



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Synthetic PAMPS gel activates BMP/Smad signaling pathway in ATDC5 cells, which plays a significant role in the chondrogenic differentiation independent of insulin
Author(s)	後藤, 佳子
Description	配架番号 : 2149
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第11667号
Issue Date	2015-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k11667
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/60462
Type	doctoral thesis
File Information	Keiko_Goto.pdf



学 位 論 文

Synthetic PAMPS gel activates BMP/Smad signaling
pathway in ATDC5 cells, which plays a significant
role in the chondrogenic differentiation
independent of insulin

(合成 PAMPS ゲルは ATDC5 細胞における BMP/Smad
シグナル伝達経路を活性化し、それはインスリン
非依存性軟骨分化において重要な役割を果たす)

2015 年 3 月

北 海 道 大 学

後 藤 佳 子

目次

発表論文目録および学会発表目録.....	1
I. 緒言	2
1. 本研究の背景	2
1.1. 関節軟骨損傷の疾患概念と病態.....	2
1.2. 関節軟骨損傷に対する現在の治療法とその問題点.....	3
1.2.1. 骨髄刺激法による治療	3
1.2.2. 自家骨軟骨柱移植による治療	3
1.2.3. 培養軟骨細胞移植による治療	3
1.3. PAMPS/PDMAAm DN ゲルを用いた新しい軟骨再生治療の試み (北大におけるこれまでの研究)	4
1.3.1. PAMPS/PDMAAm DN ゲル.....	4
1.3.2. PAMPS/PDMAAm DN ゲルの生体材料学的評価.....	4
1.3.3. PAMPS/PDMAAm DN ゲルによる軟骨分化誘導.....	5
1.3.4. PAMPS/PDMAAm DN ゲルにおける PAMPS ゲルの 役割	8
1.4. 軟骨分化誘導シグナルに関する研究の歴史.....	9
1.5. マウス由来クローン化細胞株 ATDC5 細胞について.....	11
2. 本研究の目的	11
II. 略語表.....	13
III. 実験方法.....	15
1. PAMPS ゲルの作成.....	15
2. 細胞培養	17
3. 研究デザイン	17
3.1. 研究1：PAMPS ゲルによる軟骨分化誘導能の検討.....	17

3. 2. 研究 2 : PAMPS ゲルが誘導する軟骨分化における特異的 活性化シグナルの探索.....	17
3. 3. 研究 3 : PAMPS ゲルにより誘導される BMP/Smad シグナルの 阻害による軟骨分化誘導能への影響.....	18
4. 評価方法.....	18
4. 1 マイクロアレイ解析.....	18
4. 2 ウェスタンブロット解析.....	19
4. 3 リアルタイム PCR 解析.....	21
4. 4 BMP/Smad シグナルの阻害	22
5. 統計学的解析	22
IV. 結果	23
1. PAMPS ゲルが誘導する軟骨分化誘導過程とインスリン依存性軟骨分化 過程との差異	23
2. PAMPS ゲルが誘導する軟骨分化における特異的シグナル伝達経路の 網羅的解析	27
3. PAMPS ゲルが誘導する軟骨分化における軟骨分化関連分子の発現量と リン酸化に関する解析	30
4. PAMPS ゲルが誘導する軟骨分化における TGF-beta/BMP シグナルに 関する遺伝子発現のパスウェイ解析	33
5. PAMPS ゲルが誘導する軟骨分化における BMP4 遺伝子発現の詳細....	34
6. PAMPS ゲルが誘導する軟骨分化において BMP 受容体の阻害が Smad1/5 のリン酸化に与える効果.....	35
7. PAMPS ゲルが誘導する軟骨分化における BMP/Smad シグナルの阻害が 軟骨分化に与える影響	41
V. 考察	45

VI. 総括および結論.....	49
1. 本研究から得られた新知見	49
2. 新知見の意義	50
3. 今後の課題	50
4. 本研究から得られた新知見から今後どのような研究が展開されうるか	51
VII. 謝辞	52
VIII. 文献	53

発表論文目録及び学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に投稿中である。

著者名	Keiko Goto, Taichi Kimura, Nobuto Kitamura, Shingo Semba, Yoshihiro Ohmiya, Sachiyo Aburatani, Satoko Matsukura, Masumi Tsuda, Takayuki Kurokawa, Jian Ping Gong, Shinya Tanaka, Kazunori Yasuda
論文タイトル	Synthetic PAMPS gel activates BMP/Smad signaling pathway in ATDC5 cells, which plays a significant role in the gel-induced chondrogenic differentiation
学術雑誌名	Biomaterials

本研究の一部は以下の学会に発表した。

発表者	後藤佳子 北村信人 木村太一 仙葉慎吾 黒川孝幸 グンチェンピン 田中伸哉 安田和則
演題名	ATDC5 細胞における PAMPS ゲル誘導軟骨分化特異的 シグナル伝達経路の解明 (Identification of specific signaling pathways in chondrogenesis induced by the synthetic PAMPS gel)
学会名	第 29 回日本整形外科学会基礎学術集会
日時	2014 年 10 月 9 日(木)～10 日(金)
開催場所	城山観光ホテル(鹿児島)

I. 緒言

1. 本研究の背景

1.1. 関節軟骨損傷の疾患概念と病態

関節軟骨損傷は関節内骨折や脱臼、靱帯損傷などの外傷や関節軟骨の変性などにより起こるが、スポーツ振興に伴うスポーツ人口の増加や高齢化社会により増加し、先進諸国において国民の福祉及び経済に関わる重要な問題として認識され外来診療において多く遭遇する疾患となった。実際に膝関節においては、膝関節鏡を要した患者の 66%に軟骨欠損を認めるとの報告があり¹、現代の高齢化などの社会的背景から、今後も増加する傾向を呈することが予測される。関節軟骨は血行に乏しいため一度損傷を受けると硝子軟骨により自然再生せず²⁻⁴、関節損傷の自然経過により損傷が拡大すると変形性関節症へ進行し疼痛や変形により歩行困難となる。従って関節軟骨損傷に対する治療意義は大きい。

関節軟骨は荷重時の応力や運動時の剪断力を吸収するという重要な役割を担う組織であるにも関わらず、血行に乏しいため出血による未分化細胞や成長因子などの生理活性物質の集積が惹起されず修復起点が作用しにくい。このため、古くから関節軟骨は一度損傷を受けると自然再生しないと言われてきた²⁻⁴。*in vivo*の実験において、家兎やミニブタを用いた膝関節軟骨損傷モデルの自然経過についての報告が存在する^{5,6}。部分欠損においては、軟骨損傷作成後 26 週の家兎の軟骨はほとんど修復されないことが組織学的所見やグリコサミノグリカン(GAG; glycosaminoglycan)の産生能の評価により報告され⁵、術後 8 週のミニブタの修復組織では軟骨細胞密度が減少していることが報告されている⁶。また全層欠損において、家兎に作成した術後 24 週的全層欠損モデルの修復組織は本来の硝子軟骨組織と異なる線維軟骨様であったと報告されている⁷。以上のことから、動物における軟骨損傷は軟骨による自然再生は認められないことが過去の研究より明らかになっている。ヒトにおいては、Shelbourne らは前十字靱帯損傷に併発した軟骨損傷を靱帯再建時に確認し、これらの軟骨下骨まで達する関節軟骨損傷(アウターブリッジ分類、グレード 3 及びグレード 4)を対象に損傷の自然経過を観察した。その結果、主観的評価において術後 8.7 年で損傷群では有意に悪かったと報告している⁸。以上の結果は軟骨損傷を放置すると損傷部が拡大した場合、最終的に変形性関節症へ進行することを意味している。変形性関節症は、疼痛による日常活動の低下をきたし、経済的労働力の損失や、手術に要する医療費の増大を招き、本疾病の罹患患者の増大は国家財政に影響を及ぼすものと考えられる。現在、荷重関節である膝関節、股関節を主とした変形性関節症の罹患患者数は世界で数千万人ともいわれ、その予防と

もいえる関節軟骨損傷の治療法の開発は整形外科領域では重要テーマの一つとなっている。

1.2. 関節軟骨損傷に対する現在の治療法とその問題点

1.2.1. 骨髄刺激法による治療

半世紀以上前から古くから行われ、現在も小範囲の軟骨損傷に対し、簡便で低侵襲な方法として広く行われている⁹。関節鏡下に鋼線やオウルを用いて軟骨下骨を穿孔し、出血させることにより骨髄間葉系細胞を誘導することによる軟骨再生が期待できる¹⁰。しかし、損傷範囲が4cm²以上ではその効果が限定的であること、また損傷部は硝子軟骨ではなく主に線維軟骨により修復されると考えられ、長期成績が期待できないという欠点を有している¹¹。骨髄刺激法(マイクロフラクチャー法)の11.3年における長期成績の報告では45歳以下の関節軟骨全層欠損の患者では臨床症状の改善は80%の患者にとどまる⁹。

1.2.2. 自家骨軟骨柱移植術による治療

1993年、Hangodyにより報告された方法で、荷重部関節の軟骨損傷に対し行われる¹²。非荷重部の正常軟骨より円柱状の骨軟骨柱を採取し、損傷部にモザイク状に移植する方法で¹³、正常軟骨での再建が可能であり、症例により関節鏡下に行うことができる。欠点として採取できる骨軟骨片に限りがあるため損傷の適応サイズが限定されること、採取部位の傷害の可能性があること、複数の骨軟骨柱を用いた場合、関節軟骨表面の曲面形状を再現するのが技術的に困難であることが挙げられる¹⁴。

1.2.3. 培養軟骨細胞移植術による治療

1994年にBrittbergらが報告して以来行われている方法で、膝軟骨非荷重部より軟骨片を採取し、酵素処理により単離した軟骨細胞を単層培養系で増殖させ、軟骨欠損部に浮遊液の状態で移植する方法である¹⁵。1997年、米国食品医薬品局の認可を受け軟骨細胞の培養過程が企業化され、さらにコラーゲン膜や3Dスキャフォールドなどの組織工学を駆使した第二世代、第三世代の移植術に発展した。2012年7月27日、整形外科領域におけるヒト由来細胞・組織医療機器として日本初の自家培養軟骨(株式会社ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング、販売名: ジャック)として厚生労働省より製造販売承認を受け、2013年4月1日より、外傷性膝関節軟骨欠損症または離断性骨軟骨炎を有する患者の4cm²以上の軟骨欠損で、他の治療がない症例を適応として保険適用となった。

本法の利点は、幅広い欠損サイズに適応が可能であり硝子様軟骨が再生することである。しかし軟骨組織採取と軟骨細胞移植のために2度の手術を要すること、長期の治療期間を要すること、軟骨採取部位の障害の問題や、高いコストの問題などの欠点がある。また、再生組織は病理学的構造上、真の硝子軟骨組織ではないと考えられ、長期的な成績については不明である。2003年、骨軟骨柱移植術との比較において本方法の有意性を示した報告と¹⁶、一方有意ではなかったという報告が並存する¹⁷。また2004年、骨髄刺激法との比較では差がないと報告され¹⁸、臨床的に明らかな有意性を示せていない。

1.3. PAMPS/PDMAAm DN ゲルを用いた新しい軟骨再生治療の試み（北大におけるこれまでの研究）

1.3.1. PAMPS/PDMAAm DN ゲル

PAMPS/PDMAAm DN ゲルは、申請者が属する研究グループが開発した、従来のハイドロゲルにはない性質を有する生体活性ハイドロゲルである¹⁹。従来のハイドロゲルは、柔らかく脆い構造であったが、申請者が属する研究グループは硬く脆い強電解質の poly-(2-acrylamido-2-methylpropanesulfonic acid) (PAMPS) と柔らかい中性の poly-(N,N'-dimethyl acrylamide) (PDMAAm) の2種類の異なる高分子網目構造を持つポリマーを組み合わせることによって関節荷重に耐えうる強度に匹敵する高強度のゲルを開発した。従来のハイドロゲルはゲルの主体成分である液体を受ける骨格となる高分子鎖が少なく、外力が加わると連鎖的に破断が発生すると言われている。一方、PAMPS/PDMAAm DN ゲルは第一のネットワークである高架橋密度の高分子鎖を有する PAMPS と第二のネットワークである低架橋密度の高分子鎖を有する PDMAAm が至適な容積比で組み合わせることで破壊の伝播を妨げ、これらが高強度化に寄与していると考えられている。その結果、第一のネットワークである PAMPS ゲルの圧縮破断強度は 0.4MPa であるが、PAMPS/PDMAAm DN ゲルは 3.1MPa と歩行時に膝関節軟骨にかかる 3-5MPa という応力に近似した強度を持つ。また、強度だけではなく全重量の約 90% が水分であり強い変形にも耐えうるゲルである。

1.3.2. PAMPS/PDMAAm DN ゲルの生体材料学的評価

申請者が属する研究グループは PAMPS/PDMAAm DN ゲルによる生体反応を調べるために、国際的なガイドラインに準じて *in vivo* 埋植試験を行った²⁰。PAMPS/PDMAAm DN ゲルを高密度ポリエチレンゲルを陰性対照として、また、ジエチルジチオカルバミン酸亜鉛を含有したポリウタレンを陽性対照として日本白色家兎の傍脊柱筋に埋植し、術後の埋植周囲の炎症領域を組織学的に評価し

た。その結果、PAMPS/PDMAAm DN ゲル埋植群は術後 1 週において陰性対照と比較して炎症細胞が強くみられたものの術後 6 週目の炎症領域は減少していた。また陽性対照と比較して全経過を通して炎症領域は少なかった。以上の結果より PAMPS/PDMAAm DN ゲルは生体毒性を示さないことが明らかとなった。また、PAMPS/PDMAAm DN ゲルは皮下に埋植しても高い生体内安定性を維持し、6 週間では物性変化をほとんど認めないことも確認している。さらに、日本白色家兎の組織に PAMPS/PDMAAm DN ゲルを埋植しても 6 週後の埋植ゲルの弾性率や含水量に影響を与えず、生体内に埋植しても機械特性を失わないことが示されている

²¹。

1.3.3. PAMPS/PDMAAm DN ゲルによる軟骨分化誘導

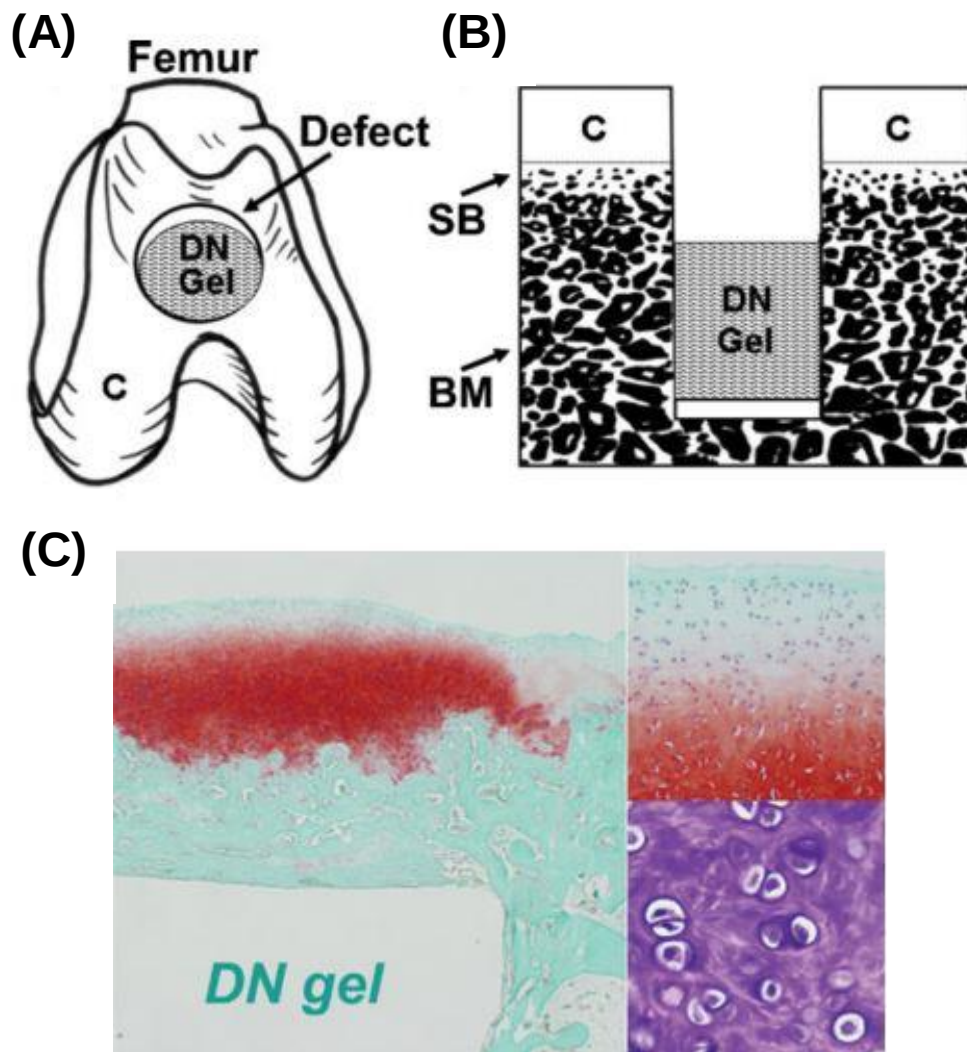
軟骨分化誘導のために数々の組織工学研究がなされているが、足場材料は細胞周囲の微小環境を調整し分化誘導する上で重要な要素である。Engler らは基板の弾性により幹細胞の分化の運命が調節され、例えば間葉系幹細胞を柔らかい基板の上で培養すると、神経系分化マーカー遺伝子が発現し、硬い基板の上で培養すると骨分化マーカー遺伝子がアクチン細胞骨格構築要素依存性に発現することを示した²²。また、この基板となる PAMPS/PDMAAm DN ゲルは従来のハイドロゲルと異なり構造内での細胞培養は困難であるものの、その高い弾性により三次元構造を付与できる。これらの特性から PAMPS/PDMAAm DN ゲルは骨軟骨柱移植術の移植骨軟骨柱のように円柱状のプラグとして軟骨欠損部に埋植でき、この移植ゲルの上に骨髄と接する空隙を作ることによって分化能を有する間葉系幹細胞が集積する場を提供できれば、ゲルの基質特性を感知した細胞が軟骨分化誘導されることが示唆された。従って、PAMPS/PDMAAm DN ゲルを用いることにより、細胞培養を要しない新しい軟骨再生治療法を確立できる可能性があると考えた。

そこで申請者が属する研究グループは、ATDC5 細胞を用いた *in vitro* 実験により PAMPS/PDMAAm DN ゲルの軟骨分化誘導能を確認した²³。その結果、インスリン添加培地を用いて PAMPS/PDMAAm DN ゲル上で ATDC5 細胞を培養 (DN ゲル培養条件) すると培養開始 7 日目で細胞凝集体を呈し、2 型コラーゲン、アグリカン及び Sox9 mRNA の発現量がポリスチレン (PS) 培養条件と比較して有意に高かった。これらの結果より PAMPS/PDMAAm DN ゲル上の ATDC5 細胞は有意に軟骨分化誘導されることが明らかとなった。また、日本白色家兎を用いた *in vivo* 実験において、膝蓋大腿関節の大腿骨滑車部に作成した骨軟骨欠損の基底部に PAMPS/PDMAAm DN ゲルを軟骨表面からゲルの表面までの空隙が 1.5-3.5mm となるように埋植すると、4 週間でこの欠損部にサフラニン O 染色で赤く染色され、かつ 2 型コラーゲン陽性の硝子軟骨が自然再生することを発見した²³。しかし術後 12 週では、再生組織内のサフラニン O 染色陽性領域の縮小と軟骨下骨領域

