

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 18日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390545

研究課題名（和文） 軟骨細胞のメカニカルストレス応答における
細胞内情報伝達のリアルタイム解析研究課題名（英文） Real-time analysis of signal transduction pathways in chondrocytes
under the mechanical stress

研究代表者

高橋 一郎（TAKAHASHI ICHIRO）

九州大学・歯学研究院・教授

研究者番号：70241643

研究成果の概要（和文）：

本研究では、蛍光標識された ERK (ERK-GFP) を導入することにより、ERK-GFP を安定して発現する軟骨前駆細胞である ATDC5 細胞株を確立し、機械的刺激負荷に対する ERK の活性化と核移行をリアルタイムで観察することにより、1 細胞内における動態の可視化に成功した。さらに刺激負荷により引き起こされる ERK の活性化・核移行はきわめて即時的な反応であることを示した。

研究成果の概要（英文）：

We established ATDC5 cells expressing ERK-GFP fusion protein to investigate ERK activation and nuclear translocation in real time in a single cell. After application of mechanical stress by using micromanipulator, we observed a translocation of the ERK-GFP fusion protein from the cytoplasm to the nucleus immediately.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	11,000,000	3,300,000	14,300,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,900,000	570,000	2,470,000
年度			
年度			
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

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：歯科矯正学，メカニカルストレス，リアルタイム解析，軟骨細胞，
細胞内情報伝達

1. 研究開始当初の背景

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、報告者等のグループは下顎頭軟骨や正

中口蓋縫合軟骨を含めた二次軟骨が機械的伸展刺激により分化抑制を受け、軟骨組織が骨組織に置換することを組織学的、あるいは、組織特異的マーカーである II 型コラーゲンあるいはオステオカルシンの特異抗体を用いて免疫組織学的に示してきた (Anat Rec 1995, Bone 1996)。一方、正中口蓋縫合軟骨の成熟軟骨細胞は機械的圧縮刺激により、肥大軟骨細胞へと分化促進されること、マウス胎仔由来間葉系幹細胞に対して、コラーゲンゲル 3 次元培養を用いて圧縮力を負荷すると軟骨細胞への分化が促進されることも示してきた (J Cell Sci 1998, Anat Rec 2000)。これらのことから、軟骨細胞の分化は機械的刺激に影響を受け、機械的刺激の方向に依存して制御されていることが示唆された。

さらに、報告者らは、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 signal-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 (Eur J Cell Biol 2003)。同時に、共焦点レーザー顕微鏡を用いた *in vivo* の解析において、機械的伸展刺激によって、軟骨細胞にアクチンフィラメントによるストレスファイバーが形成され、細胞分化が抑制されることも示してきた。報告者らは、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系に対する機械的刺激負荷装置を開発し (Eur J Cell Biol 2005, J Biotechnol 2007)、軟骨細胞の機械的刺激応答の分子メカニズムを検討した。これらの研究により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須であることを示した (Eur J Cell Biol 2005)。

これらの検討から、軟骨組織を構成する細胞集団としての軟骨細胞の機械的刺激に対する応答能やその分子メカニズムについては解明が進んできた。しかしながら、単一の軟骨細胞が、方向性のある機械的刺激に対して、方向特異的に応答するメカニズムについてはわかっていない。

2. 研究の目的

GFP 融合 ERK タンパクを安定して発現する ATDC5 細胞株を確立し、新たに開発するタイムラプス顕微鏡システム上で使用可能な機械的刺激負荷装置を用いて、ERK の活性化をリアルタイムで解析することにより、軟骨前駆細胞における機械的刺激応答の分子メカニズムを解明する。

3. 研究の方法

(1) GFP 融合タンパク発現ベクターの作製

ERK1 および ERK2 遺伝子の cDNA 全長 PCR 法

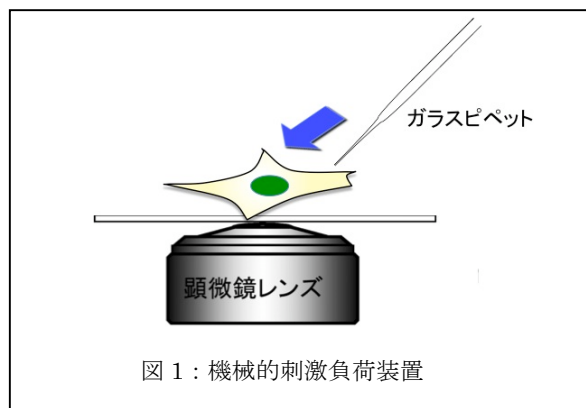
を用いて増幅、pcDNA 6.2/EmGFP/TOPO ベクターへ挿入し、GFP 融合 ERK (ERK-GFP) タンパクの発現ベクターを作製した。

