

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 29 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25463186

研究課題名(和文) 軟骨細胞における機械的刺激応答の細胞極性による制御

研究課題名(英文) Cell polarity and mechanical response in chondrocytes.

研究代表者

安永 敦 (YASUNAGA, Atsushi)

九州大学・歯学研究科(研究院)・研究員

研究者番号：80515990

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)： ATDC5細胞を軟骨分化誘導し、三次元コラーゲンゲル培養に伸展力を負荷することにより、アクチンの走行やextracellular signaling regulated kinase (ERK) 1/2の活性化の経時的変化を観察することにより、軟骨前駆細胞株ATDC5が軟骨細胞へと分化するメカニズムと細胞極性や細胞内情報伝達分子との関わりについて調べた。軟骨前駆細胞から軟骨細胞への分化時において、アクチンフィラメントの走行の変化およびERK1/2の活性化と機械的刺激の大きさには密接な関わりがあることが示された。

研究成果の概要(英文)： We investigated the time course changes of F-actin distribution and nuclear translocation of phosphorylated extracellular signaling regulated kinase (p-ERK) 1/2 under mechanical stimulation on differentiating ATDC5 cells cultured in 3-D collagen gel culture. Nuclear translocation of p-ERK1/2 was detected 1 hour after mechanical stimulation and disappeared after 12 hours at 10% and 20% stretching. In many cells exposed to stretching force for 1 hour, stress fibers were not detected, though stress fibers were observed in the most cells and align with stretching direction under the stretch condition for 12 hour. These data indicated that mechanical stress is deeply related to actin distribution during chondrogenic differentiation.

研究分野：医歯薬学

キーワード：軟骨細胞 メカニカルストレス

1. 研究開始当初の背景

我々は、矯正歯科臨床の現場において、成長期の患者に対し顎形力を負荷するための装置を使用し、顎骨成長のコントロールを試みようとする事が多い。しかし、効果的な顎整形力の負荷様式について、未だ理解できていないと言わざるを得ない。これは、軟骨組織と骨組織を含めた骨格組織の機械的刺激に対する応答機構の違いや、骨格組織の成長発育の分子メカニズムが解明されてなかったことによるところが大きいと考えられる。

これまで、われわれは、機械的伸展刺激に伴う軟骨細胞の分化抑制には、細胞内情報伝達分子である extracellular signaling – regulated kinase (ERK) –1/2 の活性化と核移行が関与していることを示した。これらの *in vivo* の実験結果を踏まえて、*in vitro* において高密度培養による軟骨細胞分化に対する機械的刺激負荷装置を開発し、軟骨細胞の機械的刺激応答の分子メカニズムを検討し、インテグリンを介した細胞と細胞外基質の接着が機械的刺激の伝達に必要なことを示した。

機械的刺激に対する細胞応答能の研究においては、軟骨細胞以外の線維芽細胞、骨芽細胞などを対象とした研究が行われてきたが、その多くは、それぞれの細胞の生死や代謝状態の変化などを解析する目的のものが多く、細胞分化との関連を検討しているものはあまり見られない。

2. 研究の目的

本研究は、三次元コラーゲンゲル培養に伸展力を負荷することにより、軟骨前駆細胞株 ATDC5 が軟骨細胞へと分化するメカニズムと細胞極性や細胞内情報伝達分子との関わりに注目し、機械的刺激応答の分子メカニズムの解明をめざす。

3. 研究の方法

(1) 機械的刺激負荷実験前のシステム構築

Cellmatrix Type I-A を用い、ガラスボトムディッシュにコラーゲンゲル層 (Base Layer) を作製した。その上に、細胞を混合したコラーゲンゲルを Base Layer 上に注ぎ、Cell Layer とした。さらに、変位を評価するための指標となる蛍光標識したマイクロビーズ (Fluosphere、直径 1.0 μm 、 2.7×10^{10} 個/ml) を懸濁した 1% アガロース/PBS でコーティングし、Top Layer とした。DMEM/F-12、5% FBS 下で培養を行い、観察直前に nuclear-ID Red

DNA stain を添加したフェノールレッド不含の Libovit's L-15 培地へ交換後、顕微鏡による解析を行った。

II型コラーゲンプロモーター・エンハンサー領域を含み、赤色蛍光蛋白 (DsRed) をレポーターとして発現するプラスミドを作製、ATDC5 にトランスフェクションを行った。Insulin-Transferrin-Selenium (ITS) を添加し、軟骨分化誘導を行った。

ストレッチチャンバーとコラーゲンゲルを三次元モデル化し、有限要素法を用いて、チャンバー伸展に伴うゲルの変形のシミュレーションを行った。

(2) ATDC5 細胞への機械的刺激負荷実験

GFP 融合 ERK2 タンパクを発現する ATDC5 を蛍光ビーズとともにコラーゲンゲルに埋入、(ITS) を添加し、実際にマイクロマニピュレーターにより伸展力を負荷した。

