

and tissues,<sup>2</sup> and miRNAs expressed specifically in cartilage<sup>4-8</sup> have been reported.

In this study, we explored the role of miRNA expression in the age-dependent changes in expression levels in chondrocytes in collagenase-treated cells from cartilage obtained during surgery from patients with polydactylism (PD), anterior cruciate ligament (ACL) injury, and OA undergoing total knee arthroplasty (TKA). We then isolated total RNA from each cartilage sample, analyzed the gene expression and miRNA expression by microarray and performed pathway analysis to investigate the association between genes regulated by the isolated miRNAs and the OA-related genes and cartilage-related genes. To confirm the relationship between the isolated miRNAs and cartilaginous tissue, the results were evaluated by real-time polymerase chain reaction (PCR) and 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay in a mimic group, in which expression was upregulated by transfecting synthetic double-stranded RNA from the sampled miRNAs into chondrocytes, and an inhibitor group, in which expression was downregulated through specific binding with each type of miRNA. These functional analyses provided information

about the relationship between miRNA expression and cartilage metabolism.

## B. 研究方法

### Cartilaginous Tissue

The protocols were performed under the approval and guidance of the Clinical Research Review Committee of the Tokai University School of Medicine. Cartilaginous tissue was obtained from 17 patients (age, 60–79 years; average age, 73.4 years) who had been diagnosed with OA and who had undergone TKA at the Tokai University Hospital from April 2010 to June 2011; three patients (age, 15–31 years; average age, 22.3 years) who had an ACL injury and who had undergone surgery at the same hospital during the same period; and six patients (age, 11–16 months; average age: 13 months) who had been diagnosed with polydactylism and who had undergone plastic surgery at the National Center for Child Health and Development during January and February 2010.

### Centrifugation and Incubation of Chondrocytes

The harvested cartilaginous tissue of each patient was sliced finely with scissors and treated with enzymes in a Petri dish for 4 h using Dulbecco's modified Eagle medium F12

(DMEM/F12; GIBCO, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) containing 0.05% collagenase type 1 (Washington Corporation, NJ, USA). The enzyme-treated cartilaginous tissue was passed through a cell strainer (BD Falcon™; BD Biosciences, Bedford, MA) with a pore size of 100 μm, and the cells were retrieved by centrifugation. The chondrocytes were seeded into a  $1 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> plate and incubated in culture medium of DMEM/F12 supplemented with 20% fetal bovine serum (FBS; Gibco, NY, USA) and 1% antibiotic-antimycotic solution (Gibco). After 4 days, the culture was maintained by adding a further 50 μg/ml ascorbic acid (Wako Junyaku Kougyou Corp, Kanagawa, Japan). All incubations were performed at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> and 95% air.

### Microarray

RNA was isolated from the chondrocytes after they were seeded into  $1 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> 24-well plates and incubated in 5% CO<sub>2</sub> and 95% air. Using miRNA kits (Qiagen, Tokyo, Japan), 10 μl of RNA was isolated according to the manufacturer's instructions. The microarrays were performed using Human GE Microarrays kits (probes: 34,127) (Agilent) and Human miRNA Microarray kits (probes: 939) (Agilent).

### Target Scan

#### *Target Gene Prediction*

We used the GeneSpring GX11 *TargetScan* function (Agilent) to predict the miRNA target genes. The context percentile was set at 90.0, and conserved and nonconserved databases were chosen.

### Pathway Analysis

Pathway analysis of the association between the miRNA-regulated genes and the OA- and cartilage-related genes, which were detected using MetaCore, was performed using GenMAPP (<http://www.genmapp.org/>) pathway analysis software.

### cDNA Synthesis

The incubated chondrocytes were rinsed twice in phosphate-buffered saline (PBS), placed in 700 μl of QIAzol Lysis Reagent (Qiagen Inc., Valencia, CA), and the RNA was isolated using a miRNeasy Mini Kit (Qiagen) in accordance with the manufacturer's protocols. RNA at a concentration of 1 μg/μl that was isolated using the miScript Reverse Transcription Kit (Qiagen) was mixed with 4 μl of miScript RT Buffer, 1 μl of miScript Reverse Transcriptase Mix, and RNase-free Water. The solution was incubated for 60 min at 37°C and then 5

min at 95°C, and the cDNA was prepared.

### Real-time PCR

In the PCR used to confirm the miRNA, 25 µl of QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix, 5 µl of miScript Universal Primer, 5 µl of miScript Primer Assay, a suitable quantity of RNase-free Water, and template cDNA were mixed for 15 min at 95°C, 15 s at 94°C, 30 s at 55°C, 30 s at 70°C (40 cycles), 15 s at 95°C, 30 s at 60°C, and 15 s at 95°C (dissociation step) using a miScript Primer Assay kit (Qiagen) and a miScript SYBR Green PCR kit (Qiagen). In the calculations, the values were standardized to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), and the expression level was calculated using the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  values.

In the PCR used to confirm the gene expression, 12.5 µl of SYBR Green Master Mix, 0.5 µl of Primer Front, 0.5 µl of Primer Reverse, 1 µl of cDNA and 10.5 µl of distilled water were mixed for 2 min at 50°C, 10 min at 95°C, 15 s at 95°C, 1 min at 60°C (60 cycles), 15 s at 95°C, 30 s at 60°C, and 15 s at 95°C (dissociation step). In the calculations, the values were standardized to GAPDH, and the expression level was calculated using the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  values. Real-time PCR was used to

confirm the gene expression of aggrecan, ADAMTS5, type 1 collagen, type 2 collagen, SOX9, MMP3, and MMP13. The primer sequences used in the real-time PCR are shown in Table 1.

Table1

Primer ID	Accession No.	Sequence	Expect size(bp)
Aggrecan-F	NM_001133	TGG AGG ACA GCG AGG CC	94
Aggrecan-R		TGG AGG GTG TAG GCG TGT AGA GA	
ADAMTS5-F	NM_000703	GAG CCA AGG CCA CTC GCT ACT A	120
ADAMTS5-R		CCT CAC AGC CAG TTC TCA CAC A	
Type I Collagen-F	NM_000368	AAG GGT GAG ACA GGC GAA CAA	170
Type I Collagen-R		TTG CCA GGA GAA CCA GCA AGA	
Type II Collagen-F	NM_003150	GGA GTT TTG TTC CCT CTC T	113
Type II Collagen-R		GAC CCG AAG GGT CTT ACA GGA	
SOX9-F	NM_009423	AAC GCC GAG CTC AGC AAG A	133
SOX9-R		CCG CCG CTG GTA CTT GTA ATC	
MMP3-F	NM_000422	ATT CCA TGG AGC CAG GGT TTC	133
MMP3-R		CAT TTG GGT CAA ACT CCA ACT GTG	
MMP13-F	NM_000427	TCA CGA TGG GAT TGG TGA CA	77
MMP13-R		AGG GCC CAT CAA ATG GGT AGA	
GAPDH-F	NM_002046	GCA CCG TCA AGG CTG AGA AC	142
GAPDH-R		ATG GTG GTG AAG ACC CCA GT	

### MTT Assay

We made a 10× stock solution by dissolving 4 mg/ml in DMEM High Glucose 1× (Invitrogen) and seeded chondrocytes into 24-well plates at 4.0 × 10<sup>4</sup> cells/cm<sup>2</sup>. Before adding the MTT solution, the DMEM medium was removed completely and the cells were washed with PBS once. To each 24-well plate, 500 µl of MTT solution was added, and the plate was incubated for 2 h at 37°C in the dark. After incubation, the MTT solution was removed, 300 µl of dimethyl sulfoxide was added to each

well, 100  $\mu$ l of the supernatant liquid was transferred to each well of a 96-well plate, and the absorbance was measured at 590 nm.

