



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	軟骨細胞の力学的ストレス応答におけるGlycosphingolipidsの機能解析
Author(s)	松原, 新史
Description	配架番号 : 2410
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第13031号
Issue Date	2018-03-22
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k13031
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/88823
Type	doctoral thesis
File Information	Shinji_Matsubara.pdf



学 位 論 文

軟骨細胞の力学的ストレス応答における Glycosphingolipids の機能解析
(Functional analysis of glycosphingolipids in response of chondrocytes under mechanical stress condition)

2018 年 3 月

北 海 道 大 学

松原 新史
Shinji Matsubara

学 位 論 文

軟骨細胞の力学的ストレス応答における Glycosphingolipids の機能解析
(Functional analysis of glycosphingolipids in response of chondrocytes under mechanical stress condition)

2018 年 3 月

北 海 道 大 学

松原 新史
Shinji Matsubara

目 次

発表論文目録および学会発表目録		1 頁
緒言		3 頁
略語表		13 頁
実験方法		14 頁
実験結果		25 頁
考察		32 頁
総括および結論		35 頁
謝辞		36 頁
引用文献		37 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に投稿中である.

1. Shinji Matsubara, Tomohiro Onodera, Eijiro Maeda, Daisuke Momma, Masatake Matsuoka, Kentaro Homan, Toshiro Ohashi, Norimasa Iwasaki

Depletion of Glycosphingolipids Induces Excessive Response of Chondrocytes under Mechanical Stress Condition

Osteoarthritis and Cartilage (submission day: 2017.9.15, 現在 under review)

本研究の一部は以下の学会に発表した.

1. 松原 新史, 小野寺 智洋, 前田 英次郎, 門間 太輔, 松岡 正剛
宝満 健太郎, 大橋 俊朗, 岩崎 倫政

三次元培養下における伸張ストレス負荷モデルの確立-

第 29 回日本軟骨代謝学会 2016 年 2 月 19-20 日, 広島, 口演

2. Shinji Matsubara, Tomohiro Onodera, Eijiro Maeda, Daisuke Momma, Masatake Matsuoka, Kentaro Homan, Toshiro Ohashi, Norimasa Iwasaki

The establishment of the novel mechanical stress model in three-dimensional culture

13th International cartilage repair society World congress 2016

September 24-27, 2016/ Sorrento, Italy, poster

3. 松原 新史, 小野寺 智洋, 前田 英次郎, 門間 太輔, 松岡 正剛
宝満 健太郎, 大橋 俊朗, 岩崎 倫政

GSLs は力学刺激応答に関与する

第 43 回日本臨床バイオメカニクス学会 2016 年 10 月 8－9 日, 札幌, 口演

4. 松原 新史, 小野寺 智洋, 前田 英次郎, 門間 太輔, 松岡 正剛
宝満 健太郎, 大橋 俊朗, 岩崎 倫政

軟骨細胞の力学的ストレス応答における GSLs の機能解析

第 30 回日本軟骨代謝学会 2017 年 3 月 3－4 日, 京都, 口演

5. Shinji Matsubara, Tomohiro Onodera, Eijiro Maeda, Daisuke Momma, Masatake Matsuoka, Kentaro Homan, Toshiro Ohashi, Norimasa Iwasaki

Depletion of Glycosphingolipids Induces the Excessive Response of Chondrocytes under Mechanical Stress Condition

Orthopaedic Research Society Annual Meeting 2017

March 19-22, 2017/ San Diego, USA, poster

6. 松原 新史, 小野寺 智洋, 前田 英次郎, 門間 太輔, 松岡 正剛
宝満 健太郎, 大橋 俊朗, 岩崎 倫政

軟骨細胞の力学的ストレス応答における GSLs の機能解析

第 33 回日本整形外科学会基礎学術集会 2017 年 10 月 26－27 日, 沖縄, 口演

緒 言

変形性関節症（Osteoarthritis, 以下 OA）は炎症とそれに付随する関節の主要な構造の変化により疼痛と運動機能低下を引き起こす¹。世界中で 1 億人以上の人が OA に罹患しており、患者の日常生活の活動レベルを低下させる²。OA の病態は遺伝的、分子的、環境的、そして力学ストレスなどの様々な要因が重なり合っているとされている³。特に肥満やアライメント異常、外傷、関節不安定性などの力学ストレスは、関節への負担の増加や関節内環境の変化を引き起こし、関節軟骨の変性を引き起こす最も重要な要因の 1 つである⁴。正常の荷重環境において、軟骨細胞はカタボリックな反応とアナボリックな反応の間でバランスをとり、関節軟骨の恒常性を維持している。一方、異常な力学ストレスはこのバランスを破綻させることで細胞外マトリックスを減少させ、軟骨変性を引き起こす^{5,6}。

軟骨細胞のメカノトランスダクションは一次繊毛や細胞骨格分子、力学感受性陽イオンチャネル stretch-activated ion channels (SACs) などを経たシグナル伝達メカニズムによって制御されていると言われている⁷⁻¹⁰。生理的で適度な力学負荷に対するシグナル伝達と、外傷などの過度な力学負荷に対するシグナル伝達は一般に異なるとされている^{5,6,11}。適度な力学負荷はインテグリン (integrin) およびアクチン細胞骨格を介して interleukin-4 (IL-4) を放出させ、カルシウムイオン (Ca^{2+}) 濃度を上昇させる。また、適度な力学負荷は Ca^{2+} チャネルの SACs や ATP を放出してプリン受容体である purinergic receptor 2 (P2) を介して、細胞内 Ca^{2+} 濃度を上昇させる。細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇は inducible nitric oxide synthase (iNOS) 発現の抑制や IL-4 産生を誘導し、カタボリックな作用を抑制する。また、interleukin-1 β (IL-1 β) 存在下においても、適度な負荷は炎症促進因子である nuclear factor-kappa B (NF- κ B) の発現抑制を介して、異化作用が抑制する¹¹ (Figure 1)。

一方、過度な力学負荷はアクチン細胞骨格を分解する $\alpha 5 \beta 1$ インテグリンや NF- κ B, 分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ (mitogen-activated protein kinase; MAPK) の発現を亢進させる。これらの作用は軟骨変性を促進する炎症性サイトカインやタンパク質分解酵素などの産生を増加する。また、過度な力学負荷は力学感受性イオンチャネルである SACs を介して細胞の Ca^{2+} 濃度を上昇させる。これに伴いカスパーゼ (caspase) がプロテアーゼカスケードを活性化させ、アポトーシスを誘発する。extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) を抑制し、タンパク質分解酵素の産生を亢進する IL-1 受容体が活性化され、アグリカンや II 型コラーゲンの産生が減少する¹¹ (Figure 2)。

いったんこのようなシグナル伝達メカニズムが破綻すると、正常な荷重環境により維持されていた関節軟骨の恒常性、特に軟骨細胞における細胞外基質産生は正常な生理学的環境においてさえ低下する⁶。このように力学ストレスを感知し、細胞内シグナルへ変換するシグナル伝達の破綻が OA を誘導することは知られているが、この OA 発症に関わるメカノトランスダクションの詳細なメカニズムについては未だ明らかとされていない。

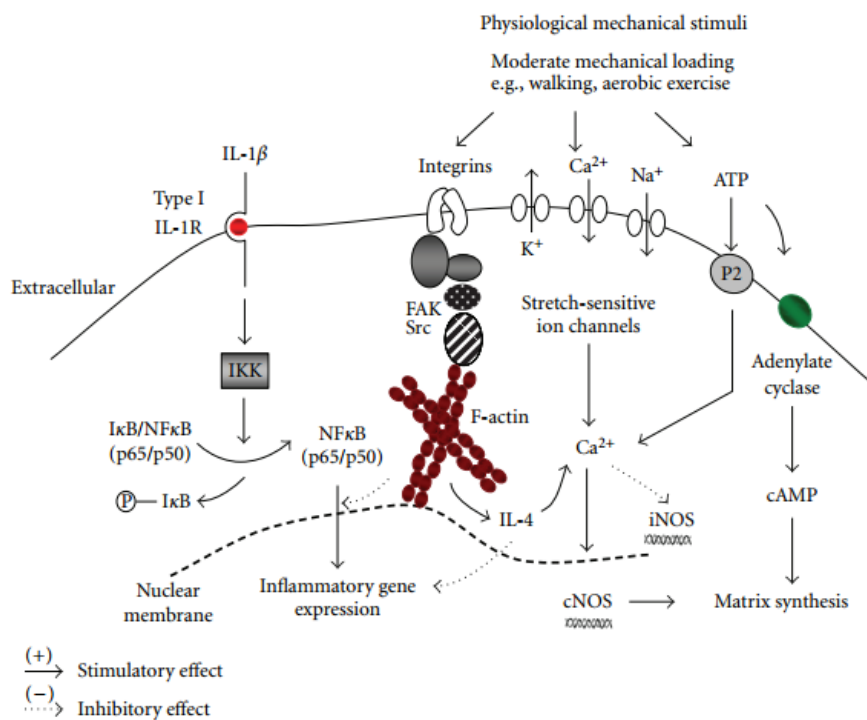


Figure 1 軟骨細胞の適度な力学的負荷に対するメカノトランスダクションおよび IL-1β に対する生化学的応答¹¹.

