

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士 (医 学) 氏名 今 淵 隆 誠

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)

【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られる。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 database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 / μl, salmon sperm DNAを含む溶液に1時間、42°C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 × 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 × SSC, 0.05% SDS で 4 分間, 0.5 × SSC で 1 分間, 2 × 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. 成熟家兔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兔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, 再生組織と成熟家兔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, 骨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.