### miRNA Overexpression

1  $\times 10^5$  chondrocytes were seeded in 24-well plates along with synthetic double-stranded RNA (Syn-rno-miR-199a-3p miScript miRNA Mimic, Syn-hsa-miR-193b miScript miRNA Mimic, and Syn-hsa-miR-320c miScript miRNA Mimic), a 2 nM solution was added, and the cells were incubated for 6 h at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> and 95% air.

### Repression of miRNA Expression

The chondrocytes were seeded at a density of 1  $\times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup> into 24-well plates, and anti-rno-miR-199a-3p miScript miRNA inhibitor, anti-hsa-miR-193b miScript miRNA inhibitor, or anti-hsa-miR-320c miScript miRNA inhibitor (Qiagen) was added. A 2 nM solution was made, and the cells were incubated for 6 h at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> and 95% air.

### Statistical Analysis

Steel's test, a nonparametric multiple-comparison test, was used to evaluate the real-time PCR and MTT

assay data. One-way ANOVA was used to evaluate microarray analysis.

### C. 結果

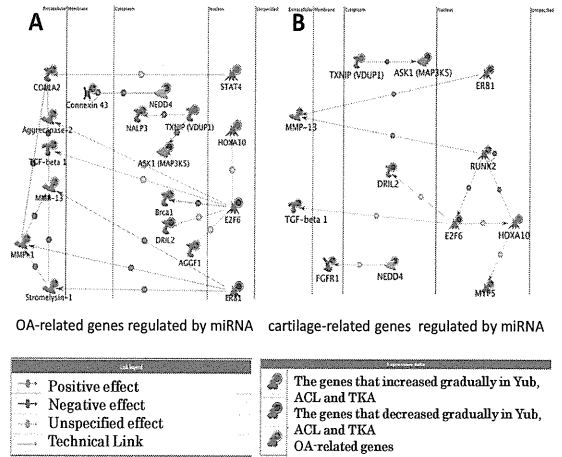
#### Microarray Analysis

Microarray analysis was performed to isolate the miRNA whose expression differs between PD, ACL, and TKA, and with age. A test microarray to compare the three groups (PD, ACL, and TKA) showed a significant difference ( $p < 0.05$ ) by analysis of variance. Isolation of the miRNAs whose expression varied consistently showed that expression was upregulated incrementally with age in two types (miR-199a-3p and miR-193b) and was downregulated incrementally with age in one type (miR-320c). A target scan was performed to investigate the genes regulated by the identified miRNAs: seven genes were regulated by miR-199a-3p, 10 were regulated by miR-193b, and 19 were regulated by miR-320c (Table 2).

Probe name	miRNA	Gene Symbol	Probe name	miRNA	Gene Symbol
A_23_P329198	hsa-miR-320c	OBFC2A	A_33_P3619171	hsa-miR-193b	FMAI1P1
A_32_P161638	hsa-miR-320c	BVE5	A_23_P19987	hsa-miR-199a-3p	IGFBP3
A_23_P68881	hsa-miR-320c	STAT4	A_23_P134125	hsa-miR-199a-3p	MAP3K5
A_33_P3312123	hsa-miR-320c	C10orf47	A_23_P47614	hsa-miR-193b	PHLDA3
A_23_P62990	hsa-miR-320c	OGN	A_23_P3357949	hsa-miR-193b	ETV1
A_33_P3519683	hsa-miR-320c	ZBTB805	A_23_P78491	hsa-miR-193b	ETV1
A_24_P77904	hsa-miR-320c	HOXA10	A_23_P602312	hsa-miR-193b	CD97
A_33_P3231297	hsa-miR-320c	CREG1	A_33_P3401156	hsa-miR-193b	ETV1
A_24_P99838	hsa-miR-320c	ZNF223	A_23_P307392	hsa-miR-199a-3p	DFF3
A_23_P127140	hsa-miR-320c	RAB11FIP2	A_33_P3389188	hsa-miR-199a-3p	TFAM
A_23_P219084	hsa-miR-320c	ZNF3	A_32_P192376	hsa-miR-193b	ENFP1
A_33_P3289113	hsa-miR-320c	COX11	A_23_P30655	hsa-miR-193b	NFKB1E
A_23_P309865	hsa-miR-320c	ZNF449	A_33_P3276475	hsa-miR-199a-3p	CHMP1B
A_23_P81650	hsa-miR-320c	C5orf15	A_23_P48339	hsa-miR-193b	IFT88
A_33_P3304372	hsa-miR-320c	TMEM144	A_33_P3408320	hsa-miR-193b	LASS1
A_23_P97700	hsa-miR-320c	TNIP	A_23_P30995	hsa-miR-199a-3p	CYBBR4
A_23_12896	hsa-miR-320c	FANCF	A_33_P3377130	hsa-miR-199a-3p	MAP3K5
A_23_P343598	hsa-miR-320c	CCR7	A_32_P12610	hsa-miR-193b	EZF6
A_33_P3392337	hsa-miR-320c	TEX2	A_33_P3357954	hsa-miR-193b	ETV1
			A_23_P68560	hsa-miR-193b	ARID3B
			A_32_P160863	hsa-miR-199a-3p	NEDD4
			A_23_P136880	hsa-miR-193b	ENFP1

## Pathway Analysis

Analysis of differences in the pathways between the isolated miRNAs and the OA-related genes and cartilage-related genes revealed that the miRNA-regulated genes were those involved in the metabolism of cartilaginous tissue, such as type 1 collagen, MMP13, stromelysin 1(MMP3), and aggrecanase 2 (ADAMTS5)(Fig. 1A, B).



