

機関番号：14401

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20592327

研究課題名 (和文) 軟骨発達・骨格成長における p38 MAP キナーゼの機能解析

研究課題名 (英文) Analysis of roles of p38 MAP kinase in skeletal development.

## 研究代表者

相川 友直 (AIKAWA TOMONAO)

大阪大学・歯学部附属病院・講師

研究者番号：00362674

研究成果の概要 (和文)：本研究は、軟骨発達・骨格発達における p38 MAP キナーゼの生理的な機能を解析し、骨格発達の分子メカニズムの知見を深める目的で行った。具体的には、p38 遺伝子アルファアイソフォームの軟骨特異的なノックダウンを 3 系統のマウスを解析した。その結果、いずれのマウス実験系においても明らかな発達異常は認められず、p38 アルファアイソフォームの余剰性もしくは他のアイソフォームによる相補性が示唆された。

研究成果の概要 (英文)：The aim of this study was to clarify the molecular roles of p38 alpha MAP kinase in cartilage and skeletal development. Briefly, we analyzed 3 independent lines of cartilage specific conditional knock-out mice of p38 alpha isoform. We did not found significant growth and developmental failure in mice, suggesting that p38 alpha isoform might be complemented by other isoforms or redundant.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：p38 MAP キナーゼ、軟骨細胞、破骨細胞

## 1. 研究開始当初の背景

骨格の成長を制御する骨端部成長板軟骨細胞の増殖や分化は Parathyroid hormone related peptide (PTHrP), Bone Morphogenetic Protein (BMP), Indian hedgehog (Ihh), FGF(線維芽細胞増殖因子) など様々な分子シグナルによって制御されている。申請者は Ihh, FGF, BMP の軟骨細胞の増殖・分化に関する作用機序について報

告してきた<sup>1-5)</sup>。これらのサイトカインシグナルは、それぞれの細胞内シグナル伝達の経路を介して生物学的な作用を発現するが、細胞の増殖、分化、ストレス応答、細胞死などに関連するいくつかの普遍的な細胞内シグナル経路の存在が知られている。Mitogen activated protein kinase (MAP kinase) family の一つである p38 kinase もその一つであり、いくつかの細胞種で細胞分化、最終

分化に関与することが報告されている。これまでに p38 が培養軟骨細胞において軟骨細胞の分化に影響していることが示されてきた。しかしながら、p38 の活性が軟骨細胞の増殖に対する作用には相反する報告がなされている。さらにこれらの研究はすべて *in vitro* での細胞培養実験や p38 の活性阻害実験によるものであり、生体での p38 分子機能やその上流因子の機能を正確に表しているとは言い難い。そこで *in vivo* での軟骨細胞の増殖・分化、軟骨内骨化に対する生理的な p38 の機能を明らかにし、種々のサイトカインシグナルの下流として p38 が存在する意義を明らかとすることを目的とし、本研究を計画している。p38 には  $\alpha, \beta, \gamma, \delta$  の 4 つのアイソフォームが存在する。このうち最も発現が優位とされる  $\alpha$  サブユニット遺伝子に焦点を絞って研究する考えにいたった。他の研究グループによって p38 $\alpha$  のノックアウトマウスは作成されているが、胎生 10.5 日で致死であり、軟骨内骨化過程は検討できていない。骨格形成過程における p38 $\alpha$  のシグナル特異性について解析するためには、軟骨特異的に p38 $\alpha$  を欠損させたマウスを作製し、その発達過程を組織学的に、分子組織学的に評価する必要があると考えられた。

一方、ひとたび形成された骨格は種々の炎症反応により関節軟骨の破壊や破骨細胞による骨破壊がおこり病的状態が生じる。この軟骨破壊や破骨細胞の活性化での p38 MAP キナーゼの機能解析を同じシステムを用いて検討を行い、骨格形成と維持における p38 遺伝子の機能の解析を行うこととした。

## 2. 研究の目的

長管骨・椎骨・下顎骨関節突起・一部の頭蓋骨などの骨格は、軟骨原基の発達、軟骨細胞の増殖、分化、骨化を経て発達・成長する内軟骨性骨化様式で発達する。その軟骨の発達には多くの重要なサイトカインシグナルが密接に関連しており、発達と成長が制御されている。それぞれの重要なサイトカインシグナルを考えると、共通したシグナル伝達経路、p38 MAP キナーゼが存在し、実際多くの研究者が軟骨発達における p38 の重要性を示唆している。

