

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 26 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659671

研究課題名(和文) 機械刺激受容体を介したSOX9発現増加による培養軟骨細胞の脱分化抑制法の開発

研究課題名(英文) TRPV4, a Ca ion channel plays pivotal role in chondrogenic mechanotransduction in ATDC5

研究代表者

石黒 直樹 (Ishiguro, Naoki)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：20212871

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：ATDC5細胞の軟骨分化ではTRPV4 mRNA発現がSOX9 mRNA発現に先行して上昇、プロテオグリカン、Ⅱ型コラーゲンも増加し軟骨分化作用との関わりを示した。機械刺激を負荷する実験系では、TRPV4活性化と、SOX9遺伝子発現の上昇、更にⅡ型コラーゲン、プロテオグリカン産生亢進を確認した。TRPV4をRNA干渉によって抑制するとSOX9、Ⅱ型コラーゲン、アグリカンのmRNA発現量は低下した。機械的刺激はTRPV4を介して、軟骨細胞分化促進効果を発揮していることを示した。TRPV4は軟骨分化に重要な働きを持つと共に、最適化した機械的刺激はTRPV4活性化を介して軟骨細胞分化に働くと結論した。

研究成果の概要(英文)：It is well known that chondrocyte metabolic activity is partly regulated by physical factors. However, the specific cellular mechanosensor responsible for perception and transduction has not been fully identified in chondrocytes. It has already reported that TRPV4 activation can contribute to the process of chondrogenesis via SOX9 pathway. In this study we demonstrated that TRPV4 works as a mechanoreceptor in response to mechanical stress in chondrocytes, and to determine the intracellular mechanisms leading to the chondrogenesis. Our conclusions are as follow, Mechanical stress promoted chondrogenesis in ATDC5 cells with increasing mRNA expression of SOX9. Inhibition of TRPV4 by chemical and siRNA suppressed chondrogenesis effect of mechanical stress in ATDC5 cells. Ca influx by mechanical stress was suppressed by RR supplementation and TRPV4 siRNA transfection.

研究分野：歯歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：TRPV4 SOX9 機械的刺激 軟骨細胞分化 ATDC5細胞

1. 研究開始当初の背景

自己軟骨細胞移植治療は期待される治療法であるが、移植軟骨細胞を効率よく得る方法が課題である。組織幹細胞から SOX9 遺伝子導入により効率に軟骨細胞を得る方法を開発した(BBRC 301:338,2003)。また、組織幹細胞からの分化誘導は培養期間の延長により低下することを示した(BBRC316:233,2004)。培養増殖・分化誘導中に適度な機械刺激を加えると、結合組織細胞では代謝変化を起こすことや、細胞分化誘導を制御できる可能性を検討した(BBRC244:615,1998,FASEBJ16:405,2002,J.Biotec133:245,2008)。軟骨分化は ATDC5 細胞を用いた実験系で促進作用を証明した(論文作成中)。機械刺激は組織幹細胞の機械刺激受容体に作用して細胞分化を促進すると考え受容体の種類と役割を検討する。近年 TRPV4 が SOX9 を介して軟骨分化に関わることが示された(J Biol Chem 282:32158,2007)。この分子はヒトでも軟骨分化に関与し、分子の異常は骨系統疾患の原因となる(Am J Med Genet 152A:1169,2010)。TRPV family (V1~V4) は機械刺激受容体としても知られている。軟骨細胞分化に関わる TRPV family の働きを検討し、軟骨細胞分化を促進する機械刺激の機序を明らかとし、これを代用する化合物を見出す。

2. 研究の目的

機械刺激は組織幹細胞の機械刺激受容体に作用して細胞分化を促進と考え軟骨細胞機械刺激受容体の種類と役割を検討する。機械刺激受容体の一種と考えられている Transient Receptor Potential Channel V4 (TRPV4) が SOX9 を介して軟骨分化に関わり、この分子はヒトでも軟骨分化に関与し、分子の異常は骨系統疾患の原因となる。さらに TRPV4 発現の低下が変形性関節症と関わり、ことが明らかとなった(Arthritis Rheum