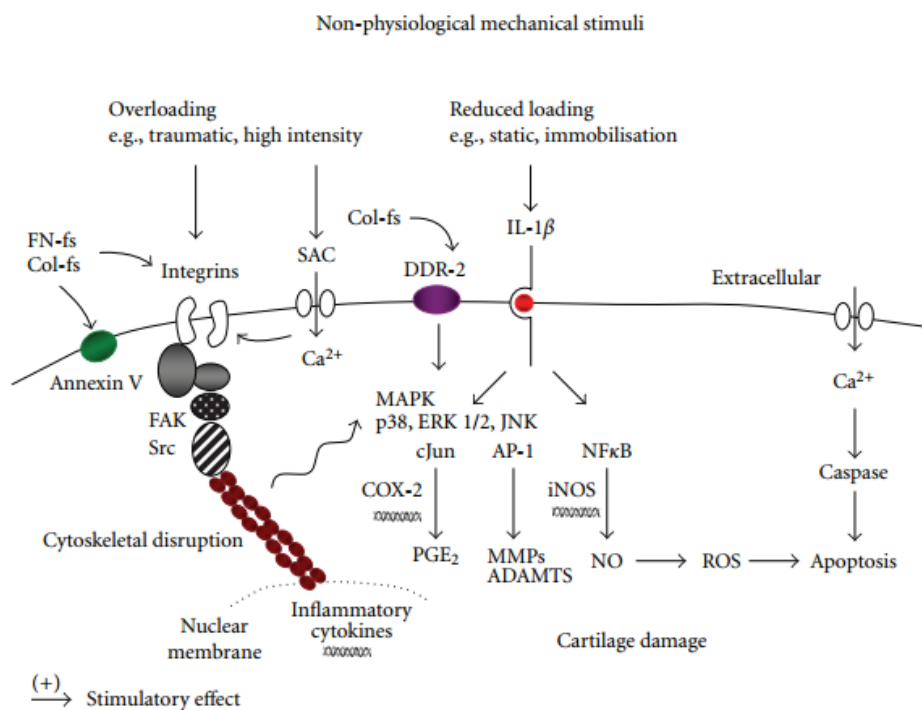


Figure 2 軟骨細胞の過度な力学的負荷に対するメカノトランスダクション¹¹.

スフィンゴ糖脂質 (glycosphingolipids; 以下 GSLs) は親水性の糖鎖部分と脂溶性のセラミドアンカーから構成されており、細胞膜に広く分布している。全ての真核細胞において、GSLs はセラミドアンカーと共に細胞膜外葉に組み込まれている。GSLs は細胞内シグナルカスケードのトリガーとなる細胞膜上の重要な受容体と相互に作用し合い¹²⁻¹⁴、ストレス応答を調節している¹⁵。OA の関節軟骨において、GSLs の 1 つであるガングリオシドの発現が低下していることが報告され¹⁶、GSLs が OA 発症に関与していることが示唆されている。そこで、私が所属する研究グループはこの GSLs に着目し、GSLs 合成経路の上流で機能するグルコシルセラミド合成酵素 (Ugcg) と ganglioside GM3 合成酵素をそれぞれノックアウトしたマウスを作製し、GSLs の機能を調査している^{17,18}。GSLs の合成経路を Figure 3 に示す。

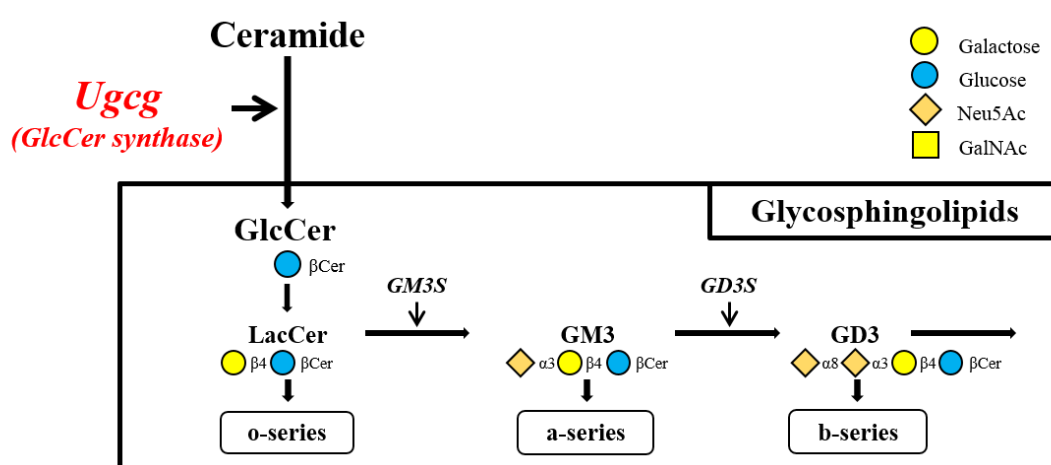


Figure 3 GSLs 合成経路. Ugcg はセラミド (Ceramide) からグルコシルセラミド (GlcCer) を合成する際に働く酵素 (グルコシルセラミド合成酵素) である。GM3 synthase (GM3S) は Lactosylceramide (LacCer) から ganglioside GM3 を合成する際に働く酵素 (GM3 合成酵素) である。

Ugcg はセラミド (ceramide) からグルコシルセラミド (glucosylceramide) を合成する際に働く酵素 (グルコシルセラミド合成酵素) であり、全身性に欠損させると胎生致死となることが知られている。そこで、我々の研究グループは、II 型コラーゲン $\alpha 1$ 鎖 (Col2a1) プロモーター下に Cre リコンビナーゼ (recombinase) が発現するマウス (Col2a1-Cre-transgenic mice) と 2 つの loxP site が Ugcg 遺伝子を挟むように存在するマウス (Ugcg^{loxP/loxP} mice) をかけ合わせることで軟骨細胞特異的に Ugcg 遺伝子をノックアウトしたマウス (Col2-Ugcg^{-/-} マウス) を作製し、その phenotype を評価している¹⁷。コントロールとして Cre がなく、かつ 2 つの loxP site を導入されたのみのマウス (Ugcg^{loxP/loxP} マウス) を用いている。便宜上、Col2-Ugcg^{-/-} マウスと Ugcg^{loxP/loxP} マウスを各々、Ugcg マウス、Flox マウスと記載している。

Figure 4-A は、実際に Cre リコンビナーゼにより 2 つの loxP site で挟まれた Ugcg 遺伝子が切り取られる模式図である。Ugcg マウスにおいて、実際に軟骨特異的に Ugcg

遺伝子がノックアウトされているかを確認するために、マウスの軟骨組織 (Cartilage) と脳 (Brain) からゲノム DNA を抽出し、PCR を行った結果が Figure 4-B である。上段のプライマー (Primer) 1 & 2 は $Ugcg^{loxP}$ の対立遺伝子を、プライマー 1 & 3 は $Ugcg^{\Delta}$ の対立遺伝子を同定するためのプライマーである。軟骨組織で、かつ、Cre が存在する (+) のみ $Ugcg^{\Delta}$ が陽性となっている。また、野生型マウス (wild-type mice, WT mice) と $Ugcg$ マウスの軟骨組織から採取した $Ugcg$ 遺伝子の mRNA 発現を qPCR (quantitative PCR) で解析し、 $Ugcg$ マウスの方が有意に低いことを確認している。