(2) ERK-GFP 安定発現 ATDC5 細胞の作製

理化学研究所より前駆軟骨細胞株である ATDC5 細胞を入手し、10%ウシ胎仔血清 (FBS) を含む DMEM/F12 の混合培地を用いて 5%CO₂ 下にて培養を行った。Lipofectamine LTX (Invitrogen 社) を用いて前述の発現ベクターを ATDC5 にトランスフェクションし、プラスチック存在下で培養することにより ERK-GFP 安定発現株を得た。

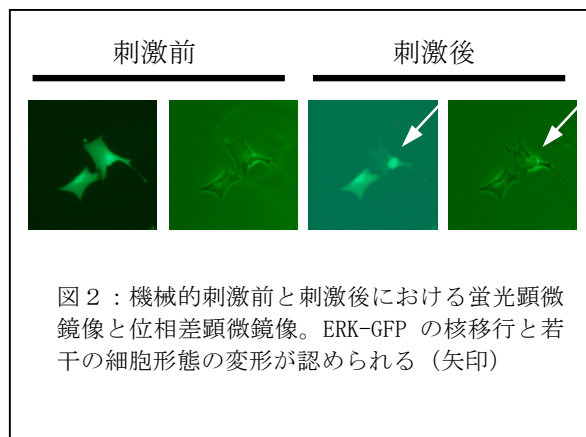
(3) 細胞への機械的刺激の負荷

樹立した細胞をガラスベースディッシュ (IWAKI 社) へ播種し、観察前には非 CO₂ 供給下における細胞増殖に適した Leibobitz's L-15 培地 (Invitrogen 社) への交換を行った。マイクロマニピュレータとガラスピペットを用いて機械的刺激を負荷し (図 1)、蛍光顕微鏡下にてタイムラプス観察に供した。

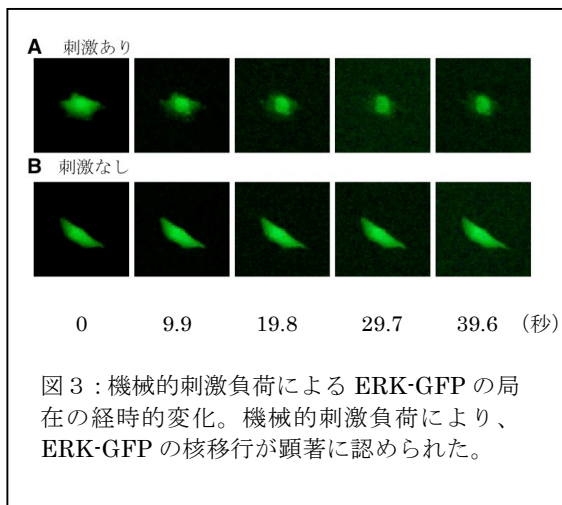


4. 研究成果

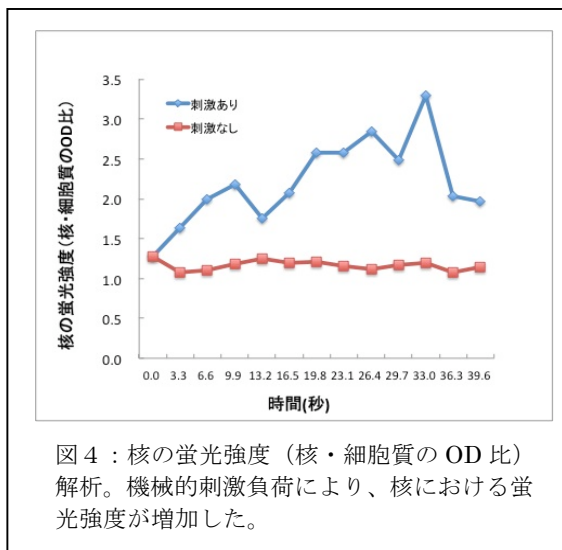
マイクロマニピュレータによる刺激開始直後より ERK-GFP の核移行が認められ、また、細胞形態にも若干の変形が認められた (図 2)。



