

学位論文題名

Gene expression profile of the cartilage tissue spontaneously regenerated in vivo by using a novel double-network gel

(新規ダブルネットワークゲルにより生体内で自然再生された
軟骨組織の遺伝子発現プロファイル)

学位論文内容の要旨

【背景と目的】 共同研究者は poly-(2-Acrylamido-2-methylpropanesulfonic acid) (PAMPS) と poly-(N,N'-Dimethylacrylamide)(PDMAAm) からなるダブルネットワーク(DN)ゲルを、家兎膝関節に作製した骨軟骨欠損部の基底に移植することにより、硝子軟骨様組織の自然再生が誘導される現象を発見した。この発見は、「硝子軟骨は生体内で再生することはない」とされてきた医学の常識に大きな修正を加える可能性がある。またこの発見は、関節外科領域における骨年骨欠損を修復する全く新しい戦略を提唱できる可能性がある。しかし、生体力学的、生化学的、遺伝子学的に再生組織を評価する研究はまだ行われてはいなかった。特に、この硝子軟骨様組織における遺伝子発現に関する解析は大変重要であると考え、本研究の目的はこの再生軟骨組織の遺伝子発現プロファイルを、正常関節軟骨との比較において明らかにすることである。

【材料と方法】 PAMPS/PDMAAm DN ゲルは、two-step sequential-polymerization 法にて合成した。重合反応の後、未反応物質を除去するため、DN ゲルを、1 日に 2 回水を交換しながら 1 週間純水に浸漬した。シート状に形成された DN ゲルより、直径 4.5mm、長さ 8mm の円筒形のゲルプラグを作製した。

動物実験は 14 羽の日本白色家兎を用い、静脈麻酔下に清潔環境にて両膝に手術を行った。膝蓋大腿関節の大腿骨滑車部に、直径 4.3 mm、深さ 10.0 mm の円筒形の骨軟骨欠損をドリルにて作製し、その骨軟骨欠損部に、関節表面から約 2 mm の深さの空隙が残存するように DN ゲルプラグを埋植した。術後 2 週及び 4 週で屠殺し、再生組織を採取して total RNA を抽出し、DNA マイクロアレイを用いた遺伝子の網羅的解析を行った。

カスタムメイドのオリゴヌクレオチド・マイクロアレイは Combimatrix 社に作製を依頼した。日本白色家兎の軟骨組織から構築された EST library(Kwon et al., 2008)により得られた 2153 遺伝子と、NCBI databnase 上の 6544 遺伝子からなる、計 8697 遺伝子に由来するラベル化された mRNA を捕捉するように、プローブを設計したが、open reading frame が短いなどの理由で、マイクロアレイに使用しなかったデータも存在した。マイクロアレイは、5 × SSC, 0.1% SDS, 400 mg/ml, ウシ血清アルブミン, 100 ng / μ l, salmon sperm DNA を含む溶液に 1 時間、42℃でプレハイブリダイスした。マイクロア

レイを double distilled water で 2 分間、3 回洗浄した後、 $5 \times \text{SSC}$ 、0.1% SDS、10% ホルムアミドに溶解した熱変性ラベル化 cDNA と 16 時間、 42°C でハイブリダイズした。その後 $5 \times \text{SSC}$ 、0.05% SDS で 4 分間、 $0.5 \times \text{SSC}$ で 1 分間、 $2 \times \text{PBS}$ で 4 分間洗浄し、GenePix 4000B で蛍光イメージを取得した。各スポットの信号強度とローカルバックグラウンドは Array-Pro Analyzer を使用して決定した。正味の信号強度は各スポット領域内のすべてのピクセルの平均信号強度からローカルバックグラウンド領域内のすべての平均信号強度を差し引いて計算された。成熟家兎の関節軟骨を比較対照とした。

