

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 東京大学大学院医学系研究科

研究要旨

関節軟骨組織を切り出し、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負荷し、代表的な細胞内シグナルの一つである細胞内カルシウムの濃度変化を測定したところ、間欠的静水圧を軟骨細胞に負荷することにより、一過性の  $Ca^{2+}$  濃度上昇を起こす軟骨細胞の応答率は表層、中層、深層によって異なった応答を示した。また間欠的静水圧を長時間負荷し続けると軟骨細胞は  $Ca^{2+}$  濃度オシレーション応答を起こすことが示された。

A. 目的

関節軟骨細胞は関節の動きに伴って、静水圧、ずり応力、浸透圧などの力が加わることが知られている。関節軟骨細胞はずり応力や浸透圧に対して細胞内  $Ca^{2+}$  濃度を変動させて応答することが知られているが、間欠的静水圧に対しての  $Ca^{2+}$  応答は不明であり、そもそも軟骨細胞が静水圧を感知する機構を有しているかどうかも判っていない。また関節軟骨細胞は軟骨表面からの深さによって細胞の分化程度や配向性が異なるために、同じ軟骨細胞でありながら機能の違い、さらには静水圧負荷に対するシグナル応答のメカニズムが異なる可能性が考えられる。本研究では関節軟

骨組織を表層・中層・深層の 3 つの領域に分類して軟骨細胞の間欠的静水圧刺激に対する  $Ca^{2+}$  応答の違いを検討し、また阻害剤を用いて  $Ca^{2+}$  の導入経路を調べることを目的とする。

B. 方法

$Ca^{2+}$  蛍光指示薬 fura 2 によって染色した軟骨組織を圧力カラム内にセットし、中を HEPES 溶液で満たす。そして静水圧チャンバーを倒立型顕微鏡のステージ上に置き、周囲を固定する。静水圧負荷装置を用いて軟骨組織に間欠的静水圧を負荷し、それに応じた細胞内  $Ca^{2+}$  蛍光画像を ARGUS  $Ca^{2+}$  解析システムに取り込み、解析した。細胞内  $Ca^{2+}$  濃度は (340nm 励起光による蛍光量 / 380nm 励起光による蛍

光量)の比から予測した。

## C. 結果とD. 考察

### 1) 間欠的静水圧の短時間負荷

軟骨組織に間欠的静水圧を5min負荷し、その後10min無負荷状態にして、この15minの間にCa<sup>2+</sup>濃度の一過性上昇を示したものを細胞の応答とみなし、軟骨の表層、中層、深層ごとに応答率を検討した。その結果、軟骨組織に負荷する間欠的圧力の周波数と細胞の応答率との関係については、表層、中層、深層のいずれにおいても周波数0.2Hzにおいて最も高い応答率を示した。一方、軟骨組織に負荷する間欠的圧力の振幅と細胞の応答率との関係については、表層は5MPa、中層と深層は2MPaにおいて最も高い応答率を示した。また、細胞外液のCa<sup>2+</sup>を除去したCa<sup>2+</sup> free HEPES、機械刺激受容チャネルの働きを阻害するgadoliniumイオン、細胞内Ca<sup>2+</sup>ストアの一つである小胞体内のCa<sup>2+</sup>を枯渇させるthapsigargin、の3つの薬剤を個別に作用させながら軟骨組織に振幅5Mpa、0.5Hz周期の間欠的圧力を負荷したときの細胞の応答率については、Ca<sup>2+</sup> free HEPES、thapsigarginは細胞の応答率を下げ、またgadoliniumイオンも若干減少を見せた。この実験結果から軟骨細胞は静水圧刺激に対して細胞外液、小胞体、機械刺激受容チャネルからの流入が絡んだ応答を示すと考えられる。

### 2) 間欠的静水圧の長時間負荷

軟骨組織に最小0MPa最大5MPaの間欠的静水圧を0.5Hz周期で60min加え続けている最中に、周期的なCa<sup>2+</sup>濃度の上昇下降(オシレーション)を示したものを細胞の応答とみなし、細胞の応答率を検討した。その結果、無負荷状態ではオシレーションは全く観測されなかったが、間欠的静水圧負荷を加えると20.2%の細胞で、振幅と周期が異なる数タイプのオシレーションが起きることを確認した。thapsigargin, gadoliniumイオン, Ca<sup>2+</sup> free HEPESのいずれかを作用させると、オシレーションは唯一約7min周期のものに限定された。このオシレーションは細胞間で同期しているのが特徴で、細胞が間欠的静水圧を感知し細胞間同士で何らかの手段でシグナル伝達を行っていないければ不可能な現象である。Ca<sup>2+</sup>によるシグナル伝達においては、情報がオシレーションの振幅や周波数にコードされる例が知られており、今回得られた実験結果もその可能性を示唆するものである。

