

平成 24 年 4 月 27 日

平成 23 年度独立行政法人日本学術振興会  
藤田記念医学研究振興基金研究助成事業研究概要報告書

独立行政法人日本学術振興会理事長殿

研究者所属・職 岡山大学病院整形外科・助教  
氏 名 古松 毅之

本助成事業による研究について、次のとおり報告します。

1. 研究課題名	遺伝子導入による靭帯-骨軟骨接合部 (enthesis) の再生
(英文名)	Regeneration of ligament-to-bone interface
2. 研究実施期間	平成 23 年 4 月 1 日～平成 24 年 3 月 31 日
3. 助成金額	1,120,000 円
4. 研究の目的	<p>靭帯損傷の治療においては、保存的加療もしくは靭帯再建術が一般的であり、enthesis の修復・再生を意図した治療法は確立されていない。これまでに申請者は、enthesis を構成する前十字靭帯 (ACL) interface 細胞の生物学的特徴を解析するとともに、軟骨細胞分化における転写因子の相互作用を検討してきた。その結果、①「ACL 細胞は高い軟骨細胞分化能を有すること (図 1、業績 12)」、②「軟骨細胞分化誘導には転写因子 Sox9 と Scleraxis のバランスが重要であること (業績 13)」、③「interface 細胞の活性化には伸張刺激が必要であること (業績 9)」が明らかとなった。本研究では、interface 細胞に対し Sox9 と Scleraxis を遺伝子導入し、ハイドロゲルを用いて 3 次元培養を施行する。さらに、3 次元培養細胞に伸張刺激を付加することにより、enthesis 再構築を達成することを目的とする。</p> <p>靭帯修復に関するこれまでの研究は、成長因子の組織修復効果に期待するものがほとんどである。本研究は、enthesis の発生・分化に重要な役割を担うと考えられる転写因子 Sox9 と Scleraxis を遺伝子導入することで、3 次元培養靭帯細胞からの enthesi s 再構築を目的とした独創的かつ先駆的な研究である。</p>

## 5. 研究概要報告

申請者はこれまでに Sox9 と Scleraxis が軟骨細胞分化初期段階に関与することを報告しており、当該研究においては enthesis と同様に軟骨細胞様の形質を維持する半月板 inner 細胞および ACL 細胞を用いて、Sox9 と Scleraxis の発現パターンを解析した。

その結果、分化した ACL 細胞においては靭帯・腱特異的マーカーとされる Scleraxis の発現が認められず、一度脱分化した後に、軟骨細胞系譜へと人工的に分化誘導がかかると、Sox9 および Scleraxis の発現がともに増強されることが明らかとなった。

また、3次元ペプチドゲルを用いた ACL 細胞に周期的伸張刺激を負荷することにより、ACL 細胞としての特性を維持するとともに、I型コラーゲンの産生が増強されることが明らかとなった。

同時に、靭帯・腱を構成する主要な細胞外マトリクス (ECM) である I型コラーゲンおよび軟骨・enthesis に特徴的とされる II型コラーゲンの発現をともに時間・空間的に制御すると考えられている CCN2/CTGF の関与を解析した。周期的伸張刺激は明らかに ACL 細胞および半月板 inner 細胞における CCN2 発現を活性化し、誘導された CCN2 はそれぞれの細胞にとって最適な ECM 環境であると考えられる I型および II型コラーゲンの産生をそれぞれ増強させることが判明した。

CCN2 発現の活性化は、CCN2 遺伝子プロモーター領域に存在する Smad-binding element に TGF- $\beta$  シグナル伝達因子である Smad3 が結合することにより誘導されることも明らかとなった。また、II型コラーゲン発現の誘導においては、半月板 inner 細胞においても、軟骨細胞と同様に SOX9 によるエピジェネティックな発現制御機構が重要であることが判明した。

これらの研究成果は、国内および国外の学術集会で発表し、その一部は論文として国際医学雑誌に掲載された。今後は、これらの事象を踏まえ、靭帯-骨軟骨接合部 (enthesis) の修復・再生に関するデータを更に収集し、論文として報告したい。

## 6. 研究成果の発表について

独立行政法人日本学術振興会藤田記念医学研究振興基金研究助成事業の英文称：  
「JSPS Fujita Memorial Fund for Medical Research」

研究者所属・職 岡山大学病院整形外科・助教  
氏 名 古松 毅之

### 論文発表

1. ○Furumatsu T, Kanazawa T, Miyake Y, Kubota S, Takigawa M, Ozaki T. Mechanical stretch increases Smad3-dependent CCN2 expression in inner meniscus cells. J Orthop Res (in press).
2. Matsumoto E, Furumatsu T, Kanazawa T, Tamura M, Ozaki T. ROCK inhibitor prevents the dedifferentiation of human articular chondrocytes. Biochem Biophys Res Commun. 2012;420:124-9.
3. Kanazawa T, Furumatsu T, Hachioji M, Oohashi T, Ninomiya Y, Ozaki T. Mechanical stretch enhances COL2A1 expression on chromatin by inducing SOX9 nuclear translocation in inner meniscus cells. J Orthop Res 2012;30:468-74.
4. ○Miyake Y, Furumatsu T, Kubota S, Kawata K, Ozaki T, Takigawa M. Mechanical stretch increases CCN2/CTGF expression in anterior cruciate ligament-derived cells. Biochem Biophys Res Commun 2011;409:247-52.

### 口頭発表

1. ○Furumatsu T, Kanazawa T, Yokoyama Y, et al. Inner meniscus cells maintain higher chondrogenic phenotype compared with outer meniscus cells. ORS 2012/2/4-7 San Francisco, USA
2. Kanazawa T, Furumatsu T, Abe N, et al. Mechanical stretch enhances COL2A1 expression on chromatin by inducing SOX9 nuclear translocation in inner meniscus cells. ORS 2012/2/4-7 SF, USA
3. Miyake Y, Furumatsu T, Kubota S, et al. Cyclic tensile strain stimulates CCN2/CTGF expression in human anterior cruciate ligament-derived cells. ORS 2012/2/4-7 SF, USA
4. ○高田直樹、古松毅之、阿部信寛ほか. 前十字靭帯細胞における三次元培養下メカニカルストレッチの影響—自己組織化ペプチドゲルを用いた検討— 日整会基礎 2011/10/20-21

### 著 書

該当なし

注：

- (1) 研究成果を学会誌等で発表する場合には、独立行政法人日本学術振興会藤田記念医学研究振興基金研究助成事業による助成を受けた旨を必ず明記して下さい。  
また、その別刷り2部を「研究概要報告書」と共に必ず提出して下さい。
- (2) 本基金の助成に係る代表的な論文、口頭発表及び著書にはタイトルの前に○を付けて下さい。