

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390462

研究課題名(和文) 下顎頭軟骨細胞の分化成熟過程における機械的刺激応答の分子メカニズムの解明

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of mechanical response of mandibular condylar cartilage cells during chondrogenic differentiation.

研究代表者

高橋 一郎 (TAKAHASHI, ICHIRO)

九州大学・歯学研究科(研究院)・教授

研究者番号：70241643

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,500,000円

研究成果の概要(和文)：マウス胎生期下顎頭由来細胞および四肢胚由来細胞の高密度培養に機械的伸展刺激を負荷したところ、下顎頭軟骨由来細胞ではCaveolin-1, Galectin-3およびPatchedは減少、Caspase-3は増加した。また、Caveolin-1, Galectin-3およびPatchedの発現は、マウス胎生期下顎頭軟骨の形成・分化が進むにつれ増加した。以上のことから、下顎頭由来細胞における機械的伸展刺激負荷による軟骨分化制御には、特異的な機械的刺激応答分子としてCaveolin-1, Galectin-3およびPatchedが深く関与していることを示した。

研究成果の概要(英文)：To investigate the mechanism of mechanical stress-induced inhibition of chondrogenic differentiation, we applied the mechanical tensile force to micromass cell culture from mouse embryonic limb bud or mandibular condylar cartilage (MCC). Mechanical stretching enhanced the expression of Caspase-3, and repressed the expression of Caveolin-1, Galectin-3, Patched in MCC micromass culture by antibody array analysis. Immunohistochemical analysis showed up-regulation of Caveolin-1, Galectin-3 and Patched during MCC development. These results indicate that Caveolin-1, Galectin-3 and Patched are associated specifically with as mechanical response of cartilage differentiation in MCC.

研究分野：医歯薬学

キーワード：歯学 細胞・組織 再生医療 下顎頭軟骨

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 下顎頭軟骨と歯科矯正臨床

顎関節は、ヒトの顔面骨格の成長発育ならびに咀嚼機能を担う最も重要な器官の一つである。特に、歯科矯正臨床においては、下顎頭軟骨の成長制御の困難性や機械的刺激負荷に伴う骨関節症の発症など、成長期から成人に至るまで下顎頭軟骨や顎関節の関わる未解決の問題が数多く残されている。

### (2) 軟骨分化と機械的刺激負荷

我々はこれまで、下顎頭軟骨の成長発育について、長管骨の一次軟骨と比較しながら、コラーゲンやアグリカンなどの細胞外基質、Matrix metalloproteinases (MMPs)やアグリカナゼなどの分解酵素およびその阻害分子である Tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMPs)の成長に発現局在の成長に伴う変化に関する検討を行ってきた。また、下顎頭軟骨の成長発育ならびに一次軟骨細胞の機械的刺激応答の分子メカニズムについて、四肢胚由来間葉系幹細胞をモデルとして機械的刺激応答の分子機構について検討し、軟骨細胞分化のモデルとしてラット四肢胚を用い、軟骨細胞分化の過程における機械的刺激応答の分子機構について検討してきた。機械的伸展刺激負荷により軟骨分化は抑制され、mitogen-activated protein kinase (MAPK)の活性化と細胞-細胞外基質間の接着が機械的刺激に対する応答において主要な役割を果たしていることを解明してきた。

## 2. 研究の目的

下顎頭軟骨に直接焦点を当て、これまで検討してきた一次軟骨と比較しながら、下顎頭軟骨の細胞分化と分化形質維持のための分子機構と、これに対して機械的刺激応答分子が果たす役割について網羅的に検討する。これらの検討により、顎顔面の成長発育に下顎頭軟骨が果たす役割と機械的刺激からの影響、および、過重負荷に伴う下顎頭軟骨破壊の分子メカニズムの解明に挑戦する。

## 3. 研究の方法

### (1) マウス胎生期由来細胞の高密度培養

これまで、我々はラット胎齢12日の四肢胚を採取し、シリコンを底面に持つFlex Iプレートを用いて細胞に伸展力を負荷してきたが、ラットからマウスへと動物種を変更し、また、販売中止となったFlex Iの後継品である