## E. 結論

1) 軟骨組織に間欠的静水圧を負荷すると、一過性のCa<sup>2+</sup>濃度上昇を起こす軟骨細胞の応答率は表層、中層、深層によって異なった。この一過性のCa<sup>2+</sup>濃度上昇は細胞外液からの流入、機械刺激受容チャネル、IP3系統の細胞内スト

アからの流入が絡んでいることが示唆された。

2) 間欠的静水圧を長時間負荷し続けると軟骨細胞は  $\text{Ca}^{2+}$  濃度オシレーション応答を起こすことがわかった。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

工学的アプローチによる細胞分化・組織形成のコントロール, 牛田多加志, 日本再生医療学会雑誌 2, 4, 33-39 (2003)

#### 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

【書籍】

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
西田圭一 郎、土井 英之、藤 原一夫、 井上 一	変形性関節症 における軟骨破 壊とNO	平澤泰介、 井上 一、 高岡邦夫	整形外科 の最新医 療	先端医療 技術研究 所	東京都	2003 年	81-87

【雑誌】

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
牛田多加志	工学的アプローチによる 細胞分化・組織形成の コントロール	日本再生医療学 会雑誌	2 巻 5 号	33-39	2003
名倉武雄ほか	変形性膝関節症患者の 動作解析—日常生活動 作における膝負荷の特 徴	膝	28	14-16	2003
Ikehira H, Watanabe A ほか	The development of three-dimensional T <sub>1</sub> image calculation program in proportion to the DICOM data of any marketing clinical MRI systems	Magnetic Resonance Imaging	In press	In press	2004
佐粧孝久,守屋秀繁 ほか	変形性膝関節症に対 する鏡視下手術—鏡 視下後内側乖離術の 適応と成績—	リウマチ科	30 巻 2号	120-128	2003
Hoshi K, Nakamura K ほか	Deficiency of insulin receptor substrate-1	J Bone Miner Res	19	214-223	2004

	impairs skeletal growth through early closure of epiphyseal cartilage				
Itaka K, Nakamura K ほか	In situ single cell observation by fluorescence resonance energy transfer reveals fast intra-cytoplasmic delivery and easy release of plasmid dna complexed with linear polyethylemine	J Gene Med	6	76-84	2004
Matsubara T, Tsutsumi S, ほか	A new technique to expand human mesenchymal stem cells using basement membrane extracellular matrix	Biochem Biophys Res Commun	313	503-508	2004
Koshizuka Y, Nakamura K ほか	Cystatin 10, a novel chondrocyte-specific protein, may promote the last steps of the chondrocyte differentiation pathway	J Biol Chem	278	48259-48266	2003
Akiyama T, Nakamura K ほか	Regulation of osteoclast apoptosis by ubiquitylation of proapoptotic BH3-only Bcl-2	EMBO J	22	6653-6664	2003

	family member Bim				
Saegusa M, Nakamura K ほか	Contribution of membrane-associated prostaglandin E <sub>2</sub> synthase (mPGES) to bone resorption	J Cell Physiol	197	348-356	2003
Itaka K, Nakamura K ほか	Polyion complex micelles from plasmid DNA and poly(ethylene glycol)-poly(L-lysine) block copolymer as serum-tolerable polyplex system: Physicochemical properties of micelles relevant to gene transfection efficiency	Biomaterials	24	4495-4506	2003
Kawano H, Nakamura K ほか	Suppressive function of androgen receptor in bone resorption	Proc Natl Acad Sci USA	100	9416-9421	2003
Seichi A, Nakamura K ほか	Image-guided resection of the thoracic ossification of the ligament flavum	J Neurosurg	99	60-63	2003
Ogihara S, Nakamura K ほか	Concurrent spinal schwannomas and meningiomas. Case illustration	J Neurosurg	98	300	2003

Seichi A, Nakamura K ほか	Image-guided surgery for cervical disorders in rheumatoid arthritis	Mod Rheumatol	12	329-332	2002
----------------------------	--	---------------	----	---------	------

【著作権】

登録者	ソフトウェア名	ソフトウェア内容	登録年
株式会社 ITTC、放射線医学総合 研究所	T <sub>1</sub> -Wizard	T <sub>1</sub> 画像処理ソフトウェア	2003年

20030672

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