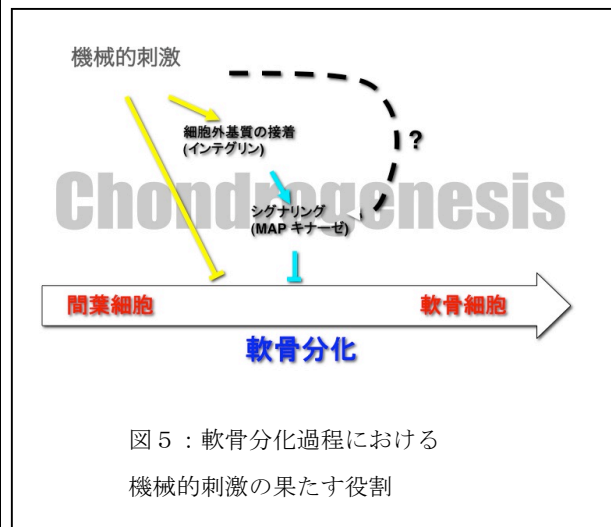
続いて、ERK-GFP の細胞内動態を経時的に解析したところ、刺激開始直後より核移行が観察され、約 40 秒後には細胞質における ERK-GFP はほとんど検出されなくなった (図 3)。



この ERK-GFP 核移行の経時変化について蛍光強度による解析を行った結果、刺激負荷直後より核の蛍光強度の増加が認められた (図 4)。



これまでの我々の研究では、軟骨細胞の分化は機械的刺激により抑制され、この細胞内情報伝達系における ERK と細胞-細胞外基質間接着が関与している可能性を示してきた。本研究の機械的刺激負荷システムにおいて 1 細胞内での動態を可視化することに成功した。さらに刺激負荷により引き起こされる ERK の活性化はきわめて即時的な反応であることを示した。細胞形態が変化することにより、インテグリンなどの細胞外基質の接着因子のシグナルを介して ERK の活性化が起こっていることが示唆された (図 5)。



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 22 件)

1. Terao E, Takahashi I, Mitani H, Haruyama N, Sasano Y, Suzuki O, Takano-Yamamoto T. Fibroblast growth factor 10 regulates Meckel's cartilage formation during early mandibular morphogenesis in rats. Dev Biol 350(2): 337-47, 2011.2 査読有り
2. Honda J, Kobayashi I, Kiyoshima T, Nagata K, Wada H, Ookuma Y, Fujiwara H, Shiotsuka M, Takahashi I, Sakai H. In situ expression of the mitochondrial ATPase6 gene in the developing tooth germ of the mouse lower first molar. J Mol Histol 42(1):83-90, 2011.2 査読有り
3. Deguchi T, Kurosaki H, Oikawa H, Kuroda S, Takahashi I, Yamashiro T, Takano-Yamamoto T. Comparison of orthodontic treatment outcomes in adults with skeletal open bite between conventional edgewise treatment and implant-anchored orthodontics. Am J Orthod Dentofacial Orthopedics 139(4): S60-S68, 2011.4 査読有り
4. Shimomura T, Ioi H, Nakata S, Counts AL. Evaluation of well-balanced lip position by Japanese orthodontic patients. Am J Orthod Dentofacial Orthop 139(4):e291-e297, 2011.4 査読有り
5. Nagata M, GH.Nuckolls, X Wang, L Shum, Seki Y, Kawase T, Takahashi K, Nonaka K, Takahashi I, AA.Nomar, Suzuki K, Slavkin HC. The primary site of the acrocephalic feature in Apert syndrome is a dwarf

cranial base with accelerated chondrocytic differentiation due to aberrant activation of the FGFR2 signaling. Bone 48:847-856. 2011.4 査読有り

6. Hayashida H, Ioi H, Nakata S, Takahashi I, Counts AL. Effects of retraction of anterior teeth and initial soft tissue variables on lip changes in Japanese adults. Eur J Orthod 33(4): 419-26. 2011.8 査読有り
7. Tsutsumi K, Matsuda M, Kotani M, Mizokami A, Murakami A, Takahashi I, Terada Y, Kanematsu T, Fukami K, Takenawa T, Jimi E, Hirata M. Involvement of PRIP, phospholipase C-related, but catalytically inactive protein, in bone formation. J Biol Chem 286(35): 31032-42, 2011.9 査読有り
8. Endo M, Terajima M, Goto T, Tokumori K, Takahashi I. Three-dimensional analysis of the temporomandibular joint and fossa-condyle relationship. Orthodontics 12(3):210-221, 2011.Fall 査読有り
9. Hagiwara Y, Ando A, Chimoto E, Tsuchiya M, Takahashi I, Sasano Y, Onoda Y, Suda H, Itoi E. Expression of collagen type 1 and 2 on articular cartilage in a rat knee contracture model, Connective Tissue Research 51:22-30, 2010. 査読有り
10. Shimonishi M, Takahashi I, Terao F, Komatsu M, Kikuchi M. Induction of MMP-2 at the interface between epithelial cells and fibroblasts from human periodontal ligament. J Periodont Res 45: 309-316, 2010. 査読有り
11. Takahashi I, Masuda T, Kohsaka K, Terao F, Ando T, Sasano Y, Yamamoto T, Suzuki O. Molecular mechanisms of mechanical stress response during chondrogenesis, J Biomechanical Science and Engineering 4(3):307-317, 2009 査読有り