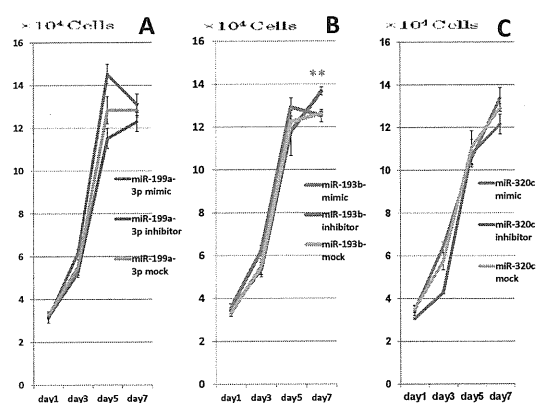
## Real-time PCR

Gene expression analysis was performed using miRNAs that were isolated by microarray (miR-199a-3p, miR-193b, and miR-320c). MiR-199a-3p and miR-193b, for which expression is upregulated with age, regulated anabolic factors such as aggrecan, type 2 collagen, and SOX9. MiR-320c, in which expression is downregulated with age, regulated the catabolic factor ADAMTS5 (Table 3).

miR199a-3p				miR193b				miR320c			
gene name	fold change	P value	SE	gene name	fold change	P value	SE	gene name	fold change	P value	SE
miR199a-3p	0.5	<0.05	0.16	miR193b	2.34	0.22	0.24	miR320c	0.20	0.01	0.24
inhibitor	0.74	<0.01	0.25	inhibitor	2.11	0.73	1.28	inhibitor	3.54	<0.01	1.54
miR199a-3p	0.5	<0.05	0.18	miR193b	0.54	<0.05	0.16	miR320c	0.20	0.12	0.23
inhibitor	8.5	<0.01	4.21	inhibitor	4.07	<0.05	5.05	inhibitor	1.18	0.41	0.24
miR199a-3p	1.03	0.85	0.20	miR193b	1.11	0.04	0.35	miR320c	0.73	<0.05	0.21
inhibitor	0.73	0.16	0.20	inhibitor	0.75	<0.05	0.19	inhibitor	1.63	0.27	0.21
miR199a-3p	0.54	<0.05	0.15	miR193b	1.01	0.24	0.55	miR320c	0.47	<0.01	0.21
inhibitor	0.75	1.04	0.26	inhibitor	0.95	<0.01	0.29	inhibitor	1.35	1.00	0.21
miR199a-3p	0.20	<0.01	0.25	miR193b	0.63	<0.01	0.29	miR320c	1.53	0.01	0.21
inhibitor	0.13	<0.05	5.08	inhibitor	1.04	<0.01	0.20	inhibitor	0.70	0.01	0.21
miR199a-3p	2.53	0.21	2.21	miR193b	1.05	0.53	0.40	miR320c	0.52	<0.05	0.21
inhibitor	2.81	1.04	1.50	inhibitor	0.80	0.28	0.27	inhibitor	2.81	<0.05	0.21
miR199a-3p	0.7	<0.05	0.15	miR193b	0.73	<0.05	0.15	miR320c	0.25	1.00	0.21
inhibitor	1.24	<0.05	0.11	inhibitor	2.01	<0.01	0.22	inhibitor	1.05	0.74	0.21

## MTT Assay

The MTT assay showed no significant difference in the cell proliferation capacity between miR-199a-3p and miR-320c. By contrast, the cell proliferation capacity was upregulated significantly in miR-193b in the inhibitor group on day 7 (Fig. 2).



## D. 考察

MiRNAs are noncoding RNAs of ~22 base pairs that are involved in cell proliferation, differentiation, development, and tumorigenesis. miRNAs bind to the 3'-end of the untranslated region of mRNA (the target) where they induce posttranscriptional repression and mRNA degeneration, and modulate gene expression.<sup>9-16</sup> Since Lee et al. reported the first miRNAs, several hundred have been discovered in plants and animals, and miRNAs specific to certain animal species and tissues are also known.<sup>17</sup> Several types of miRNA

have been discovered in fetal skeletal tissue, and it is believed that they play a key role in cartilage development.<sup>18</sup>

In terms of the miR-199a, which was the focus of this study, in experimental models using articular chondrocytes from mice, Lin et al. reported that Col2A1, COMP, and SOX9 expression was downregulated in the miR-199a expression-enhanced group and upregulated in the miR-199a expression-repressed group compared with the control group.<sup>19</sup> Because the expression of miR-199a after BMP2 induction declines initially and then increases gradually for several days, it is probably essential in the final stages of cartilage development, including cartilage hypertrophy and cartilage maturity.<sup>19</sup> MiR-193b may also target SOX5. In miRNA expression analysis on differentiated and dedifferentiated chondrocytes, miR-193b expression is about 7.6-fold higher in dedifferentiated chondrocytes than in differentiated chondrocytes.<sup>20</sup> However, there is no report on the functional analysis of miR-193b. Our study is the first report that miR-193b affects human cartilage metabolism by regulating type 2 collagen, aggrecan, and SOX9 expression. Although an association between miR-320c expression and other

abnormalities such as impaired glucose tolerance<sup>21</sup> has been reported, no relationship with cartilage has been reported.

The miRNAs identified by microarray varied with age, and this pattern may affect the juvenile properties and senescence of chondrocytes. The results of the real-time PCR analysis of the three types of miRNA (Table 3) suggest that miR-199a-3p and miR-193b expression is upregulated with age and may be involved in chondrocyte senescence by downregulating anabolic factors such as type 2 collagen, aggrecan, and SOX9. Conversely, the results also suggest that miR-320c expression is downregulated with age and may be involved in the juvenile properties of chondrocytes by downregulating the expression of the catabolic factor ADAMTS5. MiR-199a-3p and miR-193b may be involved in cartilage degeneration, and we found nothing that contradicts previous reports.<sup>19,20</sup> ADAMTS5 is an efficient aggrecanase and induces cartilage degeneration. Although miR-320c has not been reported in relation to cartilage, the expression of ADAMTS5 was downregulated in the miR-320c mimic group and was upregulated in the inhibitor group. This suggests that miR-320c is involved in the metabolism

of chondrocytes by regulating ADAMTS5. We used the TargetScan program to investigate the genes regulated by the three identified types of miRNA. ETV1 (ER81), which is regulated by miR-193b, has also been reported as a transcription factor unique to mesenchymal stem cells (MSCs).<sup>22</sup> In the study by Kubo et al., ETV1 expression was upregulated by 5–10 times in MSC compared with fibroblasts, chondrocytes, synovial cells, and adipose cells.<sup>22</sup> Kubo et al. also reported that cell differentiation and juvenile properties are affected when ETV1 is knocked down using short interfering RNA; for example, the self-renewal capacity of MSCs was repressed. Another study reported that the expression of STAT4, which is regulated by miR-320c, was upregulated in cells in which chondrocyte differentiation has been induced compared with a control group,<sup>23</sup> suggesting that STAT4 affects cartilage differentiation.

In the analysis of the pathways between the OA-related genes and cartilage-related genes detected by MetaCore and the miRNAs we identified in this study, ER81 (ETV1), which is controlled by miR-193b, produced positive feedback on the OA-related genes MMP1, stromelysin-1(MMP3), and

MMP13 (Fig. 1A). Although the pathway of the E2F6 gene, which is regulated by miR-193b, is unclear, the pathway analysis suggested that this gene is involved in the feedback on aggrecanase-2(ADAMTS5) and transforming growth factor  $\beta$ 1 (TGF $\beta$ 1) (Fig. 1A). NEDD4, which is regulated by miR-199a-3p, produced negative feedback on connexin 43, another OA-related gene (Fig. 1A). On the basis of the comparison of pathway analysis between genes regulated by miRNAs and cartilage-related genes, we believe that HOXA10, which is regulated by miR-320c, may regulate MMP13 through RUNX2 (Fig. 1B).

