

課題番号 14

軟骨細胞に対する力学刺激と SOX9 遺伝子の協調的作用の解析

[1] 組織

代表者：乾 雅史

(国立研究開発法人国立成育医療研究センター)

対応者：久保 純

(東北大学加齢医学研究所)

研究費：物件費 26 万円，旅費 4 万円

[2] 研究経過

脊椎動物の骨格の伸長は軟骨細胞の増殖及びそれに伴う収斂と伸長 (convergent extension (CE)) 運動による。そのため CE が正常でない変異マウスでは骨が短く太くなる事が示されているが、近年発生中の胚から骨格筋による張力が失われると CE 運動が阻害される事が報告された。一方申請者が作成した軟骨分化のマスター転写因子 Sox9 の機能亢進型点変異マウス (SOX9K396R マウス) においても細胞の収斂が阻害されて骨が太く短くなっていることを見いだした。これらの結果は Sox9 遺伝子の活性と骨格筋による張力が共に軟骨細胞の CE 運動に必要である事を示している。本研究計画ではこの二つの因子の軟骨細胞に対する協調的な作用について検討することにより細胞外からの情報 (力学刺激) と細胞内の状況 (Sox9 活性) が細胞内で統合されるメカニズムを明らかにすることを目的に研究を行った。

具体的には出生直後のマウス肋軟骨の初代培養細胞を細胞伸展装置で培養し、静的な伸展刺激の元での細胞の分裂面及び分裂後の挙動の観察と、サイクリックな刺激の元での細胞の遺伝子発現変化について野生型及び SOX9K396R マウス由来の細胞で比較を行った。

本年度は 12 月 8-9 日の 2 日間にわたり加齢研において打ち合わせ及び実験を行い、その前後の代表者の所属機関での実験と合わせて以下のような研究成果を得た。

(3-1) 研究成果

本年度は、以下に示す研究成果を得た。

1. 静的な伸展刺激下の軟骨細胞のタイムラプス撮影の条件及び撮影

初代培養軟骨細胞はフィブロネクチンコートされたストレッチチャンバー (ストレックス) に 5×10^5

細胞ずつ播種することで翌日力学刺激、観察及び RNA 抽出に適した密度で生着した。

上記細胞に伸展率 10% で静的な伸展を加え、DeltaVision 顕微鏡により 10 分ごと 8 視野のタイムラプス撮影を 3 時間行い、細胞分裂の分裂面及び分裂後の細胞の CE 運動を観察した。その結果、予想に反して軟骨細胞は接着面上を活発に移動しており静的な伸展刺激は持続的な刺激にならないことが示唆された (図 1)。今後はより生体内の環境を再現する様に細胞を播種する基質の検討が必要である。

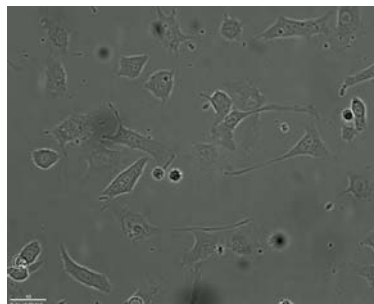


図 1 伸展刺激下の軟骨細胞

2. サイクリックな伸展刺激下の軟骨細胞の遺伝子発現と Sox9 の活性の解析

上記 1 と同様の条件で播種した細胞に伸展率 10%、5Hz の条件で 3 時間、伸展・弛緩のサイクリックな刺激を与え、totalRNA を抽出し microArray を用いて遺伝子発現を解析した。その結果伸展刺激によって発現量が増加する遺伝子が複数見出された。今後はこれらの遺伝子のうち野生型及び SOX9K396R マウス由来の細胞で挙動が異なるものについて生体における発現解析や、機能解析を進める。

(3-2) 波及効果と発展性など

本共同研究では上記のような実験の成果に加え代表者が加齢研での共同研究を行った際に対応者の研究室でセミナー及びディスカッションを行ったことで、代表者及び対応者それぞれに有用な研究のアイデアや手法のアドバイス、今後の共同研究の方向性などの波及効果が得られ、加齢研と学外の研究者との交流が促進された。

[4] 成果資料

(1) Nakamichi R., Ito Y., Inui M., et al. Mohawk promotes the maintenance and regeneration of the outer annulus fibrosus of intervertebral discs
Nature Communications 7, 12503