

平成 21 年 5 月 21 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2006～2008

課題番号：18592228

研究課題名（和文）メカニカルストレスによる軟骨細胞分化の分子制御機構における MAPK の役割

研究課題名（英文）Roles of MAPKs in molecular response to mechanical stimulation in chondrocytes

研究代表者

高橋 一郎（TAKAHASHI ICHIRO）

東北大学・大学院歯学研究科・准教授

研究者番号：70241643

研究成果の概要：

本研究では、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、ERK-1/2の活性化阻害剤を培養系に添加することにより、分化中の軟骨細胞のメカニカルストレスレスポンスを阻害できることをII型コラーゲンの遺伝子発現の半定量的解析により解明した。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。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,700,000	0	1,700,000
2007年度	800,000	240,000	1,040,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	540,000	4,040,000

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：軟骨細胞分化、機械的刺激応答、細胞内情報伝達、ERK-1/2、細胞接着、MAPK阻害剤、圧縮力、牽引力

1. 研究開始当初の背景

顎口腔機能複合体の成長発育は、それ自身が果たす役割、すなわち咀嚼・発音機能と複雑に関連しながら遺伝的要因および環境的要因とに制御されていると考えられている。この成長発育は、鼻上顎複合体および下顎骨における軟骨内骨形成および膜内骨形成によって行われるが、その中でも下顎頭軟骨における成長発育は下顎骨の成長方向や成長量を決定する成長の場の一つとして重要な役割を担っている。加えて、顎関節を構成する下顎頭軟骨は、成長期に

においては成長板軟骨として、また、成長が終了してからは関節軟骨として機能する二次軟骨として分類され、長管骨の骨幹端に存在する一次軟骨である関節軟骨と成長板軟骨の機能を同時に果たす特徴を有している。これらの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、細胞外基質代謝、および細胞増殖を変化させて対応する組織である。歯科矯正治療においては種々の顎整形力を負荷することによって、この成長発育を制御する試みが行われてきた。また、多くの研究から咀嚼筋により発生するメカニカルストレスが顎顔面骨格形態の個体差の形成に大き

な役割を果たすことが示されてきた。さらに、軟骨組織に負荷される剪断応力は、軟骨組織を破壊し骨関節炎を惹起することも知られてきた。これらのことは、環境的因子としての機械的的刺激が軟骨細胞の分化、増殖、基質代謝に与える影響が大きく、また、重要な因子であることを示している。

軟骨細胞の分化は、軟骨細胞特異的にその遺伝子が発現する high mobility group (HMG)の転写因子 Sox5, Sox6 および Sox 9 によって制御されることが知られるようになった (Ng et al, 1996)。さらに、胎生期における軟骨細胞の分化は、これら HMG の遺伝子発現を通して II 型コラーゲンやアグリカンの遺伝子発現が起こることによって進行する。最近、この未分化間葉系細胞の軟骨細胞への分化過程は mitogen-activated protein kinase (MAPK)の一つである extracellular signaling- regulated kinase (ERK)-1/2 によって抑制的に制御されていることが示された (Bobick et al, 2004)。さらに、申請者らの検討により、機械的伸展刺激が軟骨細胞の分化を抑制することがすでに知られている。

2. 研究の目的

これまで、我々はメカニカルストレスが軟骨細胞分化に与える影響を分子レベルで解明することを目的として、おもに細胞-細胞外基質間に形成される接着斑を構成するインテグリン、細胞骨格、細胞骨格関連分子、細胞内シグナル伝達分子および細胞外基質分子の果たす役割を分子生物学的に解析してきた。特に、インテグリンを介した細胞外基質と細胞の接着を通して、Extracellular signal-regulated kinase (ERK) への細胞内情報伝達系の活性化を検討するために、半定量 RT-PCR 法を用いて ERK-1/2 の遺伝子発現を解析し、同時に免疫染色により ERK の発現とメカニカルストレス負荷に伴う ERK のリン酸化、核移行を検討した。培養軟骨細胞において ERK-1/2 の遺伝子発現が認められることを発見し、メカニカルストレス負荷を行っても遺伝子発現が変化しないことを見出した。本研究は、未分化間葉系細胞の軟骨細胞への分化過程に対する機械的伸展刺激の作用が ERK-1/2 による細胞内情報伝達系を経由していることを示すことを目的とした。