Although there is a great deal of literature on miRNAs, there are few reports on the relationship between miRNAs and the cell proliferation capacity of chondrocytes. The MTT assay performed in this study (Fig. 2) suggests that, although the effects on cell replication capacity did not differ between miR-199a-3p and miR-320c, miR-193b was upregulated significantly in the inhibitor group compared with the control group on day 7. This suggests that miR-193b can affect the cell replication capacity of chondrocytes.

Our findings suggest that miR-199a-3p and miR-193b may be involved in

chondrocyte aging by regulating aggrecan, type 2 collagen, and SOX9, and that miRNA-320c may be involved in the juvenile properties of chondrocytes by regulating ADAMTS5. Our findings suggest that miR-199a-3p, miR-193b, and miR-320c may be useful for a marker of cartilage as donor tissue of cartilage graft and tissue culture for cell therapy (Fig. 3).

#### E. 結論

In summary, three types of miRNA whose expression correlates with age were identified in chondrocytes. These findings suggest that miR-199a-3p and miR-193b are involved in chondrocyte aging by regulating aggrecan and type 2 collagen, and that SOX9 and miRNA-320c are involved in the juvenile properties of chondrocytes by regulating ADAMTS5.

#### F. 健康危害情報

本研究による健康危害情報はなかった。

#### G. 参考文献

1. Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. 2005. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 120:15–20.
2. Lin EA, Liu CJ. 2009. MicroRNAs in



- skeletogenesis. *Front Biosci* 14:2527–2764.
3. Kobayashi T, Lu J, Cobb BS, et al. 2008. Dicer-dependent pathways regulate chondrocyte proliferation and differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:1949–1954.
4. Kongcharoensombat W, Nakasa T, Ishikawa M, et al. 2010. The effect of microRNA-21 on proliferation and matrix synthesis of chondrocytes embedded in atelocollagen gel. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 18:1679–1684.
5. Miyaki S, Sato T, Inoue A. 2010. MicroRNA-140 plays dual roles in both cartilage development and homeostasis. *Genes Dev* 24:1173–1185.
6. Tardif G, Hum D, Pelletier JP, et al. 2009. Regulation of the IGFBP-5 and MMP-13 genes by the microRNAs miR-140 and miR-27a in human osteoarthritic chondrocytes. *BMC Musculoskelet Disord* 10:148.
7. Araldi E, Schipani E. 2010. MicroRNA-140 and the silencing of osteoarthritis. *Genes Dev* 24:1075–1080.
8. Yamasaki K, Nakasa T, Miyaki S, et al. 2009. Expression of microRNA-146a in osteoarthritis cartilage. *Arthritis Rheum* 60:1035–1041.
9. Chan SP, Slack FJ. 2006. microRNA-mediated silencing inside P-bodies. *RNA Biol* 3:97–100.
10. Chen CZ, Li L, Lodish HF, Bartel DP. 2006. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science* 303:83–86.
11. Esau C, Kang X, Peralta E, et al. 2004. MicroRNA-143 regulates adipocyte differentiation. *J Biol Chem* 279:52361–52365.
12. Harris TA, Yamakuchi M, Ferlito M, et al. 2008. MicroRNA-126 regulates endothelial expression of vascular cell adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:1516–1521.
13. Krichevsky AM, Sonntag KC, Isacson O, Kosik KS. 2006. Specific microRNAs modulate embryonic stem cell-derived neurogenesis. *Stem Cells* 24:857–864.
14. Sempere LF, Freemantle S, Pitha-Rowe I, et al. 2004. Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation. *Genome Biol* 5:R13.
15. Yi R, O'Carroll D, Pasolli HA, et al. 2008. Morphogenesis in skin is governed by discrete sets of differentially expressed microRNAs. *Nat Genet* 38:356–362.
16. Zhao Y, Samal E, Srivastava D. 2002. Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets

Hand2 during cardiogenesis. *Nature* 436: 214–220.

17. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V, et al. 1993. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75:843–854.

18. Berezikov E, Guryev V, van de Belt J, et al. 2005. Phylogenetic shadowing and computational identification of human microRNA genes. *Cell* 120:21–24.

19. Lin EA, Kong L, Bai XH, et al. 2009. miR-199a, a bone morphogenic protein 2-responsive microRNA, regulates chondrogenesis via direct targeting to Smad1. *J Biol Chem* 284:11326–11335.

20. Lin L, Shen Q, Zhang C, et al. 2011. Assessment of the profiling microRNA expression of differentiated and dedifferentiated human adult articular chondrocyte. *J Orthop Res* doi:10.1002/jor.21423 [Epub ahead of print] 1–7.

21. Ling HY, Ou HS, Feng SD, et al. 2009. Changes in microRNA (miR) profile and effects of miR-320 in insulin-resistant 3T3-L1 adipocytes. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 36:e32–e39.

22. Kubo H, Shimizu M, Taya Y, et al. 2009. Identification of mesenchymal stem cell (MSC)-transcription factors by microarray and knockdown analyses, and signature molecule-marked MSC in bone

marrow by immunohistochemistry. *Genes Cells* 14:407–424.

23. Yates KE. 2006. Identification of cis and trans-acting transcriptional regulators in chondroinduced fibroblasts from the pre-phenotypic gene expression profile. *Gene* 377:77–78.

#### H. 研究発表

##### 1. 著書

1) Mhendra Rao, (訳) 三浦巧, 阿久津英憲: 「アメリカにおける細胞治療システムの課題」 *医学のあゆみ*, 229(9):679-680, 2009.

2) 阿久津英憲, 梅澤明弘: 第5章 細胞周辺環境のための培養技術 6.フィーダーレイヤー, 遺伝子医学MOOK別冊 ますます重要になる細胞周辺環境(細胞ニッチ)の最新科学技術, 田畑泰彦(編集) *メディカルドゥ*, 354-357, 2009.

3) 阿久津英憲, 佐藤星子: 「生殖とiPS細胞」 *HORMONE FRONTIER IN GYNECOLOGY*, 16(3):241-250, 2009.

4) 阿久津英憲, 近澤奈々, 梅澤明弘: 「クローン胚・ES細胞と生殖医療」 *Pharma Medica*, 27(5):57-61, 2009.

5) 阿久津英憲, 梅澤明弘: 第3章 病態解明 1. ES細胞の病態解明への応用, 幹細胞の分化誘導と応用-ES細胞・iPS細胞・体性幹細胞研究最前線-, エヌ・ティー・エス, 413-423, 2009.

6) 阿久津英憲: 「ノーベル医学生理学賞: 家族・社会へ寄り添う科学の誕生」 *実験医学*, 28(19):3114-3115, 2010.

