biol Chem*) を 2 mL 加えて 1 週間培養し、ヒトおよびマウスそれぞれに特有なプライマーを用いて、線維芽細胞および軟骨細胞における I, II 型コラーゲンの発現を検討した。

(4) ペリオスチンノックアウトマウスを用いた再生軟骨移植における機能検討

ペリオスチンノックアウトマウス (KO) および野生型マウス (WT) から耳介軟骨細胞を採取し、増殖能をセルカウントで検討した。次に、(1) 項に準じて KO および WT マウスの耳介軟骨細胞を PLLA 足場素材へ播種して再生軟骨組織を作製し、同系移植を行った。移植後 2, 8 週で周囲組織を含めて再生軟骨組織を回収し、(1) 項に準じて評価を行った。

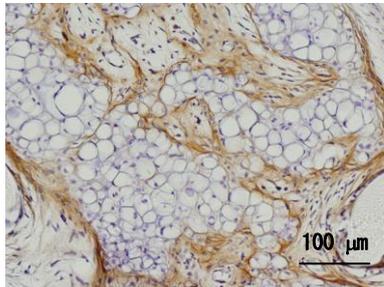
## 4. 研究成果

(1) マウス軟骨再生モデルにおける組織形成の経時的観察とペリオスチンの発現・局在解析

C57BL/6J マウス耳介軟骨細胞とポリ乳酸 (PLLA) 足場素材を用いて作製した再生軟骨を同系マウス皮下へ移植し、経時的に摘出した再生組織を組織学的に観察した。その結果、移植後 2 週から 8 週にかけてトルイジンブルー染色でのメタクロマジーが増加し、再生軟

骨組織の成熟が進むことが示された。また、ペリオスチンの発現を免疫組織化学的に検討したところ、再生軟骨周囲の軟骨膜様組織に発現していることが観察された (図 1)。

図 1 再生軟骨組織におけるペリオスチンの局在 (8 wks)



(2) ペリオスチンによるマウス培養軟骨細胞に対する支持機能の解析

ヒト耳介軟骨細胞の平面培養にペリオスチンを添加した場合には、細胞増殖に対する作用は認められなかった。同様に、ペリオスチンコート培養皿での培養時にも軟骨細胞の増殖効果は認められなかった (図 2)。

一方、アテロコラーゲン 3 次元包埋培養では、ペリオスチン添加により軟骨細胞における II 型コラーゲンの発現上昇が認められ、ペリオスチンの軟骨細胞分化制御への関与が示唆された (図 3)。

図 2 ペリオスチンコート培養皿でのヒト耳介軟骨細胞の増殖

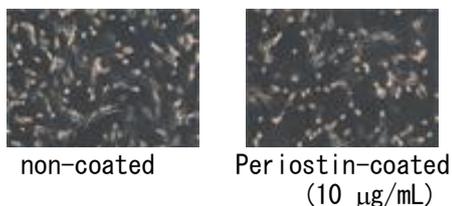
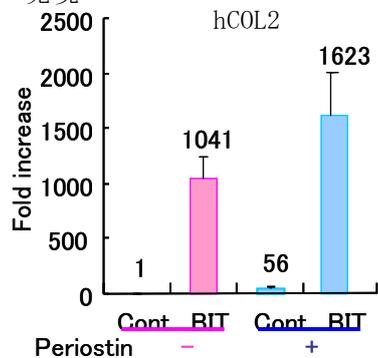


図 3 ヒト耳介軟骨細胞における hCOL2 の発現

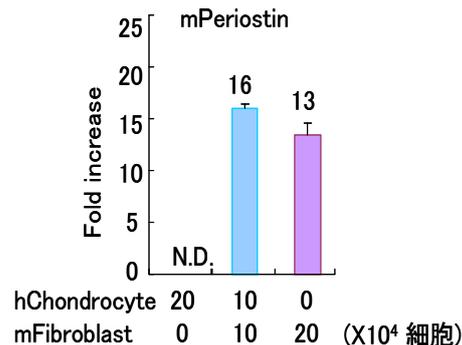


Cont: コントロール培地  
BIT: 軟骨分化誘導培地

(3) 線維芽細胞との共培養系における軟骨細胞増殖・分化の検討

軟骨細胞と線維芽細胞の相互作用を検討するため、マウス皮膚由来線維芽細胞とヒト耳介軟骨細胞の co-culture を行った。軟骨細胞との 3 次元包埋培養により、線維芽細胞におけるペリオスチンの発現が上昇することが示された (図 4)。