用いるチャンバーと伸展装置を変更し、ストレックス社のストレッチチャンバーとネジ式伸展装置を用いることとした。ストレッチチャンバーのコラーゲンと混ぜた ATDC5 を播種、(ITS) を添加した。10% および 20% 伸展力を加え、1 時間後、12 時間後に PBS で洗浄後、4% パラホルムアルデヒドにて固定を行った。ブロッキング後、4 にて抗リン酸化 ERK、抗 ERK 抗体を反応後、翌日、PBS で洗浄後、二次抗体を反応させ、さらにアクチン染色を行った。

4. 研究成果

(1) 機械的刺激負荷実験前のシステム構築

ERK2-GFP fusion タンパク発現ベクターを ATDC5 細胞へトランスフェクションし、発現を確認した。また、ERK2-GFP を発現した ATDC5 をガラスボトムディッシュに播種し、ガラスニードルとマイクロマニピュレーターを用いて伸展刺激を加えることにより、ERK2 の核移行が認められることを再確認した。

3次元コラーゲンゲルに包埋した ATDC5 細胞と蛍光ビーズを顕微鏡で解析し、最適な細胞密度と蛍光ビーズの濃度を決定した。

II型コラーゲンプロモーター・エンハンサー領域を含み、赤色蛍光蛋白 (DsRed) をレポーターとして発現するプラスミドをトランスフェクションした ATDC5 に軟骨分化誘導を行ったところ、蛍光顕微鏡下で DsRed の蛍光強度が増加した。

有限要素法による解析の結果、中央部の歪みは、チャンバー 10% および 20% 伸展時、そ

それぞれ約 15%および約 28%であった。これに対して、実際に伸展力を負荷した際、コラーゲンゲルに埋入した蛍光マイクロビーズの位置変化によってゲルの伸展を評価したところ、チャンパー10%および 20%伸展時、それぞれ約 5%および約 9%となり、有限要素モデルよりも伸展率が減少する結果となった。

(2) ATDC5 細胞への機械的刺激負荷実験

GFP融合ERK2タンパクを発現するATDC5を蛍光ビーズとともにコラーゲンゲルに埋入し、実際にマイクロマニピュレーターにより伸展力を負荷した。その結果、チャンパーを 20%伸展して経時的な変化を観察した結果、ERK2 の細胞内局在の変化は認められなかった。

伸展力負荷時のリアルタイム解析が難航したことから、急遽、観察方法を変更し、抗リン酸化 ERK、抗 ERK 抗体を用いた免疫染色およびアクチン染色の結果、10%および 20%伸展力負荷 1 時間後には、リン酸化 ERK の核移行が認められたが、アクチンフィラメントの走行にはあまり変化が認められなかった。伸展力負荷 12 時間後にはリン酸化 ERK の核移行は認められず、それに対してアクチンフィラメントの走行に変化が認められた。

軟骨前駆細胞から軟骨細胞への分化時において、アクチンフィラメントの走行の変化と機械的刺激には密接な関わりがあることが示された。今後は、伸展力の大きさとアクチンフィラメントの走行の変化について、より詳細な経時的観察をする必要がある。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 10 件)

Umeda M, Terao F, Miyazaki K, Yoshizaki K, Takahashi I.: MicroRNA-200a Regulates the Development of Mandibular Condylar Cartilage. J Dent Res. 94: 795-802, 2015 June

Albogha MH, Takahashi I. Generic finite element models of orthodontic mini-implants: Are they reliable? J Biomech. 48(14): 3751-6, 2015 Nov

Albogha MH, Kitahara T, Todo M, Hyakutake H, Takahashi I. Maximum principal strain as a criterion for prediction of orthodontic mini-implants failure in subject-specific finite element models.

The Angle Orthodontist. 86(1):24-31. 2016 Jan.

Albogha MH, Kitahara T, Todo M, Hyakutake H, Takahashi I. Predisposing Factors for Orthodontic Mini-Implant Failure Defined by Bone Strains in Patient-Specific Finite Element Models. Ann Biomed Eng. 2016 Mar

Miyazaki K, Yoshizaki K, Arai C, Yamada A, Saito K, Ishikawa M, Xue H, Funada K, Haruyama N, Yamada Y, Fukumoto S, Takahashi I. Plakophilin-1, a Novel Wnt Signaling Regulator, Is Critical for Tooth Development and Ameloblast Differentiation. PLoS One. 24;11(3):e0152206. 2016 Mar.

Hoshi K, Kawaki H, Takahashi I., Takeshita N, Seiryu M, Murshid SA, Masuda T, Anada T, Kato R, Kitaura H, Suzuki O, Takano-Yamamoto T. Compressive force-produced CCN2 induces osteocyte apoptosis through ERK1/2 pathway. J Bone Miner Res. 2014 May; 29(5): 1244-57.