【結果】 再生組織の遺伝子発現プロファイルは巨視的には成熟家兎の関節軟骨とよく近似していた。現時点で同定されている腫瘍遺伝子や異常細胞成長遺伝子の発現は認めなかった。しかし各遺伝子発現量を詳細に観察すると、再生組織と成熟家兎の関節軟骨との間には差異が存在した。例えば COL2A1, COL1A2, COL10A1, DCN, FMOD, SPARC, PLOD2, CHAD, CTGF 及び COMP は、正常軟骨に比較して再生組織で明らかな高発現が見られた。正常軟骨に比較して再生組織において 5 倍以上の発現差があった遺伝子の上位 30 遺伝子には、COL2A1, COL10A1, FN, vimentin, COMP, EF1alpha, TFCP2 及び GAPDH が含まれていた。

【考察】 本研究は、PAMPS/PDMAAm DN ゲルを用いて自然再生させた軟骨様組織の遺伝子発現プロファイルを、正常軟骨との比較において初めて明らかにした。DN ゲルにより再生された組織の軟骨マーカー遺伝子の発現プロファイルは、巨視的には正常軟骨と類似していた。組織学的及び免疫組織学的検討においては、再生組織では術後 2 週及び 4 週で II 型コラーゲン及びプロテオグリカン分子が高度に発現していた。したがって、本研究は、軟骨欠損部の基底への DN ゲルの埋植が、術後 2 週までに関節（硝子）軟骨の自然再生を誘導することを証明した。この結果は「硝子軟骨は生体内で再生することはない」とされてきた医学の常識に大きな修正を加えた。

一方、遺伝子学的には、再生された組織はいくつかの点で正常軟骨とは異なっていた。その結果は、DN ゲル埋植によって自然再生された組織においては、軟骨形成に関わる様々な遺伝子が強く発現されているということを示唆された。正常軟骨と DN ゲル埋植による再生組織との間で発現レベルに差がある遺伝子の機能分類をみると、26%以上のたんぱく質代謝関連遺伝子と 20%以上の細胞成長関連遺伝子は、正常軟骨に比較し再生軟骨で 5 倍以上高度に発現していた。しかし、これらの高発現遺伝子の中で、腫瘍もしくは細胞異常成長に関与する遺伝子（alpha-fetoprotein, beta-2-microglobulin, beta-HCG, bladder tumor antigen, CA15-3, CA19-9, CA27, CA29, CA72-4, CA125, カルシトニン, 癌胎児性抗原, chromogranin A, 上皮成長因子受容体ホルモン受容体, HER2, ヒト絨毛性腺刺激ホルモン, 免疫グロブリン, neuron-specific enolase, NMP22, 前立腺特異抗原, 前立腺酸フォスファターゼ, 前立腺特異膜抗原, S-100, TA-90, thyroglobulin, 等）は認めなかった。本研究において高発現されていた遺伝子は腫瘍細胞への分化とは関連がなく、軟骨細胞そのものへの分化と関連していることが示唆された。

【結論】 本研究は、PAMPS/PDMAAm DN ゲルを用いて自然再生された軟骨様組織の、術後 2 及び 4 週における遺伝子発現プロファイルを、正常軟骨との比較において明らかにした。DN ゲルにより生体内で自然再生された組織は、正常軟骨に比べて若干の差異は存在するが、遺伝子的にも硝子軟骨と見ることが出来る、ということが本研究によって示された。

学位論文審査の要旨

主査	教授	上出利光
副査	教授	鐙邦芳
副査	教授	武蔵学
副査	教授	安田和則

学位論文題名

Gene expression profile of the cartilage tissue spontaneously regenerated in vivo by using a novel double-network gel

(新規ダブルネットワークゲルにより生体内で自然再生された
軟骨組織の遺伝子発現プロファイル)

硝子軟骨は生体内で自然再生することはないと考えられてきた。しかし申請者の研究グループは、poly-(2-Acrylamido-2-methylpropanesulfonic acid)と poly-(N,N'-Dimethyl acrylamide) からなるダブルネットワーク (DN) ゲルを家兎膝関節の骨軟骨欠損部の基底に埋植すると、欠損部に硝子軟骨様組織が自然再生する現象を発見した。もしこの組織が本当に硝子軟骨であれば、医学の常識に大きな修正を加えることができる。そこで申請者は、この再生組織の遺伝子発現プロファイルを網羅的に解析して正常関節軟骨のそれと比較することによってこの組織を硝子軟骨とみなすことの妥当性を検討し、また家兎の正常および再生軟骨に発現する網羅的遺伝子情報を得ることを目的として、本研究を行った。