(1) 軟骨細胞の機械的伸展刺激応答機構において細胞-細胞外基質間接着が重要な働きを有していることが知られてきた。この細胞-細胞外基質間接着はインテグリンによるものであり、この接着を阻害すると機械的的刺激に対する応答が抑制されることが解明された。インテグリンを介した細胞内情報伝達機構においては ERK-1/2 に代表される MAPK が主要な働きを有していることはす

でよく知られている事実である。したがって、本研究においては、軟骨細胞への分化過程にある間葉系細胞の機械的伸展刺激応答過程において、ERK-1/2 が活性化され、遺伝子発現について検討する。

(2) ERK-1/2 のリン酸化による細胞内情報伝達系の活性化は、その特異的阻害剤である U0126 によって抑制されることが知られている。この、特異的阻害剤存在下において、機械的伸展刺激による間葉系細胞の軟骨細胞への分化抑制は阻害されると考えられる。同様に、この情報伝達経路に対する特異的阻害剤である PD98059 により阻害されることが示されてきた。したがって、本研究においては、軟骨細胞への分化過程にある間葉系細胞の機械的伸展刺激応答過程において ERK-1/2 を経由した細胞内情報伝達機構により、軟骨細胞特異的に発現している HMG 転写因子 Sox9 の発現を制御していることを検討する。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養および機械的伸展刺激負荷細胞培養系

本研究では、Sprague-Dawley 系、胎齢 12 日目の妊娠ラットを用いた。胎仔を摘出した後、さらに、前肢および後肢肢胚を採取した。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 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 4.66×10^6 cells/ml に再懸濁し、60ml の懸濁液 2 滴を図 1 に示すように Flexcell plate のウェル中心点を挟んで対象になるように播種した。軟骨細胞分化培養系 micromass culture については Solursh (1982) らの方法に従った。伸展力を負荷することができるように、培養プレート底面にスクリーンを設置し、上方に向かって突出するように回転させ伸展力の負荷を行った (図 1) (Takahashi et al, 2003)。

細胞を播種した後 3 日間、37°C、5%CO₂ 条件下にて培養し、その後、同培養条件下で伸展力の負荷を開始した。伸展力は初期負荷として 1.5mm の活性化の後、24 時間ごとに 0.5mm ずつ活性化を繰り返す、3 日目には 2.5mm の活性化量に達した。培養期間中、伸展刺激負荷開始前は毎日、培地交換を行った。伸展刺激開始後は、培地交換による刺激を避けるため培地交換を行わなかった。