の増加を認め、この結果は臨床応用において再生組織が線維化や骨化するという治療の限界が示唆された。そこで申請者が属する研究グループは軟骨細胞の増殖やマトリックスの合成を促進するといわれているヒアルロン酸 (HA; Hyaluronic acid) を添加する方法を提案し、骨軟骨欠損部への PAMPS/PDMAAm DN ゲル埋植術に HA の関節内投与を併用して日本白色家兎モデルの術後 12 週の組織を評価した²⁴。その結果、HA 投与群は HA 非投与群と比較して組織学的に有意に高い硝子軟骨再生能を示し、以上の結果から、PAMPS/PDMAAm DN ゲルは硝子軟骨を再生誘導するばかりではなく硝子軟骨形質の維持に寄与できる可能性が示唆された。

しかし、なぜ PAMPS/PDMAAm DN ゲルが軟骨分化を誘導するかについて不明である。近年、申請者が属する研究グループは、軟骨分化誘導のメカニズムを力学的観点から解明することを目的として研究を行い、PAMPS/PDMAAm DN ゲル上で ATDC5 細胞を培養すると細胞にアクチン代謝を介した細胞骨格の変化が起こり 1 細胞のヤング率が有意に増加することを明らかにしている²⁵。

今回、申請者は、PAMPS/PDMAAm DN ゲルによる軟骨分化誘導メカニズムのさらなる解明のために、PAMPS/PDMAAm DN ゲルを構成要素であり軟骨基質と近似した物性を持つ PAMPS ゲルに着目し、*in vitro* 実験を用いその軟骨分化誘導のメカニズムを分子生物学的観点から解明した。



[Yasuda, K. *et al.* (2009) 文献 23 より引用]

図 1. PAMPS/PDMAAm DN ゲルによる軟骨分化能

(A) 日本白色家兎の膝蓋大腿関節の大腿骨滑車部への PAMPS/PDMAAm DN ゲルプラグ埋植方法

(B) 日本白色家兎の膝蓋大腿関節の大腿骨滑車部に円柱状の PAMPS/PDMAAm DN ゲルプラグを埋植した後の断面図

関節面と PAMPS/PDMAAm DN ゲル表面の間に 1.5-3.5mm の空隙が残るように埋植する

(C) 組織学的所見 : PAMPS/PDMAAm DN ゲル上にサフラニン-O 染色で赤く染まる軟骨組織を認め、ヘマトキシリン・エオジン染色で卵円形細胞が細胞間マトリックス内に観察された

[SB(Subchondral bone):軟骨下骨、BM(Bone marrow):骨髓]

1.3.4. PAMPS/PDMAAm DN ゲルにおける PAMPS ゲルの役割

PAMPS ゲルは PAMPS/PDMAAm DN ゲルの構成要素であり、軟骨組織が持つプロテオグリカンと同様に硫酸基を有し陰性荷電しているハイドロゲルである。PAMPS ゲルの荷電は膨潤度に寄与するが疎の高分子鎖を持つため脆く、圧縮破断強度は 0.4MPa であり、PAMPS/PDMAAm DN ゲルの圧縮破断強度と比較して低い^{19, 26, 27}。しかし、PAMPS ゲルの荷電や硫酸基は軟骨基質と類似していることから、このゲルを基板としてそこから刺激を受けた細胞の軟骨分化が誘導されることが示唆された。そこで申請者は、PAMPS ゲルの軟骨分化誘導メカニズムの解明が PAMPS/PDMAAm DN ゲルのメカニズム解明のために有力な手がかりとなると考えた。

申請者が属する研究グループはまず PAMPS ゲルによる軟骨分化誘導能を調べた。Ogawa らは日本白色家兎を用いて膝蓋大腿関節の骨軟骨欠損部に関節表面からゲル表面まで 2.0mm の間隙を残して PAMPS/PDMAAm DN ゲル、PAMPS ゲル及び PDMAAm ゲルのいずれかを埋植し、術後 4 週に組織評価とリアルタイム PCR による軟骨分化マーカーの発現を比較した²⁸。その結果、PAMPS ゲルでは PAMPS/PDMAAm DN ゲルと同様に高い軟骨分化能を有していることが明らかとなり、PAMPS ゲルは軟骨の再生を誘導するために重要な役割を担うゲルであることが示唆された。また近年、Yoshikawa らは ATDC5 細胞をヒアルロン酸(HA)を添加した培地を用いて PAMPS ゲル上で培養すると、PAMPS/PDMAAm DN ゲル上で培養した条件と同様に軟骨分化が促進されることを報告した²⁹。この結果は、PAMPS ゲルの軟骨分化誘導は関節液中のヒアルロン酸(HA)による影響を受ける可能性を示唆した。さらに Kwon らは、PAMPS ゲル上で ATDC5 細胞を培養するとインスリンを添加しなくても軟骨分化を誘導することを示した³⁰。そのメカニズムの解明において、荷電の異なる①陰性に荷電した PAMPS ゲル、②電荷的に中性である PDMAAm ゲル、③AMPS のモル比率により電荷密度を変化させた三種類(AMPS モル比率 =0.25、 0.5、 0.75)のポリ(AMPS-co-DMAAm)ゲル上で ATDC5 細胞を培養し、ゲルの荷電が軟骨分化誘導能へ与える影響を検討した³⁰。その結果、高い陰性荷電を有する PAMPS ゲルとポリ(AMPS-co-DMAAm)ゲル(AMPS モル比率 =0.75)上の ATDC5 細胞は高い細胞増殖能を示し、培養 14 日までに ATDC5 細胞の軟骨分化形態である細胞凝集体を形成し、高い軟骨分化マーカーの発現を示すことが明らかとなった。さらに、申請者が属する研究グループはハイドロゲルの陰性荷電がウシ胎児大動脈内皮細胞(BFAECs; Bovine fetal aorta endothelial cells)において細胞増殖を促進させることを明らかにしている³¹。以上の結果は、PAMPS ゲルの負の荷電状態が細胞の接着や増殖を促進し、軟骨分化誘導することを示唆している。しかし、細胞表面は、おおよそリン脂質により陰性荷電しているにもかかわらず、細胞が細胞表面と同様の荷電を有する PAMPS ゲルに接着することは疑問である。このような背景から Narita らは細胞

とハイドロゲル基質の電氣的な接着メカニズムについて解明するための研究を行っている³²。まず、PAMPS ゲルを疎水性基質上(ポリメタクリル酸メチル樹脂 (PMMA; Polymethyl methacrylate)、ポリエチレン (PE; polyethylene)、ポリプロピレン (PP; polypropylene))、あるいは親水性基質上(硝子、雲母、シリコンウェハー、蒼玉)で作成し、これらのゲル上に分子接着の要素を排除するために細胞壁を取り除いたタバコ BY-2 プロトプラストを播種しその接着能を検討した。その結果、疎水性基質上で作成された PAMPS ゲル上のプラストの接着能は親水性基質上で作成された PAMPS ゲルと比較して高く、また陽性荷電したジメチルアミノプロピルアクリルアミド (DMAPAA ; Quaternized dimethyl-aminopropylacrylamide)においても疎水性基質上で作成するとプロトプラストが接着することを示した。一方、親水性基質上で作成された DMAPAA ゲル上ではプロトプラストの破壊が起こった。疎水性基質から成る PAMPS ゲルは、高い膨潤度と低い弾性の性質を有し、緩いクロスリンクによって高分子鎖がゲル表面に表出していると考えられている。従って、この高分子鎖の細胞表面のわずかな陽性荷電がプロトプラスト表面の陰性荷電とアクセスしていることを示唆し、従来の概念と異なる静電氣的な接着メカニズムが存在することを示唆した。

しかし、Kwon らの研究では中性である PDMAAm ゲル上の ATDC5 細胞は、接着能が低いにも関わらず軟骨分化形態である細胞凝集体を形成し、培養 7 日目で高い軟骨分化マーカーの発現を示した。また、陰性荷電した PAMPS ゲルの ATDC5 細胞における細胞増殖能は、陰性対照である PS 培養条件に比べ低かった³⁰。以上の結果より、PAMPS ゲルは電氣的な要素ばかりではなく他の作用により軟骨分化誘導している可能性がある。PAMPS ゲルは軟骨基質が有するプロテオグリカンと同様の硫酸基を有し、特有の弾性を持つハイドロゲルである。従って、PAMPS ゲル上の細胞は組織分化に重要な細胞-マトリックス間の特異的な分子生物学的な相互作用を受け、結果として軟骨分化誘導シグナルを活性化することが示唆される。しかし、PAMPS ゲルが誘導する軟骨分化メカニズムについて分子生物学的に解明した報告はこれまでにない。

1.4. 軟骨分化誘導シグナルに関する研究の歴史

胎生期における発生や軟骨内骨化における軟骨分化は種々の分子やサイトカイン、シグナルにより制御されている。これらの報告を基に種々の細胞における軟骨分化誘導シグナルが解明されてきた。

TGF-beta/BMP シグナルは軟骨分化において必須のシグナルであるが³³⁻³⁷、TGF-beta1 や TGF-beta2 はニワトリ翅芽間充細胞のマイクロマス培養で軟骨分化を誘導する³⁸。また、ウシ由来関節軟骨細胞を TGF-beta1 を添加したポリグリコール酸 (PGA; polyglycolic acid) に播種すると成長因子を添加しなくて

も軟骨基質の生成が促進される³⁹。またウシ由来骨髄系間葉系幹細胞のペレット培養系で、TGF-beta2 や TGF-beta3 は軟骨分化マーカーの発現を誘導する⁴⁰。Pei らは TGF-b1 と共に FGF2 を添加すると、ポリグリコール酸 (PGA) に培養したウシ由来軟骨細胞の再分化が誘導されることを示した⁴¹。また、Sekiya らはヒト骨髄系間葉系幹細胞の TGF-beta3 誘導性軟骨分化は BMP2、BMP4 および BMP6 の添加により促進されることを報告し、ヒト骨髄系間葉系幹細胞を培養したポリグリコール酸 (PGA) を用いた軟骨再生法において、プロテオグリカンが豊富な大量の軟骨を獲得するためには、BMP2 による誘導が最も効果的であることを報告している⁴²。Smad1、Smad5、Smad8 は BMP に対するエフェクター分子であり、Smad2 や Smad3 は TGF-beta に対するエフェクター分子であるが^{43,44}、BMP4 によって Smad1 や Smad5 の活性化が 2 型コラーゲン遺伝子の転写を促進することが軟骨原性細胞である MC615 を用いて報告されている⁴⁵。

MAPK シグナルは細胞種や分化段階により異なり、軟骨分化における基質産生は主に ERK1/2 や JNK により制御されている⁴⁶⁻⁴⁸。また、p38 は軟骨分化に促進的に作用することが報告されている⁴⁹。近年、ERK-5 はヒト由来骨髄系間葉系細胞の高密度培養系の軟骨分化において抑制的に作用することが明らかとなっている⁵⁰。さらに、MEK5 と ERK5 の siRNA によるノックダウンは軟骨形成を促進することが知られている。

Wnt/beta-Catenin における Wnt は軟骨分化に抑制的、または促進的、あるいは 2 面の作用を有する。Wnt3a は BMP2 に対し促進的に作用し間充織細胞の軟骨分化を誘導することが報告され⁵¹Wnt5a は細胞凝集を促進し、軟骨分化を誘導することが間充織細胞を用いて報告されている⁵²。一方、Wnt3a は beta-Catenin を介して Sox9 の転写を抑制することが知られ、Wnt7 も同様に抑制作用を持つことが報告されている⁵³。

Jak/Stat シグナルでは、Stat1 が FGF シグナルによる軟骨分化を抑制することがラット軟骨肉腫細胞を用いて報告されている⁵⁴。また、Stat3 は、ERK1/2 とともに成長軟骨の成長に関与するレプチンによって誘導されることが ATDC5 細胞を用いて明らかとなっている⁵⁵。

PI3K/Akt シグナルは正常の肥大化軟骨細胞への分化や骨端軟骨の成長に重要であるが^{56,57}、成人の関節軟骨では PI3K/Akt シグナルが基質の合成や維持に作用し、Akt の恒常的な発現は軟骨分化マーカーを上昇させることが知られている。また、ATDC5 細胞のインスリン誘導性軟骨分化誘導において PI3K/Akt シグナルが活性化していることが報告されている^{58,59}。

RhoA/ROCK シグナルでは、ROCK の阻害により ATDC5 細胞のアクチン骨格や Sox9 の発現が制御され、軟骨分化が促進されることが報告されている^{60,61}。

1.5. マウス由来クローン化細胞株 ATDC5 細胞について

申請者は本研究において、Atsumi らによって樹立されたマウス由来クローン化細胞株 ATDC5 細胞⁶²を用いて *in vitro* 実験を行った。ATDC5 細胞はインスリンを添加した分化培地を用いて培養することにより、未分化状態から増殖軟骨細胞、肥大化軟骨細胞および石灰化のような軟骨分化を *in vitro* で忠実に再現できる細胞として知られている⁶²。形態学的観察において、ATDC5 細胞はインスリン存在下でコンフルエントに達した後も増殖し、その後凝集し軟骨結節と呼ばれる細胞凝集体を形成する。この軟骨結節の中心は前駆肥大軟骨期であり、次第に増殖が停止する。この軟骨結節を形成し始めるとプロテオグリカンおよび2型コラーゲンを発現し、肥大軟骨期には10型コラーゲンを発現する。さらに分化が進むとアルカリホスファターゼの上昇に伴い軟骨基質の石灰化が起こる。分子生物学的には、生体内の成長板と同様に分化段階を経てFGFR3を発現することや⁶³、BMP4がATDC5細胞の未分化期に発現することが知られている^{64, 65}。これらの理由から、軟骨分化に関する *in vitro* 研究では、しばしばATDC5細胞が用いられている。

一方、インスリンなどの分化誘導因子を添加しなくてもATDC5細胞を有力に軟骨細胞へ分化させ得たという報告は、申請者の属する研究グループがPAMPSゲルあるいはPAMPS/PDMAAm DNゲル上の培養で行った上述の報告を見るのみである^{29, 30}。したがって、合成高分子ゲルであるPAMPSゲルがどのような分子機序によってATDC5細胞を軟骨細胞へ分化させ得るのか、という疑問に答えることは極めて重要である。

2. 本研究の目的

関節軟骨損傷は外傷や様々な関節疾患および加齢変化により引き起こされ、最終的に変形性関節症となるため、治療上重要な疾患であると認識されている。これまで関節軟骨(硝子軟骨)は *in vivo* で自然再生しないとされてきた²⁻⁴。従って、関節軟骨欠損部を修復するために軟骨様組織と細胞培養を組み合わせた足場材料を埋植する方法を用いた様々な組織工学的治療がなされている^{15, 18, 66, 67}。しかしながら、関節軟骨損傷に対する機能的な修復方法は、未だ組織再生医療の大きな課題となっている。

申請者が属する研究グループは、関節軟骨修復に対する革新的な治療法を開発し、細胞周囲環境の弾力が幹細胞分化を制御するというEnglerらの報告²²を基に、軟骨欠損部の底部に柔らかい生理活性ハイドロゲルを埋植することによりゲルの表面に硝子軟骨の再生を誘導することができる可能性を示唆した。そこで、申請者が属する研究グループは、2006年より軟骨修復に対する治療法を開発するため、独自に開発した生体材料であるPAMPS/PDMAAm DNゲルに着目

し、一連の研究を始めてきた¹⁹。PAMPS/PDMAAm DN ゲルは高い生体活性を有し、筋組織内に埋植すると、6 週間埋植しても組織への毒性作用を示さないことが明らかとなっている^{20,21}。また、PAMPS/PDMAAm DN ゲル上で培養した ATDC5 細胞は *in vitro* で軟骨分化が促進されることが判明した²³。さらに、ウサギの膝蓋大腿関節の大腿骨滑車部に作成した骨軟骨欠損部の基底部に関節面からゲル表面まで深さ 1.5-3.5mm の空隙が残るように PAMPS/PDMAAm DN ゲルを埋植すると、埋植後 4 週間でその空隙に硝子軟骨が再生することが明らかとなった²³。これは、細胞培養や生体活性分子の添加を加えなくても、合成ハイドロゲルが軟骨分化を誘導することを発見した最初の報告であった。

PAMPS/PDMAAm DN ゲルは、PAMPS と PDMAAm という 2 つの独立したポリマーがクロスリンクしたネットワークにより互いに網目構造を成している。この構成ゲルの 1 つである PAMPS ゲルは、陰性荷電と硫酸基を有し、正常軟骨を構成するプロテオグリカンと近似した化学的特徴を有する。そこで、申請者が属する研究グループは、*in vivo* 実験を用いてどの構成ゲルが軟骨分化を誘導するかについて研究した。その結果、PAMPS ゲル自体には硝子軟骨再生誘導能があり、DN ゲルの軟骨再生誘導において重要な役割を担っていることが示唆された²⁸。しかしながら、PAMPS ゲルがどのようなメカニズムにより損傷部に遊走してきた軟骨原性細胞や骨髄間葉系幹細胞を軟骨分化に導くかについては不明である。そこで、DN ゲルを用いた細胞培養を要しない新しい治療戦略を確立するために、このメカニズムを解明することが必要であると考えた。

そこで申請者は *in vitro* 実験を用いて、PAMPS/PDMAAm DN ゲルによる軟骨再生誘導において主たる役割を担っている PAMPS ゲルの軟骨細胞分化誘導メカニズムの解明を目指した。本研究では以下の二つの理由により軟骨細胞分化モデルである ATDC5 細胞を用いた。第一に、ATDC5 細胞はインスリン添加により軟骨分化過程を再現できる細胞であること⁶⁸、第二に、申請者が属する研究グループの先行研究において、PAMPS ゲル上で ATDC5 細胞を培養するとインスリンを添加しなくても軟骨分化誘導することが *in vitro* で解明されていることである³⁰。本 *in vitro* 実験においては、マイクロアレイ解析に基づいたコンピューターベースによる遺伝子(mRNA)解析と、ウェスタンブロット解析による分子活性の分析および対象遺伝子に対するリアルタイム PCR 解析を行った。本研究の第一の目的は、PAMPS ゲルが誘導する ATDC5 細胞の軟骨分化において、インスリン依存性軟骨分化誘導と比較してどのようなシグナルが活性化されるか明らかにすることである。第二の目的は、抽出されたシグナルの挙動を解析し、そのシグナルの阻害による軟骨分化への影響を検証することによって、PAMPS ゲル特異的に誘導されるシグナルを確定することである。

II. 略語表

本文中および図中で使用した略語は以下の通りである。

bFGF	Basic fibroblast growth factor
BMP	Bone morphogenetic protein
CBP	CREB binding protein
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DN	Double network
DNA	Deoxyribonucleic acid
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
FAK	Focal adhesion kinase
FGF	Fibroblast growth factor
FGFR	Fibroblast growth factor receptor
GAG	Glycosaminoglycan
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GO	Gene ontology
GSEA	Gene Set Enrichment analysis
HA	Hyaluronic acid
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HRP	Horseradish peroxidase
IGF	Insulin-like growth factor
INHBA	Inhibin beta A
JNK	Jun amino-terminal kinase
LTBP1	Latent-transforming growth factor beta-binding protein 1
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MEK	MAPK/ERK kinase
OP	Osteogenic protein
PAMPS	Poly-(2-acrylamido-2-methylpropanesulfonic acid)
PDGF	Platelet-derived growth factor
PDMAAm	Poly-(N,N'-dimethyl acrylamide)
PGA	Polyglycolic acid
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PLGA	Poly (Lactic Acid-co-Glycolic acid)
PLLA	Poly-L-lactic acid
PTHrP	Parathyroid hormone-related protein
PVDF	Poly vinylidene difluoride

