

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年3月31日現在

機関番号：11301
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23792414
 研究課題名（和文） 軟骨細胞分化過程にある間葉系細胞の機械的刺激による分化制御の分子機構
 研究課題名（英文） Molecular mechanism of the differentiation control by the mechanical stimulation of the mesenchymal cells which is in the process of chondrocyte differentiation
 研究代表者
 高坂 久美子（KUMIKO KOSAKA）
 東北大学・大学院歯学研究科・大学院非常勤講師
 研究者番号：30585336

研究成果の概要（和文）：

本研究では、機械的圧縮刺激負荷時には未分化間葉系細胞の軟骨細胞への分化が促進され、伸展刺激負荷時は抑制されることをⅡ型コラーゲンと Sox9 の遺伝子発現の半定量的解析により解明した。さらに機械的伸展刺激負荷にともない ERK のリン酸化が起こること、さらにはリン酸化した ERK が核内に移行することが示された。これにより、ERK-1/2 を介した細胞内情報伝達系が軟骨細胞の機械的刺激受容機構において細胞外からの刺激を核内に伝達している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

In this study, I found that mechanical compressive stimulation promoted chondrogenic differentiation of mesenchymal cells derived from rat lim bud but stretch stimulation inhibited it. In addition, phosphorylation and nuclear translocation of ERK-1/2 were observed after mechanical stretch stimulation. Therefore, activation of ERK-1/2 pathway by mechanical stimulation is involved in mechano-sensing signaling pathway of chondrogenesis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・矯正・小児系歯学

キーワード：機械的刺激、軟骨細胞分化、MAPK

1. 研究開始当初の背景

矯正歯科臨床においては、顎顔面骨格の成長制御を目的として、顎整形装置や機能的矯正装置が使用されてきた。歯科矯正学はこれらの効果やその可能性について長い間研究の対象としてきた。特に、下顎骨の成長発育を制御する矯正装置は、骨芽細胞の増殖、分化、石灰化と軟骨細胞の増殖、分化を制御し

なければならないため、これまでのような臨床的研究に加えて、細胞生物学的研究や分子生物学的研究を進めていく必要がある。顎関節はヒトの咀嚼器官としての口の運動をつかさどる最も重要な関節であり、下顎頭軟骨は常に機械的刺激にさらされ、外的刺激としてのメカニカルストレスに対して、その

細胞分化 (Kantomae et al. J Dent Res. 1994., Altman et al. FASEB J. 2002.)、細胞外基質代謝 (Takahashi et al. Anat. Res. 1995.)、および細胞増殖 (Asano et al. Am. J. Orthod. Dentofacial. Orthop. 1986., McNamara et al. Am. J. Orthod. 1979., Copray et al. Am. J. Orthod. Dentofacial. Orthop. 1986.) を変化させて対応し、下顎骨の成長能と機能を維持する役割を果たしている。このように機械的刺激は骨格系組織の成長と分化を調節する有力な後天的因子の一つと考えられている。

顎顔面領域においては下顎頭軟骨に加え正中口蓋縫合軟骨もまた二次軟骨としてよく知られており、様々な機械的刺激に対する生物学的反応がこれまでに研究されてきた。

ラット正中口蓋縫合軟骨の細胞分化を II 型コラーゲンの局在および遺伝子発現などを指標として評価すると、軟骨細胞分化は拡大力により完全に阻害され、圧縮力により促進されることが報告されている (Takahashi et al. Bone. 1996., Takahashi et al. Eur. J. Cell. Biol. 2003.)。

機械的刺激に反応する組織は生体内に広く分布し、特に血管や血管内皮細胞、骨形成系の細胞においては数多くの研究がなされてきた。ヒト歯根膜細胞に機械的刺激を与えたところ ERK1/2 と JNK の活性化と細胞増殖、骨性分化が促進されたとの報告がある (Kook et al. J. Cell. Biochem. 2009.)。また骨芽細胞様細胞においては、機械的刺激が MAPK カスケードを介して分化および機能を促進することが示唆されている (Jessop et al. Bone. 2002.)。周期的伸展刺激を与えた正常ヒト骨芽細胞では p38-MAPK 活性化による OPG 産生亢進、RANKL 産生抑制がみられることが明らか

