

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 27 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462370

研究課題名(和文) ヒト運動器細胞三次元組織の力学刺激応答におけるシグナルカスケード

研究課題名(英文) Signal cascade after cyclic compressive load in human synovial fibroblasts cultured on three-dimensional collagen constructs.

研究代表者

米谷 泰一 (YONETANI, YASUKAZU)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：80642090

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト膝関節から滑膜細胞を播種した三次元組織に対する力学刺激により、炎症反応の中心的役割を持つPGE2、IL1、IL6が産生され、IL1/IL6各々の抗受容体抗体添加による作用ブロックによりPGE2産生は部分的に抑制された。一方、力学刺激を加えず、IL6刺激のみではPGE2は産生されず、IL6受容体を高濃度で添加することでPGE2の産生増加を得たがIL1刺激に比べ低程度であった。このことから、力学刺激によるPGE2上昇には、上清中へ生成されたIL1とともにIL6が関与しており、力学的刺激は化学的刺激単独とは異なり、IL6受容体の作用を増加させている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Human synovial fibroblasts were cultured on collagen scaffolds to produce three-dimensional constructs. A cyclic compressive loading of 40 kPa at 0.5 Hz was applied to the constructs. The concentrations of PGE2, IL-1 and IL-6 in the loaded samples were significantly higher than those of unloaded samples. After the administration of a IL6 or IL1 selective inhibitor, the increased concentration of PGE2 by cyclic compressive loading was impeded. Although administration of IL6 without loading did not upregulate PGE2 production, promotion of PGE2 was occurred after IL6 stimulation with higher concentration of soluble IL6 receptor. However, the amount of PGE2 was less than that of PGE2 after IL1 stimulation. These data indicated that cyclic compressive loading stimulates IL1 pathway and IL6 pathway including not only production of IL6 but also the function of IL6 receptor.

研究分野：整形外科

キーワード：力学刺激応答 滑膜細胞 インターロイキン6 インターロイキン1 炎症反応

1. 研究開始当初の背景

変形性関節症の軟骨変性・破壊にタンパク分解酵素(MMP や ADAMTS(aggreacanase))が主役を演じていることが知られている。(Glasson SS Nature 2005, Stanton H Nature 2005)しかし、治療効果をもつ MMP および ADAMTS 抑制剤は開発されていない。そのため、発症・進行予防を目指し、酵素の上流シグナルを、根本療法の標的分子として研究され、in vivo においてマウスジェネティクスからのアプローチが盛んに行われ、根本治療の標的分子として、炎症性サイトカインなどが明らかとなっている。こうした、in vivo 遺伝子改変実験は、四足歩行で、ヒトと骨格が違い、また、関節構成組織各々が複雑に影響しあうため、各組織・各細胞における力学刺激の役割を分離して解明することは困難である。

そこで、細胞、分子レベルの力学刺激下の細胞応答は、運動器の平面培養細胞に対する、静水圧や培養皿の伸長・圧縮といった二次元的力学刺激負荷において精査されてきたが、生体内での三次元的変形を伴う力学刺激環境とは異なる弱点を有している(Elder BD, Tissue Eng Rev. 2009)。

我々は、生体内での環境に近似した、三次元組織に変形を伴う力学刺激培養システムを開発し、力学刺激応答の研究を行ってきた。(中田研, Clinical Calcium 2006, ORS 2007, 日本整形外科学会誌 2008, ICRS 2010)以下の点で、従来にない優位性を持っている。



1)三次元組織での変形を伴う力学刺激培養システム

独自開発した強度のあるコラーゲンスキャフォールドにコラーゲンゲルとともに三次元培養組織を作成し、生体内環境に近似した、変形を伴う様々な刺激量、時間、頻度を制御した力学刺激を負荷できる。

2)定量的な生体力学負荷に相関した再現性のある遺伝子、蛋白発現

先行研究により、力学刺激の負荷の量的、時間的变化により三次元組織の細胞応答として遺伝子発現、蛋白発現の定量性、再現性があることを確認した(Muroi Y, Nakata K, 2007 JDR)。

3)疾患病態モデル

変形性関節症の病態と類似した遺伝子、蛋白発現を示し、疾患モデルとしての評価できる面をもつ。

我々は、この三次元培養組織と力学刺激培養装置を用いて、力学刺激下のシグナルカスケードとして、炎症性サイトカイン(IL-6、PG)、蛋白分解酵素(MMPs, ADAMTSs)の増加を見出した。

2. 研究の目的

今研究の目的は、三次元培養組織力学刺激モデルを用いて、関節軟骨・滑膜から単離したヒト運動器細胞における力学刺激下のシグナルカスケードを、特に IL-6 関連分子群につき、gain of function, loss of function 等を用いて解明することを目的とする。