RNA	Ribonucleic acid
SAPK	Stress-activated protein kinase
SDS	Sodium dodecyl sulfate
Serpins	Serine proteinase inhibitors
Sox	SRY-related HMG box-containing gene
Stat	Signal transduction and Activator of Transcription
TGF	Transforming growth factor
THBS1	Thrombospondin 1
Tris	Tris(hydroxymethyl) aminomethane

III. 実験方法

1. PAMPS ゲルの作成

PAMPS ゲルは、モノマーの 2-アクリルアミド-2-硫酸化メチルプロパン (AMPS; Tokyo Chemical Industry Co., Ltd. Tokyo, Japan) 1mol/L を、架橋剤である N,N' -メチレンビスアクリルアミド (MBAA; Tokyo Chemical Industry Co., Ltd. Tokyo, Japan) 4mol %および UV 開始剤である 0.1mol % 2-オクソグルタル酸 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) と混合し、2枚のガラス板から成るセルに注入した¹⁹。これに波長 365 nm の紫外線を 6 時間照射し重合させ、厚さ約 2-3mm のシート状の PAMPS ゲルを合成した (図 2)。合成後、PAMPS ゲルを 4-(2-ヒドロキシエチル)-ピペラジン-1-エタンスルホン酸 (HEPES; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) バッファー [NaHCO_3 1.55×10^{-2} M, HEPES 5×10^{-3} M, NaCl 0.14 M, pH 7.4] に浸し 7 日間、1 日 2 回交換し未反応物質を除去した。細胞培養用に、直径 15mm 又は 35mm のパンチを用いてシート状の PAMPS ゲルからディスク状のゲルを抜き出し、120°C、20 分の条件下に高圧滅菌後、24well 又は 6well マルチプレートの底部に設置し PAMPS ゲル培養皿を作成した (図 2)。

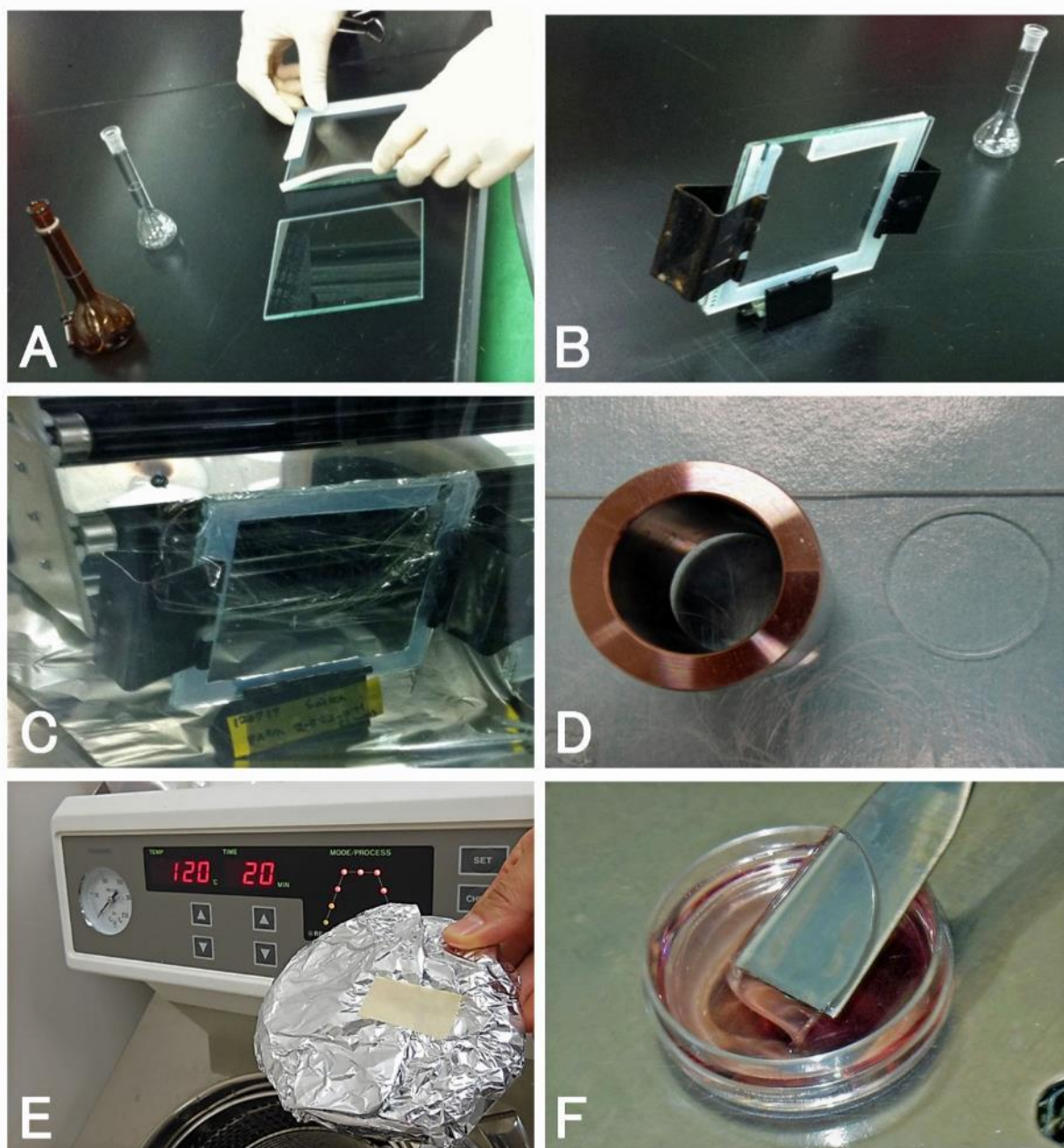


図 2. PAMPS ゲル作成過程

- A. 2 枚のガラス板とセルの作成
- B. ガラス板からなるセルに AMPS 含有水溶液、MBAA (架橋剤) と 2-オクソグルタル酸 (UV 開始剤) を注ぐ
- C. 波長 365nm の紫外線を 6 時間照射する
- D. パンチでディスク状の PAMPS ゲルを切り出す
- E. 120℃、20 分間の条件で高圧滅菌をかける
- F. ディスク状の PAMPS ゲルを培養液が入った培養皿の底部に薬匙を用いて設置する

2. 細胞培養

理化学研究所 (RIKEN, Tsukuba) より入手したマウス由来クローン化細胞株である ATDC5 細胞 5×10^4 個細胞/cm² を、維持培地[1:1 Dulbecco' s modified Eagle' s 培地/ Ham' s F-12 培地 (DMEM/ F-12; GIBCO Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)、5% ウシ胎児血清、10 µg/ml ヒトトランスフェリン (Roche, Basel, Switzerland)、30nM 亜セレン酸ナトリウム (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)]を入れたポリスチレン培養皿、または、PAMPS ゲル培養皿に播種し、5% CO₂、37℃の条件下に培養した。ATDC5 細胞の軟骨分化誘導では、維持培地に 10 µg/ml のウシ由来インスリン (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) を添加し、分化培地として使用した。実験では、24well または 6well マルチプレートを用いて①維持培地を用いてポリスチレン上で培養した条件 (PS 培養条件)、②インスリン添加培地を用いてポリスチレン上で培養した条件 (PS-I 培養条件) および③維持培地を用いて PAMPS ゲル上で培養した条件 (PAMPS ゲル培養条件) の 3 条件において ATDC5 細胞を培養した。培地交換は 2-3 日に 1 回行った。組織学的観察は、位相差顕微鏡 (Nikon Eclipse TE300, Nikon, Tokyo, Japan) を使用した。

3. 研究デザイン

3.1. 研究 1 : PAMPS ゲルによる軟骨分化誘導能の検討

ATDC5 細胞の PAMPS ゲル誘導性軟骨分化とインスリン依存性軟骨分化による誘導能の違いを確認するため、①インスリン添加培地を用いてポリスチレン上で培養した条件 (PS-I 培養条件) および②維持培地を用いて PAMPS ゲル上で培養した条件 (PAMPS ゲル培養条件) を用い、約 2 週間における ATDC5 細胞の形態変化とリアルタイム PCR による軟骨分化マーカーの mRNA の発現量を比較した。

3.2. 研究 2 : PAMPS ゲルが誘導する軟骨分化における特異的活性化シグナルの探索

第一の実験では、PAMPS ゲル培養条件により特異的に誘導される軟骨分化誘導シグナルを探索するため、Gene Set Enrichment analysis (GSEA) を用い、培養 3 日間において PAMPS ゲル培養条件で有意に発現しているシグナルの遺伝子セットを PS 培養条件および PS-I 培養条件との比較により網羅的に同定した。第二の実験では、対象となったシグナルおよび軟骨分化に関連するシグナルに属する主要な分子の培養 3 日間におけるタンパクの発現量とリン酸化量を、ウェスタンブロットを用いて解析し、PAMPS ゲル培養条件で高い発現がみられる分子を半網羅的に抽出した。第三の実験では、候補分子が属するシグナル経路

を対象として、ConPath ソフトウェア (<http://conpath.dna-chip.co.jp/>) によるパスウェイ解析を行い、どの遺伝子の発現が強調しているかを確認した。第四の実験では、対象となった分子(本研究では BMP4)の mRNA の発現量をリアルタイム PCR 解析を用いて確認した。

3.3. 研究 3:PAMPS ゲルにより誘導される BMP/Smad シグナルの阻害による軟骨分化誘導能への影響

研究 2 の結果より PAMPS ゲル特異的な軟骨分化誘導シグナルとして候補となった TGF-beta/BMP シグナルの古典的経路 (canonical pathway) である BMP/Smad シグナルの重要性を明らかにするために、BMP タイプ I 受容体の阻害剤であるドルソモルフィン (Abcam Biochemicals, Cambridge, UK) を添加した培養条件を用い、BMP4 のエフェクター分子である Smad1/5 の培養 72 時間におけるリン酸化の抑制に及ぼす効果をウェスタンブロット解析した。また、Smad1/5 のリン酸化阻害による培養 13 日間の軟骨分化へ与える影響を形態観察とリアルタイム PCR 解析による軟骨分化マーカー遺伝子の発現量により検討した。

4. 評価方法

4.1. マイクロアレイ解析

PS 培養条件、PS-I 培養条件および PAMPS ゲル培養条件における培養 3 日間の ATDC5 細胞の遺伝子発現量をマイクロアレイ解析により分析した。製造元のプロトコールに従い、スピンカラムと ISOGEN (Nippon Gene, Tokyo, Japan) を用いて各サンプルの RNA を抽出し、2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, CA, USA) を用いて RNA integrity number (RIN) と RNA 量を測定した。マイクロアレイ解析には、SurePrint G3 Mouse GE 8 x 60K Microarray を用いた。各遺伝子に対し、三組のプローブをマイクロアレイに設定した。DNA Microarray Analyzer (Agilent Technologies, CA, USA) を用いて Cy3 標識、スキャンおよびハイブリダイゼーションを行い、DNA Chip Research Inc. (Kanagawa, Japan) および Agilent-certified Service Provider を用いて、データの標準化と遺伝子オントロジー (GO; gene ontology) 解析を行った。本解析の結果を基に、PAMPS ゲル培養条件で PS 培養条件および PS-I 培養条件と比較して高く発現しているシグナルを抽出するため、Fisher の正確確率検定を用いて Gene Set Enrichment analysis (GSEA) を行った^{69,70}。パスウェイ解析では ConPath ソフトウェアを用い、PAMPS ゲル培養条件で対象となったシグナルのどの遺伝子が高群と比較し 2 倍以上発現しているかについて分析した。

4.2. ウェスタンブロット解析

各種培養条件下における培養細胞を細胞可溶化バッファー (RIPA Buffer; Radio-Immunoprecipitation Assay Buffer) [10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, complete protease inhibitor mixture (Roche, Basel, Switzerland), phosphatase inhibitor mixture (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)] を用いて溶解し、15,000 回転/分 ($20,400 \times g$)、4°C の条件下に 5 分間遠心した。得られた上澄を細胞可溶化液としてプロテインアッセイキット (Bio-Rad, CA, USA) とマイクロプレートリーダー吸光度測定器を用い、タンパク質濃度を測定した。20 μ g のタンパク質量の細胞可溶化液に 5×サンプルバッファー [125mM Tris-HCl (pH 6.5), 5% 2-mercaptoethanol, 5% SDS, 0.25% bromophenol blue (BPB), 25% glycerol] を添加し、95°C で 5 分間熱処理によりタンパクを変性させた後、10% SDS-ポリアクリルアミドゲルを用いて 100V の定電圧条件下に電気泳動した。分離したタンパクをポリフッ化ビニリデン (PVDF; polyvinylidene difluoride) 膜 (Immobilon, Millipore, Billerica, MA, USA) に 25mA の定電流により転写し、1%ウシ血清アルブミン溶液で 1 時間ブロッキング処理を行った。表 1 に示す一次抗体を 4°C で一晩反応させ、2 次抗体として西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP; horseradish peroxidase) 標識抗-マウス IgG 抗体 (Dako, Glostrup, Denmark)、あるいは西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 標識抗-ラビット IgG 抗体 (Dako) を室温で 1 時間反応させた (表 1)。検出は ECL Plus Kit (GE Healthcare Ltd, Buckinghamshire, U.K.) を使用し、LAS system (Image Quant LAS 4000 mini GE healthcare) で化学発光を検出した。検出されたバンドを NIH Image J 1.44p ソフトウェア (ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>) を用いて定量解析した。

表 1 ウェスタブロット解析に用いた一次抗体

Signaling pathway	Antibody	Species	Manufacturer
	anti-Actin(C4)	Mouse	Millipore, UK
TGF-beta/BMP	anti-Smad1	Rabbit	CST, USA
signaling pathway	anti-Smad5	Rabbit	CST, USA
	anti-phospho-Smad1/5 (Ser463/465)(41D10)	Rabbit	CST, USA
MAPK	anti-p44/42MAPK(ERK1/2)(137F5)	Rabbit	CST, USA
signaling pathway	anti-p38MAPK	Rabbit	CST, USA
	anti-SAPK/JNK(56G8)	Rabbit	CST, USA
	anti-phospho-p44/42MAPK(ERK1/2) (Thr202/Tyr204)(D13.14.4E)	Rabbit	CST, USA
	anti-phospho-p38MAPK (Thr180/Tyr182)(D3F9)	Rabbit	CST, USA
	anti-phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185)(81E11)	Rabbit	CST, USA
	anti-phospho-MEK1/2 (Ser217/221)(41G9)	Rabbit	CST, USA
	anti-phospho-p90RSK(Ser380)(9D9)	Rabbit	CST, USA
	anti-phospho-MSK1(Thr581)	Rabbit	CST, USA
Wnt	anti-Wnt3a(C64F2)	Rabbit	CST, USA
signaling pathway	anti-Wnt5a/b(C27E8)	Rabbit	CST, USA
	anti-LRP6(C5C7)	Rabbit	CST, USA
	anti-phospho-LRP6(Ser1490)	Rabbit	CST, USA
	anti-Dvl3	Rabbit	CST, USA
	anti-β-Catenin(6B3)	Rabbit	CST, USA
	anti-phospho-β-Catenin (Ser33/37/Thr41)	Rabbit	CST, USA
Jak/Stat	anti-Jak1(6G4)	Rabbit	CST, USA
signaling pathway	anti-Jak2(D2E12)	Rabbit	CST, USA
	anti-Stat1	Rabbit	CST, USA
	anti-Stat3	Rabbit	CST, USA
	anti-Stat5	Rabbit	CST, USA
	anti-phospho-Stat3(Ser727)	Rabbit	CST, USA
	anti-phospho-Stat5(Tyr694)	Rabbit	CST, USA
PI3K/Akt	anti-Akt(C67E7)	Rabbit	CST, USA
signaling pathways	anti-phospho-Akt(Thr308)(244F9)	Rabbit	CST, USA

CST; Cell Signaling Technology

4.3. リアルタイム PCR 解析

各種培養条件における細胞から、RNeasy mini kit (Qiagen, Valencia, CA) を用い、製造元のプロトコールに準じて RNA を抽出した。A260/280 の吸光度比により、RNA の質を評価した。精製した RNA を PrimeScript RT reagent Kit (TaKaRaBio, Ohtsu, Japan) を用いて一本鎖 cDNA に逆転写した。RT 反応は 37°C の条件下に 15 分間、その後 85°C にて 5 秒間行った。全オリゴヌクレオチドは公表されている cDNA 配列をもとに作成した。本実験において対称とした 2 型コラーゲン、アグリカン、BMP4 およびグリセルアルデヒド 3 リン酸脱水素酵素 (GAPDH; Glyceroaldehyde-3-phosphate dehydrogenase) のプライマーシーケンスを表に示す(表 2)。

表 2 リアルタイム PCR 解析に用いたプライマーのシーケンス

Primer ID	Primers (5'-3')	
Type-2 collagen	Forward:	AGGGCAACAGCAGGTTACATAC
	Reverse:	TGTCCACACCAAATTCCTGTTCA
Aggrecan	Forward:	AGTGGATCGGTCTGAATGACAGG
	Reverse:	AGAAGTTGTCAGGCTGGTTTGGA
BMP4	Forward:	TTCCTGGTAACCGAATGCTGA
	Reverse:	CCTGAATCTCGGCGACTTTTT
GAPDH	Forward:	TGTGTCCGTCGTGGATCTGA
	Reverse:	TTGCTGTTGAAGTCGCAGGA

リアルタイム PCR は Thermal Cycler Dice TP800 (TaKaRaBio) を用いて、SYBR Premix Ex TaqTM (TaKaRaBio, Ohtsu, Japan) により、95°C 5 秒、60°C 30 秒から成るサイクルで 40 回反応させ、増幅の蛍光変化を検出した。蛍光変化は SYBER Green により検出した。単一 PCR 産物が得られたことが確認できるサイクルの終了時に解離曲線分析を行った。各遺伝子の発現量を Thermal Cycler Dice Real Time System software program (TaKaRaBio) を用い、 $\Delta\Delta Ct$ 法によりグリセルアルデヒド 3 リン酸脱水素酵素 (GAPDH; Glyceroaldehyde-3-phosphate dehydrogenase) に対する相対値として評価した。

4. 4. BMP/Smad シグナルの阻害

ATDC5 細胞の Smad1/5 のリン酸化阻害による軟骨分化の影響を検討するため、各培養条件に BMP タイプ I 受容体の阻害剤であるドルソモルフィンを 10 μ M 添加した。陰性対照として、ジメチルスルホキシド(DMSO; Dimethyl sulfoxide)を添加した。ドルソモルフィンの添加が軟骨分化マーカーの mRNA の発現に与える影響を確認する実験において、ドルソモルフィン添加培養条件(DM 培地条件)の発現量を DMSO 添加培養条件(DMSO 培地条件)の発現量で除した値を比率として示した阻害率を検討した。

5. 統計学的解析

すべてのデータは、平均値と標準偏差で表示した。2 型コラーゲン、アグリカンおよび BMP4 の mRNA 発現量において、分散分析、Fisher の制約付き最小有意差法を用いて各培養条件間の平均値の差について検定した。Smad1/5 のリン酸化レベルおよび 2 型コラーゲンやアグリカンの mRNA 発現の抑制率について、対応のない t-検定を用い、各培養条件間の平均値の差について検定した。また、2 型コラーゲンやアグリカンの mRNA 発現量において、同一群内の経時的推移の変化の比較に対する分散分析で有意差が得られた場合、初期値を対照として Dunnett テストによる検定を行った。Gene Set Enrichment analysis (GSEA) では、Fisher の正確確率検定を用いて統計学的に分析した。有意水準は 5%未満とした。