(2) ERK 活性化の阻害

培養開始 3 日後からの伸展刺激負荷開始 1 時

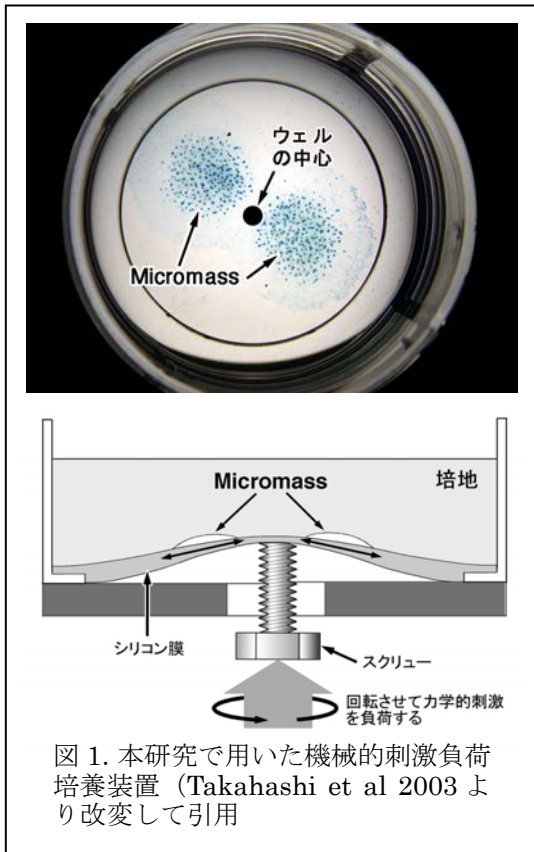


図 1. 本研究で用いた機械的刺激負荷培養装置 (Takahashi et al 2003 より改変して引用)

間前に ERK 活性化阻害剤である U0126 (MEK-1/2 阻害剤)あるいは PD98059 (MEK-1 阻害剤)を添加した。それぞれ 1.0、10.0 あるいは 100.0 μ M 並びに 0.5、5.0、あるいは 50.0 μ M となるように培地に添加した。対照群として、阻害剤の溶媒として用いた DMSO を培地に相当量添加した。阻害剤添加後、1 時間後に機械的刺激負荷を開始し、前述と同様に 24 時間ごとに活性化を繰り返し、機械的刺激負荷開始後 3 日目まで伸展刺激を継続した。

(3) タンパクの抽出と western blotting 法による解析

機械的刺激負荷開始後 60 分でタンパクの抽出を行った。タンパク抽出のための抽出バッファーにはタンパク質分解酵素阻害剤である Na-orthovanadate, NaF, aprotinin, leupetin および Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) 含有のものを使用した。タンパク濃度を Micro BCA protein assay kit を用いて測定した後、サンプル中のタンパク濃度を一定 (1mg/ml) にし、以下の分析を行った。

サンプルは、それぞれ、10mg/lane となるように 12.5% SDS-PAGE に泳動した。泳動したサンプルを nitrocellulose 膜に転写し、western blotting 法による解析を行った。まず、ERK-1/2 について、総量を確認するために非リン酸化 ERK 抗体を用い、化学発光法により検討した。

次に、このメンブレンより抗体を除去し、新たにリン酸化 ERK-1/2 抗体を用い、リン酸化された ERK-1/2 について解析を行った。一次抗体には anti-p42/44 MAPK 抗体 (Cell signaling technology 社製)と anti-phospho p42/44 MAPK 抗体を用い、二次抗体には HRP-conjugated anti-mouse IgG 抗体を用いた。

化学発光反応後、メンブレンを洗浄し、高感度化学発光検出用フィルムに感光した後、現像処理を行った。フィルムの画像をスキャナ EPSON 2200 によりデジタルデータに変換し、画像解析ソフトウェア Image J (NIH, Bethesda MD, USA) を用いて、それぞれのバンドの濃度について定量的解析を行った。

(4) アルシアンブルー染色法による検討

伸展刺激負荷後 4 日目にアルシアンブルー染色を行った。培養細胞を 0.1N 塩酸/95%エタノール溶液にて固定し、0.5% Alcian blue 8GX/1M 塩酸溶液にて 4 $^{\circ}$ C 下で 12 時間染色した。その後、PBS で洗浄し、実態顕微鏡下においてデジタルカメラ (Coolpix 995, Nikon) にて写真撮影を行った。採得したデジタル画像は Image J により二値化処理し、アルシアンブルー陽性軟骨のジュールの面積の測定に用いた。

また、アルシアンブルー染色を行った培養組織に 8M グアニジン塩酸塩溶液 500ml を添加し、室温で 24 時間、組織を溶解した。この溶解液を用いて 570nm 付近における吸光度の測定を行った。

