

機関番号：12501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20500612

研究課題名（和文） テトラスパニンウェブ依存性細胞接着における
メカニカルストレス受容

研究課題名（英文） Effects of mechanical strain to the Tetraspanin dependent adhesion.

研究代表者

野村 純（NOMURA JUN）

千葉大学・教育学部・准教授

研究者番号：30252886

研究成果の概要（和文）：

メカニカルストレス受容に関して基底膜に強く発現する EWI-F/FPRP に着目し、その接着制御について解析した。テトラスパニンウェブの細胞接着の制御機構の検討をおこなった。ノックダウン解析およびフローサイトメトリー解析の結果、HeLa 細胞においてはとくに EWI-F が細胞の接着による形態形成に重要な役割を持つことを示唆する結果が得られた。これらの結果より、テトラスパニンウェブ分子は相互に作用しながら細胞の形態維持や細胞の生存シグナルと関連していることが考えられた。

研究成果の概要（英文）：

Mechanical strain, such as stretching, is recognized as an important extracellular stimulus that promotes cellular growth and survival, influences metabolic processes (including gene expression) and governs tissue architecture in various cell types. Cyclic stretching of vascular smooth muscle cells has been reported to activate the cells, increase collagen synthesis and stimulate a growth response. Meanwhile, Chun-Min Lo proposed the “durotaxis” concept, which suggests that fibroblasts prefer stable and stiff substrates. To date, little information has been reported regarding the role of cell stretching in terms of anti-fibrotic effects on skin. To analyze the rolls of tetraspanin web molecules on response of skin fibroblasts by mechanical stress, we investigated whether tetraspanin web molecules are involved in the morphology, cell-survival and mobility.

After knock down of tetraspanins or EWI-F, morphology of the cell was changed to spindle form. Moreover, ratios of survived cells were reduced after knockdown, comparing from mock treated cells. Our results demonstrated an important role for tetraspanins and their associate molecules.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009年度	600,000	180,000	780,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学・応用健康科学

キーワード：(1) テトラスパニンウェブ (2)メカニカルストレス (3)インテグリン
(4)足場依存性(5) 細胞接着 (6)シグナル伝達 (7) 細胞形態 (8) 伸展培養

1. 研究開始当初の背景

申請者らは宇宙飛行時に起こる飛行士の体の変化が老化時の変化と酷似している点に着目し、ヒトの老化メカニズムの解明を目指し研究を続けている。我々は宇宙空間において起こる環境の変化のうち特に重力状態の変動、すなわち微小重力と過重力に焦点を絞り、これら重力状態の変化と細胞機能の分子レベル、遺伝子レベルでの変化を解析してきた。

申請者らは微小重力及び過重力が細胞に及ぼす影響を調べる過程においてメカニカルストレスが免疫細胞や皮膚線維芽細胞といった、これまでメカニカルストレスの影響を受けにくいと考えられていた細胞系においても重要なストレスラーとして働くことを明らかにしてきた。培養細胞を用いた実験では、3-Dクリノスタットによりシミュレートされる疑似微小重力環境における遺伝子発現の変動についてcDNA array解析をおこない、MAPキナーゼの1つであるp38遺伝子の発現が、増加することを見出している。さらに、Erb2をはじめ種々のシグナル伝達分子の発現量が変動することも見出している。皮膚由来線維芽細胞を用いたメカニカルストレス負荷実験ではMAPキナーゼ系のp38及びJNKが活性化されることを報告している(ケロイド研究会2004)。また、メカニカルストレス高感受性の細胞株を樹立しており、この細胞を用いることでメカニカルストレスによる細胞内シグナル伝達系解析を効率よくおこなえるように準備している(Radiat. Res2002)。この細胞を用いて、すでにメカニカルストレス負荷時のp53分子の発現誘導とそれにと

なうBax分子の発現について解析した。

ストレスラーに対する応答系を個体レベル、細胞レベルで解析する過程においては、メカニカルストレス応答における参加ストレスに対する体制化の可能性を見出した。これには GRP78 等のシャペロン分子の関与を示唆するデータを得ていた。

また、共同研究者らとのケロイド発症メカニズムの解析過程においてメカニカルストレス負荷時の正常皮膚線維芽細胞とケロイド皮膚線維芽細胞においてシグナル伝達分子のセリン・スレオニンリン酸化パターン之差を見出しており、メカニカルストレスがこれら治癒以上においても重要な役割りを果たしていることが示された。さらに結合組織構成分子の発現を制御し、皮膚形態的、機能的リモデリングにも関与することを示してきた。

さらに、種々の細胞を用いてメカニカルストレス負荷条件を検討した結果、細胞の違いにより伸展周期依存性に異なる反応を示す可能性を見出している。抗重力変化においても老化の防止においても運動はそのひとつの処方として推奨されているが、この結果は運動時のヒト個体の反応がメカニカルストレス負荷の観点からも1条件での解析では検討不能であることを示唆するものであった。実際我々も種々の運動時の変化を重力変動時の変化と比較検討してみているが、まだ一定の結論に達するにはいたっていなかった。