IV. 結果

1. PAMPS ゲルが誘導する軟骨分化誘導過程とインスリン依存性軟骨分化過程との差異

申請者は、ATDC5 細胞の PAMPS ゲル誘導性軟骨分化とインスリン依存性軟骨分化による誘導能の違いを確認するため、①インスリン添加培地を用いてポリスチレン上で培養した条件 (PS-I 培養条件) および②維持培地を用いて PAMPS ゲル上で培養した条件 (PAMPS ゲル培養条件) を用い、約 2 週間における ATDC5 細胞の形態とリアルタイム PCR による軟骨分化マーカーの mRNA の発現量を比較した。陰性対照として、③維持培地を用いてポリスチレン上で培養した条件 (PS 培養条件) を用いた。形態観察では、PAMPS ゲル培養条件の ATDC5 細胞は培養初期に紡錘形を呈し、培養 10 日目より過去の報告³⁰と同様に円形細胞から成る細胞凝集体を形成した (図 3)。一方、PS-I 培養条件の ATDC5 細胞は多角形を呈し、培養 15 日目に PAMPS ゲル培養条件と異なる細胞凝集体を呈した (図 3)。また、PS 培養条件では、細胞凝集体を形成しなかった (図 3)。

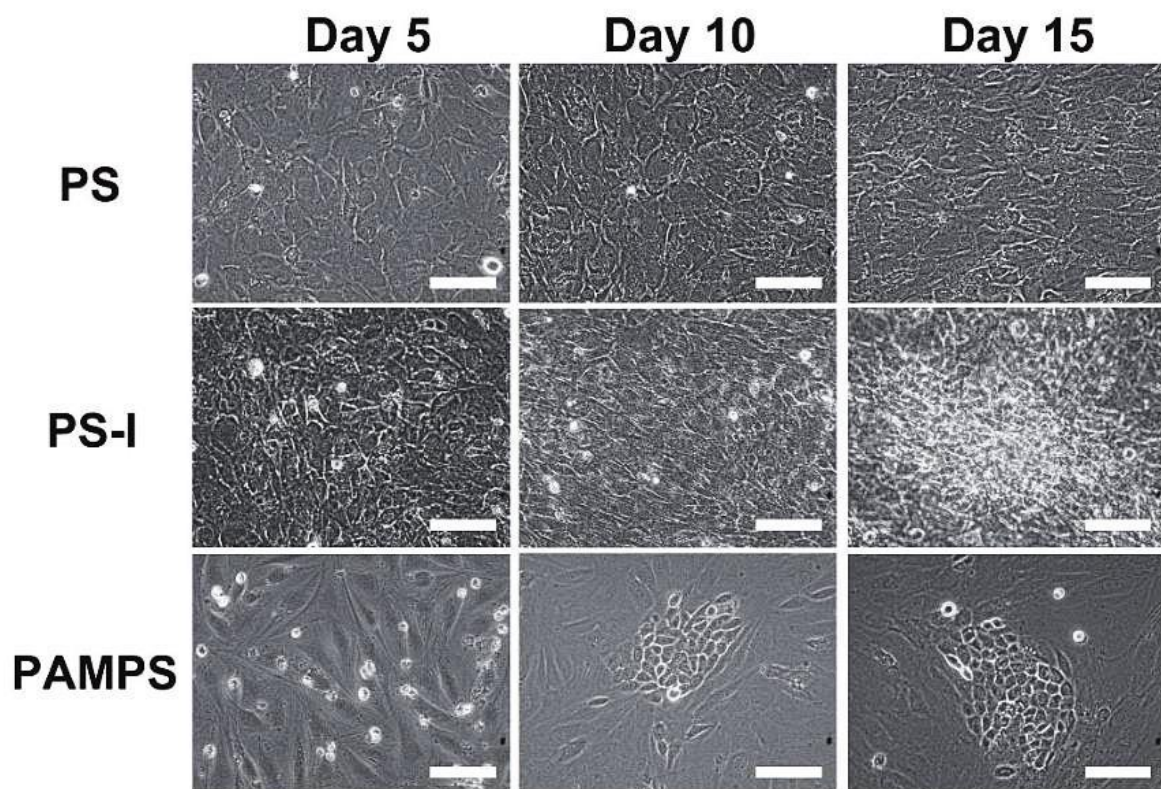


図 3. 形態観察による PAMPS ゲル培養条件と PS-I 培養条件における軟骨分化誘導過程の違い

培養開始 5 日目、10 日目および 15 日目における ATDC5 細胞の形態観察の結果を示す。PAMPS ゲル培養条件では、培養 10 日目より円形細胞から成る細胞凝集体を呈した。一方、PS-I 培養条件では培養 15 日目に PAMPS ゲル培養条件と異なる細胞凝集体を呈した。PS 培養条件では明らかな細胞凝集体を示さなかった。PS: 維持培地を用いてポリスチレン上で培養した条件 (PS 培養条件)、PS-I: インスリン添加培地を用いてポリスチレン上で培養した条件 (PS-I 培養条件)、PAMPS: 維持培地を用いて PAMPS ゲル上で培養した条件 (PAMPS ゲル培養条件)、Scale bar =100 μm 。

リアルタイム PCR 解析の結果、PS-I 培養条件における 2 型コラーゲンの発現量は、PS 培養条件と比較して培養 9-11 日目に有意に高く ($p=0.0003$: 9 日目、 $p<0.0001$: 11 日目)、アグリカンの発現量は、PS 培養条件と比較して培養 13 日目に有意に高かった ($p<0.0001$)。一方、PAMPS ゲル培養条件の 2 型コラーゲンの発現量は PS-I 培養条件と比較して培養 1-13 日目の全培養期間において有意に高く ($p=0.0001$: 1、5、7 日目、 $p<0.0001$: 3、9、11、13 日目)、アグリカンの発現量は PS-I 培養条件と比較して、培養 3 日目、9-13 日目に有意に高かった ($p=0.0001$: 3、11 日目、 $p=0.0178$: 9 日目、 $p<0.0001$: 13 日目) (図 4)。以上の結果より、PAMPS ゲル培養条件における ATDC5 細胞は、PS-I 培養条件における ATDC5 細胞と異なる形態を示し、早期より高い軟骨分化マーカーの発現を示すことが明らかとなった。また、PAMPS ゲル誘導性軟骨分化では、インスリン依存性軟骨分化と異なるシグナルが存在することが示唆された。

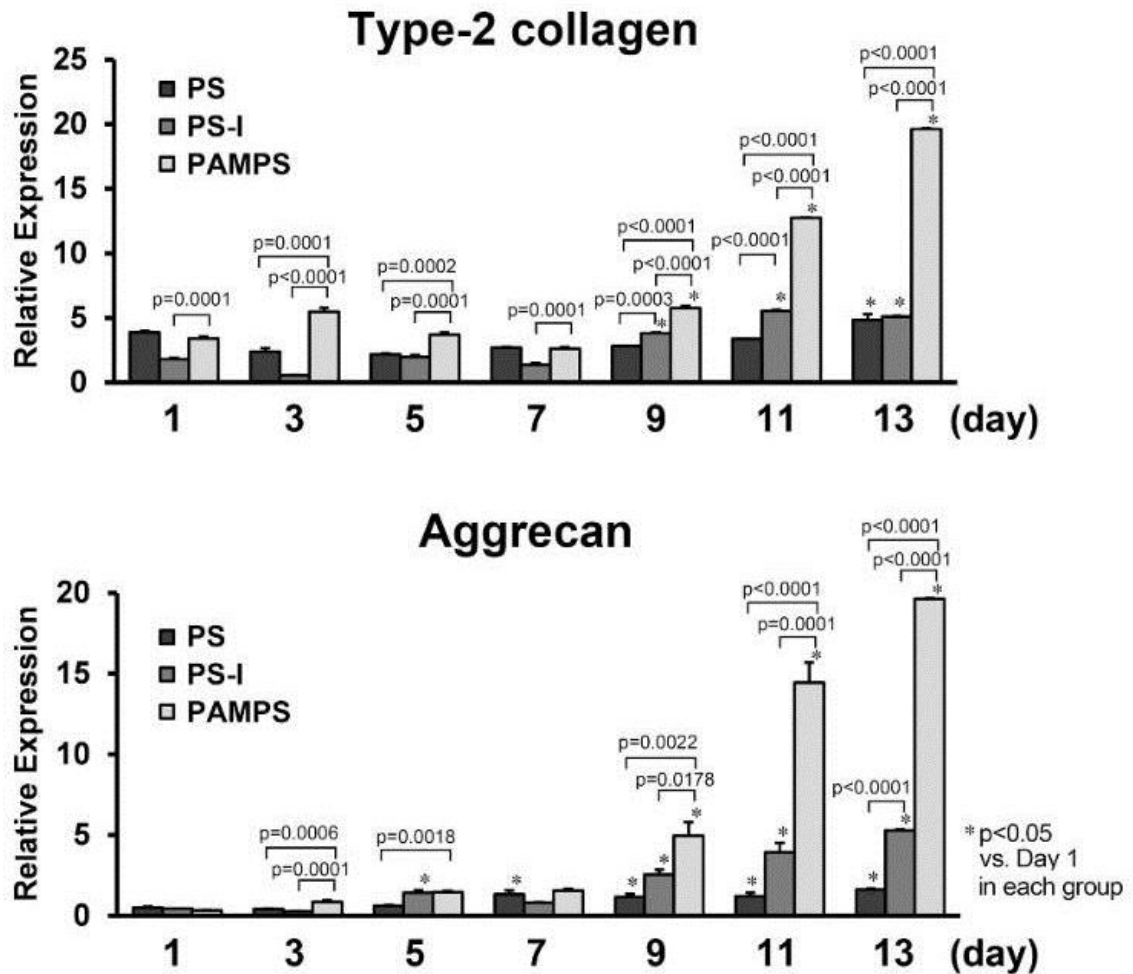


図 4. リアルタイム PCR 解析による軟骨分化マーカーの発現量の比較検討

培養開始 1 日目、3 日目、5 日目、7 日目、9 日目、11 日目および 13 日目の 2 型コラーゲンとアグリカンの発現量を比較解析した。有意水準は 5%とした。PS-I 培養条件における 2 型コラーゲンの発現量は、PS 培養条件と比較して培養 9-11 日目に有意に高く、アグリカンの発現量は、PS 培養条件と比較して培養 13 日目に有意に高かった。PAMPS ゲル培養条件における 2 型コラーゲンの発現量は PS-I 培養条件と比較して培養 1-13 日目の全培養期間において有意に高く、アグリカンの発現量は PS-I 培養条件と比較して、培養 3 日目、9-13 日目に有意に高かった。PS: 維持培地を用いてポリスチレン上で培養した条件 (PS 培養条件)、PS-I: インスリン添加培地を用いてポリスチレン上で培養した条件 (PS-I 培養条件)、PAMPS: 維持培地を用いて PAMPS ゲル上で培養した条件 (PAMPS ゲル培養条件)

2. PAMPS ゲルが誘導する軟骨分化における特異的シグナル伝達経路の網羅的解析

DNA マイクロアレイ解析のデータに基づき Gene Set Enrichment Analysis (GSEA)を行い、PAMPS ゲル培養条件において有意に発現変動がみられる遺伝子セットが属するシグナル経路を PS 培養条件および PS-I 培養条件との比較により同定した(表 3、表 4)。本解析では、Gene Set Enrichment Analysis (GSEA)により有意性がみられる経路の中でも主要な軟骨分化関連シグナル経路として知られる経路を焦点として抽出した。その結果、PAMPS ゲル培養条件では、培養 1 日目から 3 日目において、PS 培養条件および PS-I 培養条件と比較して、TGF-beta/BMP シグナルの遺伝子セットの発現変動が有意に増加していた($p < 0.0001-0.00156$)(表 3、表 4)。さらに、PAMPS ゲル培養条件では培養 2 日目および 3 日目において PS 培養条件および PS-I 培養条件と比較して、MAPK シグナルや Wnt シグナルの遺伝子セットの発現変動が有意に増加していた($p < 0.0001-0.00172$)(表 3、表 4)。

表 3 Gene Set Enrichment Analysis (GSEA)による PAMPS ゲル誘導性シグナルの抽出 (PAMPS ゲル培養条件 vs. PS 培養条件)

Day 1		Day 2		Day 3	
Pathway name	p-value	Pathway name	p-value	Pathway name	p-value
Focal adhesion KEGG	4.12E-04	Focal adhesion KEGG	0.00E+00	Focal adhesion KEGG	0.00E+00
TGF Beta SignalingPathway	1.56E-03	Smooth muscle contraction	1.00E-12	Smooth muscle contraction	2.80E-10
Inflammatory Response Pathway	8.25E-03	Insulin Signaling	1.18E-11	Insulin Signaling	4.08E-07
		MAPK signaling pathway KEGG	1.09E-09	Cell Cycle-G1 to S control Reactome	7.06E-07
		Integrin-mediated cell adhesion KEGG	1.74E-09	MAPK signaling pathway KEGG	1.82E-06
		TGF Beta Signaling Pathway	2.13E-08	Integrin-mediated cell adhesion KEGG	5.61E-06
		Alpha6-Beta4-Integrin NetPath 1	3.20E-08	Alpha6-Beta4-Integrin NetPath 1	7.79E-06
		Cell Cycle-G1 to S control Reactome	7.06E-07	TGF Beta Signaling Pathway	9.67E-06
		Regulation of Actin Cytoskeleton KEGG	2.90E-05	TNF-alpha-NF-kB NetPath 9	3.19E-04
		Wnt Signaling	1.06E-04	Wnt Signaling	1.72E-03
		TNF-alpha-NF-kB NetPath 9	1.11E-04	Inflammatory Response Pathway	1.78E-03
		Inflammatory Response Pathway	3.27E-04	Delta-Notch NetPath 3	4.02E-03
		Delta-Notch NetPath 3	1.19E-03		

表 4 Gene Set Enrichment Analysis (GSEA)による PAMPS ゲル誘導性シグナルの抽出 (PAMPS ゲル培養条件 vs. PS-I 培養条件)

Day 1		Day 2		Day 3	
Pathway name	p-value	Pathway name	p-value	Pathway name	p-value
Focal adhesion KEGG	1.96E-06	Focal adhesion KEGG	0.00E+00	Focal adhesion KEGG	0.00E+00
TGF Beta Signaling Pathway	3.25E-04	Insulin Signaling	5.75E-11	Smooth muscle contraction	6.34E-13
Inflammatory Response Pathway	1.78E-03	TGF Beta Signaling Pathway	2.13E-08	Insulin Signaling	1.18E-11
ESC Pluripotency Pathways	2.66E-03	MAPK signaling pathway KEGG	2.47E-08	Alpha6-Beta4-Integrin NetPath 1	6.25E-11
Integrin-mediated cell adhesion KEGG	3.22E-03	Integrin-mediated cell adhesion KEGG	5.31E-08	Integrin-mediated cell adhesion KEGG	2.89E-10
Smooth muscle contraction	3.43E-03	ESC Pluripotency Pathways	1.07E-07	MAPK signaling pathway KEGG	1.09E-09
Insulin Signaling	8.16E-03	Alpha6-Beta4-Integrin NetPath 1	2.18E-07	TGF Beta Signaling Pathway	2.13E-08
		Cell Cycle-G1 to S control Reactome	7.06E-07	ESC Pluripotency Pathways	2.32E-08
		Wnt Signaling	1.06E-04	Cell Cycle-G1 to S control Reactome	7.06E-07
		TNF-alpha-NF-kB NetPath 9	1.11E-04	Wnt Signaling	1.06E-04
		Regulation of Actin Cytoskeleton KEGG	7.93E-04	TNF-alpha-NF-kB NetPath 9	1.11E-04
		Delta-Notch NetPath 3	1.19E-03	Inflammatory Response Pathway	3.27E-04
				Delta-Notch NetPath 3	1.19E-03

3. PAMPS ゲルが誘導する軟骨分化における軟骨分化関連分子の発現量とリン酸化に関する解析

Gene Set Enrichment Analysis (GSEA)の結果、PAMPS ゲル培養条件で有意に発現変動がみられるシグナルとして同定された TGF-beta/BMP シグナル、MAPK シグナル、Wnt シグナルおよび軟骨分化に関連する Jak/Stat シグナル、PI3K/Akt シグナルに属する主要な分子を対象として、培養 1 日目、2 日目および 3 日目におけるタンパクの発現量とリン酸化量をウェスタングロート解析した。その結果、PAMPS ゲル培養条件では、PS 培養条件と比較して、TGF-beta/BMP シグナルに属する Smad1/5 や、MAPK シグナルに属する ERK、p38 および Jak/Stat シグナルに属する Jak1、Jak2、Stat3 の高い発現やリン酸化を認め、これらの分子群は PS-I 培養条件と比較しても同等か高い発現やリン酸化を示した(図 5)。このうち、PAMPS ゲル培養条件における Smad1/5 と p38 は、培養 2 日目から 3 日目において PS-I 培養条件と比較して高いリン酸化を示し、特に Smad1/5 のリン酸化は著明だった(図 5)。Gene Set Enrichment Analysis (GSEA)によって同定された Wnt シグナルでは、PAMPS ゲル培養条件において発現上昇を示す分子を認めなかった。以上の結果より、PAMPS ゲル培養条件では、Smad1/5 のリン酸化を介した BMP/TGF-beta シグナルの活性が重要であることが示唆された。

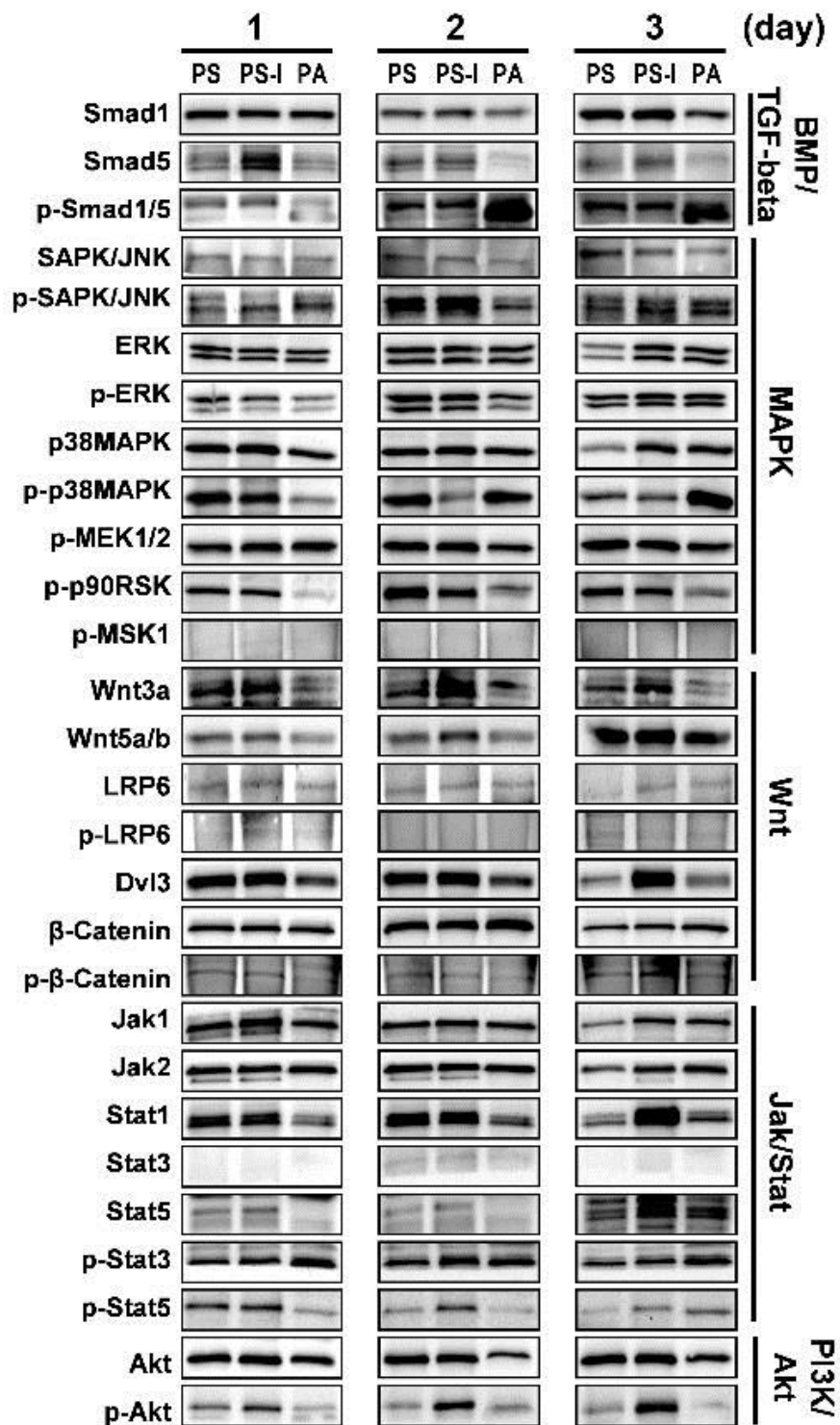


図 5. ウェスタンブロット解析による軟骨分化関連シグナル分子の発現量とリン酸化

(図 5 の説明) TGF-beta/BMP シグナル、MAPK シグナル、Wnt シグナル、Jak/Stat シグナルおよび PI3K/Akt シグナルに属する主要な分子を対象として、培養 1 日目、2 日目および 3 日目におけるタンパクの発現量とリン酸化量をウェスタンブロット解析した。その結果、PAMPS ゲル培養条件では TGF-beta/BMP シグナルに属する Smad1/5 や、MAPK シグナルに属する p38 のリン酸化が PS-I 培養条件と比較して高いことが明らかとなった。PS: 維持培地を用いてポリスチレン上で培養した条件 (PS 培養条件)、PS-I: インスリン添加培地を用いてポリスチレン上で培養した条件 (PS-I 培養条件)、PA: 維持培地を用いて PA ゲル上で培養した条件 (PAMPS ゲル培養条件)