かにされている (Kusumi et al. Am. J. Orthod. Dentofacial. Orthop. 2005.)。加えて、軟骨組織においては in vivo における正中口蓋縫合への拡大力により ERK1/2 のリン酸化と核移行が起こり、軟骨細胞分化が阻害されることが示されている (Takahashi et al. Bone. 1996.)。これらのことから、軟骨細胞を含めた間葉系細胞の分化過程に関与していることが示されてきた MAPK シグナルカスケードが機械的刺激受容機構においても重要な働きをしていると考えられる。さらに機械的刺激の種類によって応答性が異なることから、機械的刺激の種類によって細胞内情報伝達系が制御されていること、あるいは応答する分子が異なることが推察された。

2. 研究の目的

成長期における顎顔面骨格の成長発育を制御することは困難であると考えられてき

た。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いなかったことによるところが大きい。これまでの申請者らの検討により、機械的伸展刺激により軟骨細胞の分化は阻害される一方、圧縮刺激により促進されることが示されてきた。しかしながら、この軟骨細胞の指向性のある機械的刺激応答の分子メカニズムについては全く分かっていない。

本研究課題ではラット胎仔四肢胚より採取した未分化間葉系細胞に対し、伸展刺激、圧縮刺激を負荷し、軟骨細胞分化における機械的刺激応答の分子メカニズムを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養および機械的伸展圧縮刺激負荷培養系

本研究では胎齢 12 日の Sprague-Dawley 系ラット胎仔より四肢胚を摘出した。採取には実態顕微鏡を用い、採取は 4°C の冷リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 中で行った。採取した四肢胚は PBS 中で 3 回洗浄し、37°C で 15 分間 0.25mg/ml のトリプシン EDTA および 0.25mg/ml のコラゲナーゼ溶液中に浸漬し、単一細胞に分離した。細胞数を計測し、常温 (室温) で 200g 下 15 分間遠心し細胞を収集した。採取した細胞は DMEM にて 5×10^6 cells/ml に再懸濁し、PDMS 製培養面を持つコラーゲン・コート機械的刺激負荷培養装置に 5×10^6 cells/ml の細胞濃度で 50 μ l の点状高密度培養 (spot micromass culture) を行い、1 時間伸展刺激、圧縮刺激を負荷した。24 時間ごとに 3 日間段階的に刺激を加えた場合と初期歪みだけを負荷した場合とに実験系を分割して検討した。

この機械的刺激負荷装置による軟骨細胞の分化制御を検証するために Real time PCR 法を用い Sox9 および II 型コラーゲン (Col2a1) の遺伝子発現を測定した。内部基準として GAPDH を用いた。

(2) 未分化間葉系細胞に対する伸展刺激および圧縮刺激の負荷培養の系の確立

伸展刺激、圧縮刺激を負荷することが可能となる機械的刺激負荷培養装置は生体親和性に優れたポリジメチルシロキサン (PDMS) を基盤材料にした基底および薄膜から構成され、PDMS 膜の膜下面へ陽圧または陰圧を与えることにより凸面または凹面を作り、その上に播種した細胞に伸展刺激および圧縮刺激を負荷する装置である (Masuda et al., J. Biotechnol. 2008)。有限要素解析の結果、PDMS 膜下面への陽圧によ

り凸面を形成した場合、凸面の中央で伸展刺激が負荷され、陰圧により凹面を形成した場合、凹面の中央で圧縮刺激が負荷されることが示されている。これに基づき本研究では、PDMS 膜に fibronectin でコーティングし、膜の凸面、凹面のそれぞれ中央に相当する部分に未分化間葉系細胞を播種し、細胞凝集が起こり初期の軟骨分化が起きるまで 3 日間培養後、細胞に伸展刺激、圧縮刺激を負荷した。機械的的刺激は 0~10% 程度の静的刺激と繰り返し刺激を負荷することができる。