我々は、この三次元力学刺激培養システムを用いて、IL-6 の発現上昇の後に、IL-8, MMPs が上昇することを認め(Akamine Y, Int. J.Oral Maxillofac. Surg. 2012)、炎症性サイトカイン IL-6 が上流に参与している事を明らかとしている。

加えて、近年の研究により、細胞自体の三次元的変形により、Rho A シグナル経路や Ca イオンチャンネルの変形による Ca イオン濃度の上昇(B. D. Hoffman, Nature. 2011)を介して IL-6 発現が亢進する経路が明らかとなっている。しかし、こうしたシグナル経路は、力学刺激のみならず、炎症性サイトカイン IL-6 でも活性化されるため、どちらが初期に参与するかは不明である。つまり、力学刺激応答に IL-6 介した経路のみならず、IL-6 を介さない経路が存在する可能性があり、治療方法・再生工学に応用するうえで、精査を要する。

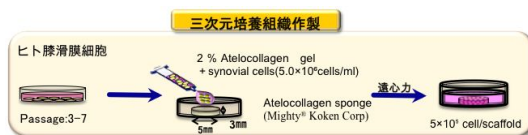
3. 研究の方法

力学刺激に応答する発現遺伝子につき、負荷なし・生理的負荷および過負荷で、遺伝子発現を Realtime RT-PCR 法、および、タンパク発現により確認し、発現定量を行い、力学刺激負荷量との関連をみる。

加えて、各種シグナル伝達阻害薬を添加し、発現遺伝子・発現蛋白の変化を精査し、各シグナル経路の関与を検討する

既に、p38 リン酸化阻害(SB202190)添加により IL-6, MMP-3 蛋白の力学刺激による発現誘導が抑制され、これら遺伝子発現が p38 シグナルを介することを見いだしており(未発表データ)今後、力学刺激応答による IL-6 発現に関与する各種シグナルの阻害剤を使用し、細胞応答を検討する。

ヒト膝関節鏡手術時に得られたヒト膝滑膜組織由来細胞を培養し、得られたヒト滑膜組織由来培養細胞 (passage:3-7, 5.0×10^6 cells/ml, 1ml と 2%atelocollagen gel(1ml)をよく混和し、 atelocollagen sponge (Mighty® Koken corp)に滴下後、遠心力(500 g)を加え、細胞を導入し、三次元培養組織 (5×10^5 cells/scaffold) を作製し



た。

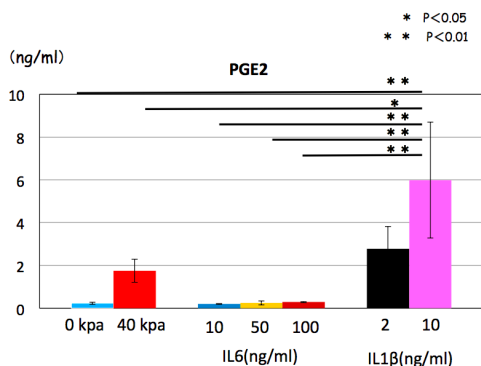
3 日間静置培養後、1×PBS で 2 回洗浄し、

以下の条件にて実験を行った。組織回収においては、先行研究により明らかになった最も炎症性サイトカインの上昇する力学負荷6時間後に回収し、培養液中の炎症タンパクであるPGE2濃度をHTRF法にて測定した。

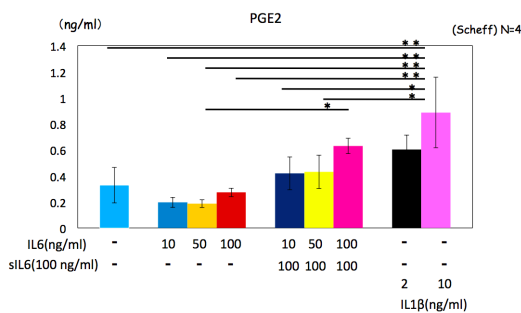
- 1) IL6(10, 50, 100 ng/ml)、IL1 (2,10 ng/ml)、独自に開発を行った力学刺激培養システム(CLS-7J® Technoview, Inc)を用いて、繰り返し圧縮負荷(40 kPa, 0.5 Hz)を1時間与えた。
- 2) IL6(10,50,100ng/ml)、IL6(10,50,100ng/ml)+sIL6R(100ng/ml)、IL1 (2,10 ng/ml)を各々添加した。
- 3) 繰り返し圧縮負荷(40 kPa, 0.5 Hz,1 hour)+IL6阻害剤(トシリズマブ®)(0, 10, 100 ng/ml)を各々添加した。