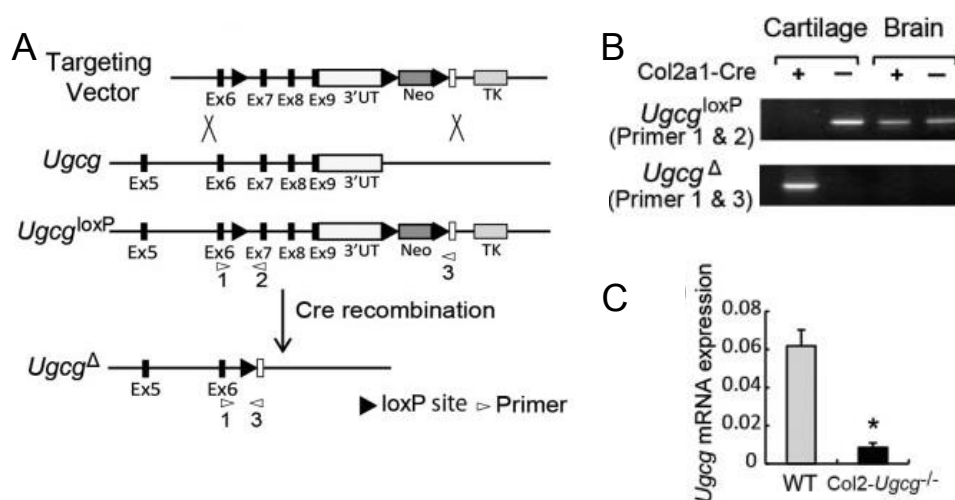


Figure 4 A Cre リコンビナーゼにより 2 つの loxP site で挟まれた *Ugcg* 遺伝子が切り取られる模式図。 B *Ugcg* マウスにおいて、実際に軟骨特異的に *Ugcg* 遺伝子がノックアウトされているかを確認するために、マウスの軟骨と脳からゲノム DNA を抽出し、PCR を行った結果。 上段のプライマー (Primer) 1 & 2 は $Ugcg^{loxP}$ の対立遺伝子を、プライマー 1 & 3 は $Ugcg^{\Delta}$ の対立遺伝子を同定するためのプライマーである。 C 野生型マウス (Wild type mice, WT mice) と *Ugcg* マウスの軟骨組織から採取した *Ugcg* 遺伝子の mRNA 発現を qPCR (quantitative PCR) で評価。 (Seito et al. 2012 より引用) ¹⁷

GSLs が欠損すると、加齢による OA の進行が助長される (Figure 5)。 Figure 5-A は、組織染色、もしくは免疫組織染色の結果である。 サフラニン O (Saf-O), matrix metalloproteinase 13 (MMP-13), そして terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL) で評価している。 Figure 5-B は組織学的に軟骨変性を評価する Mankin score¹⁹⁻²¹ (Figure 6) の結果である。 Figure 5-C, D はそれぞれの染色の陽性細胞数の結果である。 *Ugcg* マウス群で有意に陽性細胞数が増加している。

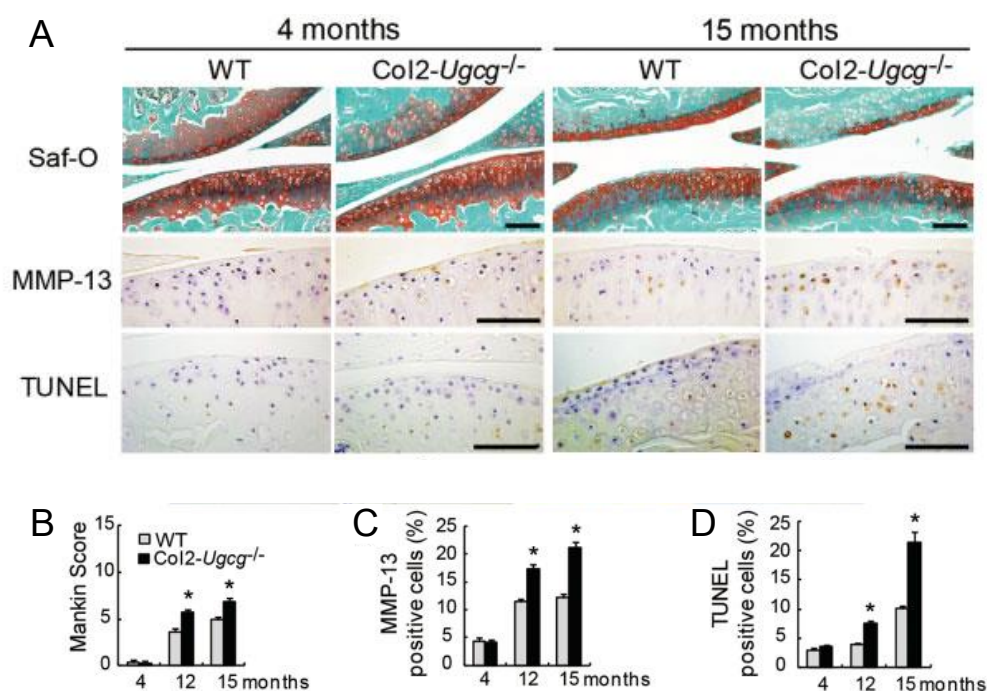


Figure 5 加齢に伴う OA の評価. 野生型マウスと Ugcg マウスとの比較. A 組織染色による評価. Saf-O, MMP-13, TUNEL による免疫染色. B Mankin score による評価¹⁹⁻²¹. C, D MMP-13 と TUNEL 染色の陽性細胞数を評価. 平均値と標準偏差 (standard deviation, SD) を表記. Bars=100 μ m. (Seito et al. 2012 より引用)¹⁷

Features	Grade
I – Cartilage structure	
a) normal	0
b) fibrillation in the superficial zone	1
c) fibrillation in the middle zone	2
d) irregularities in the superficial zone	3
e) fissures	4
f) erosion	5
g) pannus	6
II – Cellularity	
a) normal	0
b) diffuse hypercellularity	1
c) clones	2
d) hypocellularity	3
III – Toluidine blue staining	
a) normal	0
b) slight reduction	1
c) moderate reduction	2
d) severe reduction	3
e) absent	4

*Modified from Mankin et al., 1971

Figure 6 Mankin score¹⁹⁻²¹. 軟骨の構造, 細胞, トルイジンブルー (Toluidine blue, TB) の染色性によりスコアリング.

また, *GSLs* 欠損により細胞, 組織レベルにおいて, interleukin-1 (IL-1) による MMP-13 の発現や軟骨細胞のアポトーシスが增強される (Figure 7). Figure 7-A は, マウス大腿骨頭の器官培養を行い, IL-1 にて刺激することで OA を mimic した環境を作製し, 軟骨組織の細胞外基質の 1 つであるプロテオグリカン (proteoglycan) の漏出量, 細胞外基質を溶かす MMP-13, そして細胞のアポトーシスを反映する iNOS の遺伝子発現を解析した結果である. IL-1 存在下では, *Ugcg* マウス群で有意にそれぞれの遺伝子発現量が上昇しており, よりカタボリックな反応を示すことが分かる. さらに, Figure 7-B は Figure 5-A と同様に免疫組織染色の結果を示している. *Ugcg* マウス群でより変性が進行しているのが分かる.

