

厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業）
分担研究報告書

静水圧刺激が軟骨細胞に及ぼす効果に関する研究

分担研究者 牛田 多加志 東京大学大学院工学系研究科
機械工学専攻再生医工学研究室助教授

研究要旨

生理的に軟骨組織に負荷されている物理的刺激である静水圧を培養軟骨細胞へ負荷し、細胞内シグナルの伝達の有無をMAPK系に絞って検証したところ、間欠的静水圧を軟骨細胞に負荷することにより、JNKは活性化されずERKが一過性に活性化することが示された。このことは静水圧刺激がbFGF添加と同等の効果を持っていることを示唆していると考えられる。

A. 目的

軟骨欠損そして将来的には変形性関節症治療の可能性の一つとして、再生医工学による軟骨再生研究が進められている。生体外で軟骨を再生させるためには、細胞ソースの問題、3次元培養担体の問題、長期培養法の問題などクリアしなければならない問題が数多く存在するが、軟骨は無血管、無神経で比較的単純な組織構造をもっていることから、再生医学において臨床応用され得る有力な組織の一つであると考えられている。静水圧は軟骨組織が生理的に負荷されている物理的刺激の一つであり、静水圧負荷は軟骨細胞のマトリックス産生を促進させることが知られている。一方で、再生医学においては軟骨細胞を生体外培養すると脱分化するため、硝子軟骨の再生に問題を抱えおり、軟骨細胞を増殖させることにより不可避に起こると考えられている脱分化を、如何に生体外で再分化させ3次元

培養担体に播種するかが解決すべき問題の一つとしてクローズアップされている。本研究では、静水圧刺激を負荷することにより軟骨細胞にどのようなシグナル伝達が生ずるかを探ることにより、静水圧刺激の軟骨細胞に及ぼす効果を検証することを目的とする。

B. 方法

軟骨細胞は、生後一ヶ月の子牛の肘関節より軟骨片を採取し、コラゲナーゼを用いて分離した。分離した後、F-12培地10%FBSで培養を行った。軟骨細胞を3-5継代した後、コラーゲンコートしたdishに細胞を播種した。1日培養した後、無血清培地に替えさらに2日培養した。静水圧負荷カラム内に細胞が播種されたdishを入れHEPES溶液で満たした。静水圧は5MPa、0.5Hzで負荷したグループ（間欠的圧力）と5MPaで一定圧に負荷したグループ（一定圧）とポジティブコントロールとしてIL-1を添

加したグループから、それぞれ5分、15分、30分後に細胞をサンプリングした。それぞれのサンプルから、Western Blotting によりリン酸化 ERK およびリン酸化 JNK を検出し、NIH Image により解析を行なった。同様な方法で、静水圧を 5MPa、0.1Hz 負荷したグループ（間欠的圧力）とポジティブコントロールとして bFGF を添加したグループから、4 時間、8 時間後に細胞を採取し Northern Blotting により Sox9 の発現を検証した。

C. 結果

静水圧の負荷や IL-1 の添加による ERK のリン酸化を、それらの刺激が無い状態でのリン酸化の程度との比をとることにより Ratio とした。一定圧力負荷(Constant)、間欠的圧力負荷(Intermittent)、IL-1 共に 5、15 分後にはそれぞれの Ratio 値が増加し、30 分後には開始時に近い値に戻るという一過性の ERK リン酸化が起こっていることがわかった。一方、JNK のリン酸化は IL-1 のみに一過性に生じ、一定圧力負荷(Constant)、間欠的圧力負荷(Intermittent)には起こらなかった。また、間欠的静水圧負荷により 8 時間後の Sox9 の発現が、bFGF 添加と同等に増加した。

D. 考察

静水圧負荷、特に間欠的静水圧を軟骨細胞（この場合、脱分化した軟骨細胞）に負荷することにより、ERK が有意に一過的にリン酸化され、一方で JNK をリン酸化しないことがわかった。このことは、静水圧負荷が、ERK、JNK 共にリン酸化させる IL1 ではなく、ERK をリン酸化し、JNK をリン

酸化しない bFGF 添加の効果に、少なくとも ERK、JNK に限っては同等であることを示していると考えられる。また、本研究で負荷された生理的な範囲の静水圧は、JNK をリン酸化させるような（例えば UV 照射のような）物理的障害としては、軟骨細胞には認識されないと考えられる。一方、ERK のリン酸化により活性化されるシグナル伝達経路の下流に存在する Sox9 は、Type II コラーゲンの発現を調節する転写因子の一つであることから、静水圧負荷による ERK の活性化、Sox9 の発現、type II コラーゲンの発現により、脱分化した軟骨細胞を再分化させる可能性のあることが示唆された。