4. 研究成果

- 1) 滑膜由来三次元培養組織において IL1 刺激でPGE2は上昇したが、IL6単体刺激においては、PGE2上昇を認めなかった。

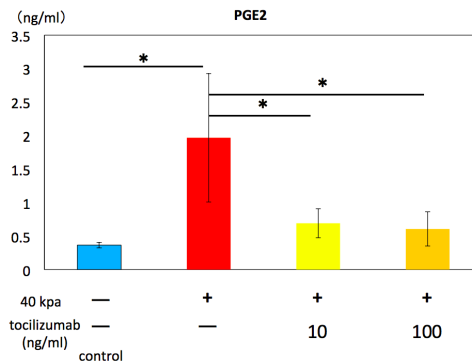


- 2) しかし sIL6R と併用することで PGE2 上昇傾向を認めた。しかし、高濃度の IL6 刺激にて、低濃度 IL1 刺激と同程度であった。



- 3) 一方、滑膜由来三次元培養組織は過度な圧縮負荷刺激(40 kpa)でPGE2上昇を認め、IL6受容体抗体(トシリズマブ)併用下においては、過度な圧縮負荷刺激を与えてもPGE2上昇を認めなかった。

今回の研究では、滑膜由来三次元培養組織に対して、IL6単体添加では反応しなかったが、sIL6R存在下ではIL6に反応し、PGE2発現上昇を認めた。このことから、滑膜由来三次元



培養組織において、IL6の作用のためにはIL6受容体の存在が重要であることが明らかとなった。また、我々は力学負荷刺激によりIL6/PGE2の蛋白発現上昇を見出しているが、IL6阻害剤であるトシリズマブ®添加時の力学負荷刺激ではPGE2発現上昇を認めないことより、力学負荷刺激は上清中へIL6を生成させ、加えてIL6受容体の作用亢進させることで、PGE2発現を上昇させている可能性が示唆された。

まとめ

今回の研究では、滑膜由来三次元培養組織において、sIL6R存在下ではIL6に反応してPGE2発現上昇を認めた。また、IL6阻害剤であるトシリズマブ®添加時の力学負荷刺激ではPGE2発現上昇を認めないことを見出した。このことから、力学負荷刺激によるPGE2上昇には、上清中へ生成されたIL6と、無負荷では作用していないIL6受容体が関与している可能性が示唆された。

参考文献

Glasson SS, Askew R, Sheppard B, Carito B, Blanchet T, Ma HL, Flannery CR, Peluso D, Kanki K, Yang Z, Majumdar MK, Morris EA. Deletion of active ADAMTS5 prevents cartilage degradation in a murine model of osteoarthritis. *Nature*. 2005 Mar 31; 434(7033):644-8.

Stanton H, Rogerson FM, East CJ, Golub SB, Lawlor KE, Meeker CT, Little CB, Last K, Farmer PJ, Campbell IK, Fourie AM, Fosang AJ. ADAMTS5 is the major aggrecanase in mouse cartilage in vivo and in vitro. *Nature*. 2005 Mar 31; 434(7033):648-52.

Elder BD, Athanasiou KA. Hydrostatic pressure in articular cartilage tissue engineering: from chondrocytes to tissue regeneration. *Tissue Eng Part B Rev*. 2009 Mar; 15(1):43-53.

Nakata K, Yoshikawa H. [Cartilage formation and regeneration by mechanical stress]. *Clin Calcium*. 2006 Nov; 16(11):1899-4.

Muroi Y, Kakudo K, Nakata K. Effects of compressive loading on human synovium-derived cells. J Dent Res. 2007 Aug;86(8):786-91.

Akamine Y, Kakudo K, Kondo M, Ota K, Muroi Y, Yoshikawa H, Nakata K. Prolonged matrix metalloproteinase-3 high expression after cyclic compressive load on human synovial cells in three-dimensional cultured tissue. Int J Oral Maxillofac Surg. 2012 Jul;41(7):874-81.

Hoffman BD, Grashoff C, Schwartz MA. Dynamic molecular processes mediate cellular mechanotransduction. Nature. 2011 Jul 20;475(7356):316-23.

Shimomura K, Kanamoto T, Kita K, Akamine Y, Nakamura N, Mae T, Yoshikawa H, Nakata K. Cyclic compressive loading on 3D tissue of human synovial fibroblasts upregulates prostaglandin E2 via COX-2 production without IL-1 and TNF-. Bone Joint Res. 2014 Sep;3(9):280-8.

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 0件)

〔学会発表〕(計 1件)

ヒト滑膜三次元培養組織へのメカニカルストレスと IL1, IL6 刺激による PGE2 発現上昇
岡本 知子, 矢谷 真也, 金銅 真世, 室井 悠里, 中田 研, 覚道 健治
第 60 回(公社)日本口腔外科学会総会・学術大会,
2015 年 10 月 16 日~2015 年 10 月 18 日

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

米谷 泰一 (YONETANI Yasukazu)

大阪大学 医学系研究科 助教

研究者番号：80642090

(2) 研究分担者

中田 研 (NAKATA Ken)

大阪大学 医学系研究科 教授

研究者番号：00283747

(3) 連携研究者

前 達雄 (MAE Tatsuo)