本研究はその内軟骨性骨化や軟骨の維持における p38 シグナルの機能を軟骨特異的 p38 遺伝子欠損マウスの解析を通して明らかにするものである。

## 3. 研究の方法

(1) 発達過程のマウス軟骨組織での p38 MAP キナーゼの発現

胎生 16.5 日マウス脛骨切片で免疫染色法にて p38 アイソフォーム ( $\alpha, \beta, \gamma, \delta$ ) の発現を検討した。さらに、新生マウス肋軟骨よ

り分離、培養した初代軟骨細胞の全細胞タンパクを用いてウェスタンブロット法で p38 アイソフォーム ( $\alpha, \beta, \gamma, \delta$ ) の発現を検討した。

(2) 軟骨特異的 p38 $\alpha$  欠損マウスの作成と解析

軟骨特異的遺伝子欠損は cre-loxP システムを用いた。軟骨特異的に cre リコンビナーゼを発現するトランスジェニックマウスは 2 種類のプロモーターで 2 系統のマウスを使用した。すなわち、軟骨特異的な細胞外基質である II 型コラーゲン遺伝子のプロモーター下流に cre 遺伝子を組み込んだ col2a1cre マウス (米国 MD アンダーソン研究所 ベーリンガー博士より供与) と XI 型コラーゲン遺伝子プロモーター下流に組み込んだ col11a2-cre マウス (大阪大学 妻木博士より供与) を使用した。p38 マウスには p38 $\alpha$  遺伝子に領域に loxP 領域を組み込んだ p38 $\alpha$  flox/flox マウス (大阪大学 大津博士より供与) を用い、さらに一部の実験では、flox マウスの片方のアレルを欠失させたマウス、すなわちコンベンショナルな p38 $\alpha$  ノックアウトマウス; p38 $\alpha$  +/- (大阪大学 大津博士より供与) と flox/flox マウスと掛け合わせられた p38 $\alpha$  flox/- マウスを用いて cre マウスと交配させた。交配させて得られたマウスの遺伝子型は PCR 法にて決定し、p38 $\alpha$  タンパク発現の欠失、減少は免疫染色法で確認した。

(3) p38 $\alpha$  変異マウスの軟骨表現型の解析マウス

p38 $\alpha$  flox/flox; cre マウス、p38 $\alpha$  flox/-; cre マウスの胎生 16.5 日齢、1 週齢の脛骨切片を作成し、同腹の対照マウスと比較した。

妊娠 16.5 日目のマウス腹腔内に BrdU を投与し、2 時間ラベルした。軟骨細胞の増殖能は、BrdU 免疫染色での陽性細胞を検出し検討した。

(4) p38 $\alpha$  変異マウスでの関節炎モデル実験。

マウス関節炎モデルには C57BL6 系マウスでも容易に関節炎が作成される Antigen Induced Arthritis モデルを用いた。すなわち、生後 8 週齢マウス後肢膝関節周囲に免疫アジュバント、とメチル化ウシ血清アルブミンを注射し関節炎を誘導した。関節炎による軟骨破壊はパラフィン切片のサフラニン O 染色性で評価した。

(5) 破骨細胞分化における p38 $\alpha$  の発現と細胞への影響

マウス培養破骨細胞での p38 アイソフォームの発現を免疫蛍光染色法で検討した。

成体 p38 $\alpha$  flox/flox マウスの大腿骨、脛骨、上腕骨の骨髓腔の洗浄液に含まれる骨髓由来単核球細胞を比重勾配遠心法で分離し、M-CSF, sRANKL 存在下に培養し、破骨細胞分化を誘導した。培養 3 日目に cre リコンビナ

ーゼアデノウイルスを感染させ、破骨細胞分化を TRAP 染色で検討した。また、破骨細胞に分化したのち、M-CSF, sRANKL を含まない培地で培養し、生存細胞を観察した。