図 4 線維芽細胞におけるペリオスチンの発現



(4) ペリオスチンノックアウトマウスを用いた再生軟骨移植における機能検討

ペリオスチンノックアウトマウス (KO) および野生型マウス (WT) から耳介軟骨細胞を採取し、増殖能を比較した。その結果、KO と WT マウスの培養軟骨細胞で、増殖能に差は認められなかった。次に、軟骨細胞をそれぞれ PLLA 足場素材へ播種して再生軟骨組織を作製し、WT および KO マウス背部皮下へ同系移植を行った。KO の再生軟骨組織を KO マウスへ移植した場合と WT の再生軟骨組織を WT マウスへ移植した場合では、移植後 8 週のトリジンブルー染色で強いメタクロマジーを示す再生軟骨組織が観察された。WT の再生軟骨組織を KO マウスへ移植した場合には、更に広汎な軟骨再生が観察された一方、KO の再生軟骨組織を WT マウスへ移植した場合には、軟骨再生は著しく抑制された。このことから、ペリオスチンが軟骨再生に促進的に作用する可能性が示唆された。

## 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 5 件)

1. Tanaka Y, Yamaoka H, Nishizawa S, Nagata S, Ogasawara T, Asawa Y, Fujihara Y, Takato T, Hoshi K. The optimization of porous polymeric scaffolds for chondrocyte-atelocollagen based tissue-engineered cartilage. *Biomaterials in press*. (査読有)
2. Fujihara Y, Takato T, Hoshi K. Immunological response to tissue-engineered cartilage derived from auricular chondrocytes and a PLLA scaffold in transgenic mice. *Biomaterials. in press*. (査読有)
3. Fujihara Y, Asawa Y, Takato T, Hoshi K. Tissue Reactions to Engineered Cartilage Based on Poly-L-Lactic Acid Scaffolds. *Tissue Eng* 2009;15:1565-77. (査読有)
4. Ogasawara T, Ohba S, Fujihara Y, Takahashi T, Liu G, Chikazu D, Suenaga H, Chung UI, Yoda T, Mori Y, Susami T, Takato T, Hoshi K. Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 in Combination with Fibroblast Growth Factor-2 and Insulin-like Growth Factor-I for Chondrocyte Proliferation Culture and Cartilage Regenerative Medicine. *Asian J Oral Maxillofac Surg* 2009;21:18-26. (査読有)
5. Liu G, Iwata K, Ogasawara T, Watanabe J, Fukazawa K, Ishihara K, Asawa Y, Fujihara Y, Chung UI, Moro T, Takatori Y, Takato T, Nakamura K, Kawaguchi H, Hoshi K. Selection of highly osteogenic and chondrogenic cells from bone marrow stromal cells in biocompatible polymer-coated plates. *J Biomed Mater Res A* 2009;92A:1273-1282. (査読有)

[学会発表] (計 5 件)

1. 藤原夕子、岩田くみ子、小笠原徹、高戸毅、星 和人：軟骨再生過程で軟骨細胞に発現する Fas ligand の機能解析。第 9 回日本再生医療学会総会，広島，2010 年 3 月 18-19 日。
2. 浅輪幸世、根本淳司、中川 匠、藤原夕子、高戸 毅、星 和人：ヒト関節軟骨細胞の表面マーカーと基質産生の相関解析。第 9 回日本再生医療学会総会，広島，2010 年 3 月 18-19 日。
3. Fujihara Y and Hoshi K: Expressions of immune privilege factors could be

increased in chondrocytes of tissue-engineered cartilage through interactions with host-derived cells in mice. The First International Kishimoto Foundation Symposium. May 25-27, 2009 Osaka, Japan.

4. 藤原夕子、西澤悟、岩田くみ子、柯政全、藤川由美子、高戸毅、星和人：再生軟骨組織における免疫特権因子の発現検討。第 8 回日本再生医療学会総会，東京，2009 年 3 月 5-6 日。

5. 浅輪幸世、坂本朋昭、古村眞、藤原夕子、渡邊真、西澤悟、金澤三四朗、高戸毅、星和人：インプラント型再生軟骨のビーグル犬自家軟骨移植モデルにおける生分解性ポリマー多孔体の検討。第 8 回日本再生医療学会総会，東京，2009 年 3 月 5-6 日。

[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]

ホームページ等

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤原 夕子 (FUJIHARA YUKO)  
東京大学・医学部附属病院・特任助教  
研究者番号：50466744