62:2973,2010)。そこで TRPV4 を中心に TRPV family 全般について SOX9, 軟骨細胞分化との関連を検討する。TRPV4 の活性化がヒト関節軟骨細胞で SOX9 を介して軟骨形質維持に関わることを明らかとする。更に軟骨細胞静置培養では TRPV4 活性化が抑制され、結果として SOX9 低下、軟骨細胞形質変化が起こる機序を明らかとする。目的は軟骨細胞単層培養における TRPV4 活性化を介した脱分化の抑制方法 (TRPV4 活性化作用の化合物を含む) の開発である。

3. 研究の方法

当初は TRPV1~4 を研究対象としたが、その後の検討により TRPV4 に絞って軟骨分化への影響を検討した。ATDC5 細胞の培養実験系を用いた。ATDC5 細胞の単層静置培養系で軟骨への分化における TRPV4 mRNA 発現が SOX9 mRNA 発現に先行して上昇すること、TRPV4 の抑制により、その下流にあるプロテオグリカン、型コラーゲンの発現を蛋白レベルで確認し、軟骨分化作用を明確とした。機械刺激

Mechanical loading system

図



を負荷する実験系を用いて TRPV4 を順次 RNA 干渉によって抑制して SOX9、型コラーゲン、アグリカンの mRNA 発現量を検討しつつ、最適の機械的刺激負荷量を求めた。Mechanical loading は引っぱり力により細胞に機械的負荷をかけるものである、左が負荷無し、右が進展による負荷をかけた状態である(図1)。

図

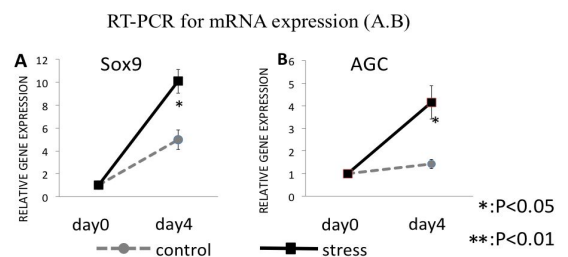


図 は適切な運動負荷を加えた状態と静置の条件で培養 4 日目の SOX9、アグリカン mRNA の発現量をみたもの。軟骨分化に関わる物質の遺伝子発現量の上昇に繋がることから ATDC5 細胞における軟骨細胞分化促進効果を確認した。逆に機械的市刺激が過度に高まることにより TRPV4 を介した SOX9 発現が低下するも観察された。運動過多による発育障害発生の可能性を示唆する結果であった。機械的刺激は強度を増すと結果として軟骨分化が阻害されること、それに TRPV4-SOX 9 の関連があることが示唆された。