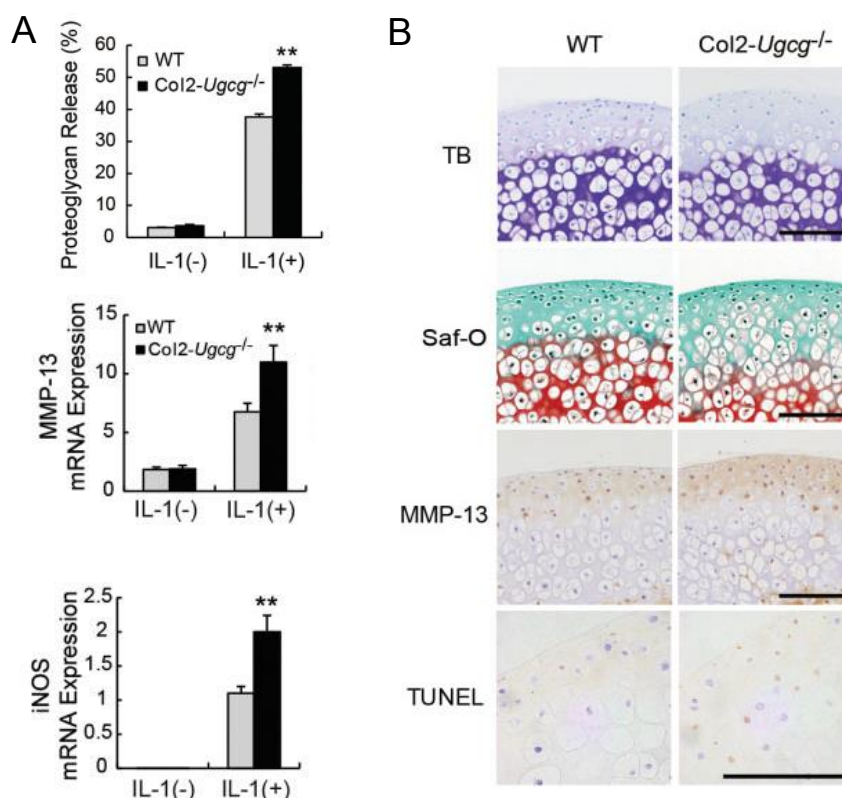


Figure 7 マウス大腿骨頭の器官培養に IL-1 刺激を負荷し, プロテオグリカンの漏出量, MMP-13 と iNOS の遺伝子発現を評価 (A). さらに TB, Saf-O, MMP-13, TUNEL による免疫組織染色の結果 (B). Bars =100 μ m. (Seito et al. 2012 より引用) ¹⁷

さらに OA が比較的早期に発症する膝関節の不安定性モデル用いて, 過度な力学ストレス環境を作り, *GSLs* 欠損が過度な力学ストレスによる OA 進行に及ぼす影響を評価した (Figure 8) ¹⁷. hematoxylin and eosin (HE) 染色とサフラニン O 染色における組織学的評価では, *Ugcg* マウスでより OA の進行を認め (Figure 8-A), さらに Mankin score による軟骨変性の評価でも, *Ugcg* 群で OA の進行が有意に促進されていた (Figure 8-B). これらの結果より, *GSLs* 欠損による OA 進行において, 力学ストレスが重要な役割を担う可能性が示唆されている.

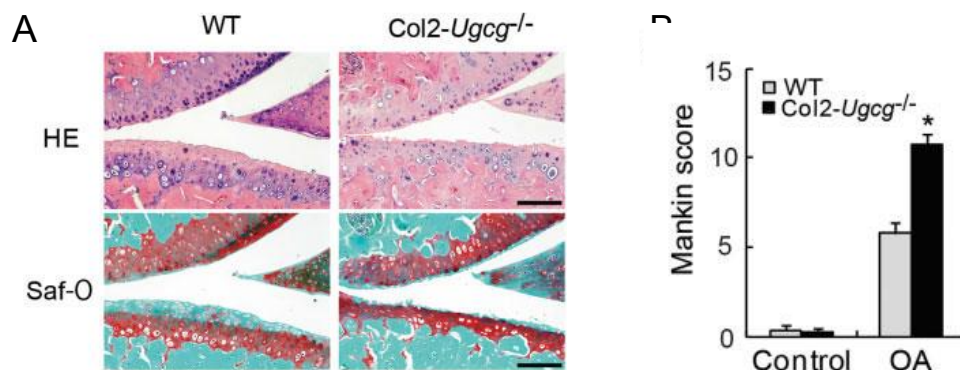


Figure 8 野生型マウス (WT) と Ugcg マウス (Ugcg) における膝関節不安定性 OA モデルにおける軟骨変性を組織学的に評価. A Hematoxylin and eosin (HE) 染色とサフラニン O 染色における組織学的評価の結果, Ugcg マウスでより OA の進行を認めた. B Mankin score¹⁹⁻²¹ の結果, Ugcg 群で有意に OA の進行を認めた. Bars=100 μ m. (Seito et al. 2012 より引用)¹⁷

細胞膜を模した脂質二重層構造の違いが細胞の圧縮弾性率と曲げ弾性率に影響を及ぼす²². さらに, GSLs の 1 つである ganglioside GM3 が細胞骨格構成要素の 1 つである中間径フィラメントと共局在を示すとする報告があり²³, GSLs が細胞骨格における構造変化を介して軟骨細胞の力学的性質に影響を及ぼしていることが示唆されている.

細胞の力学的性質を評価する目的に幾つかの方法が開発されてきた. 原子間力顕微鏡 (atomic force microscopy, AFM), MTC (magnetic twisting cytometry), サイトインデンテーション (cytoindentation), せん断流れ試験 (shear flow experiments), マイクロピペット吸引法 (micropipette aspiration) などがある²⁴ (Figure 9).

AFM は, カンチレバー先端の探針で試料表面をトレースし, 探針と試料との間に発生する力によって生じるカンチレバーのたわみ量を検出することで試料の表面形状を計測する装置であるため, 細胞の局所力学特性を計測することができる利点がある.

(Figure 9-A). MTC は, 細胞を磁場の発生するプレート上に接着させ, 細胞表面に接着した磁気ビーズに変動磁場を加え, 磁気ビーズの変位量から細胞の局所力学特性を計測する装置であるため, 光学顕微鏡を用いて視野内の多数の細胞を同時に計測できる利点がある (Figure 9-B). サイトインデンテーションは, 直径 10~100 μ m のサイトインデーター (cytoindenter) を細胞に当て, 細胞の反力を高感度の力変換機によって検出し, 細胞のポアソン比などの物性値を計測できる (Figure 9-C).

せん断流れ試験 (shear flow experiments) は, 静止した平らなプレートと回転するコーンで構成するビスコメーターによって, 細胞にせん断流れを負荷し, その抵抗力から細胞の力学特性を測定することができる (Figure 9-D). マイクロピペット吸引法 (micropipette aspiration) は, 細胞の一部または細胞全体をマイクロピペットで吸引圧を負荷して吸引する手法で, 吸引による変位量から細胞のヤング率や粘弾性を測定することができる (Figure 9-E).

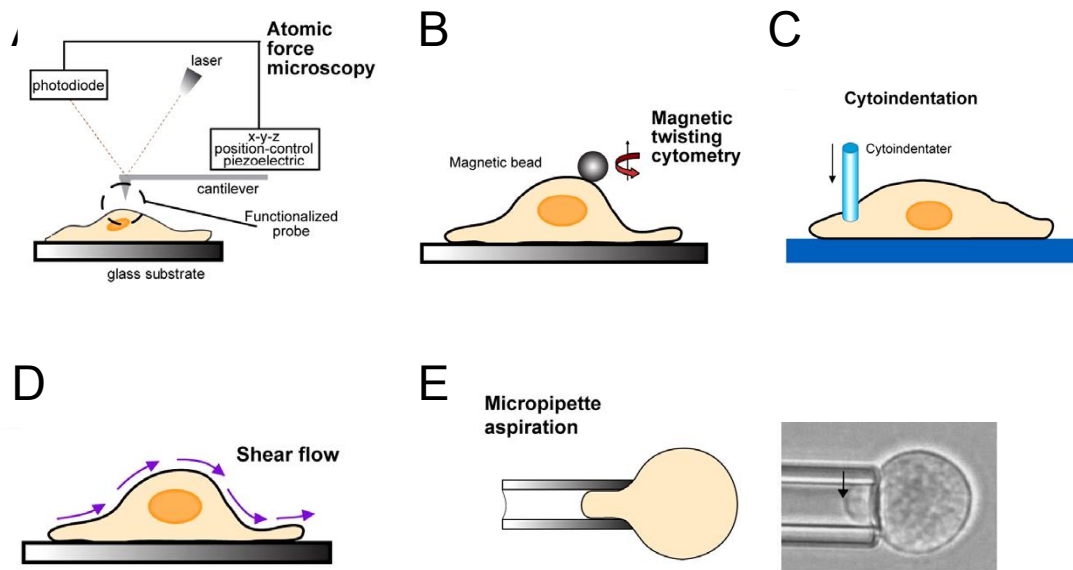


Figure 9 細胞の力学的性質を評価する様々な方法²⁴. A 原子間力顕微鏡 (AFM). B MTC. C サイトインデンテーション (cytoindentation) D せん断流れ試験 (shear flow experiments). E マイクロピペット吸引法 (micropipette aspiration).