4. PAMPS ゲルが誘導する軟骨分化における TGF-beta/BMP シグナルに関する遺伝子発現のパスウェイ解析

申請者は、ConPath ソフトウェアによるパスウェイ解析を行い、PAMPS ゲル誘導性に軟骨分化シグナルとして同定された TGF-beta/BMP シグナルの遺伝子の発現変動と相互発現を確認した。その結果、PAMPS ゲル培養条件では、BMP4 や、Inhba、Ltbpl、Fst、Thbs1、Smad6、Serpine1 の発現が、PS-I 培養条件と比較して 2 倍以上に高いことが明らかとなった(図 6)。培養 3 日目においても、同様の結果が得られた。

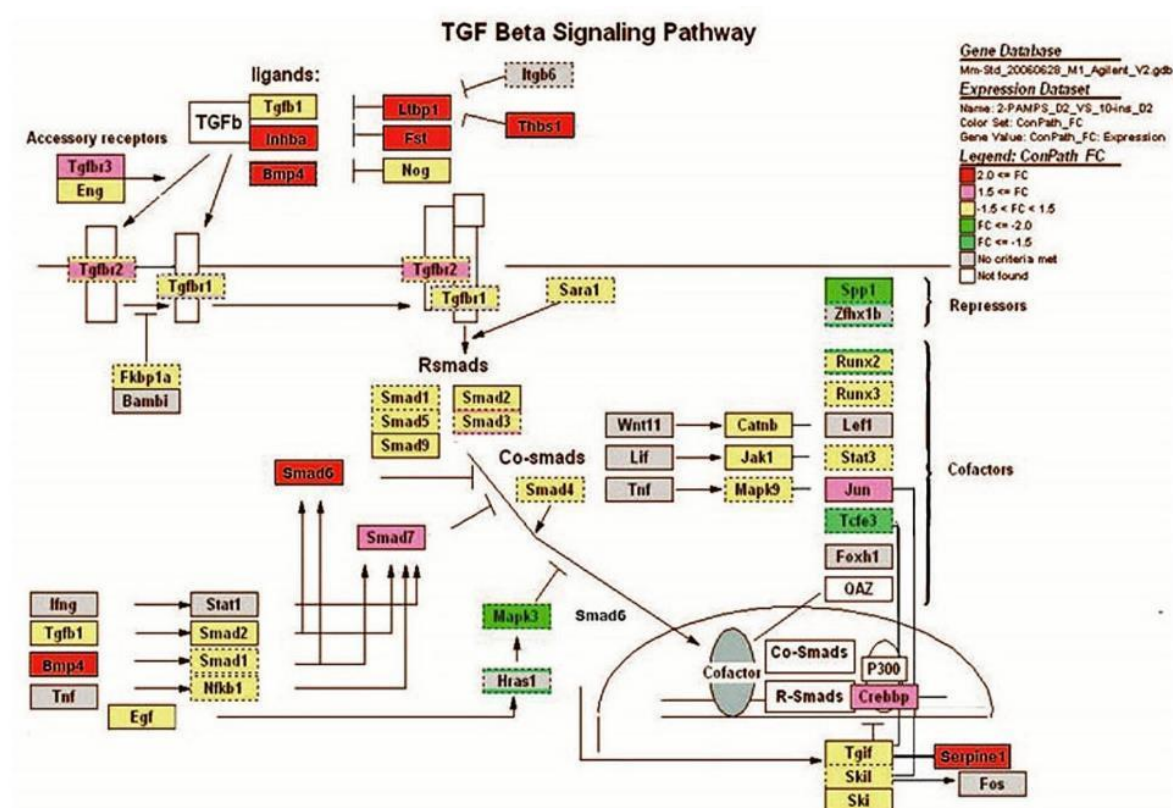


図 6. TGF-beta/BMP シグナルにおける PAMPS ゲル誘導性発現遺伝子の探索

PAMPSゲル培養条件で有意に発現変動がみられるシグナルとして同定された TGF-beta/BMPシグナルのパスウェイ解析の結果を示す。解析にはConPathソフトウェアを用いた。代表的な結果として、培養2日目におけるPS-I培養条件との比較の結果を示す。PAMPSゲル培養条件において2倍以上の発現を示す遺伝子を赤色で示した。PAMPSゲル培養条件ではBMP4や、Inhba、Ltbpl、Fst、Thbs1、Smad6、Serpine1の発現がPS-I培養条件と比較して2倍以上高かった。

5. PAMPS ゲルが誘導する軟骨分化における BMP4 遺伝子発現の詳細

パスウェイ解析の結果、PAMPS ゲル培養条件で高発現を示した BMP4 は、TGF-beta/BMP シグナルにおいて、Smad1/5 のエフェクター分子として作用する⁷²。そこで、申請者は BMP4 に着目し、実際の mRNA の遺伝子発現量をリアルタイム PCR により半定量解析した。その結果、PAMPS ゲル培養条件における BMP4 mRNA の発現は、培養 1 日目 ($p < 0.0001$, $p < 0.0001$) および 3 日目 ($p < 0.0001$, $p < 0.0001$) において、PS 培養条件や PS-I 培養条件と比較して有意に高かった (図 7)。

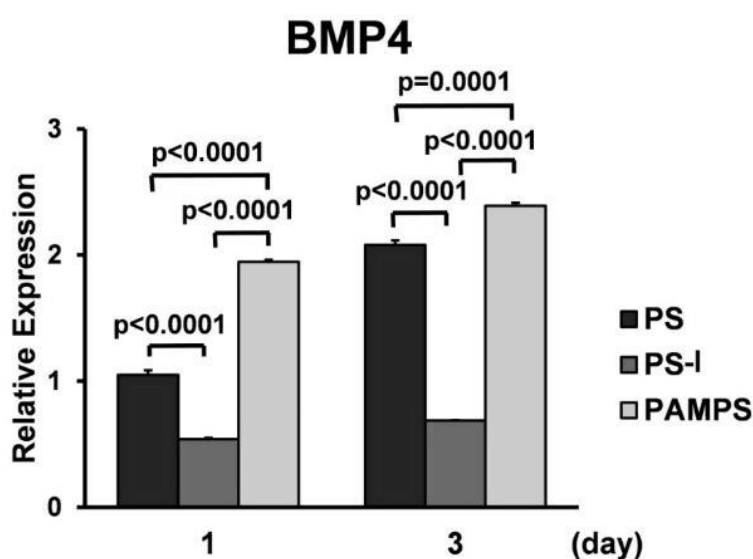


図 7. リアルタイム PCR 解析による ATDC5 細胞の BMP4 mRNA の発現量

各培養条件における BMP4 mRNA の培養 1 日目および 3 日目における発現量を半定量解析した。PAMPS ゲル培養条件では、培養 1 日目および 3 日目に PS 培養条件や PS-I 培養条件と比較して有意に高い発現量を示した。一元分散分析： $p < 0.0001$ (培養 1 日目)、 $p < 0.0001$ (培養 3 日目)、PS: 維持培地を用いてポリスチレン上で培養した条件 (PS 培養条件)、PS-I: インスリン添加培地を用いてポリスチレン上で培養した条件 (PS-I 培養条件)、PAMPS: 維持培地を用いて PAMPS ゲル上で培養した条件 (PAMPS ゲル培養条件)

本結果より、PAMPS ゲルによる軟骨分化誘導では、BMP4 の発現を介した TGF-beta/BMP シグナルの活性化が重要であることが示唆された。

6. PAMPS ゲルが誘導する軟骨分化において BMP 受容体の阻害が Smad1/5 のリン酸化に与える効果

マイクロアレイ解析の結果に基づいた Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) やパスイエイ解析の結果、PAMPS ゲル培養条件では、BMP4 の発現を介した BMP/TGF-beta シグナルが活性化していることが示唆された。さらにウェスタンブロット解析の結果、PAMPS ゲル培養条件における ATDC5 細胞では、Smad1/5 の高いリン酸化を認めることから、TGF-beta/BMP シグナルの古典経路である BMP/Smad シグナルが特異的に活性化している可能性が示唆された。そこで、BMP タイプ I 受容体を阻害するドルソモルフィンを用いた PAMPS ゲル培養条件に添加し、Smad1/5 のリン酸化に与える影響を確認した。最初に、PAMPS ゲル培養条件の培養 72 時間の経時的なリン酸化挙動をウェスタンブロット解析した。Smad のリン酸化において、短時間にみられるウルトラディアン振動 (ultradian oscillation) が存在するという報告されているため⁷³、培養 6、12、24、36、48、60 および 72 時間の詳細なタイムポイントにより解析した。その結果、PS 培養条件では、Smad1/5 のリン酸化状態はほぼ一定であるのに対し、PAMPS ゲル培養条件では時間経過と共にリン酸化が亢進し、培養 36-72 時間において、PS 培養条件と比較して有意に高いリン酸化を示すことが明らかとなった ($p=0.0034$: 36 時間、 $p=0.0001$: 48 時間、 $p=0.0004$: 60 時間、 $p=0.0003$: 72 時間) (図 8、図 9)。また、PAMPS ゲル培養条件および PS 培養条件の両条件において、Smad1/5 のリン酸化におけるウルトラディアン振動は認められなかった。

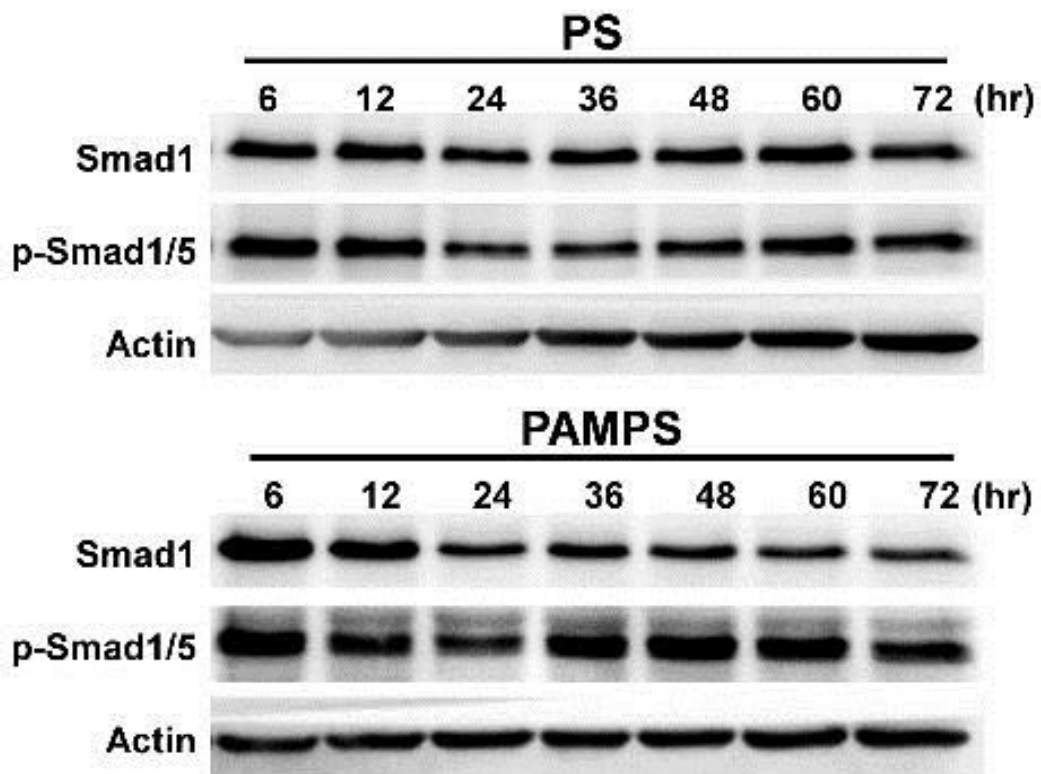


図 8. ウェスタンブロット解析による PAMPS ゲル培養条件の ATDC5 細胞における Smad1/5 の発現量とリン酸化

PS 培養条件および PAMPS ゲル培養条件における培養 6 時間、12 時間、24 時間、36 時間、48 時間、60 時間および 72 時間の Smad1/5 の発現量とリン酸化を示す。PAMPS ゲル培養条件における Smad1/5 のリン酸化は、培養 36 時間、48 時間、60 時間および 72 時間において高かった。PS: 維持培地を用いてポリスチレン上で培養した条件 (PS 培養条件)、PAMPS: 維持培地を用いて PAMPS ゲル上で培養した条件 (PAMPS ゲル培養条件)

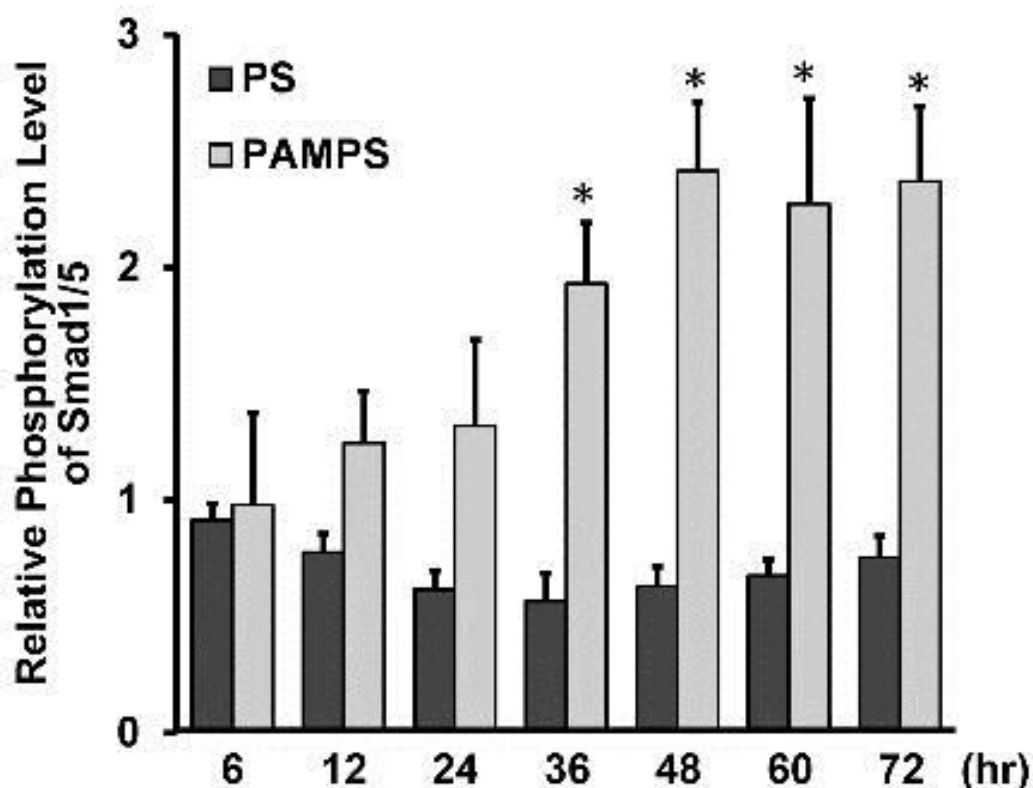


図 9. ウェスタンブロット解析による PAMPS ゲル培養条件の ATDC5 細胞における Smad1/5 のリン酸化率

PS 培養条件および PAMPS ゲル培養条件の ATDC5 細胞における培養 6 時間、12 時間、24 時間、36 時間、48 時間、60 時間および 72 時間の Smad1/5 の発現量とリン酸化量を NIH Image J 1.44p ソフトウェアを用いて定量化した。p-Smad1/5(phospho-Smad1/5) の発現量を Smad1/5(total-Smad1/5) の発現量で標準化した値をリン酸化率として示した。分散分析の結果、PS 培養条件および PAMPS ゲル培養条件における Smad1/5 のリン酸化率の間に有意な差を認めた ($p=0.0001$)。ポストホック解析の結果、PAMPS ゲル培養条件における Smad1/5 のリン酸化は、培養 36 時間、48 時間、60 時間および 72 時間において PS 培養条件と比較して有意に高かった (36 時間 : $p=0.0034$ 、48 時間 : $p=0.0001$ 、60 時間 : $p=0.0004$ 、72 時間 : $p=0.0003$)。*: 多重比較検定による有意差を示した。PS: 維持培地を用いてポリスチレン上で培養した条件 (PS 培養条件)、PAMPS: 維持培地を用いて PAMPS ゲル上で培養した条件 (PAMPS ゲル培養条件)

本結果より、PAMPS ゲル培養条件における ATDC5 細胞の Smad1/5 のリン酸化は継続的にみられ、培養 36-72 時間に有意に高いことが明らかとなった。

続いて、ドルソモルフィンを用いた阻害実験を行うため、至適濃度の検討を行った。1 から 10 μM の異なる濃度のドルソモルフィンを PS 培養条件に添加した結果、10 μM のドルソモルフィン添加培養条件において、Smad1/5 のリン酸化が十分に抑制されることが明らかとなった(図 10)。

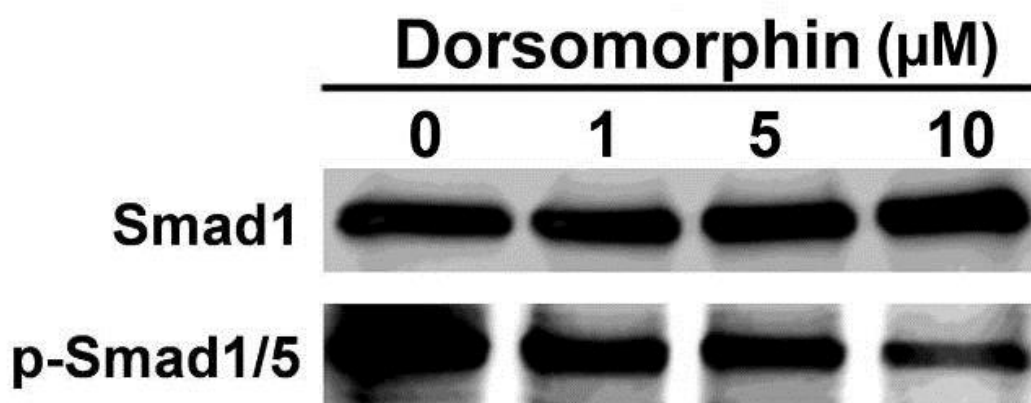


図 10. ATDC5 細胞におけるドルソモルフィンの至適濃度の検討

ポリスチレン上で維持培地を用いた培養条件(PS 培養条件)に 0 μM 、1 μM 、5 μM および 10 μM の異なる濃度のドルソモルフィンを添加し、Smad1/5 の培養 48 時間におけるリン酸化をウェスタンブロットにより解析した。Smad1/5 のリン酸化は 10 μM のドルソモルフィン添加培養条件において、十分に抑制された。