Bioflexを用いた際の下顎頭由来細胞および四肢胚由来細胞を用いた培養条件を新たに設定するため、胎齢12日のマウス胎仔から下顎頭(MCC)を、胎齢10日のマウス胎仔からは四肢胚を冷PBS下にて摘出した。トリプシン・コラーゲナーゼ液にて細胞を処理後、 $2 \times 10^6$ ,  $3 \times 10^6$ ,  $4 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$  cells/mlの濃度で、シリコン底面にI型コラーゲンコート処理を行った培養ディッシュ(BioFlex, Flexcell International Corp.)のウェルの真ん中へ60  $\mu$ lのスポット状に播種し、10%FBS添加DMEM培地にて培養を行った。培養開始7日後、ホールマウントアルシアンブルー染色を行った。

### (2) 伸展力の負荷

MCC 由来細胞および四肢胚由来細胞をそれぞれ  $3 \times 10^6$  cells/ml および  $5 \times 10^6$  cells/ml に懸濁した後、BioFlex 上に 60  $\mu$ l のスポット状に播種し、10%FBS 添加 DMEM 培地にて培養した。軟骨ノジュール形成開始直後、BioFlex の底面に、ネジをつけたアクリル半球付きプレートを設置、ネジを5回転させることにより伸展力を負荷し、60分間の刺激負荷を行った。

### (3) タンパクの回収

プレートをPBSで2回洗浄し、セルスクレーパーにて軟骨ノジュールを回収した。2,000 rpm で2分間遠心し、余分なPBSを除去後、液体窒素にて凍結を行った。

### (4) 抗体アレイ

Signaling Antibody Array (Full Moon Biosystems)を用いて、網羅的タンパク質発現解析を行った。ビオチン化したタンパク質をアレイにアプライして抗原抗体反応させた。洗浄後、Cy-3-Streptavidin をアレイへアプライし、ビオチン-アビジン反応させた。洗浄後、GenePix 4400A (Filgen)にて蛍光発光画像を読み取り、Array-Pro Analyzer (Media Cybernetics Inc.)にて解析を行った。

### (5) 免疫染色

抗体アレイにて MCC 特異的に変動がみられ

たタンパクの発現を検討した。胎齢 14 日および 17 日のマウス胎仔から冷 PBS 下にて頭部を切り出し、4% Paraformaldehyde にて固定を行った。エタノール脱水、レモゾールにて透徹後、パラフィン包埋を行い、6 $\mu$ m のパラフィン切片を作製した。脱パラフィン、親水化を行い、Citrate buffer にて Microwave 処理を行った後、0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処理、5% BSA 含有 PBS にてブロッキング後、Caveolin-1, Galectin-3 および Patched 抗体を反応させた後、二次抗体を添加、DAB 溶液を用いて免疫染色を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) 培養条件の設定

ホルマウントアルシアンブルー染色の結果から、BioFlex プレートへの播種を行う最適条件は、四肢胚は 5 $\times 10^6$  cells/ml、MCC では 3 $\times 10^6$  cells/ml で 1 スポット 60  $\mu$ l であることが分かった。

##### (2) 機械的伸展刺激負荷装置の解析

メンブレンの厚み (Flex I: 2 mm, BioFlex: 0.5 mm) や well の表面積の違い (Flex I: 4.91 cm<sup>2</sup>, Bioflex: 9.62 cm<sup>2</sup>) を考慮し、伸展力を負荷するネジの先端を半球状に加工することにより、メンブレンの厚みの違いにより生じた伸展領域の減少を解消することができた。有限要素解析を行うことにより、この装置を用いて伸展力を負荷した際、シリコンメンブレンにおける細胞の播種領域には、ネジを 5 回転すると細胞を播種した領域に 0.1% 以上のひずみが付加されることを明らかにした。

