

論文内容要旨

軟骨に対する過度な機械的負荷時の FAK - MAPKs
カスケードによる炎症反応メカニズムの解明

主指導教員：谷本 幸太郎教授

(医歯薬保健学研究科 歯科矯正学)

副指導教員：里田 隆博教授

(医歯薬保健学研究科 生体構造・機能修復学)

副指導教員：國松 亮講師

(医歯薬保健学研究科 歯科矯正学)

矢野下 真

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

軟骨細胞において適度な力学的負荷は細胞外マトリックス（ECM）の恒常性維持に必要であるが、生理的許容を超える過度な機械的負荷は炎症反応とこれに続く ECM の破壊を引き起こすことで関節炎などの軟骨疾患の一因となる。

我々は、これまでに軟骨細胞において過度な機械的負荷時に、メカノレセプターの一つであるインテグリンを介したシグナル伝達により炎症反応が惹起される可能性について報告した。また、インテグリンの活性化に伴い、インテグリンの Focal adhesion kinase（FAK）への結合がトリガーとなり細胞内のシグナル伝達が生じることが明らかとなっている。しかしながら、軟骨細胞における機械的負荷受容時の FAK の機能と炎症反応との関係については不明である。そこで本研究では、過度な機械的負荷受容時のシグナル伝達における FAK の機能と炎症反応誘発メカニズムを解明することを目的とした。

1. 器官培養による下顎頭高負荷モデルを作製し、下顎頭軟骨細胞における高負荷受容時の FAK 阻害剤の役割を検討した。
13 週齢 Wistar 系雄性ラットの下顎頭軟骨を採取し、20g の分銅を用いて機械的負荷を付与した状態で 10 μM の FAK 阻害剤添加群と非添加群において器官培養を行った。24 時間後に下顎頭表層より下顎頭軟骨を採取し、COX-2、IL-1 β 、TNF- α 、MMP-3 および MMP-13 の遺伝子発現についてリアルタイム PCR 解析を行い FAK 阻害剤の作用を検討した。
2. EC 細胞株 AT805 から樹立されたマウス胚性腫瘍性細胞由来のクローン化細胞株 ATDC5 を軟骨分化誘導後、Flexcell Strain Unit®（FX-2000, Flexcell Corp）を用いて 10% の細胞伸展、毎分 30 サイクル（1 秒伸長/1 秒弛緩）の過度な周期的伸張刺激（CTS）を ATDC5 に負荷した。COX-2、IL-1 β 、TNF- α 、MMP-3 および MMP-13 の遺伝子発現についてリアルタイム PCR 解析を行った。
3. CTS 時の FAK 機能の解明のため、2. と同様に軟骨細胞に対して CTS 付与 0, 5, 10, 30, 60, 180 分後の FAK のリン酸化タンパク質について Western blot 解析を行った。また、FAK 阻害剤を添加後、CTS を付与 3 時間後の COX-2、IL-1 β 、TNF- α 、MMP-3 および MMP-13 の遺伝子発現についてリアルタイム定量 PCR 解析を行い FAK 阻害剤添加群（0.1 μM 、1 μM および 10 μM ）、負荷・非添加群および非負荷・非添加群について比較検討した。
4. CTS 時の FAK と MAPKs との関係を解明するため 2. と同様に FAK 阻害剤添加後、CTS を負荷し、p-38、ERK、JNK のリン酸化タンパク質について Western blot 解析により FAK 阻害剤添加群（0.1 μM 、1 μM および 10 μM ）と非添加群との比較検討を行った。また、FAK、p-38、ERK および JNK の各リン酸化阻害剤による CTS 時の COX-2、IL-1 β 、MMP-13 のタンパク質について Western blot 解析による比較検討した。

これらの実験結果、以下のことが明らかとなった。

1. 器官培養下顎頭高負荷モデルにおいて、20g の分銅による機械的負荷により亢進した COX-2、IL-1 β 、TNF- α 、MMP-3 および MMP-13 の遺伝子発現は 10 μM の FAK 阻害剤

の添加により有意に低下した。下顎頭軟骨細胞において FAK が炎症反応と関連していることが示唆された。

2. 培養軟骨細胞 に対する 10%の CTS 付与後 1 時間で、IL-1 β および TNF- α 、 3 時間で COX-2 および MMP-13、 6 時間で MMP-3 の発現が有意に亢進した。
3. 培養軟骨細胞 に対する 10%の CTS 付与後、 5 分で FAK のリン酸化が最大に達し、その後リン酸化レベルは 180 分まで継続した。また、 CTS により有意に亢進した COX-2、 IL-1 β 、 TNF- α 、 MMP-3 および MMP-13 の遺伝子発現は、FAK 阻害剤の添加により、濃度依存性に抑制された。培養軟骨細胞において FAK を介して炎症反応が惹起されている可能性が示唆された。
4. CTS により亢進した p-38、 ERK および JNK のリン酸化は、FAK 阻害剤の添加により濃度依存性に抑制された。FAK、 p-38、 ERK および JNK の各阻害剤による IL-1 β 、 COX-2、 MMP-13 のタンパク発現レベルの比較では、各阻害剤添加により同様に抑制された。

以上より、機械的負荷受容時に FAK は p-38、 ERK および JNK 経路を介して軟骨細胞の炎症反応を調節していると推察された。