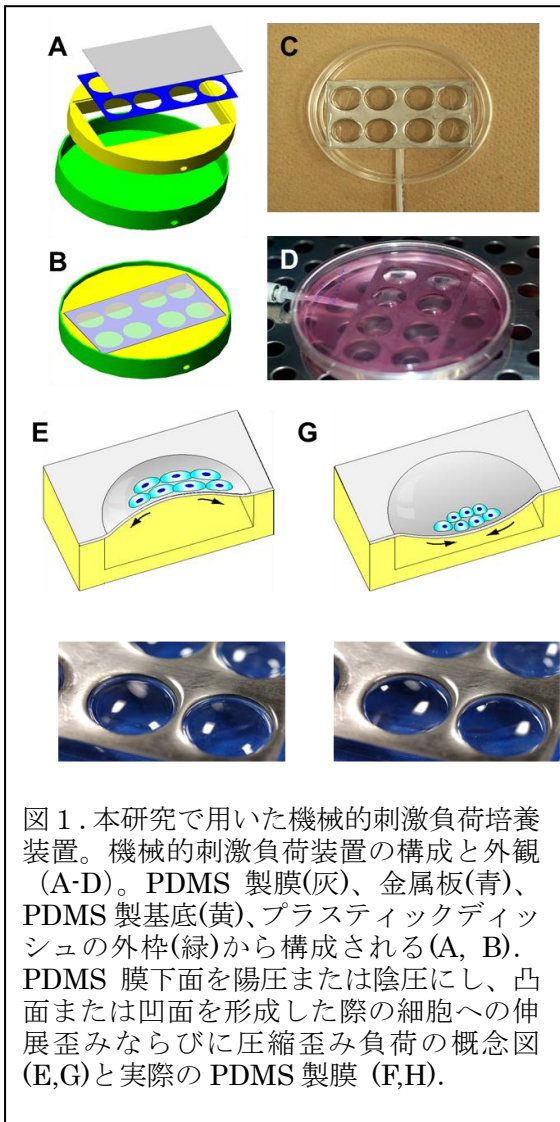


図 1. 本研究で用いた機械的的刺激負荷培養装置。機械的的刺激負荷装置の構成と外観 (A-D)。PDMS 製膜(灰)、金属板(青)、PDMS 製基底(黄)、プラスチックディッシュの外枠(緑)から構成される (A, B)。PDMS 膜下面を陽圧または陰圧にし、凸面または凹面を形成した際の細胞への伸展歪みならびに圧縮歪み負荷の概念図 (E,G)と実際の PDMS 製膜 (F,H)。

(3) 機械的伸展刺激および圧縮刺激負荷時の未分化間葉系細胞の軟骨分化の検討

①アルシアンブルー染色による軟骨分化の検討

伸展刺激および圧縮刺激の負荷は 24 時間ごとに段階的に 3 日間行った。非刺激負荷群を対照群とした。刺激負荷時間経過後、アルシアンブルー染色を行った。アルシアンブルー

陽性細胞の面積を算出し、軟骨に分化している細胞の割合を検討した。

②Sox9, col2a1 のリアルタイム PCR による検討

伸展刺激および圧縮刺激の負荷は 1)と同様の条件で行った。刺激開始 72 時間後に total RNA の精製を行い、逆転写による cDNA の合成を行った。合成された cDNA を用いて Sox9, col2a1 のリアルタイム PCR を行い、発現量を定量的に検討した。