実験には総計 17 羽の日本白色家兎を用いた。使用した DN ゲルは、共同研究者が特許を有する製法で作製した。遺伝子解析には 13 羽を使用し、その内の 10 羽の両膝蓋大腿関節の大腿骨滑車部に、直径 4.3 mm、深さ 10.0 mm の円筒形の骨軟骨欠損を作製し、その骨軟骨欠損部に関節表面から約 2 mm の深さの空隙が残存するように DN ゲルプラグを埋植した。術後 2 週及び 4 週で屠殺して、再生組織を採取した。残りの 3 羽はコントロールとして、正常関節軟骨を採取した。各組織より total RNA を抽出し、その 20 µg と CyScribe First-strand cDNA labeling kit を使用して、Cy3-dUTP の直接抱合により蛍光ラベル DNA を作製した。解析には総計 8697 種の遺伝子単一鎖プローブを搭載したカスタムメイドのオリゴヌクレオチド・マイクロアレイを用い、熱変性ラベル化 cDNA とハイブリダイズした後、蛍光イメージを取得した。各スポットの信号強度とローカルバックグラウンドは Array-Pro Analyzer を使用して決定した。蛍光強度に関する 2 週対正常、および 4 週対正常の比較はそれぞれ 3 回ずつ行い、平均化した。別の 4 羽に対しては片側のみに上述の処置を行い、対側には骨軟骨欠損に DN ゲルを埋植せずに、2 週及び 4 週で屠殺して組織学的及び免疫組織学的解析に供した。

術後 2 週の骨軟骨欠損部は血餅で充たされており、その中にプロテオグリカンと II 型コラーゲンを細胞内外に発現した細胞に富む小領域が観察された。術後 4 週では、軟骨欠損

部の全体がこの組織によって充たされていた。正常軟骨及び再生組織の遺伝子発現に関しては、DNA チップ上の 8697 プローブのうち、最大信号強度の 1000 分の 1 以上の信号強度を示したものは、正常軟骨で 8488 個、再生組織では術後 2 週で 8479 個、4 週で 8625 個であり、遺伝子情報データベースを用いてそれらの機能を分類した。再生組織に発現した遺伝子の機能的分類は正常軟骨のそれとほぼ同一であった。両組織に特に高発現した遺伝子の中では MGP、SN6、PH domain が注目された。TFCP2 と CITED は再生組織でのみ高発現していた。2 週および 4 週の再生組織で、すべての軟骨関連遺伝子は正常軟骨とほぼ同様に発現していたが、コラーゲン関連遺伝子では 2A1、1A2、10A1 が、プロテオグリカン関連遺伝子では DCN と FMOD が、そしてその他のマトリックス構成たんぱく質遺伝子では SPARC、PLOD2、CHAD、CTGF、COMP が、再生組織において正常軟骨の 2 倍以上発現していた。再生組織の正常軟骨に対する 5 倍以上高発現していた遺伝子は、術後 2 週と 4 週で、それぞれ 307 及び 270 個であった。これらの遺伝子の各時期における機能分類は、ほぼ同一であった。同定できた遺伝子では protein metabolism 関連遺伝子と cell growth and/or maintenance 関連遺伝子が大半を占めた。

口頭発表の後、副査の鑑教授から、再生組織において正常軟骨よりも高度に発現している遺伝子の意義について質問があった。次に武蔵教授から、再生細胞の起源、DN ゲルによる軟骨再生の機序について質問があった。次に副査の安田教授から今後の研究の方向性、臨床応用の可能性、等について質問があった。最後に主査が術直後の病態、炎症の存在と経過、骨化の可能性、等について質問した。いずれの質問に対しても申請者は、自己の研究結果と文献的考察に基づいて概ね妥当な回答を行った。

本研究は、DN ゲルを用いて自然再生させた再生組織が遺伝子学的にも硝子軟骨とみなすことができることを示し、また今後の軟骨再生研究に有用な家兔の正常および再生軟骨に関する網羅的遺伝子情報を初めて提供した。審査員一同は、これらの成果を高く評価し、申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。