

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890050

研究課題名(和文) 組織再生におけるマトリセルラープロテインの機能と形態制御に対する役割の解明

研究課題名(英文) The organization of collagen architecture by periostin contributes to the maintenance and the maturation of regenerated tissue.

研究代表者

稲木 涼子 (Inaki, Ryoko)

東京大学・医学部附属病院・特任臨床医

研究者番号：90632456

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,100,000円、(間接経費) 330,000円

研究成果の概要(和文)：再生軟骨医療の臨床導入にあたり、移植後再生軟骨の形態維持が極めて重要な課題である。移植後の再生軟骨は、外周に型コラーゲンを基調とした線維組織を形成し組織再生が進行するが、これら線維組織にはマトリセルラープロテインと呼ばれるタンパク質が存在し、中でもペリオスチン(PN)が豊富に存在することが確認されている。本研究では、再生軟骨を取りまく線維組織におけるPNの機能解明ならびに再生医療での活用を目的とし、遺伝子欠損(Pn^{-/-})マウスを用いた解析とPN含有再生軟骨の検討を行った。結果、PNはコラーゲンの高次構造形成を促し、再生軟骨組織の形状維持と軟骨細胞の分化促進に貢献することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In transplants of tissue engineering, the surrounding fibrous tissues form which are speculated to support the tissue regeneration. Adhesion molecule periostin (PN) is abundantly localized in surrounding fibrous tissues, it may be essential for tissue regeneration. To verify this, we investigated the phenotype of cartilage regeneration, using wild-type (Pn^{+/+}) or PN knockout (Pn^{-/-}) mice. When cubic sponge containing Pn^{+/+} chondrocytes were syngeneically transplanted in Pn^{+/+} mice, the cubic cartilage was regenerated with abundant cartilage matrix. While in Pn^{-/-} mice, the surrounding tissues were devoid of PN, exhibiting irregular shapes of transplants. In vitro assay, PN contained in the culture medium failed to show any effects, although the 3D culture in collagen gel premixed with PN enhanced chondrocyte differentiation, suggesting that biological action of PN could be collagen-mediated.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系歯学

キーワード：再生軟骨 ペリオスチン マトリセルラープロテイン コラーゲン高次構造

1. 研究開始当初の背景

顎顔面領域の修復に関しては、自家組織を用いた移植治療が広く行われているが、精密な形態の再現性が求められる顔面領域では困難を伴うことが多い。中でも支持組織である骨・軟骨の再建は、正常組織と同等の3次元形態の回復が必須であるが、その形態は複雑で実現することは難しい。そのため、近年形態付与が可能で調整を施すことができる再生医療に高い期待が寄せられている。申請者の所属するグループでは、ポリ-L-乳酸(PLLA)多孔体を用いた3次元再生軟骨の作製方法を確立しているが、移植後の再生軟骨の長期形状維持が課題の一つである。

そこで申請者は、移植後再生軟骨の形態維持機構の解明において、再生軟骨組織の周囲を取り囲むように形成される線維組織に着眼した。線維組織は、I型コラーゲンを基調とし、その他様々な細胞外基質タンパクが存在する中で特異的な高次構造を形成し、その機能を発揮する。申請者は、中でもマトリセルラールプロテイン(Matricellular Protein)と呼ばれるタンパク質群に注目した。実際、予備実験において再生軟骨周囲の線維形成において各種マトリセルラールプロテインが高発現していることを確認し、組織再生における関与が示唆された。

2. 研究の目的

本研究の目的は、マトリセルラールプロテインの線維組織における役割を明らかにし、再生軟骨周囲の外周線維組織が形態制御に及ぼす機構を解明し、長期に渡る形態および機能の維持を可能とする軟骨再生医療技術の確立である。予備実験において、これらマトリセルラールプロテインはI型コラーゲン陽性の線維組織に特異的に観察されることが確認され、線維組織形成において構造タンパク質との相互作用ならびに構造構築への関与が推測された。中でも、線維組織形成において特に高発現が認められたペリオスチン(PN)に着眼し、移植再生軟骨成熟における機能解明ならびに軟骨再生医療への応用を目的とした。

3. 研究の方法

線維組織形成におけるマトリセルラールプロテインの関与評価

in vitroにおけるコラーゲン構造化への作用解析として、可溶性コラーゲンをを用いたゲル化実験を行った。PNを添加したコラーゲンゲルのゲル化を評価し、力学的評価に加え、電子顕微鏡を用いて内部のコラーゲン分子

の走行変化および構造変化を観察した。また in vivo の評価として、再生軟骨の移植母床であり外周線維組織の形成に関わるマウス背部皮下組織の解析を行った。PN 遺伝子欠損マウスを用い、野生型マウスと比較し PN 欠損が線維組織形成に及ぼす影響を評価した。評価項目として、組織学的・免疫組織化学的解析、遺伝子解析、力学試験を行った。

コラーゲンの立体構造変化が再生軟骨に及ぼす影響の解析

コラーゲンゲルを用いた軟骨細胞の三次元培養系において、PN をコラーゲンゲルに添加し増殖・分化に関する検討を行った。分化に関しては軟骨特異マーカー遺伝子の発現を評価した。また、基質タンパク質の立体構造変化は細胞表面のレセプター分子を介して細胞内情報伝達に関与するため、PN のコラーゲンへの添加が軟骨細胞の情報伝達に影響を及ぼすか検討した。コラーゲン基質の膜受容体インテグリンの下流シグナルである、FAK、Akt などのシグナルタンパク質のリン酸化をウェスタンブロッティングにより生化学的定量を行った。