続いて、PS 培養条件および PAMPS ゲル培養条件に 10 μ M のドルソモルフィンを添加し、添加後 72 時間における Smad1/5 の発現量とリン酸化をウェスタンブロット解析した。その結果、Smad1/5 のリン酸化は PS 培養条件では添加後 48 時間および 72 時間に減少し、PAMPS ゲル培養条件では、添加後 24 時間、48 時間および 72 時間に減少した(図 11)。また、PAMPS ゲル培養条件における Smad1/5 のリン酸化の抑制効果は PS 培養条件の抑制効果と比較して大きかった(図 11)。

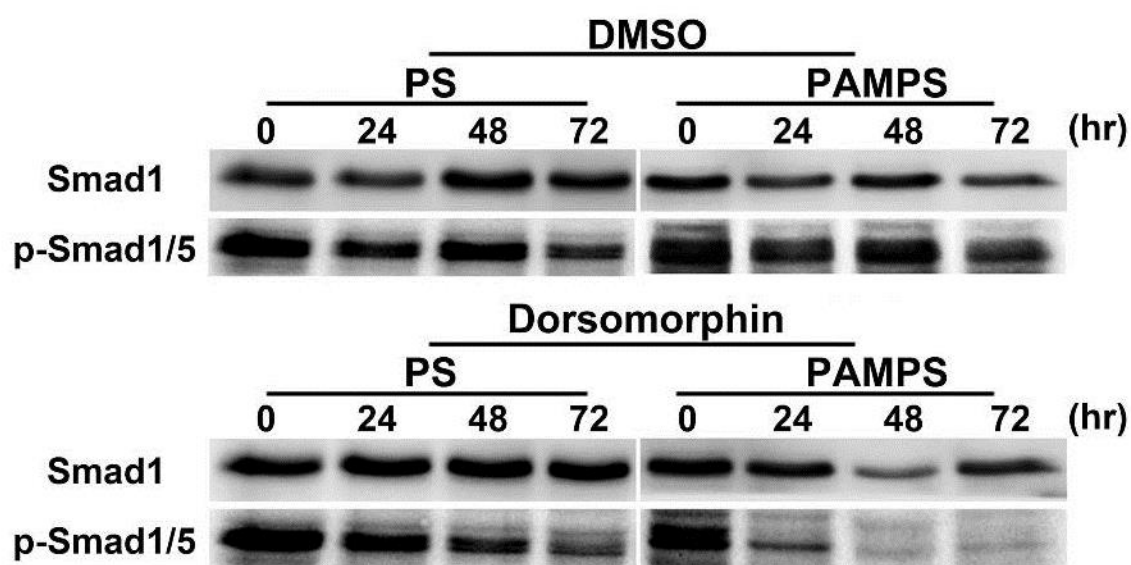


図 11. ドルソモルフィン(BMP タイプ I 受容体の阻害剤)の阻害による Smad1/5 のリン酸化阻害

PS 培養条件および PAMPS ゲル培養条件に、10 μ M のドルソモルフィンを添加し、Smad1/5 のリン酸化をウェスタンブロット解析した。ドルソモルフィンを培養開始 24 時間、72 時間に添加した。コントロールとしてジメチルスルホキシド(DMSO; Dimethylsulfoxide)添加培養条件を用いた。ドルソモルフィン添加前、添加後 24 時間、48 時間、72 時間における Smad1/5 のリン酸化を示す。ドルソモルフィンを添加すると、PS 培養条件および PAMPS ゲル培養条件で共に Smad1/5 のリン酸化レベルが減少した。PAMPS ゲル培養条件の Smad1/5 のリン酸化は PS 培養条件と比較して減少した。PS: 維持培地を用いてポリスチレン上で培養した条件(PS 培養条件)、PAMPS: 維持培地を用いて PAMPS ゲル上で培養した条件(PAMPS ゲル培養条件)、DMSO: ドルソモルフィン非添加培養条件、Dorsomorphin: ドルソモルフィン添加培養条件

以上の結果より、PAMPS ゲルにより誘導される ATDC5 細胞の軟骨分化において、Smad1/5 の活性化が重要性であることが示唆された。また、PAMPS ゲル培養条件と PS 培養条件における Smad1/5 のリン酸化の抑制効果に差が認められたが、両条件共に、Smad1/5 のリン酸化が十分に抑制されていたため、同サンプルを用いて、Smad1/5 のリン酸化阻害が軟骨分化に与える影響を検討した。

7. PAMPS ゲルが誘導する軟骨分化における BMP/Smad シグナルの阻害が軟骨分化に与える影響

BMP タイプ I 受容体の阻害剤であるドルソモルフィンを各培養条件に添加し、Smad1/5 のリン酸化抑制による BMP/Smad シグナルの阻害が、PAMPS ゲル培養条件における ATDC5 細胞の軟骨分化誘導に与える影響を形態変化とリアルタイム PCR 解析による軟骨分化マーカーの発現変化により検討した。最初に、軟骨分化形態として重要な所見として知られる細胞凝集体⁷¹を観察した。その結果、PAMPS ゲル培養条件ではドルソモルフィン非添加条件(DMSO 培養条件)において細胞凝集体を示した。一方、ドルソモルフィン添加条件(DM 培養条件)では細胞凝集体を示さなかった。また、PS 培養条件では、細胞凝集体へ与える影響はみられなかった(図 12)。

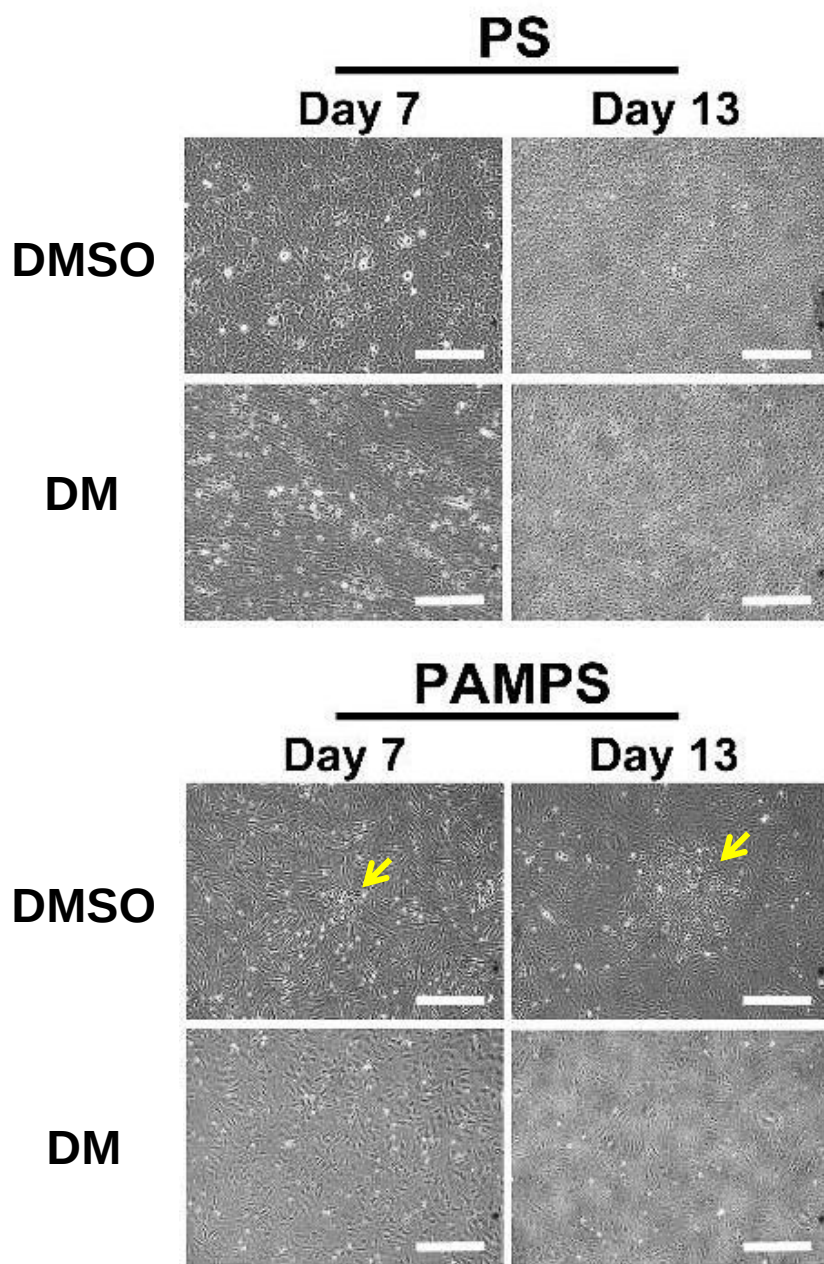


図 12. BMP/Smad シグナルの阻害による ATDC5 細胞の形態学的変化

10 μ M のドルソモルフィン添加し培養 7 日目および 13 日目における ATDC5 細胞の形態変化を位相差顕微鏡にて観察した。PAMPS ゲル培養条件のドルソモルフィン添加培養条件 (DM 培養条件) は、細胞凝集体を示さなかった。PS: 維持培地を用いてポリスチレン上で培養した条件 (PS 培養条件)、PAMPS: 維持培地を用いて PAMPS ゲル上で培養した条件 (PAMPS ゲル培養条件)、DMSO: ドルソモルフィン非添加培養条件、DM: ドルソモルフィン添加培養条件、矢印: 細胞凝集体、Scale bar= 500 μ m

続いて、リアルタイム PCR 解析を用いて、Smad1/5 のリン酸化抑制による BMP/Smad シグナルの阻害が、ATDC5 細胞の軟骨分化マーカーの発現へ与える影響を検討した。その結果、PAMPS ゲル培養条件におけるドルソモルフィン添加条件(DM 培養条件)の 2 型コラーゲンとアグリカンの mRNA の発現量は、ドルソモルフィン非添加培養条件の発現量と比較して有意に減少した($p < 0.0001$ 、 $p=0.0165$) (図 13)。PS 培養条件におけるドルソモルフィン添加条件(DM 培養条件)の 2 型コラーゲンとアグリカンの mRNA の発現量においても同様に、ドルソモルフィン非添加培養条件の発現量と比較して、有意に減少した($p=0.0111$ 、 $p=0.0101$) (図 13)。

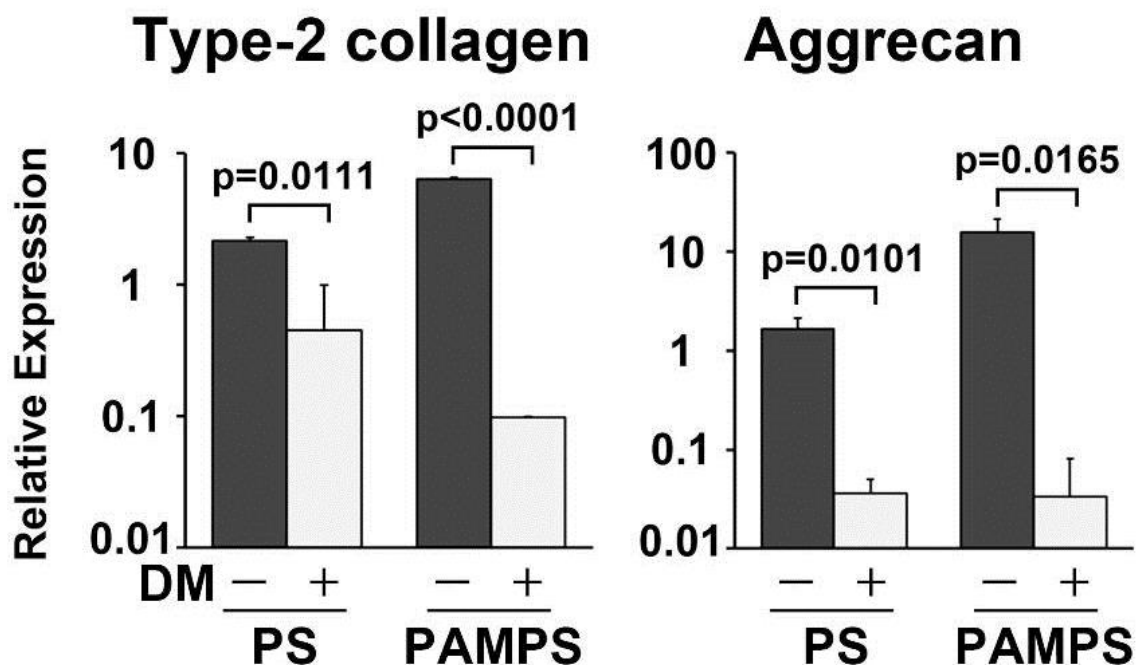


図 13. BMP/Smad シグナルの阻害による軟骨分化マーカーの mRNA の発現抑制

PS 培養条件および PAMPS ゲル培養条件において 10 μ M のドルソモルフィンを培養開始 24 時間および 72 時間に添加し、培養 13 日目における 2 型コラーゲンおよびアグリカンの mRNA の発現量をリアルタイム PCR 解析した。PAMPS ゲル培養条件および PS 培養条件のドルソモルフィンの添加培養条件では、軟骨分化マーカーの mRNA の発現量がドルソモルフィン非添加培養条件と比較して有意に抑制された。PS: 維持培地を用いてポリスチレン上で培養した条件 (PS 培養条件)、PAMPS: 維持培地を用いて PAMPS ゲル上で培養した条件 (PAMPS ゲル培養条件)、DM-: ドルソモルフィン非添加培養条件、DM+: ドルソモルフィン添加培養条件

次いで、ドルソモルフィン添加培養条件(DM 培地条件)の発現量を DMSO 添加培養条件(DMSO 培地条件)の発現量で除した値の比率として示した阻害率を検討した。その結果、PAMPS ゲル培養条件における 2 型コラーゲンおよびアグリカンの mRNA の発現量は、培養 13 日目に PS 培養条件と比較して有意に抑制された($p=0.0178$ 、 $p=0.0006$) (図 14)。以上の結果より、PAMPS ゲル培養条件における ATDC5 細胞の Smad1/5 のリン酸化抑制による BMP/Smad シグナルの阻害は、軟骨分化マーカーの発現を有意に抑制することが明らかとなった。

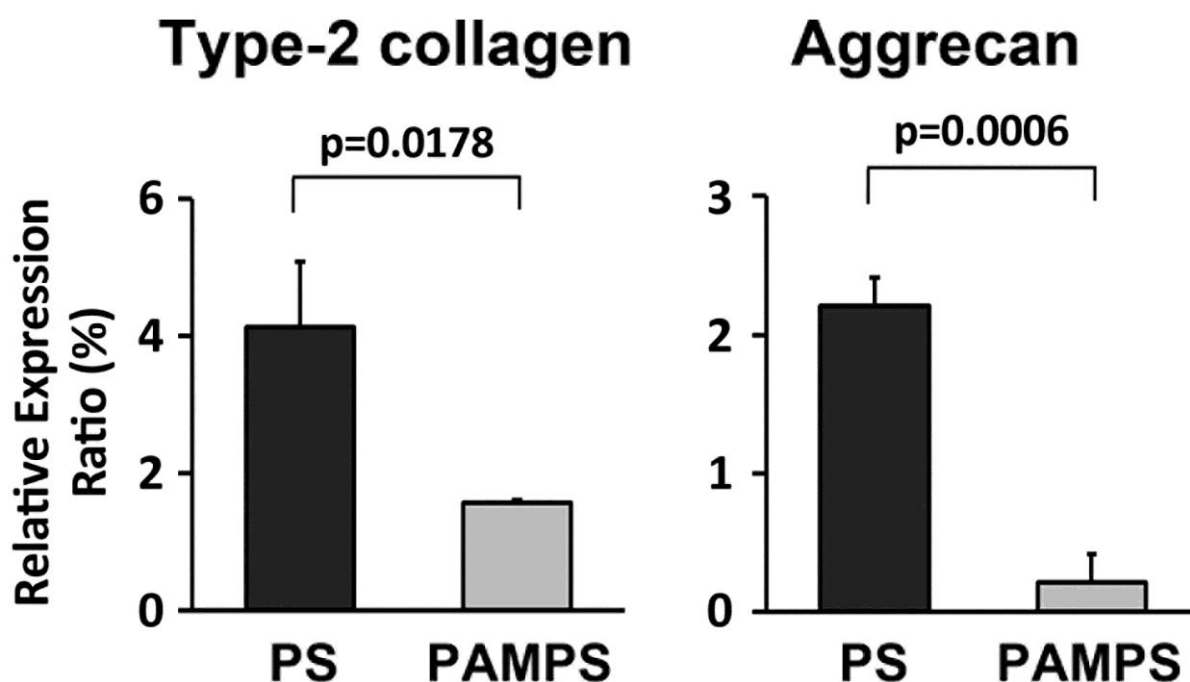


図 14. TGF-beta/Smad シグナルの阻害による軟骨分化マーカーの発現抑制率

ドルソモルフィンにより発現抑制された軟骨分化マーカーの mRNA の発現量の解析結果をもとに、PS 培養条件および PAMPS ゲル培養条件における 2 型コラーゲンおよびアグリカンの mRNA の発現の抑制率について検討した。阻害率はドルソモルフィン添加培養条件(DM 培地条件)の発現量を DMSO 添加培養条件(DMSO 培地条件)の発現量で除した値の比率として示した。PAMPS ゲル培養条件における 2 型コラーゲンおよびアグリカンの発現は PS 培養条件と比較して有意に抑制された。PS: 維持培地を用いてポリスチレン上で培養した条件(PS 培養条件)、PAMPS: 維持培地を用いて PAMPS ゲル上で培養した条件(PAMPS ゲル培養条件)

