

〔学位論文〕

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

檜尾 治奈

北海道医療大学歯学部口腔構造・機能発育学系歯科矯正学分野

Effects of mechanical stress on expression of extracellular matrix
in rat TMJ disc cells

Haruna KASHIO

Division of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics, Department of Oral Growth and Development,
School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido

Key words : TMJ disc tensile strain collagen proteoglycan tropoelastin

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。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。

材料及び方法

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℃、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パ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発現の再現性確認のため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。メカニカルストレスによりcollagen原線維の数の増加と太さが増大し、抵抗性が増したという報告がある。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は構造が類似しており、ヒアルロン酸と高い結合能をもっている。Versicanとaggrecanの結合によりヒアルロン酸の保水力を高め、細胞間の隙間を補い、力学的強度を生み出しているという報告があ

る。本研究における伸展負荷によるversicanとaggrecanの増加は、伸展負荷による細胞間隙を補い、力学的強度の増強に関与していると考えられた。

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。



檜尾 治奈

平成17年4月 北海道医療大学歯学部 入学

平成23年3月 北海道医療大学歯学部 卒業

平成28年3月 北海道医療大学歯学部歯学研究科博士課程 修了

平成28年4月 北海道医療大学 特別研究員