[学会発表] (計 47 件)

1. Shiotsuka M, Wada H, Kiyoshima T, Kobayashi I, Nagata K, Fujiwara H, Takahashi I, Sakai H. Expression pattern and possible function of thymosin beta-10 in developing tooth germ compared with thymosin beta-4. The 6th International Joint Symposium on “Dental and Craniofacial Morphogenesis and Tissue Regeneration” and “Oral Health Science”(第6回国際シンポジウム) 2011.3.4-5, Fukuoka.
2. Murata N, Ioi H, Ohuchi M, Takao T, Oida

H, Yamaza T, Takahashi I, Kido MA. Effects of allergic inflammation on orthodontically induced tooth root resorption. The 6th International Joint Symposium on “Dental and Craniofacial Morphogenesis and Tissue Regeneration” and “Oral Health Science”(第6回国際シンポジウム) 2011.3.4-5, Fukuoka.

3. Ioi H, Kang S, 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, Chicago, IL, 2011.5.14.
4. Nomura S, Tsuru K, Valanezhad A, Matsuya S, Takahashi I, Ishikawa K. Fabrication of Carbonate Apatite Block from Calcium Sulfate by Hydrothermal Treatment. BIOCERAMICS 23, Istanbul, Turkey 07.11.2011
5. 寺尾文恵、高橋一郎、三谷英稔、春山直人、笹野泰之、鈴木治、山本照子 胎生期下顎形成期におけるFGF10によるメッセル軟骨形態の制御、第29回日本骨代謝学会学術集会、2011.7.28-30, 大阪市
6. Terao F. FGF10 contributes Meckel's cartilage formation in early mandibular development. The 6th International Workshop on Nano-, Bio- and Amorphous Materials, Zao, Miyagi, 2011.8.8-9.
7. Takahashi I: Mechano-Biology of cytoskeletal reorganization in differentiating chondrocytes. International Workshop on Nano, Bio and Amorphous Materials, Miyagi-Zao, 2010.8.9-10
8. 本田淳也, 小林家吉, 坂井英隆, 高橋一郎: 歯胚における phosphoglycerate kinase (Pgk)1 タンパクの局在とその新しい役割について. 第69回日本矯正歯科学会大会, 横浜市, 2010.9.27-29.
9. Terao F, Takahashi I, Mitani H, Haruyama N, Sasano Y, Suzuki O, Takano-Yamamoto T: Fibroblast growth factor 10 and Meckel's cartilage formation in the early mandibular morphogenesis, The 5th International Symposium on Dental and Craniofacial Morphogenesis and Tissue Regeneration: A View from Stem Cell Research (第5回国際シンポジウム「口腔組織の再生・再建医療研究」), 福岡市, 2010.2.5
10. Ayako Murakami, Miho Matsuda, Koushirou Tsutsumi, Masato Hirata, and Ichiro Takahashi. Studies on

characterization of the gene structure and transcriptional regulation of a novel inositol 1,4,5-trisphosphate binding protein, possibly involved in bone metabolism. The 5th International Symposium on Dental and Craniofacial Morphogenesis and Tissue Regeneration: A View from Stem Cell Research (第5回国際シンポジウム「口腔組織の再生・再建医療研究」), 福岡市, 2010.2.5

11. Islam R, Kitahara T, Naher L, Takahashi I. Lip-morphological differences between class II and class III molocclusion before/after orthodontic treatment. International Association for Dental Research, Spain-Barcelona, 2010.7.14-17.
12. Murata N, Ioi H, Takahashi I, Kido MA. Effect of allergic inflammation on the orthodontically induced root resorption. International Association for Dental Research, Spain-Barcelona, 2010.7.14-17.
13. Ioi H, Nakata S, Counts AL. Effects of buccal corridors on smile esthetics in Japanese. 109th annual session of American Association of Orthodontists, Boston, USA, 2009.

[その他]

<http://www.ortho.dent.kyushu-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

山本 照子 (YAMAMOTO TERUKO)
東北大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号：00127250

五百井 秀樹 (IOI HIDEKI)
九州大学・大学病院・講師
研究者番号：10274474

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