(5) RT-PCR 法による検討

培養開始後 3 日目の機械的刺激負荷開始後より total RNA の抽出を行った。採取した total RNA の濃度を測定し、逆転写を行った後、半定量 PCR により II 型コラーゲン遺伝子ならびに Sox9 遺伝子の発現量を測定した。本研究で用いた RT-PCR の条件および使用したプライマーなどについては、これまでの論文にしたがった (Onodera et al, 2005)。すなわち、total RNA を採取し、SuperScript II 逆転写酵素を用いて逆転写を行ったのち、PCR マシン (PTC-100, MJ Research) を用いて増幅を行い、2%アガロースゲルに電気泳動後、エチジウムブロマイドにてゲルを染色、ゲル撮影装置にてバンド画像をデジタル化した。このデジタル画像を Image J ソフトウェアにて解析し、遺伝子発現量を判定的に検討した。

4. 研究成果

(1) MEK 阻害剤による ERK-1/2 活性化の阻害効果

MEK-1/2 阻害剤 U-0126 あるいは MEK-1 阻

害剤 PD98059 の添加により、ERK-1/2 の活性化は阻害された。写真には示さないが、これまでに示されてきたとおり、これらの阻害剤は ERK-1/2 のリン酸化(活性化)を完全に阻害した。

(2) 機械的伸展刺激による軟骨細胞分化抑制における ERK-1/2 の役割

①アルシアンブルー染色による評価

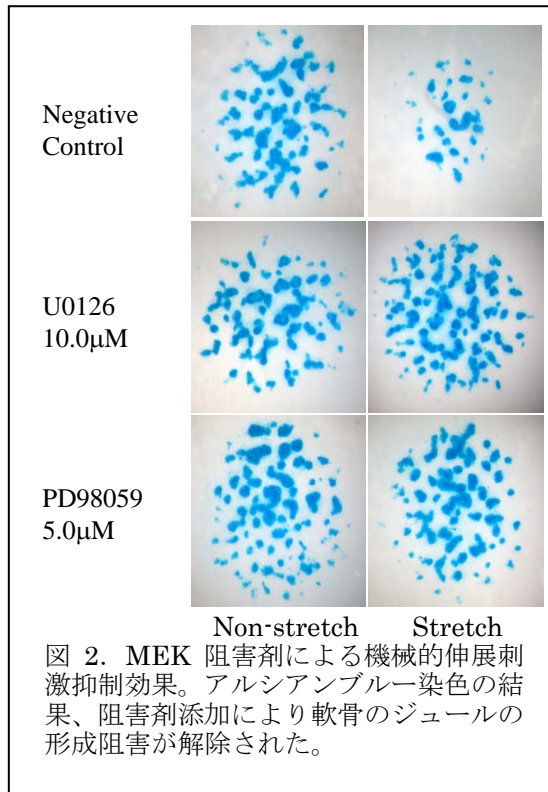


図 2. MEK 阻害剤による機械的伸展刺激抑制効果。アルシアンブルー染色の結果、阻害剤添加により軟骨のジュールの形成阻害が解除された。

アルシアンブルー染色を行った結果、MEK 阻害剤を添加して機械的伸展刺激を負荷しても、軟骨ノジュール形成を抑制することができないことが示された(図2)。この分化抑制阻害活性は濃度依存的であり、U0126 では 10.0µM 以上、PD98059 では 5.0µM 以上で認められた。

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(図3)。

②II 型コラーゲン遺伝子 Col2a1 の発現量の評価

II 型コラーゲンの遺伝子である Col2a1 の発現を検討した結果、伸展力の負荷に伴って抑制された Col2a1 の遺伝子発現が MEK 阻害剤の添加に伴って回復することが示された。Col2a1 遺伝子は軟骨細胞の分化マーカーとして知られ、この遺伝子発現が上昇することは、すなわち、軟骨細胞分化の促進を示し、逆に低下は分化抑制を示す。また、U0126 お