V. 考察

申請者は第一の研究において、PAMPS ゲルがインスリン非存在下で ATDC5 細胞を軟骨分化誘導することを確認した。第二の研究において、PAMPS ゲルにより特異的に誘導されるシグナル経路を、PS 培養条件および PS-I 培養条件と比較により探索した。Gene Set Enrichment Analysis (GSEA)の結果、PAMPS ゲル培養条件では、TGF-beta/BMP シグナル、MAPK シグナルおよび Wnt シグナルに属する遺伝子セットの発現変動が、PS 培養条件や PS-I 培養条件と比較して有意に高く認められた。またウェスタンブロット解析では、TGF-beta/BMP シグナルの古典的経路 (canonical pathway) である BMP/Smad シグナルに属するエフェクター分子、Smad1/5 のリン酸化が、PS 培養条件や PS-I 培養条件と比較して著明に高いことが判明した。さらに、マイクロアレイ解析により得られたデータに基づきパスウェイ解析を行った結果、PAMPS ゲル培養条件では、BMP/Smad シグナルに重要な BMP4 をはじめ、Inhba、Ltbpl、Fst、Thbs1、Smad6、Serpine1 の発現が、PS-I 培養条件と比較して2倍以上高く発現していた。そこで申請者は、BMP/Smad シグナルにおいて、Smad1/5 をエフェクター分子とする BMP4 に着目し、リアルタイム PCR によりその発現量を半定量的に解析した。その結果、PAMPS ゲル培養条件における BMP4 mRNA は、培養 1 日目および 3 日目において、PS 培養条件や PS-I 培養条件と比較して有意に高い発現を示した。以上の結果より、PAMPS ゲル培養条件では、PS-I 培養条件と比較して BMP/Smad シグナルが高く発現していることが示唆された。さらに第三の研究において、BMP タイプ I 受容体であるドルソモルフィンの添加による BMP/Smad シグナルの阻害が、PAMPS ゲル培養条件における軟骨分化誘導へ与える影響を確認した。PAMPS ゲル培養条件では、ドルソモルフィンの添加により Smad1/5 のリン酸化が抑制され、ATDC5 細胞の軟骨分化形態として知られる細胞凝集体の形成が阻害された。また、培養 13 日目の 2 型コラーゲンやアグリカンの mRNA の発現が PS 培養条件と比較して有意に抑制された。以上の結果より、BMP/Smad シグナルの阻害により、PAMPS ゲル誘導性の軟骨分化が抑制されることを示した。これらの研究結果は、合成 PAMPS ゲルが BMP/Smad シグナルを活性化することにより ATDC5 細胞の軟骨分化を誘導することを示し、PAMPS ゲルによる軟骨分化誘導機構はインスリン依存性のそれとは異なることが明らかとなった。本研究は、特定の合成ゲル表面の刺激によりゲル特異的なシグナルが活性化し、それらが遺伝子や分子レベルを調節することによって軟骨分化を誘導できることを示した最初の研究である。今後、多機能ゲルにより種々の細胞の分化を制御できる可能性が示唆された。

TGF-beta/BMP シグナルが軟骨分化に果たす重要な役割について、間葉系幹細胞を用いた多くの報告がある⁷⁴⁻⁷⁷。また、BMP ファミリーは骨格形成、特に軟骨形成において重要な役割を果たすことが知られている^{33, 36, 37}。例えば、Denker らは、BMP2 を添加した高密度培養系は軟骨分化を促進させることをマウス由来

C3H10T1/2 細胞を用いて報告した⁷⁸。また、Yoon らは遺伝子改変マウスを用い BMP が早期軟骨形成において必須のシグナル分子であることを明らかにした⁷⁹。さらに、Retting らは遺伝子改変マウスを用い、Smad1、Smad5 および Smad8 の複合的な欠失は重度の軟骨形成不全を引き起こし、Smad は軟骨形成において重要な分子であることを報告している³⁵。BMP ファミリーの中でも、特に BMP4 は *in vivo* や *in vitro* において強力な軟骨分化誘導因子であることで注目され、近年、軟骨再生治療に対する有力な薬剤と考えられている⁸⁰。また Kuroda らは、ラットの軟骨再生モデルにおいて、BMP4 を導入した筋原性幹細胞が良好な軟骨再生を示したと報告している⁸¹。さらに、Lin らは、*in vitro* および *in vivo* において、BMP4 が脱分化した軟骨細胞を再分化させることを明らかにし、軟骨修復への有用性を示した⁸²。本研究において申請者は、PAMPS ゲルが軟骨分化に重要な TGF-beta/BMP シグナルを活性化させることを明らかにした。TGF-beta/BMP シグナルは一度活性化すると、BMP などの刺激分子がオートクリンに作用し高いシグナル活性を維持する。申請者が属する研究グループはこれまでの *in vitro* 研究において、PAMPS ゲルがインスリン非存在下で ATDC5 細胞の軟骨分化を誘導することを明らかにし³⁰、また *in vivo* 研究においても、PAMPS ゲルの骨軟骨欠損部への埋植が硝子軟骨再生を誘導することを示してきた²⁸。しかし、この合成ゲルがどのようなメカニズムで軟骨分化を誘導するか未解明であった。本研究は、PAMPS ゲルが軟骨分化を誘導するメカニズムの一部を説明するための重要な情報を提供した。この結果は、合成ゲルが、軟骨分化誘導因子を添加することなしに軟骨分化を誘導するメカニズムについて示した最初の報告であり、この結果は生体材料学分野において重要な情報である。

しかし、本研究においては PAMPS ゲルがどのようなメカニズムにより BMP/Smad シグナルを刺激するかについては明らかにできなかった。申請者は二つの可能性を推測した。その第一の可能性として、PAMPS ゲルの物理的特性が BMP/Smad シグナルを活性化する可能性である。過去の研究において、細胞が接着する表面の物理的特性は遺伝子の発現パターンを変化させ、細胞分化の運命を決定することがよく知られている^{22,83}。例えば Engler らは弾性率の異なるポリアクリルアミドゲル上で培養した間葉系幹細胞の遺伝子の発現が異なり、弾性率 34kPa のゲル上の培養では、BMP や SOX9 の発現が上昇することを報告している²²。従って、ゲル表面に接着した ATDC5 細胞は、PAMPS ゲル特異的な柔らかさを感じることによって、BMP/Smad シグナルを活性化した可能性が考えられる。この時、ATDC5 細胞が接着環境を介して材料表面の物理特性を感じ取る機序として、インテグリンが基質-細胞間の接着刺激により p130cas や細胞接着関連チロシンキナーゼ (FAK; Focal adhesion kinase) など多くのタンパク質と「focal adhesion」と呼ばれる複合体 (the complex) を形成し、細胞外の情報を細胞内に伝えている可能性がある⁸⁴⁻⁸⁷。また、細胞が接着する材料表面の物理特性を感じ取る際に、アクチン骨格が重要な役割をなすことが知られている

^{84, 86, 88}。従って、ATDC5 細胞が PAMPS ゲルの物理特性を感知するために、インテグリンが重要な役割を果たしている可能性が高いと考えられる。今回申請者が行った Gene Set Enrichment analysis (GSEA) では、PAMPS ゲル培養条件において focal adhesion 経路や integrin-mediated 経路が活性化されていた(表 2、3)。この結果は、PAMPS ゲルへ ATDC5 細胞が接着する際にインテグリンが強く関与していることを示唆している。また、申請者が属する研究グループの最近の研究によれば、PAMPS/PDMAAm DN ゲル上で ATDC5 細胞を培養すると、細胞にアクチン代謝を介した細胞骨格の変化が起こり、1 細胞のヤング率が有意に増加することが明らかになっている²⁵。また、今回の申請者の研究においては、PS 培養条件および PS-I 培養条件における ATDC5 細胞が培養 5 日目で 1 層の敷石状になりコンフルエントになっていたのに対し、PAMPS ゲル培養条件では培養 10 日目で紡錘形を呈する細胞が渦を巻くような方向性を有する細胞集団を形成していた(図 3)。これらの所見は、アクチン代謝を介した細胞骨格や細胞極性の変化によって、細胞の接着能が変化している可能性を示唆している。一方、メカノシグナルトランスダクションでは focal adhesion kinase (FAK) や、extracellular-signal-regulated kinase (ERK) が活性化されることが知られており^{84, 89}、その際 integrin/p130Cas を介して ERK が活性化する。しかし本研究では、PAMPS ゲル培養条件において ERK のリン酸化は増加していなかった(図 6)。以上の結果は、PAMPS ゲル培養条件では、従来知られているメカノシグナルトランスダクション以外のシグナルを介して BMP/Smad シグナルが活性化されている可能性があることを示唆しており、今後の研究において、このような物理特性によって誘導されるシグナルの介在について、詳細に調べる必要がある。

PAMPS ゲルが BMP/Smad シグナルを活性化する機序に関する第二の可能性として、PAMPS ゲルが持つ特異的な生化学的材料特性の関与が挙げられる。PAMPS ゲルは硫酸基を持ち、強い陰性荷電を有するが、これまで申請者の属する研究グループは、PAMPS ゲルが持つ陰性荷電の強さが、細胞増殖のみならず ATDC5 細胞の軟骨分化や、血管内皮細胞の糖鎖分泌に影響を与えることを明らかにしている^{30, 90, 91}。また、Chen らは、ゲルの荷電状態は、ゲルへのタンパク吸着やフィブロネクチンの吸着に大きく関与することを報告している⁹¹。従って、PAMPS ゲルが有する陰性荷電が、ATDC5 細胞の形態変化に寄与した可能性がある。また、以上の二つの機序が複合的に関与し、PAMPS ゲルが BMP/Smad シグナルを活性化している可能性がある。これらの仮説を証明するために、さらなる研究が必要である。

PAMPS ゲルは BMP/Smad シグナル以外のシグナルも同時に活性化している可能性がある。例えば、本研究で行った Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) の結果、PAMPS ゲル培養条件では、培養 2 日目および 3 日目において Wnt シグナル、および MAPK シグナルに属する遺伝子セットの発現変動が有意に認められた。しかしウェスタンブロット解析では Wnt シグナルに属する主要な分子の高い発

現やリン酸化が認められなかったため、本研究では Wnt シグナルの関与について検討しなかった。一方、PAMPS ゲル培養条件では、培養 2 日目、3 日目に MAPK シグナルに属する、p38 の高いリン酸化を認めた。近年、Greenblatt らは、TGF-beta/BMP シグナルの古典的経路において作用する Smad1/5/8 と、非古典的経路で作用する p38 が、TGF-beta-activated kinase 1 (TAK1) 誘導性に活性化され、幹細胞の軟骨分化を誘導することを報告した⁹²。また、Watanabe らは ATDC5 細胞の軟骨分化において、Smad と ERK1/2 および p38 のクロストークが TGF-beta 誘導性にアグリカンの発現を調節し、軟骨分化誘導したと報告している⁹³。本研究において、PAMPS ゲル誘導性の軟骨分化における MAPK シグナルの役割について焦点としなかったが、今後、詳細に検討する必要がある。

本研究において、PAMPS ゲル上で培養した ATDC5 細胞にドルソモルフィンを添加し、Smad1/5 のリン酸化を抑制すると、培養 72 時間の初期の阻害であるにも関わらず、培養 13 日目の 2 型コラーゲンやアグリカンの mRNA の発現量が抑制された。しかしながら、BMP/Smad シグナルの阻害が直接的に軟骨分化マーカーの発現を抑制したか否かについては明らかにしていない。ATDC5 細胞や成長板を用いた軟骨分化過程では、様々な転写因子や成長因子および細胞外基質や細胞の相互作用による調節を受けながら多段階過程を経て誘導されることが報告されている^{22, 94, 95}。従って、本研究の PAMPS ゲル誘導性軟骨分化において発現がみられた BMP/Smad シグナルは、軟骨分化を誘導において多段階的に誘導されるシグナルを活性化させる初期の重要なシグナルであった可能性がある。今後、BMP/Smad シグナルの阻害により抑制されるシグナルについて明らかにする必要がある。本結果により、BMP/Smad シグナルは PAMPS ゲル誘導性軟骨分化において重要なシグナルであることが明らかとなったが、ドルソモルフィンによる BMP タイプ I 受容体の阻害による軟骨分化マーカーの発現抑制は、PAMPS ゲル培養条件においてばかりではなく、PS 培養条件においても認められた。この現象は過去の報告から、ATDC5 細胞では BMP が一定レベルで恒常的に発現しているためと考える^{64, 65}。しかしながら、パスイエイ解析やリアルタイム PCR による BMP4 の半定量解析において、PAMPS ゲル培養条件の BMP4 の mRNA の発現量は PS 培養条件と比較して有意に高かった。

本研究にはいくつかの限界がある。第一の限界として、培養期間が約 2 週間と短いことである。細胞分化に要する期間は細胞種に依存するが、より長い培養期間により本研究により得られた結果とは異なる結果を示す可能性がある。第二の限界として、本研究は PAMPS ゲルにより誘導される BMP/Smad シグナルを活性化する最初のシグナルについて明らかにしていない。第三の限界として、本研究は培養開始から 24 時間以内における種々のシグナルの活性化について明らかにしていない。BMP/Smad シグナルを活性化するメカニズムとして、PAMPS ゲル特異的な物理特性が細胞に与えるシグナルが関与している可能性があり、focal adhesion などに関与するシグナルの検索が必要であると考えられる。第四の

限界として、本研究は BMP/Smad シグナルに属する BMP4 以外のリガンドの関与について調べていない。今回、BMP4 に着目したが、Smad を活性化させる他のリガンドにより Smad が活性化している可能性がある。第五の限界として、本研究では PAMPS ゲルが誘導する軟骨分化誘導能の検討において、グリコサミノグリカンの発現について評価していない。しかし、これらの限界は、本研究が初めて明らかにした、合成 PAMPS ゲルが ATDC5 細胞を軟骨分化誘導する過程において、BMP/Smad シグナルが有意に活性化しているという事実を否定するものではない。以上の限界については今後、本研究とは別に企画される研究により解決できるものであると考える。

最後に本研究の臨床との関連について述べる。申請者が属する研究グループはこれまでの研究において、軟骨欠損に対してその基底部に合成 PAMPS/PDMAAm DN ゲルを埋植することにより、細胞培養や生体由来材料を用いることなく軟骨再生を誘導するという新しい治療戦略を提唱してきた。この新しい軟骨再生治療戦略の有効性を確立するためには、ゲルが軟骨再生を誘導するメカニズムを解明する必要があった。本研究はそのメカニズムの一部を明らかにし、上述の新しい軟骨再生治療戦略の有効性を確立するための重要な情報を提供した。さらに本研究は、ゲノミクスを用いて合成ゲルが様々な細胞に対して与える生物学的効果を解析する新しい研究分野、マテリアルゲノミクスを提唱した。本研究は今後、マテリアルゲノミクスの発展に寄与するものと考えている。

VI. 総括および結論

① 本研究から得られた新知見

- PAMPS ゲル培養条件の 1 日目から 3 日目における TGF-beta/BMP シグナルの遺伝子セットの発現変動は、PS 培養条件および PS-I 培養条件と比較して有意に増加していた (DNA マイクロアレイ解析のデータに基づく Gene Set Enrichment Analysis)。さらに PAMPS ゲル培養条件における BMP4 mRNA の発現が、培養 1 日目および 3 日目に有意に高いことを確認した (リアルタイム PCR 解析)。
- PAMPS ゲル培養条件では、2 日目および 3 日目において TGF-beta/BMP シグナルの古典的経路である BMP/Smad 経路のエフェクター分子、Smad1/5 のリン酸化が、PS 培養条件や PS-I 培養条件と比較して著明に増加していた (ウェスタンブロット解析)。
- PAMPS ゲル培養条件における TGF-beta/BMP シグナル経路に関する主要遺伝子群の発現を調べると、BMP4、Inhba、Ltbpl、Fst、Thbs1、Smad6 および Serpine1 の発現が PS-I 培養条件と比較して 2 倍以上高かった (Gene Set Enrichment Analysis に基づくパスウェイ解析)。

- BMP タイプ I 受容体の阻害剤ドルソモルフィンの投与は、PAMPS ゲル培養条件下の 24 時間、48 時間および 72 時間において Smad1/5 のリン酸化レベルを低下させた（ウェスタンブロット解析）。また、この投与は培養 13 日間における細胞凝集体の形成を阻害し、2 型コラーゲンやアグリカンの mRNA の発現を有意に抑制した（リアルタイム PCR 解析）。
- 以上の新知見から、合成 PAMPS ゲルが誘導する ATDC5 細胞の軟骨分化においては、インスリンに依存しないシグナル経路が存在し、培養初期における Smad1/5 を介した BMP/TGF- β シグナル経路の活性化が PAMPS ゲルによる軟骨分化誘導に重要であることが明らかとなった。

② 新知見の意義

- 本知見は、PAMPS ゲル誘導性軟骨分化における関連シグナルを解明した初めての報告であり、この結果は PAMPS ゲルを構成要素とする DN ゲルを軟骨欠損部に埋植することによって硝子軟骨の再生を誘導するという、細胞培養や生体由来材料を用いない新しい治療戦略の有効性を確立するための重要な情報となる。
- また本知見は、将来、種々の未分化細胞に対して合成高分子ゲルを用いてその機能分化の関連シグナルを制御できるようになる可能性を示唆している。また今後、単純な高分子の物理・化学的特性が様々な細胞に与える分子機序のデータベースを構築することにより、医学に必要な新規高機能ゲルの分子設計を演繹的に行えるようになる可能性がある。本研究は、材料科学と医学の融合による新しい研究分野を創成するための端緒を開く可能性がある。

③ 今後の課題

- 本研究は、PAMPS ゲルにより誘導される BMP/Smad シグナルを活性化する最初の刺激シグナルの存在について明らかにできていない。今後はこのシグナルについて詳細に検討する必要がある。
- PAMPS ゲルは BMP/Smad シグナル以外のシグナルも同時に活性化している可能性があるが、本研究では TGF- β /BMP シグナル以外の候補シグナルについて詳細に検証していない。例えば MAPK シグナルや Wnt シグナルの関与について、今後調べる必要がある。
- また DNA マイクロアレイ解析で得られた遺伝子発現データでは PAMPS ゲル上の培養において、他の培養と比較した様々な差が検出されている。その詳細な解析も今後の課題である。
- 本研究では、軟骨原性 ATDC5 細胞を用いたが、間葉系幹細胞など、その他の細胞を用いた研究を行う必要がある。

- 本研究は *in vitro* の実験であり、今後は PAMPS ゲルにおける *in vivo* 関節軟骨再生現象のシグナル伝達経路について解明する必要がある。

④ 本研究から得られた新知見から今後どのような研究が展開されうるか

- PAMPS ゲルにより誘導される BMP/Smad シグナルを活性化する最初の刺激シグナルの存在について明らかにするため、本研究と同じ実験系を用いて培養開始直後から早期のシグナルについて解析を進める。
- PAMPS ゲルによって BMP/Smad シグナルと同時に活性化している可能性がある以外のシグナル（例えば、本研究で注目された MAPK シグナル）の関与について詳細に検討を加える。
- ATDC5 細胞の代わりにマウス間葉系幹細胞株（C3H10T1/2）を用いて、同様の実験を行い、細胞特異性について明らかにする。
- すでに DNA マイクロアレイ解析で得られている遺伝子発現データを用いて、PAMPS ゲル上の培養で起こっている軟骨分化分子機序の差をさらに詳しく明らかにする中で、分化誘導能を有する生体材料としての PAMPS ゲルの機能の本質を明らかにする。

VII. 謝辞

本研究を進めるにあたりひとかたならぬご指導、ご鞭撻を賜りました指導教官の北海道大学大学院医学研究科機能再生医学講座スポーツ医学分野の安田和則教授ならびに北村信人准教授に篤く御礼申し上げます。また、研究・実験を進めていくにあたりさまざまな御助言、御指導を賜りました北海道大学大学院医学研究科病理学講座腫瘍病理学分野の田中伸哉教授、津田真寿美講師、木村太一助教、北海道大学大学院医学研究科連携研究センター再生医学・組織工学部門の仙葉慎吾特任助教に深謝いたします。またゲルの製作とその物理特性に関しご教示いただいた北海道大学大学院先端生命科学研究院ソフトアンドウェットマター研究室の龔劍萍教授、黒川孝幸准教授に深謝いたします。さらに、マイクロアレイ解析データを御恵与いただいた、産業技術総合研究所バイオメディカル研究部門シグナル分子研究グループ長の近江谷克裕先生、バイオアナリティカル研究グループの松倉智子先生、およびマイクロアレイ解析データの解析にあたり貴重な御助言をいただいた産業技術総合研究所ゲノム情報研究センターネットワーク情報チーム長の油谷幸代先生に深謝いたします。