- 7) 伊藤千鶴, 阿久津英憲, 京野廣一, 宇都宮隆史, 年森清隆:「良質精子の条件:精子頭部扁平化およびperinuclear theca構成物質MN13と関連する卵活性化能」産婦人科の実際, 59(12):2069-2075, 2010.
- 8) 阿久津英憲, Sullivan Stephen:「幹細胞の創薬への応用 患者由来iPS細胞作製による疾患モデル細胞開発」実験医学, 28(2):351-355, 2010.
- 9) 阿久津英憲, 佐藤俊, 秦健一郎:「ARTによる出生時の問題 児のエピジェネティックス異常との関連」臨床婦人科産科, 65(6):770-776, 2011.
- 10) 阿久津英憲, 草川森士, 梅澤明弘:「ヒトES細胞を用いた臨床試験」感染・炎症・免疫, 41(4):68-72, 2011.
- 11) 三浦巧, 阿久津英憲:「目で見る生殖と再生 iPS細胞(図説)」HORMONE FRONTIER IN GYNECOLOGY, 18(3):232-236, 2011.
- 12) 阿久津英憲, 佐藤俊, 秦健一郎:「ARTによる出生時の問題 児のエピジェネティックス異常との関連」臨床婦人科産科, 65(6):770-776, 2011.
2. 論文発表
- 1) Makino H, Toyoda M, Matsumoto K, Saito H, Nishino K, Fukawatase Y, Machida M, Akutsu H, Uyama T, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Fujino T, Ishikawa Y, Nakamura T, Umezawa A. Mesenchymal to embryonic incomplete transition of human cells by chimeric OCT4/3 (POU5F1) with physiological co-activator EWS. *Exp Cell Res.* 2009; 315(16):2727-2740.
- 2) Ito C, Akutsu H, Yao R, Kyono K, Suzuki-Toyota F, Toyama Y, Maekawa M, Noda T, Toshimori K. Oocyte activation ability correlates with head flatness and presence of perinuclear theca substance in human and mouse sperm. *Hum Reprod.* 2009; 24(10):2588-2595.
- 3) Yamada M, Hamatani T, Akutsu H, Chikazawa N, Kuji N, Yoshimura Y, Umezawa A. Involvement of a novel preimplantation-specific gene encoding the high mobility group box protein Hmgpi in early embryonic development. *Hum Mol Genet.* 2009; 19(3):480-493.
- 4) Nagata S, Toyoda M, Yamaguchi S, Hirano K, Makino H, Nishino K, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Nakagawa M, Yamanaka S, Akutsu H, Umezawa A, Tada T. Efficient reprogramming of human and mouse primary extra-embryonic cells to pluripotent stem cells. *Genes Cells.* 2009; 14(12):1395-404.
- 5) Ichida JK, Blanchard J, Lam K, Son EY, Chung JE, Egli D, Loh KM, Carter AC, Di Giorgio FP, Koszka K, Huangfu D, Akutsu H, Liu DR, Rubin LL, Eggan K. A small-molecule inhibitor of tgf-Beta signaling replaces sox2 in reprogramming

- by inducing nanog. *Cell Stem Cell*. 2009; 5(5):491-503.
- 6) Akutsu H, Miura T, Machida M, Birumachi J, Hamada A, Yamada M, Sullivan S, Miyado K, Umezawa A. Maintenance of pluripotency and self-renewal ability of mouse embryonic stem cells in the absence of tetraspanin CD9. *Differentiation*. 2009; 78(2-3):137-42.
- 7) Inamura M, Kawabata K, Takayama K, Tashiro K, Sakurai F, Katayama K, Toyoda M, Akutsu H, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Umezawa A, Hayakawa T, Furue MK, Mizuguchi H. Efficient Generation of Hepatoblasts From Human ES Cells and iPS Cells by Transient Overexpression of Homeobox Gene HEX. *Mol Ther*. 2011; 19(2): 400-407.
- 8) Chowdhury MM, Katsuda T, Montagne K, Kimura H, Kojima N, Akutsu H, Ochiya T, Fujii T, Sakai Y. Enhanced effects of secreted soluble factor preserve better pluripotent state of embryonic stem cell culture in a membrane-based compartmentalized micro-bioreactor. *Biomed Microdevices*. 2010; 12(6):1097-1105.
- 9) Sasaki N, Hirano T, Kobayashi K, Toyoda M, Miyakawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Akutsu H, Umezawa A, Nishihara S. Chemical inhibition of sulfation accelerates neural differentiation of mouse embryonic stem cells and human induced pluripotent stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010; 401(3):480-486.
- 10) Nishino K, Toyoda M, Yamazaki-Inoue M, Makino H, Fukawatase Y, Chikazawa E, Takahashi Y, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Akutsu H, Umezawa A. Defining hypo-methylated regions of stem cell-specific promoters in human iPS cells derived from extra-embryonic amnions and lung fibroblasts. *PLoS One*. 2010; 5(9): e13017.
- 11) Adachi T, Wang X, Murata T, Obara M, Akutsu H, Machida M, Umezawa A, Tomita M. Production of a non-triple helical collagen alpha chain in transgenic silkworms and its evaluation as a gelatin substitute for cell culture. *Biotechnol Bioeng*. 2010; 106(6): 860-870.
- 12) Stadtfeld M, Apostolou E, Akutsu H, Fukuda A, Follett P, Natesan S, Kono T, Shioda T, Hochedlinger K. Aberrant silencing of imprinted genes on chromosome 12qF1 in mouse induced pluripotent stem cells. *Nature*. 2010; 465(7295):175-181.
- 13) Yamada M, Hamatani T, Akutsu H, Chikazawa N, Kuji N, Yoshimura Y, Umezawa A. Involvement of a novel preimplantation-specific gene encoding the high mobility group box protein