#### 4. 研究成果

発達過程の軟骨組織でのアイソフォームの分布を、免疫組織染色、ウエスタンブロット法で調べた結果、p38 $\alpha$ が優位に発現し、他のアイソフォームの発現は非常に弱いことが明らかとなった。p38 $\alpha$ タンパクは胎生 16.5 日齢の脛骨軟骨で、関節周囲の増殖軟骨細胞、増殖層の円柱状増殖軟骨細胞、最終分化した肥大軟骨細胞の細胞質と核内に染色性を示した。ほかのアイソフォームは  $\beta > \gamma > \delta$  の順に弱い染色性を示した。

軟骨特異的ノックアウトは p38 $\alpha$  flox/flox; col2 $\alpha$ 1 cre、および p38 $\alpha$  flox/flox; col11 $\alpha$ 1 cre を作成した。Col2 プロモーターでの cre 発現も軟骨特異的で、col11 プロモーターでの cre 発現も軟骨特異的であり、関節や周囲組織での発現には col11 プロモーターが有利と考えて作成した。それぞれの遺伝子型の繁殖、交配、に時間がかかったため、その間、片方の p38 $\alpha$  遺伝子アレルを欠失させ cre リコンビナーゼを導入した p38 $\alpha$  flox/-; col11 $\alpha$ 2 cre マウスを作成した。

免疫染色でそれらの p38 $\alpha$  変異マウス軟骨での p38 発現を確認したところ、すべてのマウスで p38 $\alpha$  タンパクの染色性を弱く認め、そのコンディショナルノックアウトは不完全であった。しかし、部分的に減弱され、ノックダウンされている状態であった。胎生 16.5 日齢と生後 1 週齢の脛骨組織では最も p38 $\alpha$  発現が低い p38 $\alpha$  flox/-; col11 $\alpha$ 1 cre マウスも同腹の対照マウスと組織学的構築、細胞形態に変化なかった。円柱状増殖軟骨細胞の BrdU 陽性率も有意差なかった。

p38 $\alpha$  flox/-; col11 $\alpha$ 2 cre マウスに免疫アジュバントとメチル化 BSA で実験的に誘導した関節炎実験では、変異マウスではサフラン O 染色の染色性が消失し、関節炎・関節破壊をきたしやすいことが示唆された。

以上より、p38 $\alpha$  遺伝子は、発達過程の軟骨細胞に優位に発現していたが、軟骨特異的にその発現を低下させても組織学的、細胞形態的に明らかな変化はなく細胞増殖能にも影響しなかった。しかし、種々のメカニカルストレスや炎症反応のかかる環境下では軟骨組織、軟骨細胞の維持に関与していることが示唆された。

破骨細胞での p38 $\alpha$  欠損細胞は in vitro で p38 $\alpha$  flox/flox マウス骨髄由来マクロファージ破骨細胞分化を誘導する実験系において、種々の分化段階で cre リコンビナーゼ

を導入しその破骨細胞分化と破骨細胞のサバイバルを検討した。その結果 p38 $\alpha$  発現をノックダウンさせても初期の破骨細胞分化に影響はなかった。一方、破骨細胞の生存は抑制された。p38 MAP キナーゼシグナルは破骨細胞の細胞死に関与する可能性が示唆された。

#### 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 21 件)

① Way to increase mechanical strength during distraction osteogenesis of mandibular symphysis: technical note: Aikawa T, Ohnishi K, Ohnishi H, Iida S. Br J Oral Maxillofac Surg 2011 (in press)、査読有

② Rotation movement of the anterior maxillary segment by hybrid distractor in patients with cleft lip and palate: Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 110:292-300, 2010、査読有

③ 口腔扁平上皮癌の遠隔成績に与える予後因子ーリンパ節転を移中心にー: 大倉正也, 平沼勉, 鏡内肇, 沢井奈津子, 飯田征二, 石井庄一郎, 相川友直, 古郷幹彦. 日本口腔科学会雑誌 59:68-78, 2010、査読なし

④ 異時性に発生した両側耳下腺 MALT リンパ腫の 1 例: 沢井奈津子, 大倉正也, 相川友直, 岸野万伸, 増田智丈, 古郷幹彦. 日本口腔外科学会雑誌 56:18-22, 2010、査読有

⑤ 含歯性嚢胞から発生した下顎骨顎骨中心性扁平上皮癌の 1 例: 相川友直, 飯田征二, 徳宮元富, 高尾香名, 沢井奈津子, 田中晋, 福田康夫, 岸野万伸, 大倉正也. 大阪大学歯学雑誌 54:17-21, 2009、査読なし