(4) 機械的伸展刺激および圧縮刺激負荷時の MAPK の活性化の解析

①ウエスタンブロット法による MAPK 活性化の検討

伸展刺激および圧縮刺激を 1 時間負荷し、0, 15, 30, 60 分後に細胞からタンパクを採取し、ウエスタンブロット法により ERK1/2, p38 MAPK, の活性化の程度を定量的に検討した。これにより機械的的刺激に応答するシグナル伝達分子を特定し、刺激負荷後のシグナル伝達分子の活性化の経時的変化を解明した。また各種 MEK 阻害剤を用いてそれぞれの MAPK の活性化を抑制し、伸展刺激および圧縮刺激負荷に伴って起こる MAPK の活性化と未分化間葉系細胞の軟骨細胞への分化の関連を検討した。

②免疫染色による MAPK の核移行の検討

伸展刺激および圧縮刺激を 1 時間負荷し、60 分後に 4%パラホルムアルデヒドで室温にて 30 分間固定し、ERK1/2, pERK1/2 の免疫染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡で核移行を観察した。

4. 研究成果

(1) 機械的伸展刺激および圧縮刺激負荷時の未分化間葉系細胞の軟骨分化の検討

アルシアンブルー染色を行い、アルシアンブルー陽性細胞の面積を算出した結果、機械的伸展刺激を負荷した群では対照群に比べてアルシアンブルー陽性細胞の面積が有意に小さかった。さらに、これらの軟骨ノジュールを溶解して 570nm 付近での吸光度を測定した結果、同様の結果が得られた。

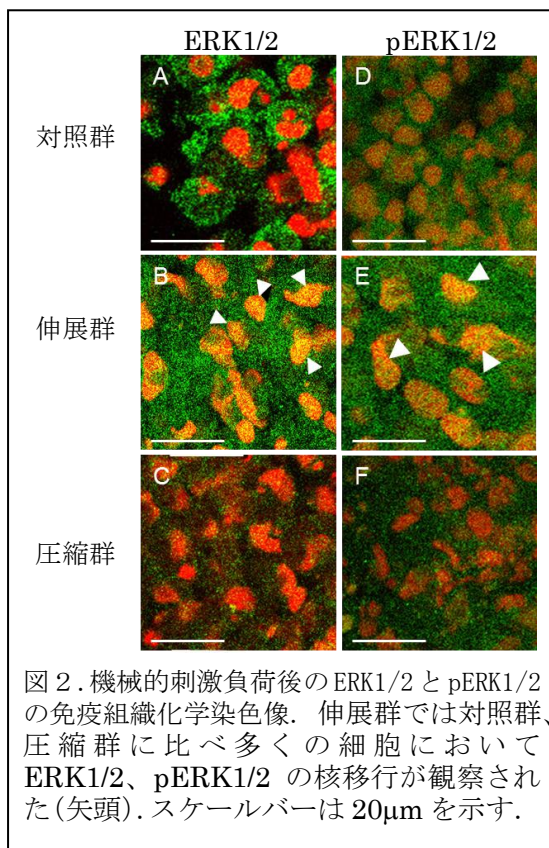
また、Sox9, col2a1 のリアルタイム PCR を行い、発現量を定量的に検討したところ、Sox9, col2a1 とともに機械的伸展刺激負荷群において有意に発現が減少し、圧縮刺激負荷群では増加する傾向がみられた。

以上より機械的伸展刺激は未分化間葉系

細胞の軟骨細胞への分化を抑制し、圧縮刺激は軟骨細胞への分化を促進する可能性が示された。

(2) 機械的伸展刺激および圧縮刺激負荷時の MAPK の活性化の解析

機械的刺激負荷 60 分後の軟骨細胞における ERK1/2 と pERK1/2 の局在を調べるため、免疫組織化学染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡により観察したところ、ERK1/2 は対照群と圧縮群において主に細胞質に存在しているのに対して、伸展群においては核移行が観察された。pERK1/2 は全ての群において細胞質と核の両方に認められたが、伸展群においては他の群に比べてより核に一致した局在が認められた (図 2)。



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 0 件)

[図書] (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高坂 久美子 (KUMIKO KOSAKA)

東北大学・大学院歯学研究科・大学院非常勤講師

研究者番号 : 30585336