- Hmgpi in early embryonic development. *Hum Mol Genet.* 2010; 19(3):480-493.
- 14) Egli D, Akutsu H. Aging of the Female Reproductive System. *J Mamm Ova Res* 2011; 28: 118-125.
- 15) Takezawa Y, Yoshida K, Miyado K, Sato M, Nakamura A, Kawano N, Sakakibara K, Kondo T, Harada Y, Ohnami N, Kanai S, Miyado M, Saito H, Takahashi Y, Akutsu H, Umezawa A. Beta-catenin is a molecular switch that regulates transition of cell-cell adhesion to fusion. *Scientific Reports* 1, Article number: 68
- 16) Gokoh M, Nishio M, Nakamura N, Matsuyama S, Nakahara M, Suzuki S, Mitsumoto M, Akutsu H, Umezawa A, Yasuda K, Yuo A, Saeki K. Early senescence is not an inevitable fate of human-induced pluripotent stem-derived cells. *Cell Reprogram.* 2011;13(4):361-370.
- 17) Tateno H, Toyota M, Saito S, Onuma Y, Ito Y, Hiemori K, Fukumura M, Matsushima A, Nakanishi M, Ohnuma K, Akutsu H, Umezawa A, Horimoto K, Hirabayashi J, Asashima M. Glycome diagnosis of human induced pluripotent stem cells using lectin microarray. *J Biol Chem.* 2011; 286(23):20345-20353.
- 18) Nishino K, Toyota M, Yamazaki-Inoue M, Fukawatase Y, Chikazawa E, Sakaguchi H, Akutsu H, Umezawa A. DNA methylation dynamics in human induced pluripotent stem cells over time. *PLoS Genet.* 2011; 7(5): e1002085.
- 19) Sato B, Katagiri YU, Miyado K, Okino N, Ito M, Akutsu H, Okita H, Umezawa A, Fujimoto J, Toshimori K, Kiyokawa N. Lipid rafts enriched in monosialylGb5Cer carrying the stage-specific embryonic antigen-4 epitope are involved in development of mouse preimplantation embryos at cleavage stage. *BMC Dev Biol.* 2011;11:22.
- 20) Nishi M, Akutsu H, Masui S, Kondo A, Nagashima Y, Kimura H, Perrem K, Shigeri Y, Toyoda M, Okayama A, Hirano H, Umezawa A, Yamamoto N, Lee SW, Ryo A. A distinct role for Pin1 in the induction and maintenance of pluripotency. *J Biol Chem.* 2011;286(13):11593-11603.
- 21) Toyoda M, Yamazaki-Inoue M, Itakura Y, Kuno A, Ogawa T, Yamada M, Akutsu H, Takahashi Y, Kanzaki S, Narimatsu H, Hirabayashi J, Umezawa A. Lectin microarray analysis of pluripotent and multipotent stem cells. *Genes Cells.* 2011;16(1):1-11.
3. 学会発表
- 1) 阿久津英憲：「ヒト iPS 細胞遺伝子発現動態の多様性」第 8 回日本再生医療学会総会シンポジウム, 3 月 5 日～ 6 日, 2009.

- 2) 阿久津英憲：「難治性疾患克服に向けたヒト iPS 細胞の可能性」日本人類遺伝学会第 54 回大会 ワークショップ 4, 9 月 23~26 日, 2009.
- 3) 阿久津英憲：「Human Embryonic stem cells and iPS Cells: Potential tool for Low temperature medical experiments」第 36 回日本低温医学会総会・学術集会シンポジウム 2, 11 月 27~29 日, 2009.
- 4) Akutsu H. “Xeno-Free Growth and Expansion of Human Pluripotent Stem Cells”, Commercial Tutorial Directory; ISSCR 8<sup>th</sup> annual meeting, San Francisco, CA USA. 18<sup>th</sup> Jun, 2010.
- 5) 阿久津英憲：「臨床グレード幹細胞樹立の試み」第 28 回日本ヒト細胞学会学術集会シンポジウム, つくば市, 8 月 23 日, 2010 年.
- 6) Akutsu H. “xeno-free growth and expansion of human pluripotent stem cells”, Symposium 7; The 23<sup>rd</sup> Annual and International Meeting of the Japanese Association for Animal Cell Technology, Sapporo, 1<sup>st</sup>-4<sup>th</sup> Sep, 2010.
- 7) 阿久津英憲：「網羅的発現解析から見出した ES 細胞と iPS 細胞の相関性と研究者」第 28 回 JMAC ワーキンググループ会議, 東京, 9 月 22 日, 2010 年.
- 8) 阿久津英憲：「臨床応用に使える、ヒト ES 細胞とヒト iPS 細胞とは何か？」BTJ プロフェッショナルセミナー iPS 細胞/ヒト ES 細胞臨床研究の落とし穴、次世代の医療に必要な技術突破, 東京, 12 月 21 日, 2010 年.
- 9) 阿久津英憲：「ヒト ES 細胞の臨床応用を可能にする技術開発と課題」再生医療の実現化プログラム関連事業・公開ワークショップ ヒト多能性幹細胞の医療応用と輪唱研究指針の改訂—研究開発と規制のシンクローニーを目指して—, 神戸, 2 月 17 日, 2011 年.
- 10) 阿久津英憲：「受精からの発生で理解する幹細胞生物学」日本生殖再生医学会第 6 回学術集会, 東京, 2011 年, 3 月 13 日.
- 11) Akutsu H. “Development of xeno-free culture systems of human embryonic stem cells for cell therapy”, JST/CIRM Workshop “Early translational research on stem cells”, Kobe, 16<sup>th</sup> May, 2011.
- 12) 阿久津英憲：「エピゲノムの基礎知識」エピゲノムワークショップ(座長;河野友宏、阿久津英憲) 第 52 回日本哺乳動物卵子学会, 大田原, 5 月 21 日, 2011 年
- 13) 阿久津英憲：「特別講演 再生医療を見すえたヒト ES 細胞の樹立」日本組織培養学会 第 84 回大会, 東京, 5 月 28 日, 2011 年
- 14) 阿久津英憲：「難治性疾患に挑む ES/iPS 細胞の可能性」小児交互性片麻痺親の会 2011 年度全体会, 大阪, 8 月 6 日, 2011 年
- 15) Akutsu H. “Human ES cell and iPS cell derivation: Clinical application and

biological characterization”, 16<sup>th</sup> World Congress on In Vitro Fertilization, Tokyo, 13<sup>th</sup> Sep, 2011.

16) 阿久津英憲：「ヒト ES/iPS 細胞の疾患モデリング研究への応用」岐阜大・岐阜薬科大連携脳卒中・ALS セミナー，岐阜，10 月 20 日，2011 年

17) 阿久津英憲：「臨床グレード ES 細胞の作製を目指して」理化学研究所筑波研究所，つくば，11 月 7 日，2011 年

18) 阿久津英憲：「新たなヒト胚作製技術の報告（米国）について」第 64 回生命倫理専門調査会，中央合同庁舎第 4 号館第 2 特別会議室，1 月 17 日，2012 年

19) 阿久津英憲：「臨床応用を目指すヒト ES 細胞研究の現状」第 15 回ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針の見直しに関する専門委員会，厚生労働省 17 階 専用第 18-20 会議室，1 月 25 日，2012 年

20) 阿久津英憲：「新たなヒト胚作成技術について～SCNT 法による 3 倍体 ES 細胞論文の背景～」科学技術・学術審議会 生命倫理・安全部会 特定胚及びヒト ES 細胞等研究専門委員会（第 80 回），文部科学省 16 階 特別会議室，1 月 25 日，2012 年

21) 阿久津英憲：「ヒト ES 細胞の臨床応用へ向けた取り組み」バイオロジクスフォーラム第 9 回学術集会，東京 タワーホール船堀，2 月 22 日，2012 年

I. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

## 細胞シートならびに遺伝子改変ブタ精子の 凍結保存に関する研究

分担研究者 長嶋比呂志 明治大学農学部生命科学科発生工学研究室 教授

研究要旨：(1)大型実験動物であるブタを用いて細胞シートの移植試験を行う際に、蛍光蛋白のような細胞マーカーを持ったブタの利用が望まれる。そのようなブタの安定供給を可能にするため、我々が既に開発した赤色蛍光蛋白（クサビラオレンジ）遺伝子を持ったブタの精子の凍結保存を行い、さらにそれらの受精能を検証した。凍結精子を用いた人工授精で産仔が得られることが確認され、これによって赤色蛍光蛋白マーカーを持ったブタの研究利用が可能となった。(2)軟骨細胞シートによる軟骨再生技術の臨床応用の促進を目的として、細胞シートの低温保存ならびに凍結保存に取り組んだ。低温保存では、約3週間の冷蔵保存（4℃）が可能であった。保存液への抗酸化物質の添加が、細胞生存性維持に効果があることが示唆された。凍結保存研究では、哺乳動物初期胚、胎仔組織および成体卵巣組織等に実績のあるガラス化法を細胞シートに適用し、実用性の高いガラス化保存法の開発に成功した。細胞シートの臨床応用に際して、シートを用時調製することに加えて、今後は凍結保存シートの利用が可能になるであろう。

### A. 研究目的

1. 細胞シートの移植実験を遂行する際に、有力なリサーチツールとなり得る、赤色蛍光蛋白遺伝子導入ブタの精子の凍結保存と、凍結精子の利用による増殖を目的とした。
2. 東海大学医学部整形外科佐藤正人准教授らによって開発された細胞シートによる軟骨再生技術の臨床応用の促進を目的として、細胞シートの低温および凍結保存法を開発することを目的とした。

### B. 研究方法

#### 1. 遺伝子改変ブタ精子の凍結保存

性成熟に達した、クサビラオレンジ遺伝子導入ブタの雄個体から精巣を摘出し、精巣上体精子を還流法により採取した。精子の凍結保存は Niwa ら(1989)の方法に準じて行った。融解後の精子の活力ならびに生

存率(live and dead stain)を検定した。さらに、発情誘起した雌ブタに、卵管内人工授精を行い、精子の受精能を判定した。

#### 2. 細胞シートの低温および凍結保存

##### 2-1. 細胞シートの低温保存

ウサギ軟骨細胞（株式会社プライマリーセル）を 100mM アスコルビン酸・10% FBS 添加 RPMI で 9 日間培養し、薄層（1 層）形成を確認した後に保存用培地に置き換え、4℃で 2～3 週間保存した。保存液には、①: 10% FBS 添加ヒト線維芽細胞増殖用完全合成培地（mHFDm-1:機能性ペプチド研究所）、②: 100mM アスコルビン酸・10% FBS 添加 RPMI、③: ②の液に①と同じ抗酸化剤（トコフェロール、グルタチオン、葉酸、アスコルビン酸）を添加したものの(RPMI+supl)の 3 種を用いた。保存期間後にコラゲナーゼ処理により細胞を回収し、



細胞の生存性およびアポトーシスをトリパンブルー染色、FACS によって解析した。保存期間後に細胞を 37°C で 1 日培養した後に生存判定する区も設けた。

また、培養中の細胞シートの表面微細構造を走査型電子顕微鏡で観察した。

## 2-2. 細胞シートの凍結保存

### 2-2-1. 積層化細胞シートの作製

ウサギ軟骨細胞（株式会社プライマリーセル）を 100mM アスコルビン酸・10% FBS 添加 RPMI で温度応答性培養皿（Up cell; cell seed 社）にて 3 週間培養し、薄層（1 層）形成を確認した後に Cell shifter（cell seed 社）を用いて 3 層に積層化し、1 週間追加培養した。

### 2-2-2. ガラス化保存方法

マウスおよびブタ胚、ブタ胎仔臓器、マウス卵巣、ヒト卵巣組織片等の凍結保存に実績のある MVC ガラス化法(Kuwayama et al.,2005)を、細胞シートの凍結保存に修正して適用した。細胞浸透性凍害保護剤として、平衡液には 10% DMSO および 10% ethylene glycol を、ガラス化液には 20% DMSO および 20% ethylene glycol を用いた。さらに、細胞非浸透性の凍害保護剤として、ガラス化液に 0.5Msucrose および 10% ポリリジン誘導体（カルボキシル基導入ポリリジン）を加えた。ガラス化の際は、細胞シートを液体窒素蒸気中に保持した（新規法）。比較の目的で、シートを培養するシャーレ内の培地をガラス化液（約 2ml）

で置換してガラス化する方法（従来法）も施行した。融解は細胞シートを 38.5°C の加温盤上に静置して行った。引き続きシートを 1M、0.5M、0M sucrose を含む 20mM Hepes 緩衝 TCM199（20% FBS 添加）に順次移し、凍害保護剤の希釈ならびに洗浄を行った。

融解後の細胞シートをコラゲナーゼ処理して細胞分散し、細胞の生存性をトリパンブルー染色により判定した。

また、ガラス化・融解後の細胞シートの表面構造を走査型電子顕微鏡で観察した。

## C. 結果

### 1. クサビラオレンジ遺伝子導入ブタ精子の凍結保存

#### ① 精子生存性確認試験

凍結融解精子の生存率は 77%であった。また、融解時の精子活力は+++50%であった。

#### ② 受精能試験

凍結融解精子を用いて 7 頭の雌に人工授精を行った結果、2 頭が妊娠・分娩し、合計 12 頭の産仔が得られた。これらのうちの、5 頭には遺伝子伝達が確認された。

### 2. 低温保存された細胞シートの生存性

表 1 に示す通り、低温保存 2 週間後も細胞生存性は高く保たれており保存前と同等であった(94.6～96.5% vs 94.1%)。また、用いた 3 種の保存液間に細胞生存性の差は見られなかった。しかし、RPMI(4.2%)および RPMI+supl(2.9%)を用いた保存ではアポト

ーシス細胞の増加が見られたのに対し、mHFDM-1区ではアポトーシス誘導は低く抑えられた(0.7%)。さらに、mHFDM-1を用いた場合、3週間保存後の細胞生存性(79.5%)は、他の2種の保存液より高い傾向であった(54.9, 64.1%)。図1に、FACS解析結果の一例を示す。

また、表2に示す様に、低温保存後に1日間の回復培養を行うことによって、細胞の生存性が若干向上する傾向が見られた。

図2に示す様に、走査型電顕によって細胞シートに特徴的な微細構造の観察が可能であった。

### 3. ガラス化された細胞シートの形態変化と細胞生存性

液体窒素ガス中で細胞シートをガラス化することで、シート構造の亀裂や破断を防ぐことが出来ることを見出した(図3)。非浸透性凍害保護剤としてポリリジン誘導體(PLL)の有無がシート構造の保護および細胞生存性に及ぼす影響をさらに詳細に検討した。