E. 結論

生理的に負荷されている物理的刺激である静水圧を培養ウシ軟骨細胞に間欠的（0.5Hz、5MPa）に負荷したところ、細胞内シグナルタンパクの一つである ERK が一過的に活性化した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yoshimasa Ishii, Takashi Ushida, Tetsuya Tateishi, Hitoshi Shimojo, Yutaka Miyanaga, Effects of different exposures of hyperbaric oxygen on ligament healing in rats. *J Orthop Res*, 2002. 20: 353-356.
- 2) Kensuke Ochi, Guoping Chen., Takashi Ushida, Hitoshi Abe, Satoshi Gojo, Kaoru Segawa, Hitoshi Tai, Kenju Ueno, Yoshiaki

- Toyama, Junichi Hata and Akihiro Umezawa,
Use of Isolated Mature Osteoblasts in
Abundance Acts as Desired-Shaped Bone
Regeneration in Combination With a
Modified Poly-DL-Lactic-Co-Glycolic
Acid(PLGA)-Collagen Sponge. *J Cell
Physio*, 2002.194: 45-53
- 3) Shuichi Mizuno, Tetsuya Tateishi., Takashi
Ushida, Julie Glowacki, Hydrostatic Fluid
Pressure Enhances Matrix Synthesis and
Accumulation by Bovine Chondrocytes in
Three-dimensional Culture. *J Cell Physiol*,
2002.193:319-327
- 4) Katsuko S Furukawa, Takashi Ushida,
Kenshi Toita, Yasuyuki Sakai, Tetsuya
Tateishi, Hybrid of gel-cultured smooth
muscle cells with PLLA sponge as a
scaffold towards blood vessel regeneration.
Cell Transplantation, 2002. 11(5):
475-480
- 5) Takashi Ushida, Katsuko Furukawa., Kenshi
Toita, Tetsuya Tateishi, Three dimensional
seeding of chondrocytes encapsulated in
collagen gel into PLLA scaffolds. *Cell
Transplantation*, 2002. 11(5): 489-494
- 6) Guoping Chen, Takashi Ushida, Tetsuya
Tateishi, Scaffold Design for Tissue
Engineering. *Macromole. Biosci*, 2002. 2:
67-77..

H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル	発表誌名	巻号	ページ	出版年
N. OGATA, K. NAKAMURAほか	Association of <i>Klotho</i> Gene Polymorphism With Bone Density and Spondylosis of the Lumbar Spine in Postmenopausal Women	Bone	31	37-42	2002
T. AKUNE, K. NAKAMURAほか	Insulin receptor substrate-2 maintains predominance of anabolic function over catabolic function of osteoblasts.	J Cell Biol	159	147-156	2002
T. SHIMOAKA, K. NAKAMURAほか	Regulation of osteoblast, chondrocyte, and osteoclast functions by fibroblast growth factor (FGF)-18 in comparison with FGF-2 and FGF-10.	J Biol Chem	277	7493-7500	2002
T. IKEDA, K. NAKAMURAほか	Identification and characterization of the human long form of Sox5 (L-Sox5) gene.	Gene	298	59-68	2002
名倉武雄ほか	深屈曲動作におけるPCLの重要性	膝	27	87-89	2003
Y. Ishii, T. Ushida ほか	Effects of different exposures of hyperbaric oxygen on ligament healing in rats	J Orthp Res	20	353-356	2002
K. Ochi, T. Ushida ほか	Use of Isolated Mature Osteoblasts in Abundance Acts as Desired-Shaped Bone Regeneration in Combination With a Modified Poly-DL-Lactic-Co-Glycolic Acid (PLGA)-Collagen Sponge	J Cell Physiol	194	45-53	2002
S. Mizuno, T. Ushida ほか	Hydrostatic Fluid Pressure Enhances Matrix Synthesis and Accumulation by Bovine Chondrocytes in Three-dimensional Culture	J Cell Physiol	193	319-327	2002
K. S. Furukawa, T. Ushida ほか	Hybrid of gel-cultured smooth muscle cells with PLLA sponge as a scaffold towards blood vessel regeneration	Cell Transplantation	11(5)	475-480	2002
T. Ushida ほか	Three dimensional seeding of chondrocytes encapsulated in collagen gel into PLLA scaffolds	Cell Transplantation	11(5)	489-494	2002
Guoping Chen, T. Ushida ほか	Scaffold Design for Tissue Engineering	Macromole . Biosci	2	67-77	2002

20020806

以降は雑誌/図書に掲載された論文となりますので、
P.22の「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。