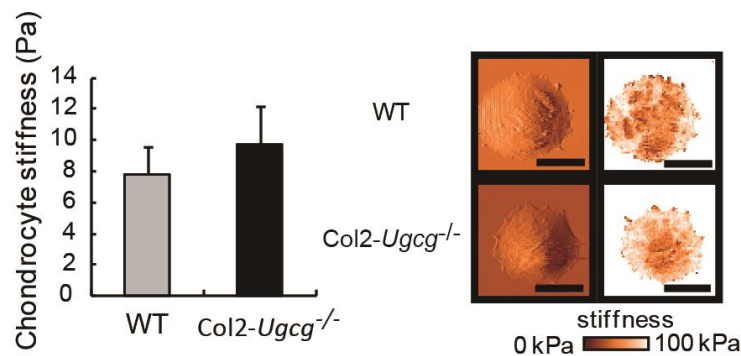


Figure 10 原子間力顕微鏡 (AFM) を用いて軟骨細胞の剛性を評価. Bars=30 μ m. (Seito et al. 2012 より引用)¹⁷

我々の研究グループは、AFM を用いて評価した軟骨細胞の剛性に対して、GSLs 欠損が影響を及ぼさないことを報告している (Figure 10)¹⁷. ただし、この結果は接着した状態での軟骨細胞の剛性を評価しているに過ぎず、さらに詳細な評価が必要と判断した. 接着している細胞においては、細胞骨格の評価が重要であると考え、アクチン染色の評価を、さらには浮遊した状態での細胞の評価も必要であり、マイクロピペット吸引法による評価が必要と思われた.

以上より、我々は本実験の仮説を GSLs が軟骨細胞の力学的性質と力学ストレスに対する生理的応答を調節している、とした. この仮説を評価するためにまず、GSLs

欠損軟骨細胞の力学的性質を評価することとした。次いで、軟骨細胞の力学ストレスに対する生理的応答を評価するために、軟骨細胞に負荷する力学ストレスのレベルを調節できる三次元培養下力学負荷モデルを確立し、確立したモデルを用いて **GSLs** 欠損軟骨細胞の力学ストレス応答を調査することとした。

本研究の目的は、軟骨細胞の力学的性質と力学ストレスに対する生理的応答における **GSLs** の役割を明らかにすることである。

略 語 表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである.

ADAMTS-5	a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 5
AFM	atomic force microscopy
AM	acetoxymethyl ester
ANOVA	analysis of variance
CCD	charge-coupled device
CI	confidence interval
Ct	threshold Cycle
CTS	cyclic tensile strain
Col2a1	collagen type II alpha 1 chain
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DMEM	dulbecco's Modified Eagle Medium
ERK1/2	extracellular signal-regulated kinase 1/2
FBS	fetal bovine serum
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GSL	glycosphingolipid
HE	hematoxylin and eosin
IL-1	interleukin-1
IL-1 β	interleukin-1 β
IL-4	interleukin-4
iNOS	inducible nitric oxide synthase
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MMP-13	matrix metalloproteinase 13
MTC	magnetic twisting cytometry
NF- κ B	nuclear factor-kappa B
OA	osteoarthritis
PBS	phosphate-buffered saline
PC	personal computer
P2	purinergic receptor 2
qPCR	quantitative PCR

SACs	stretch-activated ion channels
SD	standard deviation
TB	toluidine blue
TNF- α	tumor necrosis factor- α
TUNEL	terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling
Ugcg	UDP-glucose ceramide glucosyltransferase
WT	wild type

実験方法

動物

本研究のために実施した動物実験はすべて北海道大学動物実験に関する規程に従って実施した。

C57BL/6 マウス（野生型マウス, wild-type マウス), GSLs 合成経路 (Figure 4) においてセラミドからグルコシルセラミドを合成する過程で作用するグルコシルセラミド合成酵素 (Ugcg) の遺伝子を Cre/loxP system を用い, 軟骨の主要なマーカーである II 型コラーゲン (Col2) のプロモーター存在下に欠損させたマウス (Col2-Ugcg^{-/-}マウス), そしてそのコントロールとして Loxp site を導入したマウス (Ugcg^{loxP/loxP} マウス) を用いた^{17,18}. 便宜上, Col2-Ugcg^{-/-}マウスと Ugcg^{loxP/loxP} マウスを各々, Ugcg マウス, Flox マウスと記載することにした.

細胞単離と継代

軟骨細胞は生後 5 日のマウス膝関節より先行研究で示した方法に準じて単離した^{25,26}. まず, 大腿骨顆部と脛骨顆部より採取した軟骨片をトリプシン-EDTA (trypsin-EDTA 0.25 % (w/v), 和光純薬, 日本) を含んだ生理食塩水に浸し, 37°C で 30 分間処理した. その後, 100 unit/ml のペニシリン-ストレプトマイシン (penicillin-streptomycin, 和光純薬, 日本) および 10% の牛胎児血性 fetal bovine serum (FBS, Invitrogen, USA) を含んだダルベッコ変性イーグル培地 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Invitrogen, USA) で 0.25% に調整したコラゲナーゼ (Gibco, Invitrogen, USA) を添加し, 37°C で 4 時間処理することで軟骨細胞を単離した. この単離した初代軟骨細胞を 6 日間培養し, 継代を行った. 軟骨細胞の力学的性質を調査する実験では 4 継代まで行い, 初代, 1 継代, 4 継代の細胞を実験に用いた. 一方, 軟骨細胞の力学応答を調査する実験では 1 継代した細胞を用いた.

培地は, 100 unit/ml のペニシリン-ストレプトマイシンおよび 10% の FBS を添加した DMEM を用いた. 培養環境保持のため, 培地は 2 日おきに交換し, その際, リン酸緩衝生理食塩水 phosphate-buffered saline (PBS, タカラバイオ, 日本) を用いて 3

回洗浄した。6日間培養した細胞はトリプシン (trypsin-EDTA 0.5%, Invitrogen, USA) 2 ml を加え、インキュベーター内で5分間静置することでディッシュ底面から剥離させ、継代を行った。

軟骨細胞のアクチン細胞骨格を蛍光顕微鏡にて評価

軟骨細胞の細胞骨格を観察するため、アクチンフィラメントおよび細胞核の蛍光染色を行った。染色用の試料は、観察を行い易くするために直径 35 mm のガラスベースディッシュ (IWAKI, 日本) を用いた。細胞染色を行うために、まずディッシュから培地を取り除き PBS で2回洗浄した。細胞を固定するために、4%パラホルムアルデヒド (和光純薬工業, 日本) をディッシュ底面が覆われる程度加えて5分間静置し、PBS で2回洗浄した。次に PBS に溶解させて、0.05%に調整した Triton X-100 (和光純薬工業, 日本) をディッシュ底面が覆われる程度加えて5分間静置し、PBS で2回洗浄した。以降の作業は暗所で行った。アクチンフィラメントを染色するため、PBS で150 倍に薄めたローダミンファロイジン (rhodamine-phalloidin, Invitrogen, USA) をディッシュ底面が覆われる程度加えて30分間静置し、PBS で2回洗浄した。最後に細胞内の核を染色および退色を防止するために slow- fade gold with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Invitrogen, USA) を数滴加えて静置した。蛍光観察は北海道大学内ニコンイメージングセンターにて、高速共焦点顕微鏡 (共焦点レーザー顕微鏡システム A1, ニコン, 日本; 電動倒立顕微鏡 Ti-E, ニコン, 日本) に60倍対物レンズ (ニコン, 日本) を用いて行った。

