

高機能高分子ゲルを用いた 関節軟骨自然再生誘導法の開発

安田 和則 [北海道大学大学院医学研究科/教授]
近江谷 克裕 [北海道大学大学院医学研究科/教授]
小野 寺 伸 [北海道大学大学院医学研究科/助教]
北村 信人 [北海道大学大学院医学研究科/助教]

背景・目的

損傷した軟骨は再生しないと信じられてきた。従ってその治療に関しては、軟骨欠損部への培養自家細胞移植や成長因子を含む細胞誘導スカフォールドの充填などが最先端戦略として研究されてきた。しかし未だ実用可能な戦略となるには至っていない。損傷した軟骨が自然に再生することは本当にはないのであろうか？我々は再生可能な「場」の研究を行った結果、合成高分子材料である PAMPS/PDMAA ダブルネットワーク (DN) ゲルを軟骨欠損部位の母床に埋植することによって、欠損部位に軟骨の自然再生を誘導させる治療技術を開発した。本研究の目的は、このゲル上で起こる軟骨自然再生の細胞内分子機序を解明することである。

内容・方法

1) 軟骨再生過程に発現する遺伝子群の網羅的な解析による分子マーカーの探索

5羽のウサギ軟骨組織から約1gの mRNA を抽出し、逆転写反応によってウサギ軟骨の cDNA library を作製した。cDNA library を均一化してから大腸菌に遺伝子導入させて EST library を構築し、その中で5184個のクローンの塩基配列を決定し、その中で解析できる4885個のクローンの解析を行なった。

2) 軟骨分化モデル細胞の発光イメージングシステム構築

軟骨分化が *in vitro* で実現するモデル細胞として、インスリン投与によって軟骨細胞へ分化するマウスの ATDC5 細胞を用い、軟骨分化中に時計分子 Bmal1 の発現パターンをイメージングした。Bmal1 のプロモーターと甲虫由来シフェラーゼ Eluc を融合した Bmal-Eluc レポーターベクターを ATDC5 細胞に導入し、安定株を構築した。Bmal1 発現のリアルタイムモニタリングにおいて細胞全体の発光値の測定はクロノスを用いて、また個々の細胞での発現のイメージングは Cellgraph を用いて行なった。

結果・成果

1) 軟骨再生過程に発現する遺伝子群の網羅的な解析による分子マーカーの探索

ウサギ軟骨組織から構築した EST library を解析した結果、4885個の EST 中で重複しない独立クローンは2387

個であり、それらの中で機能が知られている遺伝子は1618個であった。機能が知られている1618個の遺伝子を機能別で分類した結果、細胞骨格及び運動(11.3%)、信号伝達(20.1%)、物質代謝(12.5%)、蛋白質代謝(19.6%)、遺伝子発現(17.9%)に関連している遺伝子が多く存在することが分かった。軟骨組織の約90%を占めている細胞外マトリクスに関連する EST の重複頻度を調べた結果、コラーゲン遺伝子の中ではⅡ型(20.8%)とⅩ型(39.6%)が、プロテオグリカンの中ではプロテオグリカン4(56.8%)とデコリン(30.1%)が、またそれ以外の細胞外マトリクス蛋白質の中では cartilage oligomeric matrix protein(46.3%)と matrix G protein(18.6%)が多く重複されることが分かった。これらの遺伝子は軟骨組織で特異的に発現されることが報告されているので今回の研究で構築された EST library は軟骨組織の特異性を持っていると考えられる。この軟骨組織特異性を持っている EST library は今後軟骨再生過程において重要な分子あるいは新しいマーカー分子の探索に有用であると期待される。

2) 軟骨分化モデル細胞の発光イメージングシステム構築

Bmal1-Eluc 発現する ATDC5 安定株に培地交換と Dexamethasone で刺激を与えてから Bmal1 発現パターンをリアルタイムモニタリングした結果、24時間周期のサーカディアンリズムで発現することが確認された。しかし、インスリンを加えた培地で軟骨分化を誘導すると Bmal1 が最初3日目までは24時間周期のサーカディアンリズムを表すがその後、6-10時間の短い周期のリズムで発現することが見つかった。軟骨分化中の短い周期のリズムが個々の細胞のリズムの周期が短くなったことによるのか、個々の細胞は24時間周期のサーカディアンリズムを維持するが位相が違う何個かの細胞集団が形成されることによるのかを確認するために個々の細胞での Bmal1 の発現をリアルタイムでイメージングした。その結果、軟骨分化中に個々の細胞で Bmal1 が約6時間の短い周期のリズムで発現することが確認された。これらの結果は発光プローブを用いたリアルタイムイメージングの技術を用いることで初めて見つかった現象であり、リアルタイム発光イメージングの重要性を示していることである。

今後の展望

1) *In vivo* 研究

DNA アレイを作成し、再生過程の軟骨より抽出した mRNA の相互関係から再生過程における発現遺伝子のプロファイリングを行う。これを基に軟骨再生における分子マーカーを少なくとも3種同定する。これらの分子マーカーについて、解明した家兎 DNA ライブラリーからプロモーター配列をクローン化し、発光酵素遺伝子の5'上流に挿入する。これを再生初期過程の軟骨細胞に導入

し、DN ゲルによって誘導される再生過程におけるそれらの遺伝子の役割を解明する。

2) Ex vivo 研究

クローン化した分子マーカー遺伝子群をルシフェラーゼ遺伝子に挿入したベクターを構築する。このベクターでヒト培養軟骨細胞に遺伝子導入した遺伝子発現パターンを、光によってモニタリングしてリアルタイムに解析し、DN ゲル上で培養したヒト由来軟骨細胞がマトリクスを形成する過程における各遺伝子の役割を明らかにする。