##### (3) 抗体アレイ

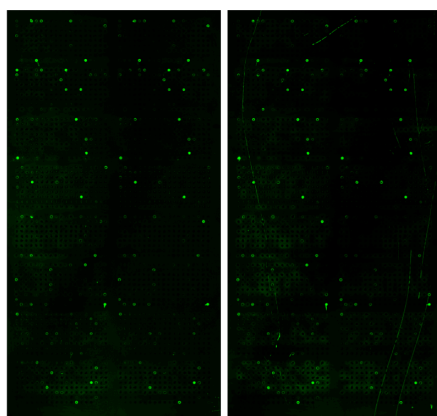


図 1: MCC の抗体アレイ解析

MCC 由来細胞および四肢胚由来細胞の高密度培養に機械的伸展刺激を 60 分間くわえた後、回収したタンパクを用いた抗体アレイ解析 (図 1) により、下顎頭由来細胞における伸展刺激負荷により、Caspase-3 において有意に増加が認められ、Caveolin-1, Galectin-3 および Patched において有意に減少が認められた。一方、四肢胚への伸展刺激負荷では同様の傾向は認められなかった。

##### (4) 免疫染色

胎齢 14 日の下顎頭において、Caveolin-1 の発現は認められなかったが、Galectin-3 および Patched は下顎頭原基で陽性を示した。胎齢 17 日の下顎頭においては、Caveolin-1 は下顎頭軟骨の線維層および関節円板原基において、弱く陽性であった。Galectin-3 は、下顎頭全体で強く陽性を示したのに対し、Patched は、下顎頭全体に陽性は認められるが、特に前肥大および肥大軟骨細胞層において強く陽性であった。

以上のことから、MCC 由来細胞における機械的伸展刺激負荷による軟骨分化制御は、四肢胚由来細胞とは異なり、特異的な機械的刺激応答分子として Caveolin-1, Galectin-3, Patched および Caspase-3 が深く関与していることを示した。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

1. 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.
2. Kihara M, Kiyoshima T, Nagata K, Wada H, Fujiwara H, Hasegawa K, Someya H, Takahashi I, Sakai H. Itm2a expression in the developing mouse first lower molar, and the subcellular localization of itm2a in mouse dental epithelial cells. *PLoS One.* 2014 Jul; 9(7): e103928
3. Mizokami A, Yasutake Y, Higashi S, Kawakubo-Yasukochi T, Chishaki S,