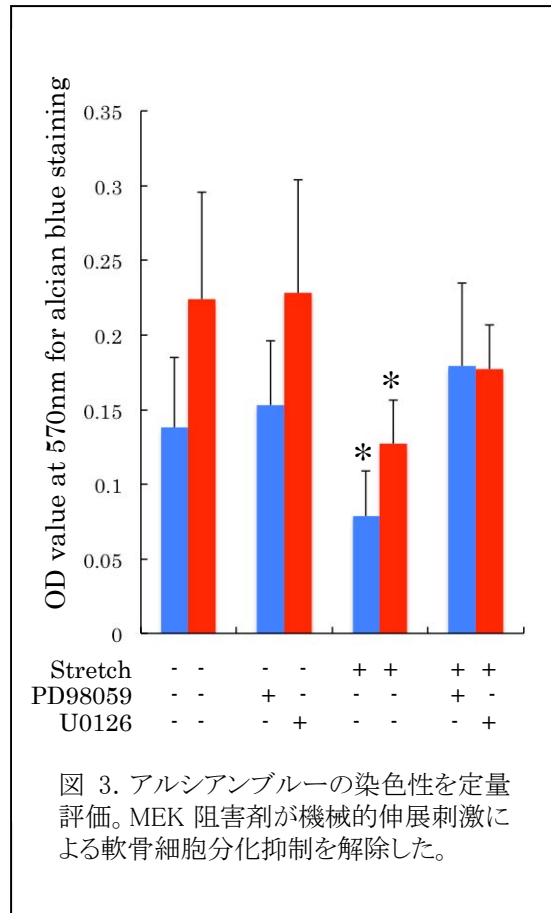


図 3. アルシアンブルーの染色性を定量評価。MEK 阻害剤が機械的伸展刺激による軟骨細胞分化抑制を解除した。

よび PD98059 の双方が同等の抑制解除効果

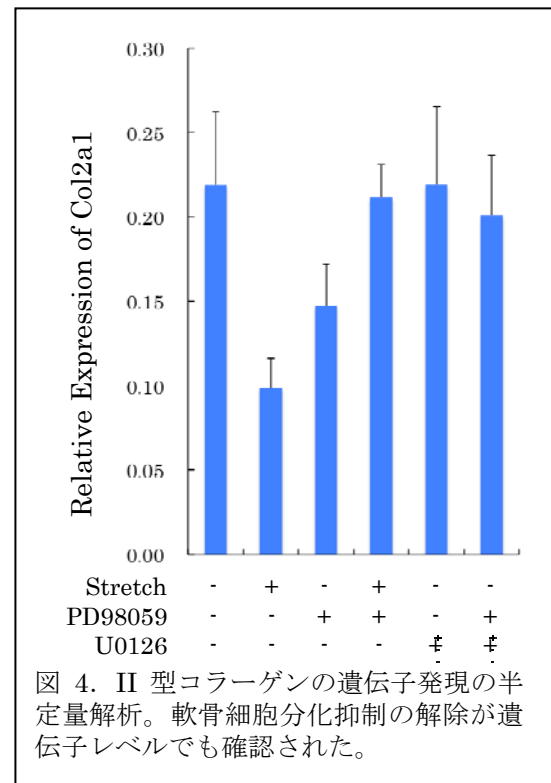


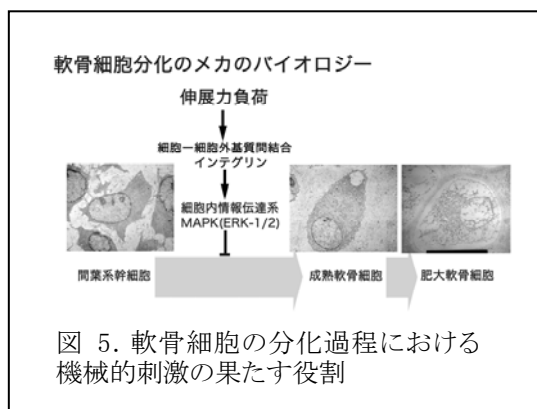
図 4. II 型コラーゲンの遺伝子発現の半定量解析。軟骨細胞分化抑制の解除が遺伝子レベルでも確認された。