表3に示す通り、3種のロットの細胞を用いて実験を行った。10%PLL存在下でガラス化を行った場合、供試した合計8例のシート全てが損傷なく融解後に回収された。細胞シートの構成細胞の生存性は、非ガラス化試料と同等であった(90.7% vs 95.2%)。一方、PLL非存在下で細胞シートのガラス化を行った場合は、実験に供した8例中7例(87.5%)が、融解時には著しい損傷(亀裂・破断)を受けていた(図4)。ただし、

PLL非存在下でガラス化を行った場合も、細胞生存性の低下は見られなかった(91.3%)。

従来法においても、ガラス化液中にPLLを含む場合は、実施した2例中2例とも細胞シートの亀裂・破損は起こらなかったが、融解後の細胞の生存性はやや低下する傾向であった(78.8%)。一方、PLLを含まない場合には、ガラス化時に亀裂が生じ、シートの損傷は避けられないことが明らかとなった(表4)。

### 4. パッケージング法によりガラス化された細胞シートの生存性

ガラス化した細胞シートの保管を考慮し、パッケージング法を開発した。ガラス化液には10%PLLを含む液を用いた。表5に示す通り、合計3例のシートをガラス化した結果、全例が亀裂・破断なく融解・回収された。融解後の細胞生存率は高く保たれていた(87.2%)。

### 5. ガラス化された細胞シート表面および断面構造の走査型電顕像

図5に示す様に、PLL存在下でガラス化された細胞シートの表面及び断面構造の走査型電顕像は、非ガラス化試料と比較して差は無かった。パッケージング法および従来法でガラス化されたシートに関しても、シート構造の破綻は見られず、非ガラス化との差は無かった。シートの上面(重層化後の培養時にcell shifterに接していた面)には、軟骨と思われる顆粒状構造の形成が

認められた（黄色矢印部分）。下面（培養時にディッシュに接していた面）は、上面よりも繊維状組織が密になっていることが分かった。

#### D. 考察

クサビラオレンジ遺伝子導入ブタ精子の凍結後の生存性は高く、卵管内人工授精によって後代産仔を得ることの出来る正常性を保っていると判断された。レシピエント雌への授精適期について検討することで、受胎率は向上するものと考えられる。効率向上のための課題は残るものの、赤色蛍光タンパクマーカーを発現するブタを、凍結精子と人工授精の利用によって研究に供給し得る体制は整備された。

細胞シートの低温保存では、2-3週間後にも、細胞生存性の顕著な低下は見られなかったものの、保存条件によっては細胞のアポトーシスが誘導される可能性が示された。保存期間中に細胞のシート構造が脆弱化するようなことはなく、低温保存は十分に実用的方法となり得るであろう。

一方本研究では、細胞シートの凍結保存にも実用的な目途がついた。

ポリリジン誘導体を凍害保護剤に用いることでガラス化状態が安定し、ガラス化・融解に伴うシートの破損が顕著に抑制されることが明らかとなった。作製したシートに重層化のムラや欠損孔がある場合は、ガラス化時にシートに亀裂が生じる可能性があるが、良好な構造を持ったシートであれば、本研究で開発した方法により融解後も

損傷なく回収可能である。本法の特徴は、ポリリジン誘導体の添加によるガラス化状態の安定化に加えて、液体窒素蒸気中でシートを保存することにある。脆弱な細胞シートと液体窒素との直接の接触を避けることで、シートの損傷を回避することができる。

走査電顕像観察では、ガラス化されたシートは、非ガラス化試料と同等の、特徴的なネットワーク構造を保持していることが確認された。今後は、シート構成細胞の生理的機能が維持されているか否かの解析が必要ではあるが、少なくとも構造的には損傷のない状態で、細胞シートを凍結保存し得ることの意義は大きい。

さらに本研究では、細胞シートをパッケージングした状態でガラス化する方法も開発した。凍結細胞シートの臨床応用に際しては、保存中の安定性や汚染防止の観点から、適当な素材で被覆すること、すなわちパッケージングが必要であろう。本研究では、試験段階として市販のポリ塩化ビニリデン製ラップ（食品用）を用いて、細胞シートのガラス化を行った。パッケージング法においても、ガラス化状態が安定で、かつ融解時に氷晶形成が起こらないことから、この方法は十分に機能的であると判断された。今後は、よりパッケージングに適した素材の探索と、実用的なパッケージング工程や器材の開発が重要であろう。

#### E. 結論

1) ポリリジン誘導体を非浸透性凍害保護

剤に用いることでガラス化状態が安定し、ガラス化・融解に伴うシートの破損が顕著に抑制される。

2) 液体窒素蒸気中でシートを保存することにより、シートの破損を回避することができる。

3) 作製したシートに重層化のムラや欠損孔がある場合は、ガラス化時にシートに亀裂が生じる可能性があるが、良好な構造を持ったシートであれば、本研究で開発した方法により再現性高くガラス化することが可能である。

4) パッケージングを伴う方法においても、細胞シートのガラス化が可能である。

## F. 研究発表

### 1. 総説

1) Matsunari H, Nagashima H. Application of genetically modified and cloned pigs in translational research. *Journal of Reproduction and Development* 2009; 55: 225-230.

2) 松成ひとみ、長嶋比呂志. 蛍光マーカー遺伝子を組み込んだ大型動物の医学研究応用. *医学のあゆみ* 2009; 230: 147-151.

3) 長嶋比呂志. クローン動物とクローニング技術の医学・医療への利用. *日本畜産学会報* 2010; 81: 53-64.

4) Nagashima H, Matsunari H, Umeyama K: Creation and conservation of genetically modified pigs: applications to genetic disease model and xenotransplantation. In: *The Minipig in*

*Biomedical Research*. Edited by McAnulty PA, Dayan AD, Ganderup NC, Hastings KL: CRC Press, Boca Raton, FL, USA; 2011: 415-430.

5) Matsunari H, Watanabe M, Umeyama K, Nakano K, Ikezawa Y, Kurome M, Kessler B, Wolf E, Miyagawa S, Nakauchi H, Nagashima H. Cloning of homozygous  $\alpha$ 1,3-galactosyltransferase gene knock-out pigs by somatic cell nuclear transfer. In: *Xenotransplantation*. Edited by Miyagawa S: InTech, Rijeka, Croatia; 2012: 37-54.

### 2. 論文発表

1) Umeyama K, Watanabe M, Saito H, Kurome M, Tohi S, Matsunari H, Miki K, Nagashima H. Dominant-negative mutant hepatocyte nuclear factor 1alpha induces diabetes in transgenic-cloned pigs. *Transgenic Res* 2009; 18: 697-706.

2) Tomii R, Kurome M, Wako N, Ochiai T, Matsunari H, Kano K, Nagashima H. Production of cloned pigs by nuclear transfer of preadipocytes following cell cycle synchronization by differentiation induction. *J Reprod Dev* 2009; 55: 121-127.

3) Kasai T, Kano H, Umeda Y, Sasaki T, Ikawa N, Nishizawa T, Nagano K, Arito H, Nagashima H, Fukushima H. Two-year inhalation study of carcinogenicity and chronic toxicity of