

論文要旨

メカニカルストレスがラット関節円板培養細胞の
細胞外基質の mRNA 発現に及ぼす影響

平成 27 年度

北海道医療大学大学院歯学研究科

檜尾 治奈

【諸言】

関節円板は、様々な口腔機能によって生じる機械的力の分散と吸収および顎関節複合体の円滑な運動において重要な役割を担っている。関節円板は顎関節の正常な機能や顎関節症の病態における主要な構成要素である。関節円板を構成する主要な細胞外基質は collagen, proteoglycan および elastic fiber であり、顎関節の機能や形態維持のために重要な役割を担っている。しかし、関節円板の機械的力に対する適応反応、病態変化あるいは細胞外基質の mRNA 発現やタンパク質発現の動態を検討した研究はほとんどない。本研究では、関節円板を構成する細胞の伸展刺激に対する反応性を明らかにすることを目的として、ラット関節円板から採取した培養細胞（以下、関節円板培養細胞と略す）を用いて、伸展負荷が関節円板培養細胞の collagen, proteoglycan および tropoelastin の mRNA 発現の変化を検討した。

【方法】

1. 関節円板培養細胞の培養系

生後4週齢の Wistar 系雄性ラットから関節円板を採取し、10% NCS (newborn calf serum) を添加した最小必須培養液 (MEM) 中で 37°C, 5% CO₂ 環境下にて培養し、関節円板培養細胞として単離した。

2. 伸展負荷

Fibronectin で処理したシリコンチャンバー上に関節円板培養細胞を播種し、3日間培養後、サブコンフルエント状態を確認し、伸展率 10%、頻度 1 分間/1 往復で、4 時間および 12 時間伸展負荷を与えた。

3. マイクロアレイによる網羅的解析

4 時間と 12 時間の伸展群と対照群の試料に対してアジレント社マイクロアレイにて解析した。細胞外基質に変化があるものに関して I 型 collagen, versican, aggrecan, tropoelastin, fibromodulin, lumican, decorin の mRNA 発現の再現性確認ため real-time PCR 法にて詳細な発現変化の定量を行った。

4. siRNA による fibromodulin 抑制実験

Fibromodulin の siRNA を用いて fibromodulin 抑制後に伸展負荷し、fibromodulin と lumican の mRNA 発現の変化を検討した。

5. 統計学的処理

統計分析には、SPSS20 の Mann-Whitney U test を用いた。

【結果】

1. マイクロアレイによる細胞外基質の mRNA 発現の網羅的解析

関節円板培養細胞に 4 時間と 12 時間の 10% 伸展負荷を行い、対照群と伸展群の試料に対しマイクロアレイ解析を行った。その結果、versican, aggrecan, fibromodulin の mRNA 発現は 4 時間と 12 時間で増加した。I 型 collagen の mRNA 発現は 4 時間で増加した。Lumican, decorin, asporin, tropoelastin, III 型 collagen の mRNA 発現は 12 時間で減少した。Keratocan の mRNA 発現は 4 時間で増加し、12 時間で減少した。

2. Real-time PCR 法による細胞外基質の mRNA 発現の定量

4 時間の伸展負荷により、versican, fibromodulin, I 型 collagen の mRNA 発現はそれぞれ 70%, 240%, 50% 増加した。4 時間の伸展負荷により、decorin の mRNA 発現が 60% 減少した。12 時間の伸展負荷により、versican, aggrecan, fibromodulin の mRNA 発現はそれぞれ 30%, 50%, 50% 増加した。12 時間の伸展負荷により lumican, decorin, tropoelastin の mRNA 発現はそれぞれ 70%, 70%, 40% 減少した。

3. siRNA による fibromodulin mRNA 発現の抑制実験

siRNA による fibromodulin 抑制状態では対照群と 12 時間の伸展群において、fibromodulin の mRNA 発現は抑制されそれぞれ 0.1 倍と 0.4 倍に減少した。一方、lumican の mRNA 発現は対照群では変化がみられなかったのに対し、12 時間の伸展群は siRNA による fibromodulin の mRNA 発現抑制により 1.7 倍まで回復した。

【考察】

過去の幾つかの組織学的研究は、機械的刺激と細胞外基質の組成や構成との関連性を指摘している。例えば、マウスの成長や運動負荷により腱への機能力が高まると collagen 原線維の直径、断面積、密度が増加することが報告されている。本研究では、4 時間の伸展負荷によって I 型 collagen の mRNA 発現は増加した。本研究では collagen 原線維の形態学的評価は行っていないが、伸展刺激による I 型 collagen の mRNA 発現レベルの増加は、機械的刺激に対する組織の適応反応であり、その抵抗性の増強に関与していると考えられる。

本研究では、versican の mRNA 発現は、伸展負荷 4 時間後に増加し、aggrecan の mRNA 発現は 12 時間で増加した。Versican と aggrecan は modular proteoglycan に属し、様々な構造ドメイン（ヒアルロン酸結合、GAG 結合、幾つかの C 末端機能ドメイン）を含む 200kD

を超えるサイズの core protein を有する。これら 2 つの proteoglycan には GAG 結合ドメインに GAG 鎖が結合し、GAG 鎖の硫酸基の親水性によって膨潤力を生じる。この膨潤力は proteoglycan を取り巻く collagen 線維の牽引力と拮抗し、組織に圧縮力に対する抵抗性を付与する。本研究における伸展負荷による versican と aggrecan の増加は、力学的強度の増強に關与していると考えられた。

Fibromodulin と lumican は I 型 collagen の C 末端側の同じ領域に結合し、collagen 原線維形成を調節している。また fibromodulin は lumican より I 型 collagen への親和性が高いため、lumican の collagen monomer への結合を抑制する。Fibromodulin の mRNA 発現は 4 時間をピークに増加し、12 時間で変化は認められなかったのに対し、lumican の mRNA 発現は 4 時間で変化は認められなかったが、12 時間で減少したことから、lumican の mRNA 発現にフィードバック調節機構が働き 12 時間の lumican の mRNA 発現が減少したという仮説を立てた。この仮説を検証するために、siRNA による fibromodulin の mRNA 発現の抑制実験を行った。その結果、siRNA による fibromodulin の mRNA 発現の抑制下では lumican の mRNA 発現は非伸展群では変化がみられなかったのに対し、伸展群での lumican の mRNA 発現は siRNA による fibromodulin の mRNA 発現抑制下においても 1.7 倍まで回復した。本研究では fibromodulin と lumican のタンパク質の定量は行っていないが、この解析によって、伸展負荷による fibromodulin の mRNA 発現の増加が lumican の mRNA 発現を減少させるという興味深い結果が得られた。

【結論】

ラット関節円板培養細胞は伸展刺激に対して collagen, proteoglycan および tropoelastin の mRNA 発現に変化を示すことが明らかになった。