マイクロピペット吸引実験

倒立顕微鏡 (IX81, オリンパス, 日本) と連結したマイクロピペット吸引システムのセットアップとそれに続く検査法は、過去に報告した方法に準じて行った²⁷⁻²⁹。マイクロピペット吸引法の概略を Figure 11 に示す。マイクロピペット吸引法とは細胞のヤング率を計測する方法で、ガラス製のマイクロピペットを細胞の表面に軽く接触させ、ピペット内を陰圧に負荷することで、その圧力と細胞の吸引変形量からヤング率を計測する方法である。ヤング率の算出方法は Theret らによって定式化されている³⁰。

これは試料を半無限体の均質な弾性体と仮定し、それにピペットで吸引圧力を作用させるモデルを用い、ピペット内の吸引圧を ΔP 、ピペットの内径を a 、外径を b 、変形量を L 、また $\eta = (b - a) / a$ に依存するピペット形状関数 (wall function) を $\Phi(\eta)$ とすると試料のヤング率 E は以下の式で与えられる³⁰.

$$E = \frac{3a \cdot \Delta P \cdot \Phi(\eta)}{2\pi L}$$

$\Phi(\eta)$ は Theret らによって定義された Force model と Punch model と呼ばれるモデル (Figure 12) から求められたピペットの形状関数 (pipette wall function) で, Force model がピペットの先端と試料の接触面に均一な応力が加わっていると定義し, その形状関数を Φ_F とした^{30,31}. 一方, Punch model はピペットの先端と試料の接触面の変位が 0 としたものと定義し, その形状関数を Φ_P とした. 本実験ではピペットの形状の影響が少ない Punch model を採用した. よって, Figure 12 のグラフと実際に用いたピペットの形状の寸法からピペット毎に形状関数を決定した.

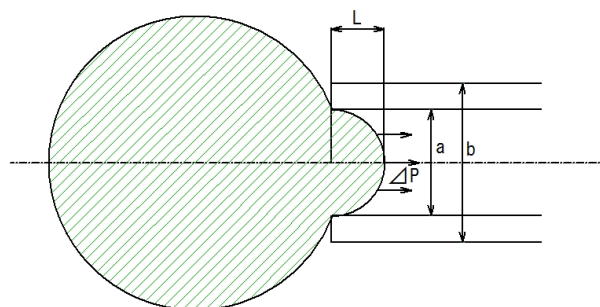


Figure 11 マイクロピペット吸引法: ピペット内の吸引圧を ΔP 、ピペットの内径を a 、外径を b 、変形量を L 、また $\eta = (b - a) / a$ に依存するピペット形状関数 (Wall function) を $\Phi(\eta)$ とする.

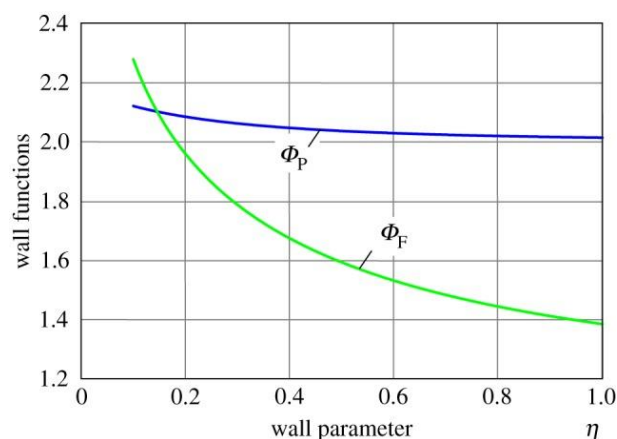


Figure 12 ピペットの形状関数³¹. Φ_P は Punch model の形状関数を, Φ_F は Force model の形状関数を示している.

本実験で使用した装置の概略と写真を Figures 13, 14 に示す. 顕微鏡は除振台 (明立精機, 日本) 上に設置され, 外部からの振動の影響を最小限に抑えた. マイクロピペットを操作する粗動マニピュレーター (MN-4, ナリシゲ, 日本) とマイクロマニピュレーター (MHW-103, ナリシゲ, 日本) は顕微鏡のステージに固定した. マイクロピペットは外径 1 mm, 内径 0.6 mm のガラス管 (G-1, ナリシゲ, 日本) をピペットプーラー (PC-10, ナリシゲ, 日本) で引き伸ばし, マイクロフォージ (MF-900, ナリシゲ, 日本) で先端部を加工した. ピペットプーラーの設定は 75°C と 61.2°C の二段引きとし, おもりの重さを 370 g にして, 内径 4 μm , 外径 8 μm の細いマイクロピペットを作製した. 作製したマイクロピペットをピペットホルダー (HI-7, ナリシゲ, 日本) 中のシリコンチューブ内に挿入してマイクロマニピュレーターに接続した. ピペットホルダーから内径 1.5 mm のシリコンチューブと三方活栓 (テルモ, 日本) を介して三角フラスコ, シリンジ (テルモ, 日本) をつなぎ, 三角フラスコに PBS を入れ, シリコンチューブと接続した後, シリンジを使ってチューブ全体とピペットホルダーまで気泡が残らないように PBS を満たした. 三角フラスコは穴付ゴム栓を取り付け, 大気に開放しながら Z 軸ステージ上に乗せてフラスコ内の液面の高さが顕微鏡のステージの高さ付近を上下に可動できるようにした. 液面がピペット先端より高い位置にあるときは陽圧が, 低い位置にあるときは陰圧がピペット内に作用する. また, シリンジはチューブ内の気泡を抜くために用いた. マイクロピペットに加えた圧力は顕微鏡の横にシリコンチューブと定規を垂直に立たせ簡易的なマンオメーターを作製し, チューブ内の液面の高さを測ることで計測した.

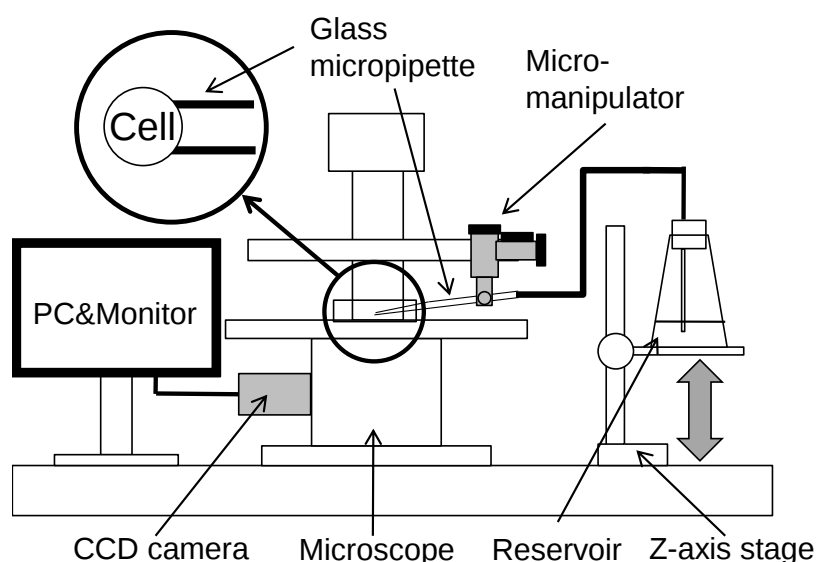


Figure 13 実験装置概略図. Charge-Coupled Device (CCD). personal computer (PC).