VIII. 文献

- 1 Aroen, A. *et al.* Articular cartilage lesions in 993 consecutive knee arthroscopies. *Am. J. Sports Med.* 32, 211-215 (2004).
- 2 Buckwalter, J. A. & Mankin, H. J. Articular cartilage repair and transplantation. *Arthritis Rheum.* 41, 1331-1342 (1998).
- 3 Mandelbaum, B. R. *et al.* Articular cartilage lesions of the knee. *Am. J. Sports Med.* 26, 853-861 (1998).
- 4 Hunter, W. On the structure and diseases of articulating cartilage. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 9, 267 (1743).
- 5 Jansen, E. J., Emans, P. J., Van Rhijn, L. W., Bulstra, S. K. & Kuijer, R. Development of partial-thickness articular cartilage injury in a rabbit model. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 466, 487-494 (2008).
- 6 Hunziker, E. B. & Quinn, T. M. Surgical removal of articular cartilage leads to loss of chondrocytes from cartilage bordering the wound edge. *J. Bone Joint Surg. Am.* 85-A Suppl 2, 85-92 (2003).
- 7 Wakitani, S. *et al.* Repair of rabbit articular surfaces with allograft chondrocytes embedded in collagen gel. *J. Bone Joint Surg. Br.* 71, 74-80 (1989).
- 8 Shelbourne, K. D., Jari, S. & Gray, T. Outcome of untreated traumatic articular cartilage defects of the knee: a natural history study. *J. Bone Joint Surg. Am.* 85-A Suppl 2, 8-16 (2003).
- 9 Steadman, J. R. *et al.* Outcomes of microfracture for traumatic chondral defects of the knee: average 11-year follow-up. *Arthroscopy* 19, 477-484 (2003).
- 10 Hunziker, E. B. Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. *Osteoarthritis Cartilage* 10, 432-463 (2002).
- 11 LaPrade, R. F., Bursch, L. S., Olson, E. J., Havlas, V. & Carlson, C. S. Histologic and immunohistochemical characteristics of failed articular cartilage resurfacing procedures for osteochondritis of the knee: a case series. *Am. J. Sports Med.* 36, 360-368 (2008).
- 12 Hangody, L. & Karpáti, Z. [New possibilities in the management of severe circumscribed cartilage damage in the knee]. *Magy. Traumatol. Ortop. Kezseb. Plasztikai Seb.* 37, 237-243 (1994).
- 13 Matsusue, Y., Yamamuro, T. & Hama, H. Arthroscopic multiple osteochondral transplantation to the chondral defect in the knee

- associated with anterior cruciate ligament disruption. *Arthroscopy* 9, 318–321 (1993).
- 14 Hangody, L. *et al.* Autologous osteochondral mosaicplasty. Surgical technique. *J. Bone Joint Surg. Am.* 86-A Suppl 1, 65–72 (2004).
 - 15 Brittberg, M. *et al.* Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N. Engl. J. Med.* 331, 889–895 (1994).
 - 16 Horas, U., Pelinkovic, D., Herr, G., Aigner, T. & Schnettler, R. Autologous chondrocyte implantation and osteochondral cylinder transplantation in cartilage repair of the knee joint. A prospective, comparative trial. *J. Bone Joint Surg. Am.* 85-a, 185–192 (2003).
 - 17 Bentley, G. *et al.* A prospective, randomised comparison of autologous chondrocyte implantation versus mosaicplasty for osteochondral defects in the knee. *J. Bone Joint Surg. Br.* 85, 223–230 (2003).
 - 18 Knutsen, G. *et al.* Autologous chondrocyte implantation compared with microfracture in the knee. A randomized trial. *J. Bone Joint Surg. Am.* 86-a, 455–464 (2004).
 - 19 Gong, J. P., Katsuyama, Y., Kurokawa, T. & Osada, Y. Double-Network Hydrogel with Extremely High Mechanical Strength. *Adv. Mater.* 15, 1155–1158 (2003).
 - 20 Tanabe, Y. *et al.* Biological responses of novel high-toughness double network hydrogels in muscle and the subcutaneous tissues. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 19, 1379–1387 (2008).
 - 21 Azuma, C. *et al.* Biodegradation of high-toughness double network hydrogels as potential materials for artificial cartilage. *J. Biomed. Mater. Res. A* 81, 373–380 (2007).
 - 22 Engler, A. J., Sen, S., Sweeney, H. L. & Discher, D. E. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell* 126, 677–689 (2006).
 - 23 Yasuda, K. *et al.* A novel double-network hydrogel induces spontaneous articular cartilage regeneration in vivo in a large osteochondral defect. *Macromol. Biosci.* 9, 307–316 (2009).
 - 24 Fukui, T. *et al.* Intra-articular administration of hyaluronic acid increases the volume of the hyaline cartilage regenerated in a large osteochondral defect by implantation of a double-network gel. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 25, 1173–1182 (2014).

- 25 Maeda, E. *et al.* Significant increase in Young's modulus of ATDC5 cells during chondrogenic differentiation induced by PAMPS/PDMAAm double-network gel: Comparison with induction by insulin. *J. Biomech.* 47, 3408–3414 (2014).
- 26 Gong, J. P., Nitta, T. & Osada, Y. Electrokinetic Modeling of the Contractile Phenomena of Polyelectrolyte Gels. One-Dimensional Capillary Model. *J. Phys. Chem.* 98, 9583–9587 (1994).
- 27 Yang-Ho, N., Yoshinori, K., Rikimaru, K., Takayuki, K. & Yoshihito, O. Toughening of Hydrogels with Double Network Structure. *e-Journal of Surface Science and Nanotechnology* 3, 8–11 (2005).
- 28 Ogawa, M. *et al.* Poly(2-acrylamido-2-methylpropanesulfonic acid) gel induces articular cartilage regeneration in vivo: comparisons of the induction ability between single- and double-network gels. *J. Biomed. Mater. Res. A* 100, 2244–2251 (2012).
- 29 Yoshikawa, K. *et al.* Hyaluronic acid affects the in vitro induction effects of synthetic PAMPS and PDMAAm hydrogels on chondrogenic differentiation of ATDC5 cells, depending on the level of concentration. *BMC Musculoskelet. Disord.* 14, 56 (2013).
- 30 Kwon, H. J. *et al.* In vitro differentiation of chondrogenic ATDC5 cells is enhanced by culturing on synthetic hydrogels with various charge densities. *Acta Biomater.* 6, 494–501 (2010).
- 31 Chen, Y. M. *et al.* Cultivation of endothelial cells on adhesive protein-free synthetic polymer gels. *Biomaterials* 26, 4588–4596 (2005).
- 32 Narita, T., Hirai, A., Xu, J., Gong, J. P. & Osada, Y. Substrate effects of gel surfaces on cell adhesion and disruption. *Biomacromolecules* 1, 162–167 (2000).
- 33 Kobayashi, T., Lyons, K. M., McMahon, A. P. & Kronenberg, H. M. BMP signaling stimulates cellular differentiation at multiple steps during cartilage development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 18023–18027 (2005).
- 34 Miyazono, K., Kusanagi, K. & Inoue, H. Divergence and convergence of TGF- β /BMP signaling. *J. Cell. Physiol.* 187, 265–276 (2001).
- 35 Retting, K. N., Song, B., Yoon, B. S. & Lyons, K. M. BMP canonical Smad signaling through Smad1 and Smad5 is required for endochondral bone formation. *Development* 136, 1093–1104 (2009).

- 36 Tsumaki, N. & Yoshikawa, H. The role of bone morphogenetic proteins in endochondral bone formation. *Cytokine Growth Factor Rev.* 16, 279-285 (2005)
- 37 Yoon, B. S. & Lyons, K. M. Multiple functions of BMPs in chondrogenesis. *J. Cell. Biochem.* 93, 93-103 (2004).
- 38 Kulyk, W. M., Rodgers, B. J., Greer, K. & Kosher, R. A. Promotion of embryonic chick limb cartilage differentiation by transforming growth factor-beta. *Dev. Biol.* 135, 424-430 (1989).
- 39 Blunk, T. *et al.* Differential effects of growth factors on tissue-engineered cartilage. *Tissue Eng.* 8, 73-84 (2002).
- 40 Barry, F., Boynton, R. E., Liu, B. & Murphy, J. M. Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow: differentiation-dependent gene expression of matrix components. *Exp. Cell Res.* 268, 189-200 (2001).
- 41 Pei, M., Seidel, J., Vunjak-Novakovic, G. & Freed, L. E. Growth factors for sequential cellular de- and re-differentiation in tissue engineering. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 294, 149-154 (2002).
- 42 Sekiya, I., Larson, B. L., Vuoristo, J. T., Reger, R. L. & Prockop, D. J. Comparison of effect of BMP-2, -4, and -6 on in vitro cartilage formation of human adult stem cells from bone marrow stroma. *Cell Tissue Res.* 320, 269-276 (2005).
- 43 Fisher, M. C., Li, Y., Seghatoleslami, M. R., Dealy, C. N. & Kosher, R. A. Heparan sulfate proteoglycans including syndecan-3 modulate BMP activity during limb cartilage differentiation. *Matrix Biol.* 25, 27-39 (2006).
- 44 Ito, Y. *et al.* Receptor-regulated and inhibitory Smads are critical in regulating transforming growth factor beta-mediated Meckel's cartilage development. *Dev. Dyn.* 224, 69-78 (2002).
- 45 Hatakeyama, Y., Nguyen, J., Wang, X., Nuckolls, G. H. & Shum, L. Smad signaling in mesenchymal and chondroprogenitor cells. *J. Bone Joint Surg. Am.* 85-A Suppl 3, 13-18 (2003).
- 46 Bobick, B. E. & Kulyk, W. M. The MEK-ERK signaling pathway is a negative regulator of cartilage-specific gene expression in embryonic limb mesenchyme. *J. Biol. Chem.* 279, 4588-4595 (2004).
- 47 Nakajima, M., Negishi, Y., Tanaka, H. & Kawashima, K. p21(Cip-1/SDI-1/WAF-1) expression via the mitogen-activated protein kinase signaling pathway in insulin-induced chondrogenic

- differentiation of ATDC5 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 320, 1069–1075 (2004).
- 48 Yosimichi, G. *et al.* Roles of PKC, PI3K and JNK in multiple transduction of CCN2/CTGF signals in chondrocytes. *Bone* 38, 853–863 (2006).
- 49 Bobick, B. E. & Kulyk, W. M. Regulation of cartilage formation and maturation by mitogen-activated protein kinase signaling. *Birth Defects Res. C Embryo Today* 84, 131–154 (2008).
- 50 Bobick, B. E., Chen, F. H., Le, A. M. & Tuan, R. S. Regulation of the chondrogenic phenotype in culture. *Birth Defects Res. C Embryo Today* 87, 351–371 (2009).
- 51 Staines, K. A., Macrae, V. E. & Farquharson, C. Cartilage development and degeneration: a Wnt Wnt situation. *Cell. Biochem. Funct.* 30, 633–642 (2012).
- 52 Church, V., Nohno, T., Linker, C., Marcelle, C. & Francis-West, P. Wnt regulation of chondrocyte differentiation. *J. Cell Sci.* 115, 4809–4818 (2002).
- 53 Hwang, S. G., Yu, S. S., Lee, S. W. & Chun, J. S. Wnt-3a regulates chondrocyte differentiation via c-Jun/AP-1 pathway. *FEBS Lett.* 579, 4837–4842 (2005).
- 54 Sahni, M. *et al.* FGF signaling inhibits chondrocyte proliferation and regulates bone development through the STAT-1 pathway. *Genes Dev.* 13, 1361–1366 (1999).
- 55 Ben-Eliezer, M., Phillip, M. & Gat-Yablonski, G. Leptin regulates chondrogenic differentiation in ATDC5 cell-line through JAK/STAT and MAPK pathways. *Endocrine* 32, 235–244 (2007).
- 56 Harrington, E. K., Coon, D. J., Kern, M. F. & Svoboda, K. K. PTH stimulated growth and decreased Col-X deposition are phosphatidylinositol-3,4,5 triphosphate kinase and mitogen activating protein kinase dependent in avian sterna. *Anat. Rec. (Hoboken)* 293, 225–234 (2010).
- 57 Ulici, V., Hoenselaar, K. D., Gillespie, J. R. & Beier, F. The PI3K pathway regulates endochondral bone growth through control of hypertrophic chondrocyte differentiation. *BMC Dev. Biol.* 8, 40 (2008).
- 58 Ihara-Watanabe, M. *et al.* Involvement of phosphoinositide 3-kinase signaling pathway in chondrocytic differentiation of ATDC5 cells:

- application of a gene-trap mutagenesis. *J. Cell. Biochem.* 93, 418-426 (2004).
- 59 Hidaka, K. *et al.* Involvement of the phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B signaling pathway in insulin/IGF-I-induced chondrogenesis of the mouse embryonal carcinoma-derived cell line ATDC5. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 33, 1094-1103 (2001).
- 60 Woods, A., Wang, G. & Beier, F. RhoA/ROCK signaling regulates Sox9 expression and actin organization during chondrogenesis. *J. Biol. Chem.* 280, 11626-11634 (2005).
- 61 Haudenschild, D. R., Chen, J., Pang, N., Lotz, M. K. & D'Lima, D. D. Rho kinase-dependent activation of SOX9 in chondrocytes. *Arthritis Rheum.* 62, 191-200 (2010).
- 62 Atsumi, T., Miwa, Y., Kimata, K. & Ikawa, Y. A chondrogenic cell line derived from a differentiating culture of AT805 teratocarcinoma cells. *Cell Differ. Dev.* 30, 109-116 (1990).
- 63 Shimizu, A. *et al.* A novel alternatively spliced fibroblast growth factor receptor 3 isoform lacking the acid box domain is expressed during chondrogenic differentiation of ATDC5 cells. *J. Biol. Chem.* 276, 11031-11040 (2001).
- 64 Shukunami, C., Akiyama, H., Nakamura, T. & Hiraki, Y. Requirement of autocrine signaling by bone morphogenetic protein-4 for chondrogenic differentiation of ATDC5 cells. *FEBS Lett.* 469, 83-87 (2000).
- 65 Akiyama, H., Shukunami, C., Nakamura, T. & Hiraki, Y. Differential expressions of BMP family genes during chondrogenic differentiation of mouse ATDC5 cells. *Cell Struct. Funct.* 25, 195-204 (2000).
- 66 Ochi, M. *et al.* Articular cartilage repair using tissue engineering technique-novel approach with minimally invasive procedure. *Artif. Organs.* 28, 28-32 (2004).
- 67 Peterson, L., Minas, T., Brittberg, M. & Lindahl, A. Treatment of osteochondritis dissecans of the knee with autologous chondrocyte transplantation: results at two to ten years. *J. Bone Joint Surg. Am.* 85-A Suppl 2, 17-24 (2003).
- 68 Shukunami, C. *et al.* Chondrogenic differentiation of clonal mouse embryonic cell line ATDC5 in vitro: differentiation-dependent gene expression of parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor. *J. Cell Biol.* 133, 457-468 (1996).

- 69 Fisher, R. On the Interpretation of χ^2 from Contingency Tables, and the Calculation of P. *J. R. Stat. Soc.* 85, 87–94 (1992).
- 70 Agresti, A. A Survey of Exact Inference for Contingency Tables. *Statistical Science* 7 131–153 (1992).
- 71 Shukunami, C. *et al.* Cellular hypertrophy and calcification of embryonal carcinoma-derived chondrogenic cell line ATDC5 in vitro. *J. Bone Miner. Res.* 12, 1174–1188 (1997).
- 72 Derynck, R. & Zhang, Y. E. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* 425, 577–584 (2003).
- 73 Yoshiura, S. *et al.* Ultradian oscillations of Stat, Smad, and Hes1 expression in response to serum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 11292–11297 (2007).
- 74 Esquivies, L. *et al.* Designer nodal/BMP2 chimeras mimic nodal signaling, promote chondrogenesis, and reveal a BMP2-like structure. *J. Biol. Chem.* 289, 1788–1797 (2014).
- 75 Brady, K. *et al.* Human fetal and adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells use different signaling pathways for the initiation of chondrogenesis. *Stem Cells Dev.* 23, 541–554 (2014).
- 76 Frenz, D. A. *et al.* Induction of chondrogenesis: requirement for synergistic interaction of basic fibroblast growth factor and transforming growth factor-beta. *Development* 120, 415–424 (1994).
- 77 Tsai, T. L., Manner, P. A. & Li, W. J. Regulation of mesenchymal stem cell chondrogenesis by glucose through protein kinase C/transforming growth factor signaling. *Osteoarthritis Cartilage* 21, 368–376 (2013).
- 78 Denker, A. E., Haas, A. R., Nicoll, S. B. & Tuan, R. S. Chondrogenic differentiation of murine C3H10T1/2 multipotential mesenchymal cells: I. Stimulation by bone morphogenetic protein-2 in high-density micromass cultures. *Differentiation* 64, 67–76 (1999).
- 79 Yoon, B. S. *et al.* Bmpr1a and Bmpr1b have overlapping functions and are essential for chondrogenesis in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 5062–5067 (2005).
- 80 Miljkovic, N. D., Cooper, G. M. & Marra, K. G. Chondrogenesis, bone morphogenetic protein-4 and mesenchymal stem cells. *Osteoarthritis Cartilage* 16, 1121–1130 (2008).
- 81 Kuroda, R. *et al.* Cartilage repair using bone morphogenetic protein 4 and muscle-derived stem cells. *Arthritis Rheum.* 54, 433–442 (2006).

- 82 Lin, L. *et al.* Articular cartilage repair using dedifferentiated
articular chondrocytes and bone morphogenetic protein 4 in a rabbit
model of articular cartilage defects. *Arthritis Rheum.* 58, 1067–1075
(2008).
- 83 Khetan, S. *et al.* Degradation-mediated cellular traction directs
stem cell fate in covalently crosslinked three-dimensional
hydrogels. *Nat. Mater.* 12, 458–465 (2013).
- 84 Sawada, Y. *et al.* Force sensing by mechanical extension of the Src
family kinase substrate p130Cas. *Cell* 127, 1015–1026 (2006).
- 85 Nakamoto, T. *et al.* Requirements for localization of p130cas to focal
adhesions. *Mol. Cell Biol.* 17, 3884–3897 (1997).
- 86 Geiger, B., Spatz, J. P. & Bershadsky, A. D. Environmental sensing
through focal adhesions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 21–33 (2009).
- 87 Puklin-Faucher, E. & Sheetz, M. P. The mechanical integrin cycle.
J. Cell Sci. 122, 179–186 (2009).
- 88 Walcott, S. & Sun, S. X. A mechanical model of actin stress fiber
formation and substrate elasticity sensing in adherent cells. *Proc.
Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 7757–7762 (2010).
- 89 Jaalouk, D. E. & Lammerding, J. Mechanotransduction gone awry. *Nat.
Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 63–73 (2009).
- 90 Chen, Y. M. *et al.* Platelet adhesion to human umbilical vein
endothelial cells cultured on anionic hydrogel scaffolds.
Biomaterials 28, 1752–1760 (2007).
- 91 Chen, Y. M. *et al.* Tuning of cell proliferation on tough gels by
critical charge effect. *J. Biomed. Mater. Res. A* 88, 74–83 (2009).
- 92 Greenblatt, M. B., Shim, J. H. & Glimcher, L. H. TAK1 mediates BMP
signaling in cartilage. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1192, 385–390 (2010).
- 93 Watanabe, H., de Caestecker, M. P. & Yamada, Y. Transcriptional
cross-talk between Smad, ERK1/2, and p38 mitogen-activated protein
kinase pathways regulates transforming growth factor-beta-induced
aggrecan gene expression in chondrogenic ATDC5 cells. *J. Biol. Chem.*
276, 14466–14473 (2001).
- 94 Kronenberg, H. M. Developmental regulation of the growth plate.
Nature 423, 332–336 (2003).
- 95 Michigami, T. Regulatory mechanisms for the development of growth
plate cartilage. *Cell. Mol. Life Sci.* 70, 4213–4221 (2013).