外周線維組織の構造化獲得が再生軟骨の形態制御および組織成熟に及ぼす影響の検証

PN 遺伝子欠損マウスをホストに用いたマウス同系移植実験を行い、再生軟骨外周に形成される線維組織での PN 欠損に伴う外周線維組織の構造変化が再生軟骨に及ぼす影響を検討する。ドナーには野生型マウスから単離した耳介軟骨細胞を用いマウス再生軟骨を作製し、PN 遺伝子欠損マウスの背部皮下に移植する。移植後 2 週、8 週で再生軟骨および外周線維組織を採取し、形態学的、組織・生化学的、生体力学評価を行う。

実証実験による再生軟骨医療への応用検討

上記研究で明らかにした、外周線維組織における PN の機能をもとに、軟骨再生への応用を探る。ビーグル犬を用いた、大型動物での実証実験を実施した。マウスの同系移植の方法に準じ、耳介軟骨組織から軟骨細胞を採取し再生軟骨を作製、自家移植を行い、移植後 1、2 か月で摘出し、3 次元形状、軟骨基質産生、力学強度、細胞生存性などを評価し、対照群と比較検討した。

4. 研究成果

線維組織形成におけるマトリセルラープロテインの関与評価

PN を可溶化コラーゲンに添加しゲル化検討した所、PN 添加に伴いコラーゲンゲルの力学強度は増加し、電子顕微鏡所見 (TEM) ではコラーゲン分子の会合促進と線維の高次構造化が観察された。また、移植部位に相当し外周線維組織の形成に關与する背部皮下線維組織を PN 遺伝子欠損マウスおよび野生型マウスにおいて比較し、組織学的および物理学的評価を行った。PN が存在する Pn+/+マウス線維組織では、偏光顕微鏡で偏光を呈する会合度が高いと思われる線維が密に集合しているのに対し、Pn-/-マウスでは会合度が低いと思われる線維が疎に観察された。力学評価として剥離応力を算出すると、Pn-/-マウスで有意に低下し物理的強度において有意差が示された。

コラーゲンの立体構造変化が再生軟骨に及ぼす影響の解析

軟骨細胞に対する PN の作用を検討するため、PN 含有培養液下でヒト軟骨細胞を培養したところ、増殖や分化に影響はなかった。一方で、PN 含有コラーゲンを用いて軟骨細胞を 3 次元培養したところ分化促進が観察された。そのため、PN の生物活性はコラーゲンを介するものと考え、確認された PN 添加による高次構造化コラーゲンを用いて、軟骨細胞を培養したところ、分化の促進が観察され、また軟骨細胞における AKT シグナルが活性化されていることが明らかとなった。

外周線維組織の構造化獲得が再生軟骨の形態制御および組織成熟に及ぼす影響の検証

PN 遺伝子欠損マウスを用いて再生軟骨皮下移植実験を行った。結果、ホストに野生型 (Pn+/+) および遺伝子欠損 (Pn-/-) マウスを用いて、ドナーとして野生型マウス耳介軟骨細胞から作製した再生軟骨を同系移植すると、ホストに Pn+/+マウスを用いた移植では再生軟骨の外周線維に Ⅱ型コラーゲンと共局在する PN が発現し形状は維持されるのに対し、ホストに Pn-/-マウスを用いた移植では外周線維に PN を欠き Ⅱ型コラーゲンを基調とした外周線維組織の強度は低下し、再生軟骨は外部に広がる不整形を呈した。

実証実験による再生軟骨医療への応用検討

ペリオスチンとの相互作用によるコラーゲン線維の会合促進と、それに伴う線維組織

の力学強度向上を実証するため、ビーグル犬を用いた、大型動物での実証実験を実施した。ビーグル犬へ皮下移植するイヌ再生軟骨に、ペリオスチンを練和したコラーゲンゲルを塗布 (coat COL+PN) して評価した。無処理再生軟骨 (non treatment) およびペリオスチン無練和コラーゲンゲル塗布 (coat COL) の再生軟骨においては、移植後再生軟骨は長期に形態を維持することができなかった。一方で、coat COL+PN 再生軟骨では、長期に渡り目的の足場素材の形態を維持した。形態の変化は生じたが、各再生軟骨の GAG およびⅡ型コラーゲンの含有量に差異は無く、各再生軟骨で軟骨形成の差は認めなかった。

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 1 件)

K Hoshi, R Inaki, T Takato: Soft tissue supporting biointegration. *Journal of Bio-Integration* 3(1): 3-5, 2013

[学会発表](計 3 件)

稲木涼子, 藤原夕子, 三澤雅樹, 工藤明, 高戸毅, 星和人: 再生軟骨組織の形態維持機構におけるペリオスチンの作用解明. 第 12 回日本再生医療学会総会 2013 年 3 月 21 - 23 日 パシフィコ横浜, 神奈川県

稲木涼子, 藤原夕子, 高戸毅, 星和人: 軟骨再生過程で形成される膜様線維組織の機能解析. 第 12 回日本再生医療学会総会 2013 年 3 月 21 - 23 日 パシフィコ横浜, 神奈川県

稲木涼子, 藤原夕子, 星和人, 高戸毅: 再生軟骨組織の形態維持機構の解明と細胞外基質ペリオスチンの働き. 第 67 回日本口腔科学会学術総会 2013 年 5 月 22 - 24 日 栃木県総合文化センター, 栃木

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

6. 研究組織

(1)研究代表者

稲木 涼子 (INAKI RYOKO)

東京大学・医学部附属病院・特任臨床医

研究者番号：90632456

(3)連携研究者