Figure 14 実験装置写真

細胞の変形は油浸 60 倍対物レンズ（オリンパス，日本），CCD カメラ（ORCA-R2，浜松ホトニクス，日本）を通してパソコンのモニターで観察した．実験に用いる浮遊細胞を含んだ懸濁液は Figure 15 のように加工した厚さ 2 mm のアクリル板と 30 mm × 30 mm のカバーガラス（松浪ガラス，日本）を接着して製作したチャンバーに導入した．チャンバーはマイクロピペットが横方向から進入できるようになっている．このチャンバーを倒立型顕微鏡-IX81 のステージに設置して実験を行った (Figure 16)．

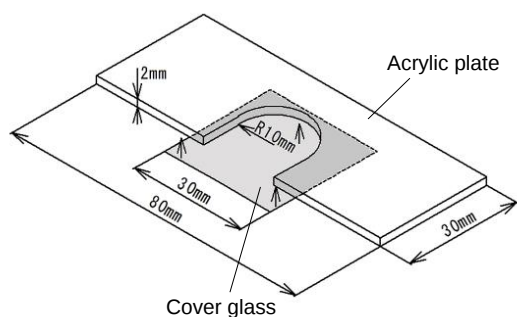


Figure 15 チャンバー．Cover glass の上に細胞懸濁液を 150 μ l 滴下し，実験を行う．

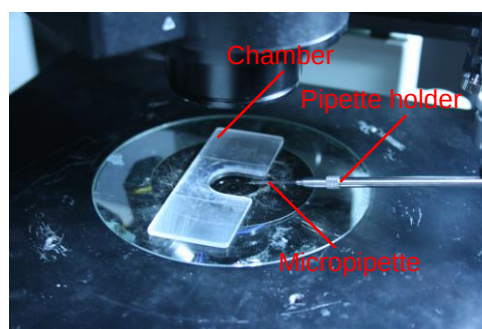


Figure 16 顕微鏡ステージとチャンバーの設置．

実験中にマイクロピペットに細胞や細かなゴミが附着しないように、ピペットの先端部を一度 Sigmacote (Sigma-Aldrich, USA) に浸した後、マイクロピペットをホルダーに取り付け、ピペットホルダーに接続したシリンジを使ってピペット先端部まで PBS を満たした。その後、ピペットホルダーをマイクロマニピュレーターに固定して、ピペット先端がチャンバー上の懸濁液に浸るように粗動マニピュレーターを動かした。マイクロマニピュレーターと顕微鏡を使い、細胞とピペット先端のピントを合わせ、細胞をピペット先端に捕捉した。モニターで確認しながらピペット内の圧力差が 0 cmH₂O になるように Z 軸ステージを動かし、この時の液面の高さを計測した。次に、Z 軸ステージを 0.5 cm ずつ降下させながら吸引実験を行った。また、細胞のもつ粘弾性が吸引量に影響を及ぼさないよう、各陰圧の負荷後 60 秒保持してからモニター上の映像を取得した (Figure 17)。これを各細胞につき 2.5 cm 降下させるまで行った。実験終了後、シリコンチューブとシリンジ内に入っている PBS は全て取り除いて廃棄し、三角フラスコやチューブ類等の実験器具はゴミが付着しないように超純水を用いて洗浄し、再度利用できるようにした。取得した画像から細胞の吸引長さ L 、ピペット内径 a 、外径 b を画像処理ソフト ImageJ (Version 1.45s, National Institute of Health, USA) を用いて計測した。なお、計測時のスケールはあらかじめマイクロメーター (オリンパス, 日本) を実験と同じ倍率で撮影した顕微鏡画像を用いて校正した。1 回の実験において、懸濁液から 3 つ以上の細胞を選択し、少なくとも 3 回以上は繰り返し計測を行なった。

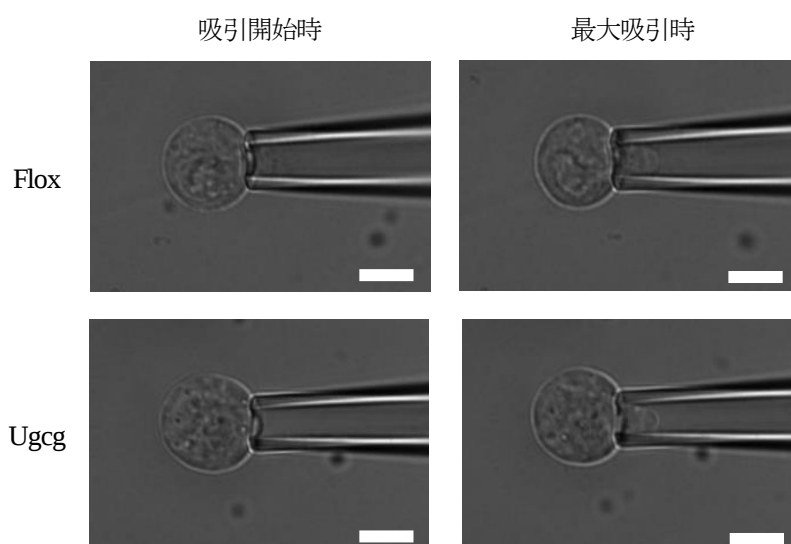


Figure 17 Flox マウスと Ugcg マウスから採取した軟骨細胞にマイクロピペット吸引を負荷した際の明視野像。左側が吸引開始時、右側が最大吸引時。Scale bar = 10 μ m.

3次元培養下における軟骨細胞への力学負荷実験

野生型マウス, Flox マウス, Ugcg マウスから採取し, 1 継代した軟骨細胞を I 型コラーゲンゲル (新田ゼラチン, 日本) に包埋し, 最終の細胞濃度を 1.0×10^6 cells/ml とした³². 細胞が包埋されたゲルを 2.0×10^6 cells/chamber となるようにチャンバーに流し込み, ゲル化させた後に 2 ml の培地を加えた. チャンバーの中央には 4 本の円筒状のポストが正方形 ($1.0 \text{ mm} \times 1.0 \text{ mm}$) を形作るように存在する (Figure 12-A, B). 軟骨細胞を包埋したゲルに培地を加えた状態で 24 時間前培養した後に, FBS 無しの培地に変更し, 力学負荷装置 (ST-140, ストレックス社, 日本) を用いて細胞入りのゲルに対して cyclic tensile strain (CTS) を負荷した (Figure 12-C). 一般に軟骨細胞には繰り返しの圧縮力, 浸透圧, 伸張力が負荷される³³. 私はその中でもよりカタボリックな負荷となり易い伸張力を選択した. 負荷条件は, 頻度を 1 Hz, ひずみ量を 5%, 10%, 16%, 時間を 3 時間, 24 時間に設定した. CTS を負荷しない群をコントロールとして用いた.

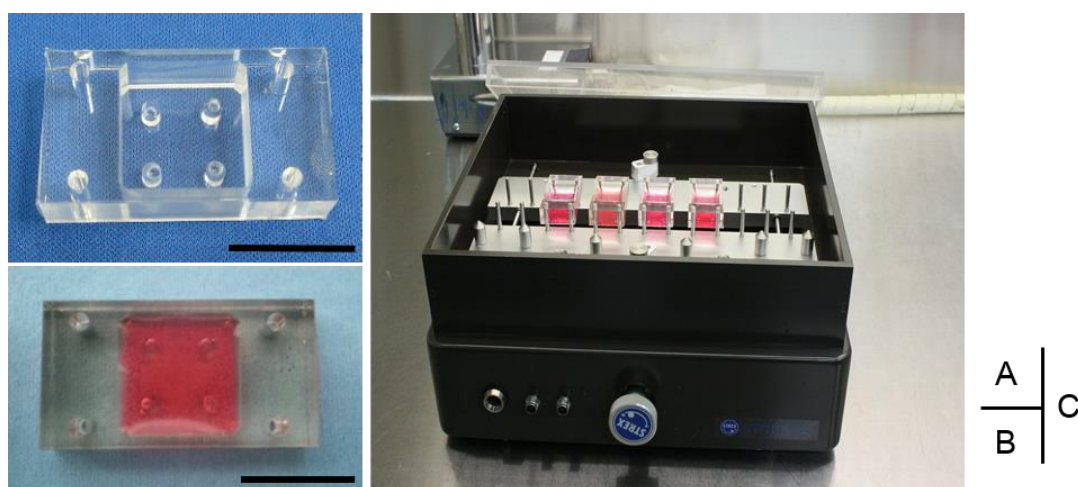


Figure 18 A 本実験で用いたチャンバー. $2.0 \text{ cm} \times 2.0 \text{ cm}$ の培養領域の中央に 4 本の円筒状ポストが正方形 ($1.0 \text{ mm} \times 1.0 \text{ mm}$) を形成している. Scale bar = 1 cm. B 軟骨細胞をコラーゲンタイプ 1 のゲルに包埋し, 2ml の培地を滴下した. C ゲル入りのチャンバーを力学負荷装置 (ST-140) に設置し, CTS (cyclic tensile strain) を負荷した.