- Takahashi I, Takeuchi H, Hirata M. Oral Administration of Osteocalcin Improves Glucose Utilization by Stimulating Glucagon-Like Peptide-1 Secretion. Bone. 2014 Dec;69: 68-79.
4. Yasumatsu K, Manabe T, Yoshida R, Iwatsuki K, Uneyama H, Takahashi I, Ninomiya Y. Involvement of multiple taste receptors in umami taste: analysis of gustatory nerve responses in mGluR4 knock-out mice. J Physiol. 2015 Feb 15; 593(4):1021-34
  5. Nomura S, Tsuru K, Valanezhad A, Matsuya S, Takahashi I, Ishikawa K. : Fabrication of carbonate apatite block from calcium sulfate by hydrothermal treatment. Key Engineering Materials 493-494:139-142,2012.4  
[学会発表] (計 25 件)
  1. K.Ishikawa, S.Nomura, K.Tsuru, I.Takahashi. Fabrication of interconnected porous carbonate apatite from gypsum spheres IADR.2014.6.25-28
  2. 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. International Biology on Mechanobiology. 2014. 5. 20-23
  3. 星健治、川木晴美、高橋一郎、竹下信郎、清流正弘、Sakhr A Murshid、益田泰輔、穴田貴久、加藤龍史、北浦英樹、鈴木治、山本照子 圧縮力負荷に伴い骨細胞より産生された CCN2 は ERK1/2 経路を介してアポトーシスを誘導する。 第 53 回日本生体医工学会 2014 年 6 月 24-26 日
  4. 森山加奈子、久木田明子、上原範久、久本由香里、高橋一郎、久木田敏夫 免疫制御膜表面分子 Tim-3 を介する炎症性骨破壊制御 第 32 回日本骨代謝学会 2014 年 7 月 24-26 日
  5. 村田直久、五百井秀樹、大内雅博、城戸瑞穂、高橋一郎 矯正の歯の移動時におけるアレルギー誘導性歯根吸収促進メカニズムの解明 第 73 回日本矯正歯科学会 2014 年 10 月 20 - 22 日
  6. 古賀のり子、都留寛治、戸井田力、高橋一郎、石川邦夫 水酸化カルシウム圧粉体の炭酸化に及ぼす湿度の影響 平成 26 年度日本歯科理工学会九州地方会夏期セミナー 2014 年 8 月 8-9 日
  7. Koga N, Nomura S, Tsuru K, Takahashi I, Ishikawa K. Effect of humidity on carbonation of calcium hydroxide. The 15<sup>th</sup> IUMRS-International Conference in Asia 2014. 8. 24-30
  8. 古賀のり子、都留寛治、戸井田力、高橋一郎、石川邦夫 水酸化カルシウム圧粉体を用いたカルサイト硬化体の調製 - 処理条件の影響 - 第 64 回日本歯科理工学会学術講演会 2014 年 10 月 4-5 日
  9. 宮崎佳奈子、吉崎恵悟、新井智映子、張麗麗、韓雪、春山直人、高橋一郎 歯原性上皮細胞における Ca<sup>2+</sup> を介した細胞接着メカニズム及び分化に及ぼす影響について 第 56 回歯科基礎医学会学術大会・総会 2014 年 9 月 25 - 27 日
  10. 宮崎佳奈子、吉崎恵悟、新井智映子、張麗麗、韓雪、春山直人、高橋一郎 歯の発生における外胚葉異形成原因遺伝子 Plakophilin 1 (Pkp1) の役割 第 73 回日本矯正歯科学会 2014 年 10 月 20 - 22 日
  11. 平田 牧子、倉谷 颯子、安武 雄、高橋一郎、平田 雅人 PRIP 欠損マウスにおけるインスリンシグナリングの検討 第 56 回歯科基礎医学会学術大会・総会 2014 年 9 月 25 - 27 日
  12. Moriyama K, Kukita A, Yin-ji Li, Peng-Fei Qu, Takahashi I, Kukita T: A Possible Regulation of Osteoclast Differentiation by Galectin-9. 2nd Joint Meeting of the International Bone and Mineral Society and The Japanese Society for bone and Mineral Research, Kobe, 2013.5.28-6.1
  13. 森山加奈子、久木田明子、上原範久、張旌旗、高橋一郎、久木田敏夫 : 炎症抑制因子ガレクチン 9 の膜表面受容体 Tim-3 を介した破骨細胞形成制御. 第 12 回 西日本骨・関節関連疾患懇話会, 九州大学, 2013.7.6
  14. 森山加奈子、久木田明子、上原範久、張旌旗、高橋一郎、久木田敏夫 : 炎症抑制因子ガレクチン 9 の膜表面受容体 Tim-3 を介した破骨細胞形成制御. 第 55 回 歯科基礎医学会学術大会・総会, 岡山, 2013.9.20-22
  15. 木原楨子、清島保、永田健吾、和田 裕子、藤原 弘、長谷川 佳那、染矢 祐孝、高橋一郎、坂井 英隆 : マウス歯胚形成過程における integral membrane protein 2a (itm2a) の発現様式 第 55 回 歯科基礎医学会学術大会・総会, 岡山,

