

## 論文題目

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

## 【緒論】

顎関節症の病態の主要な要因は関節円板障害である (Osborn, 1985; Blaustein & Scapino, 1986; Stegenga, 1991). 関節円板の機能や形態の維持のためには細胞外基質の組成・構成が重要であり, 円板組織に存在する細胞は組織に負荷されるメカニカルストレスに対する適応反応として細胞外基質の発現を変化させる.

関節円板に関連する細胞における伸展負荷に対する反応および細胞外基質の mRNA 発現やタンパク質発現への影響を検討した研究はほとんどなく, いまだ不明な点が多い. 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% CO<sub>2</sub> 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, ノンパラメトリック検定の 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

Versican の mRNA 発現は、伸展負荷により 4 時間と 12 時間でそれぞれ 1.7, 1.3 倍に増加した。Aggrecan の mRNA 発現は 12 時間では 1.5 倍に増加した。Fibromodulin と I 型 collagen の mRNA 発現はそれぞれ 4 時間では 3.4, 1.5 倍に増加し、12 時間では対照群と同レベルとなった。Lumican の mRNA 発現は 12 時間で 0.3 倍に減少した。Decorin の mRNA 発現は 4 時間と 12 時間でそれぞれ 0.4, 0.3 倍に減少した。Tropoelastin の mRNA 発現は、12 時間で 0.6 倍に減少した。

### 3. siRNA による fibromodulin 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】

4 時間の伸展負荷によって、I 型 collagen の mRNA 発現は増加した。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 (Parry & Craig, 1977; Michna & Hartmann, 1989)。したがって、本研究における I 型 collagen の増加も伸展負荷に対する抵抗性の増強に関与していると考えられた。

また、versican の mRNA 発現は 4, 12 時間の伸展負荷により増加し、aggrecan の mRNA 発現は 12 時間で増加した。Versican と aggrecan には 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 (Stegenga et al., 1991)。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関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 (Svensson et al., 2000). 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 (Kalamajski & Oldberg, 2007). 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. 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. これらの細胞外基質の発現変化は、関節円板の機械的強度に影響を及ぼすことが示唆された.

#### 【文献】

- Blaustein DI & Scapino RP. Remodeling of the temporomandibular joint disk and posterior attachment in disk displacement specimens in relation to glycosaminoglycan content. *Plast Reconstr Surg* 78:756–764, 1986.
- Kalamajski S & Oldberg A. Fibromodulin binds collagen type I via Glu-353 and Lys-355 in leucine-rich Repeat 11. *J Biol Chem* 282:26740–26745, 2007.
- Michna H & Hartmann G. Adaptation of tendon collagen to exercise. *Int Orthopaed* 13:161–163, 1989.
- Osborn JW. The disc of the human temporomandibular joint: design, function and failure. *J Oral Rehabil* 12:279–293, 1985.
- Parry DAD & Craig AS. Quantitative electron microscope observations of the collagen fibrils in rat-tail tendon. *Biopolymers* 16:1015–1031, 1977.

Stegenga B, de Bont LG, Boering G & van Willigen JD. Tissue responses to degenerative changes in the temporomandibular joint: a review. *J Oral Maxillofac Surg* 49:1079–1088, 1991.

Svensson L, Narlid I & Oldberg A. Fibromodulin and lumican bind to the same region on collagen type I fibrils. *FEBS Lett* 470:178–182, 2000.