2. 研究の目的

メカニカルストレス受容に関しては細胞膜によるメカニカルストレス感受性イオン

チャンネルや接着分子特にインテグリンとの関与が示唆されているが、まだ、その詳細については明らかにされていない。この点に関して我々が抗体パネルを用いて皮膚線維芽細胞の接着制御に関わる分子を検索した結果、テトラスパニンウェブ構成分子を見出した。テトラスパニンウェブは CD81、CD151、EWI-F 等によって構成されており、その分子構成は細胞及び状況等により変動する可能性が示唆されている。我々はこのうち基底膜に強く発現する EWI-F/FPRP に着目し、その接着制御について解析することとした。この結果、細胞内におけるチロシンリン酸化パターンの変化が EWI-F /FPRP によって誘導されることが考えられた。細胞内での種々の制御の関与が示唆された。そこで今回申請者らはこのテトラスパニンウェブのメカニカルストレス受容における役割りを明らかにすることとした。

3. 研究の方法

(1) 細胞接着は接着分子と細胞外基質との関係の上に成り立っているためコラーゲンのみならずフィブロネクチン等種々の土台を使用し、培養系を検討する。

(2) テトラスパニンウェブ構成分子の変化が細胞接着に影響をおよぼすことが示唆されている。このためメカニカルストレス孵化により変動することが期待されるコラーゲンや、炎症性サイトカイン遺伝子の発現量に着目して解析する。検出された候補遺伝子についてPCRサイクラーを用いた半定量解析を行った。

(3) RNAの発現レベルの変動は必ずしもタンパク質レベルでの発現量の違いや、安定性の違いを反映しないことが知られている。このため、足場強度の変化による

細胞内分子の発現量の変動を二次元電気泳動法により分子量の変動を解析した。

(4) ケロイド由来線維芽細胞と正常線維芽細胞とでメカニカルストレス時に差認められたp38とJNK MAPキナーゼのリン酸化の変化について解析し、基質の強度依存性のMAPキナーゼのリン酸化のパターンを解析した。

(5) 遺伝子に関してはアンチセンス法による発現抑制を行う。形態変化や細胞死について解析した。

4. 研究成果

今回、テトラスパニンウェブのメカニカルストレス応答における役割とテトラスパニンウェブを介する(が関与する)メカニカルストレスシグナルトランスダクションの意義を検討した。ノックダウン解析の結果、HeLa細胞においてはとくにEWI-Fが細胞の接着による形態形成に重要な役割を持つことを示唆する結果が得られた。また、フローサイトメトリ解析の結果、EWI-F/FPRPの減少に伴い他のテトラスパニンウェブ分子の発現量が減少する可能性が示唆された。これらの結果より、テトラスパニンウェブ分子は相互に作用しながら細胞の形態維持や細胞の生存シグナルと関連していることが考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計4件)

Anti-proliferative and apoptosis-inducible activity of labdane and abietane diterpenoids from the pulp of *Torreya nucifera* in HeLa cells. Chen, S-P., Dong, M., Kita, K., Shi, Q-W., Cong, B., Guo, W-Z., Sugaya,

S., Sugita, K., Suzuki, N. Molecular Medical Report, (査読あり) 3, 673-678, 2010

Active recovery effects by previously inactive muscle on 40-s exhaustive cycling, Fujita, Y., Koizumi, K., Sukeno, S., Manbe, M., Nomura, J. Journal of Sports Science (査読あり) 27 (11), pp1145-1151, 2009

Cyclical Cell stretching of skin-derived fibroblasts downregulates connective tissue growth factor (CTGF) production. Y., Kanazawa, J., Nomura, S., Yoshimoto, T., Suzuki, K., Kita, N., Suzuki, M., Ichinose, Connective tissue Research (査読あり) 50, pp323-329, 2009
ケロイド由来皮膚線維芽細胞を用いた in vitro 創傷治癒モデルにおけるメカニカルストレスの影響 野村純、石坂美穂、金沢雄一郎、宇田川晃一、吉本信也、一瀬正治 ケロイド・肥厚性瘢痕研究会記録集、(査読なし) 14、p14-19, 2009

[図書] (計1件)

野村純、輝ける若者の未来へ向けて、千葉大学教育学部養護教育講座、p1-187、2011

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野村 純 (NOMURA JUN)

千葉大学・教育学部・准教授

研究者番号：30252886

(2) 研究分担者

杉田 克生 (SUGITA KATUO)

千葉大学・教育学部・教授

研究者番号：40211304

吉本 信也 (YOSHIMOTO SHINYA)

千葉大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号：90220748