Ioi H, Kang S, Shimomura T, Kim SS, Park SB, Son WS, Takahashi I. Effects of vermilion height on lip esthetics in Japanese and Korean orthodontists and orthodontic patients. Angle Orthod 84(2):239-245, 2014.

Yanase Y, Ioi H, Nishioka M, Takahashi I. Effects of sliding velocity on friction. Angle Orthod 84(3):454-458, 2014.

Trisnawaty N, Ioi H, Kitahara T, Suzuki A, Takahashi I. (2013): Effects of extraction of four premolars on vermilion height and lip area in patients with Bimaxillary protrusion, Eur J Orthod 35(4):521-528,2013.4

Ioi H., Kang S., Shimomura T., Kim S. S., Park S. B., Son W. S., Takahashi I. Effects of vertical positions of anterior teeth on smile esthetics in Japanese and Korean orthodontists and orthodontic patients. J Esthet Dent.25(4):274-282,2013.8

〔学会発表〕(計 9 件)

新井智映子、吉崎恵悟、宮崎佳奈子、韓雪、

鮎田啓太、高橋一郎 基底膜分子 Nephronectin は歯原性上皮幹細胞の分化および細胞増殖に關与する 第57回歯科基礎医学会學術大会・総会、ポスター、2015年9月11-13日、新潟

宮崎佳奈子、吉崎恵悟、新井智映子、韓雪、鮎田啓太、高橋一郎 新規 Wnt シグナル調節因子 PKP1 の歯の発生における役割 第57回歯科基礎医学会學術大会・総会、ポスター、2015年9月11-13日、新潟

新井智映子、吉崎恵悟、宮崎佳奈子、韓雪、鮎田啓太、高橋一郎 歯の発生における基底膜分子 Nephronectin の役割 第74回日本矯正歯科学会大会（優秀発表賞受賞）、ポスター、2015年11月18-20日、福岡
宮崎佳奈子、吉崎恵悟、新井智映子、韓雪、鮎田啓太、高橋一郎 外胚葉異型性症原因遺伝子 Plakophilin 1 は歯の発生において Wnt シグナル調節因子として作用する 第74回日本矯正歯科学会大会、ポスター、2015年11月18-20日、福岡

Albogha Mhd Hassan, Kitahara Toru, Todo Mitsugu, Hiyakutake Hiroto, Takahashi Ichiro Three factors play significant role in the stability of orthodontic mini-implants 第74回日本矯正歯科学会大会（優秀発表賞受賞）、口演、2015年11月18-20日、福岡

Miyazaki K, Yoshizaki K, Arai C, Han Xue, Funada K, Takahashi I. Plakophilin-1, a novel Wnt signaling regulator, is critical for tooth development and ameloblast differentiation. (口演、ポスター), International Symposium 2015 Oral and Craniofacial Development and Disease, December 10th, 11th, 2015, Yumikura Hall Osaka University, Osaka, Japan

Arai C, Yoshizaki K, Miyazaki K, Xue Han, Funada K, Takahashi I. Nephronectin, a basement membrane protein, plays critical roles for differentiation and proliferation of dental epithelial stem cells during tooth development. (口演), Kyudai Oral Bioscience 2016, February 27th, 2016, Fukuoka, Japan

北原亨、飯久保正弘、湯浅賢治、高橋一郎 筋機能MRI および31P-MRSを用いた咀嚼筋疲労の分子イメージング 第73回日本矯正歯科学会 2014年10月20-22日

Ioi H, Kang DS, Shimomura T, Kim S, Park

S, Son W, Takahashi I, Counts AL. Effects of Buccal Corridors on Smile Esthetics in Korean and Japanese Orthodontic Patients. American Association of Orthodontists 111th Annual Session. Chicago, USA, 2014.

〔図書〕(計1件)

Ichiro Takahashi, Mechano-Reaction of Chondrocytes in the Mandibular Condyle During Orthopedic-Orthodontic Intervention in Orthodontic Treatment of Class III Malocclusion, eds. Peter W Ngan, Toshio Deguchi, Eugene W. Roberts, Chapter 3. Bentham Science Publishers Ltd. Sharjah, U.A.E: 2014, pp37-60.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安永 敦 (YASUNAGA Atsushi)
九州大学・歯学研究院・研究員
研究者番号：80515990

(2) 研究分担者

高橋 一郎 (TAKAHASHI Ichiro)
九州大学・歯学研究院・教授
研究者番号：70241643

星 健治 (HOSHI Kenji)
九州大学・歯学研究院・助教
研究者番号：90569964

寺尾 文恵 (TERAO Fumie)
九州大学・歯学研究院・助教
研究者番号：10510018