- 2013.9.20-22
16. 村田直久、五百井秀樹、大内雅博、合島 怜央奈、沖雄二、山座孝義、高橋一郎、城戸瑞穂：矯正の歯の移動時におけるアレルギー誘導性歯根吸収促進機構。第55回 歯科基礎医学会学術大会・総会、岡山、2013.9.20-22
  17. 木原楨子、清島保、高橋一郎、坂井英隆：歯胚発生期から歯根形成開始期における integral membrane protein 2a (Itm2a) の発現様式と機能 第90回九大病理研究会、2013.12.14
  18. 梅田 まりこ、寺尾 文恵、吉崎 恵悟、宮崎 佳奈子、高橋一郎：胎生期マウス下顎頭軟骨における microRNA-200a の役割。第72回日本矯正歯科学会大会、松本、2013.10.7-9
  19. ALBOGHA Mhd Hassan、高橋一郎、北原亨、東藤貢、百武弘登：Subject-specific finite element study for failed orthodontic anchor screw 第九回九州矯正歯科学会、沖縄、2014、2,8-9
  20. 高橋一郎：顎関節の成長発育の分子基盤—細胞外基質代謝と機械的刺激応答—、第28回東北矯正歯科学会シンポジウム「口腔顎顔面成長発育の生物学」、仙台、2012.5.19
  21. 塩塚真帆、和田裕子、清島保、永田健吾、藤原弘明、高橋一郎、坂井英隆：マウス歯胚形成を制御する Thymosin  $\beta$ 10 の発現様式解析と機能解析。第54回歯科基礎医学会学術大会・総会、福島県郡山市、2012.9.15
  22. 成松加奈子、李銀姫、久木田明子、屈鵬飛、渡辺敏之、高橋一郎、久木田敏夫：ガレクチン9による破骨細胞分化制御。第54回歯科基礎医学会学術大会、郡山市、2012.9.15-16.
  23. 松元歌奈子、都留寛治、石川邦夫、高橋一郎：カルシウム塩導入による炭酸アパタイト骨置換材の機械的強さ向上。第8回九州矯正歯科学会学術大会、北九州市、2013.2.2-3
  24. Umeda M, Terao F, Yoshizaki K, Takahashi I, Profiling MicroRNA Expression in Mouse Mandibular Condylar Cartilage during Development, 91st General Session of International Association for Dental Resaerch, シアトル, アメリカ合衆国, 2013. 3.20-23.
  25. Terao F, Umeda M, Yoshizaki K, Takahashi I, Real-time Monitoring of Intracellular ERK in ATDC5 Under Mechanical Stress, 91st General Session of International Association for Dental Resaerch, シアトル, アメリカ合衆国, 2013. 3.20-23.
- [図書] (計 4 件)
1. Takahashi I, Mechano-Reaction of Chondrocytes in the Mandibular Condyle During Orthopedic-Orthodontic Intervention. in Orthodontic Treatment of Class III Malocclusion, Eds. Ngan PW, Deguchi T, Roberts EW, Chapter 3. Bentham Science Publishers Ltd. Sharjah, U.A.E: 2014, pp37-60.
  2. 星健治、川木晴美、高橋一郎、竹下信郎、清流正弘、Sakhr A Murshid、益田泰輔、穴田貴久、加藤龍史、北浦英樹、鈴木治、山本照子 圧縮力負荷に伴い骨細胞より産生されたCCN2はERK1/2経路を介しアポトーシスを誘導する 第53回日本生体医工学会 Proceeding, O2-08-3
  3. 高橋一郎、梅田まりこ、寺尾文恵：顎顔面の成長発育—下顎頭軟骨の成長メカニズム、2012 歯科医療秋号 P15～掲載
  4. 高橋一郎：口腔顎顔面成長発育の生物学—細胞外基質代謝と機械的刺激応答—、2012.12.21 発行 東北矯正歯科学会雑誌 第20巻1号掲載
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  
春山 直人 (HARUYAMA NAOTO)  
九州大学・病院・講師  
研究者番号：70359529
- 寺尾 文恵 (TERAO FUMIE)  
九州大学・大学院歯学研究院・助教  
研究者番号：10510018
- (3) 研究連携者  
梅田 まりこ (UMEDA MARIKO)  
九州大学・病院・医員  
研究者番号：40707618