⑥ 関節突起部に生じた周辺性骨腫の 1 例: 沢井奈津子, 相川友直, 原田計真, 増田智丈, 太田之博, 古郷幹彦. 日本口腔外科学会雑誌 55:514-518, 2009、査読有

⑦ 舌下部に生じた異所性胃粘膜嚢腫の 1 例: 沢井奈津子, 飯田征二, 相川友直, 岸野万伸, 辻本育子, 古郷幹彦. 日本口腔外科学会雑誌 55:644-648, 2009、査読有

⑧ Facial frontal morphological changes related to mandibular setback osteotomy using cephalograms: Amano K, Yagi T, Iida S, Aikawa T, Yashiro K, Takada K, Kogo M. J Craniomaxillofac Surg 37:412-416, 2009、査読有

⑨ Intraductal papilloma arising from sublingual minor salivary gland: case report and immunohistochemical study: Aikawa T, Kishino M, Masuda T, Isomura ET, Tanaka S, Namikawa M, Iida S. Oral Surg

Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 107(5):e34-37, 2009、査読有

⑩ Decision analysis and treatment threshold in a management for the NO neck of the oral cavity: Okura M, Aikawa T, Sawai NY, Iida S, Kogo M. Oral Oncol 45:908-911, 2009、査読有

⑪ Simulation of Osteotomy and Support for Surgery using VR Hepatic Device: Sohura T, Iida S, Aikawa T, Kogo M, Iguchi Y, Yamamoto T, Takada K. Stud Health Technol Inform 142:331-336, 2009、査読有

⑫ Computed Tomography Followed by Ultrasound Examination Improves Detection of Regional Metastases in Patients with Squamous Cell Carcinoma of the Tongue: Sawai NY, Okura M, Tanaka S, Aikawa T, Sasai T, Iida S, Masuda T, Ishii S, Furukawa S, Kogo M. 大阪大学歯学雑誌 54:9-16, 2009、査読なし

⑬ 顎矯正手術により長期間咬合の安定が得られた末端肥大症の1例: 相川友直, 太田之博, 飯田征二, 松岡裕大, 高尾香名, 古郷幹彦. 日本口腔外科学会雑誌 54:234-238, 2008、査読有

⑭ MR 画像で経時の変化を観察した顎関節滑膜軟骨腫症の1例: 榎本明史, 飯田征二, 足立忠文, 相川友直, 小泉英彦, 古郷幹彦. 日本口腔外科学会雑誌 54:59-63, 2008、査読有

⑮ Widening a narrow posterior mandibular alveolus following extirpation of a large cyst. -A case treated with a titanium mesh-plate type distractor: Aikawa T, Iida S, Senoo H, Hori K, Namikawa M, Okura M, Ono T. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 106(5):e1-7, 2008、査読有

⑯ An uncommon cleft subtype of unilateral cleft lip and palate: Yamanishi T, Kobayashi C, Tsujimoto I, Koizumi H, Miya S, Yokota Y, Okamoto R, Iida S, Aikawa T, Kohara H, Nishio J, Kogo M. J Dent Res 87:164-168, 2008、査読有

⑰ Breakage of internal maxillary distractor -Considerable complication of maxillary distraction osteogenesis: Aikawa T, Iida S, Isomura ET, Namikawa M, Matsuoka Y, Yamada C, Yamamoto T, Takigawa Y. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 106(1):e1-6, 2008、査読有

⑱ Nasolabial cyst in a patient with cleft lip and palate: Aikawa T, Iida S, Fukuda Y, Nakano Y, Ota Y, Takao K, Kogo M. Int J Oral Maxillofac Surg 37:874-876, 2008、査読有

⑲ Conventional bone-anchored palatal distractor using an orthodontic palatal expander for the transverse maxillary distraction osteogenesis -Technical note-: Iida S, Haraguchi S, Aikawa T, Yashiro K, Okura M, Kogo M. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 105(2):e8-11, 2008、査読有

⑳ 摂食障害が誘因と考えられた口蓋壊死性唾液腺炎の1例: 原田丈司, 相川友直, 川寄康大, 飯田征二, 岸野万伸, 古郷幹彦. 日本口腔科学会雑誌 57:311-314, 2008、査読有