カルシウムイオン除去、あるいは TRPV4 特異的阻害薬でも同様の軟骨細胞分化抑制効果を認めていることから、TRPV4 は軟骨分化に重要な働きを持つと結論した。

図

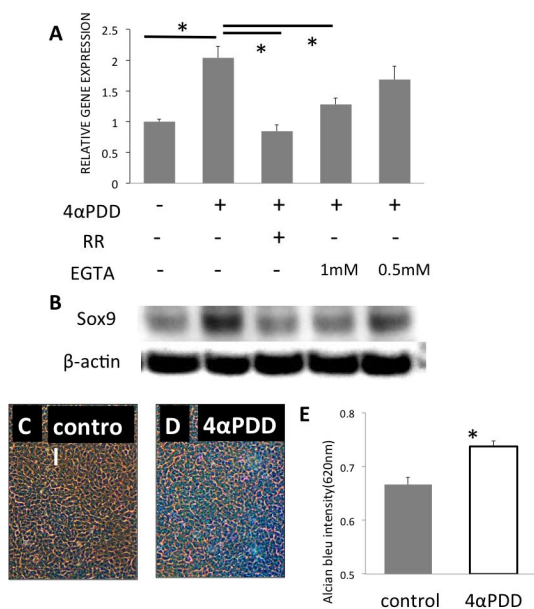
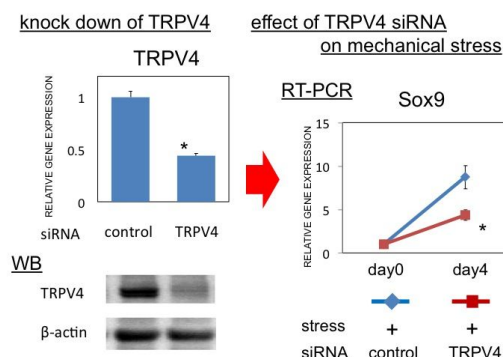


図 では特異的 TRPV4 活性化促進薬である 4 PDD (4 -phorbol 12,13-didecanoate)により SOX9 発現が上昇したことを示す。この上昇は特異的阻害薬である RR(ruthenium red)、Ca キレート作用のある EGTA によっても抑制された。更に 4 PDD 添加によりアグリカン合成の上昇を確認している。以上から ATDC5 細胞の軟骨細胞分化は機械的刺激を介した TRPV4 活性化によって促進されることが示された。

図



更に図 は TRPV4 を siRNA で抑制した条件を作り出して、機械的刺激を負荷した場合の SOX9mRNA 発現量を見たものである。TRPV4 抑制により SOX9 発現が抑制されている。

先の研究で ATDC5 の培養系に機械的刺激（伸長刺激）を加えると軟骨分化が促進される事を報告しているが、今回の結果を合わせると運動刺激による軟骨分化、形質維持には TRPV4 が深く関わり、これの活性化が軟骨形質発現・維持に必要であると推論した。機械的刺激を加えて軟骨細胞を培養するバイオリアクターの使用が考慮されているが、TRPV4 刺激物質を用いればバイオリアクター無しでの培養・増殖が可能である可能性が示された。

4 . 研究成果

ATDC5 の培養系に機械的刺激（伸長刺激）を加えると軟骨分化が促進される事を合わせると運動刺激による軟骨分化、形質維持には TRPV4 が深く関わり、これの活性化が SOX9 活性化に繋がり、プロテオグリカン、型コラーゲン発現上昇に表される軟骨形質発現に強く結びつくことを明らかとした。引き続き、このメカニズムに基づく創薬を目指すこととした。この創薬ターゲットは広く軟骨変性疾患が含まれる可能性を考えてる。

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 13 件)(全て査読有り)

1. Kitoh H, Achiwa M, Kaneko H, Mishima K, Matsushita M, Kadono I, Horowitz JD, Sallustio BC, Ohno K, Ishiguro N. Perhexiline maleate in the treatment of fibrodysplasia ossificans progressiva: an open-labeled clinical trial. Orphanet J Rare Dis. 2013 Oct 16;8:163. doi: 10.1186/1750-1172-8-163.
2. Kaneko H, Kitoh H, Mishima K, Matsushita M, Ishiguro N. Long-term outcome of gradual reduction using overhead traction for developmental dysplasia of the hip over 6 months of age. J Pediatr Orthop. 2013 Sep;33(6):628-34. doi: 10.1097/BPO.0b013e31829b2d8b.
3. Kitoh H, Kitakoji T, Hattori T, Kaneko H, Mishima K, Matsushita M, Ishiguro N. A comparative study of blade plate fixation and external fixation in osteotomies for slipped capital femoral epiphysis. J Pediatr Orthop B. 2013 Nov;22(6):542-7. doi: 10.1097/BPB.0b013e3283637070.
4. Kitoh H, Kaneko H, Mishima K, Matsushita M, Ishiguro N. Prognostic factors for trochanteric overgrowth after containment treatment in Legg-Calvé-Perthes disease. J Pediatr Orthop B. 2013 Sep;22(5):432-6. doi: 10.1097/BPB.0b013e32835f585b.
5. Kaneko H, Kitoh H, Mabuchi A, Mishima K, Matsushita M, Ishiguro N. Isolated bifid rib: clinical and radiological findings in children. Pediatr Int. 2012 Dec;54(6):820-3. doi:

〔学会発表〕(計 25 件)

1. Hiroshi Kaneko, Hiroshi Kitoh, Kenichi Mishima, Masaki Matsushita, Naoki Ishiguro. Long-term outcome of gradual reduction with overhead traction for developmental dysplasia of the hip in children over six months of age. Annual meeting of Pediatric Orthopedic Society of North America 2013.5.1-4 (Sheraton Center Toronto Hotel . (Tronto. Canada))
2. 三島健一、鬼頭浩史、金子浩史、松下雅樹、杉浦洋、長谷川幸、北村暁子、石黒直樹. 下肢長不等例における脚長差の経時的変化. 第 24 回日本小児整形外科学会 2013.11.8-9.パシフィコ横浜(横浜市)
3. 鬼頭浩史、金子浩史、三島健一、松下雅樹、石黒直樹. 大腿骨頭すべり症に対する創外固定法による矯正骨切り術の短期成績-プレート法との比較-. 第 86 回日本整形外科学会 2013.5.23-26 広島グリーンアリーナ リーガロイヤルホテル広島 NTT クレドホール メルパルク広島 (広島市)
4. 鬼頭浩史、金子浩史、三島健一、松下雅樹、石黒直樹. ヒト骨髄由来間葉系幹細胞の細胞増殖能および骨芽細胞分化能. 第 23 回日本小児整形外科学会. 2012.11.30-12.1 九州大学医学部百年講堂 (福岡市)
5. 鬼頭浩史. 軟骨無形成症に対する治療の展望. 第 85 回日本整形外科学会学術総会. 2012.5.17-20. 国立京都国際会館・グランドプリンスホテル京都(京都市)

〔図書〕(計1件)

三島健一、鬼頭浩史、石黒直樹. トピックス
2 .骨形成促進治療の展望-Runx2 を活性化す
る薬剤の検討-. 『先端医療シリーズ 44 臨
床医のための最新整形外科』. 先端医療技術
研究所.570(4-7).2013

〔産業財産権〕

出願状況(計2件)

名称: 骨系統疾患治療薬及びその用途
発明者: 大野欽司、石黒直樹、鬼頭浩史、
松下雅樹
権利者: 国立大学法人名古屋大学
種類: 特許
番号: 特願 2013-047426
出願年月日: 2013 年 3 月 10 日
国内外の別: 国内

名称: 骨形成促進剤及びその用途
発明者: 大野欽司、石黒直樹、鬼頭浩史、
三島健一
権利者: 国立大学法人名古屋大学
種類: 特許
国際出願番号:PCT/JP2012/071264
国際出願年月日:2012 年 8 月 23 日
国内外の別: 国外

6 . 研究組織

(1)研究代表者

石黒 直樹 (ISHIGURO NAOKI)
名古屋大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 20212871

(2)研究分担者

鬼頭 浩史 (KITOH HIROSHI)
名古屋大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号: 40291174

酒井 忠博(SAKAI TADAHIRO)
名古屋大学・医学部附属病院・
病院講師
研究者番号: 60378198

金子 浩史(KANEKO HIROSHI)
名古屋大学・大学院医学系研究科・
寄附講座助教
研究者番号: 60566975

三島 健一 (MISHIMA KENICHI)
名古屋大学・大学院医学系研究科・
寄附講座助教
研究者番号: 40646519

(3)連携研究者

成瀬 恵治(NARUSE KEIJI)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・
教授
研究者番号: 40252233