を示したことから、両方の阻害剤によって活性を阻害される MEK1-ERK-1 のシグナル伝

達系が、主に軟骨細胞における機械的刺激の細胞内情報伝達に寄与しているものと考えられた。

(3) 機械的伸展刺激による軟骨細胞の分化制御の分子メカニズム

今回の研究と、これまでの我々の研究から、軟骨細胞の分化は機械的伸展刺激により抑制され、圧迫刺激によって促進されることが示唆された。この機械的伸展刺激の細胞内における情報伝達には ERK-1 が主体的に関与していることが示唆された。これまでの多くの研究では、機械的刺激に対して細胞の代謝機能が応答し細胞増殖や代謝が活性化されることが示されてきたが、本研究は機械的刺激が間葉系細胞の分化過程を制御することを示した。



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 4 件)

1. Takahashi I, Masuda T, Kohsaka K, Terao F, Anada T, Sasano Y, Takano-Yamamoto T, Suzuki O, Molecular mechanisms of mechanical stress response during chondrogenesis. J Biomech Sci Eng, 2009 (in press) 査読有り
2. Masuda T, Takahashi I, Anada T, Arai F, Fukuda T, Takano-Yamamoto T, Suzuki O. The differentiation of chondrocytes under cyclic mechanical strain by unique culture system. J Biotechol 13: 231-238, 2007. 査読有り
3. Takahashi I, Masuda T, Arai F, Anada T, Fukuda T, Suzuki O, Takano-Yamamoto T, Mechanobiological signal transduction in differentiating chondrocyte and new configuration for mechanical stress culture. Proceedings of the 2nd IEEE International Conference on Nano/Micro Engineered and

Molecular Systems, 1061-1064, 2007 査読有り

4. Takahashi I, Terao F, Masuda T, Sasano Y, Suzuki O, Takano-Yamamoto T, Mechanical stretch inhibits chondrogenesis through ERK1/2 phosphorylation in micromass culture. Interface Oral Health Science 2007, 161-166, 2007. 査読有り

[学会発表] (計 7 件)

1. Takahashi I, Molecular mechanisms of response to mechanical stimulation in chondrocyte differentiation. The 3rd International Symposium for Interface Oral Health Science, 2009 年 1 月 15, 16 日, Sendai.
2. 鈴木治, 高橋一郎, 益田泰輔, 山本照子, 新井史人, 硬組織形成細胞の分化とメカニカルストレス, 第 31 回 日本バイオレオロジー学会, 2008 年 6 月 5, 6 日, 東京.
3. 高橋一郎, 益田泰介, 高坂久美子, 寺尾文恵, 笹野泰之, 鈴木治, 山本照子. 軟骨細胞における機械的刺激応答の分子機構について. 第 5 回 東北大学バイオサイエンスシンポジウム, 2008 年 5 月 19 日, 仙台.
4. 高橋一郎, 寺尾文恵, 高坂久美子, 益田泰介, 笹野泰之, 鈴木治, 山本照子. 機械的伸展刺激は ERK1/2 シグナルの活性化を介して軟骨細胞の分化を抑制する. 第 29 回 東北骨代謝研究会, 2008 年 2 月 2 日, 仙台.
5. 高橋一郎, 益田泰輔, 寺尾文恵, 笹野泰之, 鈴木治, 山本照子, 軟骨細胞の機械的刺激応答機構における MAPK が果たす役割. 第 4 回 東北大学バイオサイエンスシンポジウム, 2007 年 6 月 4 日, 仙台
6. Masuda T, Takahashi I, Matsui A, Arai F, Takano-Yamamoto T, Suzuki O, Development of mechanical strain cell culture system for mechanobiological analysis. 第 2 回 International Symposium for Interface Oral Health Science in Sendai, 2007 年 2 月 18, 19 日, Sendai, Japan.
7. Takahashi I, Masuda T, Arai F, Anada T, Fukuda T, Suzuki O, Takano-Yamamoto Y, Mechanobiological signal transduction in differentiating chondrocyte and new configuration for mechanical stress culture. IEEE-NEMS 2007 年 1 月 16-19 日, Bangkok, Thailand.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 一郎 (TAKAHASHI ICHIRO)

東北大学・大学院歯学研究科・准教授

研究者番号 : 70241643