㉑ 線維芽細胞と混合培養条件下での口腔扁平上皮癌細胞の基底膜浸潤の制御-MT1MMPの役割-: 松岡裕大, 中原寛和, 久島潔, 大谷朋弘, 能崎晋一, 平岡慎一郎, 永田雅英, 相川友直, 山本悦秀, 古郷幹彦. 日本口腔外科学会雑誌 54:2-7, 2008、査読有

[学会発表] (計 12件)

① 歯源性腫瘍・嚢胞が産生する TGF- $\beta$  および IL-1 $\alpha$  は間質線維芽細胞の破骨細胞促進因子発現を促進する: 山田智明, 相川友直, 辻本育子, 天野克比古, 木全正彰, 飯田征二, 古郷幹彦. 第65回日本口腔科学会、2011年4月22日、東京

② 眼・歯・指症候群の原因遺伝子 GJA1 は症候性口唇裂の発症に関与する: 石口満津子, 相川友直, 古郷幹彦. 第65回日本口腔科学会、2011.4. 21、東京

③ TGF- $\beta$  and IL-1 $\alpha$  in jaw tumor fluids participate in bone resorption through stimulation of osteoclastogenesis: Aikawa T, Yamada C, Tsujimoto I, Amano K, Namba N, Iida S, Kogo M. American Society for Bone and Mineral Metabolism Annual Meeting, Toronto, Canada, 2010年10月17日

④ 開口障害を伴った小児の下顎骨類腱線維腫の1例: 川島ひとみ, 相川友直, 増田智丈, 岸野万伸, 福田康夫, 大槻浩一, 谷口佳孝, 山本奈穂, 古郷幹彦. 題64回日本口腔科学会、2010年6月24日

⑤ Hybrid 型延長装置を用いて側方回転を伴う上顎骨前方部の骨延長術を行った唇顎口蓋裂症例: 田中晋, 飯田征二, 相川友直, 石橋美樹, 阿部早苗, 古郷幹彦. 第34回日本口蓋裂学会、東京、2010年5月28日

⑥ Maxillary anterior segmental distraction osteogenesis by hybrid distractor successfully demonstrate the rotational segmental movements in patients with cleft lip and cleft palate: Tanaka S, Iida S, Aikawa T, Ishibashi M, Kogo M. 67rd annual meeting of American cleft palate-craniofacial association, Fort Worth, USA, 2010年3月17日

⑦ 口腔癌 NO 頸部の治療方針に関する決定樹解析と治療閾値：沢井奈津子，大倉正也，相川友直，永田雅英，石本俊介，飯田征二，増田智丈，古郷幹彦．第 54 回日本口腔外科学会，札幌，2009 年 10 月 10 日

⑧ 異時性に発生した両側耳下腺 MALT リンパ腫の 1 例：石本俊介，沢井奈津子，大倉正也，相川友直，岸野万伸，増田智丈，古郷幹彦．第 54 回日本口腔外科学会，札幌，2009、2009 年 10 月 10 日

⑨ ビスフォスフォネート系薬剤関連顎骨壊死 (BRONJ) の診断と治療：相川友直．日本骨代謝学会，大阪，2009 年 7 月 23 日

⑩ Hybrid type の延装置を用いた上顎骨の水平的延長術：相川友直，飯田征二，石橋美樹，小泉英彦，磯村恵美子，阿部早苗，古郷幹彦．第 53 回日本口腔外科学会，徳島，2008 年 10 月 20 日

⑪ 舌下部に発生した Intraductal papilloma の 1 例：増田智丈，相川友直，磯村恵美子，飯田征二，松田智子，岸野万伸，田中晋，古郷幹彦．第 53 回日本口腔外科学会，徳島，2008 年 10 月 20 日

⑫ 口腔悪性腫瘍手術施行症例における術後感染について：樋口将隆，石浜孝二，田中晋，住岡聡，和田剛信，吉村奈津子，相川友直，大倉正也，古郷幹彦．第 53 回日本口腔外科学会，徳島，2008 年 10 月 20 日

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

相川 友直 (AIKAWA TOMONAO)  
大阪大学・歯学部附属病院・講師  
研究者番号：00362674