予備実験において, 24 時間の力学負荷を行った時点でチャンバーの力学負荷方向と直行する面でゲルが剥がれてしまった. したがって, 24 時間負荷の間, 負荷強度が一定でないことが示唆された (Figure 19-Group 1). そこで, 本実験では 4 本のポストに

囲まれた領域に細胞を包埋し、力学負荷前に Group 1 で剥がれてしまった面を予めチャンバーから剥がしておき、4 本のポストによって細胞へ伸張力を負荷した (Figure 19-Group 2)。

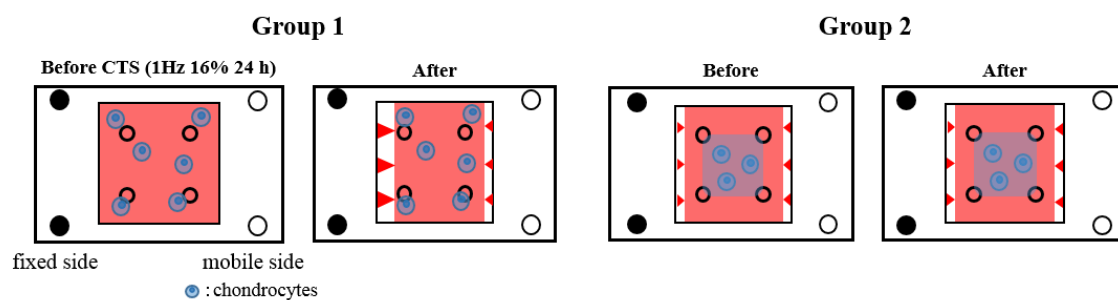


Figure 19 Group 1 軟骨細胞を包埋したゲルをチャンバー内で隙間なく作製し、cyclic tensile strain (1 Hz, 16%, 24 h) を負荷したが、ゲルが負荷方向と垂直な面で剥がれてしまっていた。Group 2 細胞を 4 本のポストの中央に包埋し、ゲルをチャンバーの力学負荷方向と垂直な面で予め剥がしておき、CTS (1 Hz, 16%, 24 h) を負荷した。負荷終了後の時点でゲルのチャンバーからの剥がれ方に変化はなかった。

伸張負荷による細胞変形の評価

野生型マウス軟骨細胞を 4 本のポストに囲まれた領域に包埋し (Figure 19-Group 2), チャンバーをカスタムメイド力学負荷装置³⁴に設置した (Figure 20)。この力学負荷装置は顕微鏡 (Nikon A1R system) に設置することが可能であり、力学負荷と同時に細胞の形態変化を観察可能である。

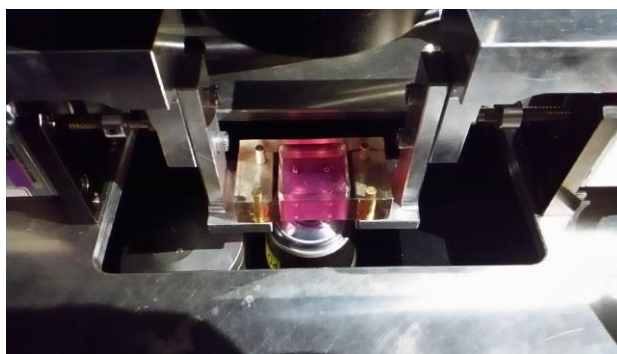


Figure 20 カスタムメイドの力学負荷装置。チャンバーを設置し、伸張力の強度、頻度、時間を調節して負荷することができる。

この装置には作業プログラム (LabVIEW, National Instruments, USA) を介してチャンバーに一軸性の伸張力を負荷することができる一組のリニアアクチュエーターが備わっており、細胞は透過光を用いて 20 倍のレンズで観察した。5%, 10%, 16%の静的引張りひずみをチャンバーに負荷し、それぞれの条件における視野イメージを観察した。細胞に負荷した伸張力レベルを定義するために、顕微鏡下に得られた視野から選択した細胞の縦径と横径を算出した。伸張力を負荷していくと、少しずつ焦点の合っている場所が移動してしまい、縦径・横径の値に影響を及ぼしてしまうため、縦横比にて伸張力のレベルを評価することとした (Figure 121. この縦横比の算出は伸張力を負荷していない状態 (0% strain) でも行い、これを基準とした。さらに、静的引張りひずみを負荷した際の縦横比はCTSの中で最も厳しい条件である「1 Hz, 16%, 24時間」を負荷する前後、2つのタイムポイントで評価した。

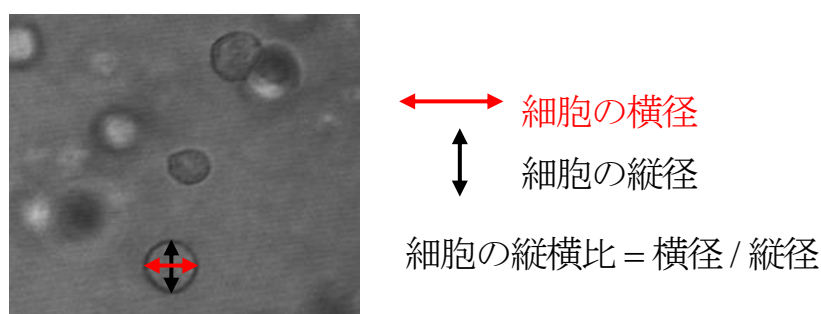


Figure 21 カスタムメイド力学負荷装置 (Figure 14) で細胞に伸張力を負荷した状態で顕微鏡下に細胞の変形を観察し、細胞の横径、縦径より縦横比を算出。この縦横比より伸張力のレベルを評価。

遺伝子発現の評価

軟骨細胞に CTS を 3 時間または 24 時間負荷した直後に、細胞が包埋されている 4 本のポストに囲まれた立方体の領域のゲルを切り出し、メーカープロトコル従って Trizol (Invitrogen Life Technologies, CA)を用いて軟骨細胞から全 RNA を抽出した。DNA 合成のために、random hexamer primers (Promega, USA)と ImProm II reverse transcriptase (Promega)を用いて、0.5 mg または 1.0 mg の RNA を逆転写し、cDNA を合成した。

real-time quantitative PCR (qPCR) は Opticon II system (Bio-Rad, Japan)によって施行し、シグナルは SYBR Green qPCR Kit (Finnzymes, Japan) を用いて検出した。Col2a1, Aggrecan, a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 5 (ADAMTS-5),

MMP-13, Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) 遺伝子に対する特異的なプライマーを用いた (Table 1). Housekeeping gene として, GAPDH を, アナボリックなファクターとして, Col2a1, Aggrecan を, カタボリックなファクターとして, ADAMTS-5, MMP-13 を評価した. それぞれのターゲット遺伝子の相対的な発現は $\Delta\Delta C_t$ 法により GAPDH の Threshold cycle (C_t) 値で標準化した C_t 値で表した³⁵. この遺伝子発現評価は, モデル作製のために野生型マウス軟骨細胞で行い, モデル確立後に Flox マウス, Ugcg マウスの軟骨細胞で行った.

Table 1 本研究で使したプライマー

Anabolic factor		
Col2a1-encoding gene	forward	5'-AGGATGGCTGCACCAAACAC-3'
	reverse	5'-TGTCCATGGGTGCGATGTC-3'
Aggrecan-encoding gene	forward	5'-CCCTCACCCCAAGAATCAAG-3'
	reverse	5'-GGATAGTTGGGGAGCGACAC-3'
Catabolic factor		
ADAMTS-5-encoding gene	forward	5'-GGAGCGAGGCCATTTACAAC-3'
	reverse	5'-CGTAGACAAGGTAGCCCCTTT-3'
MMP-13-encoding gene	forward	5'-TTGGCCACTCCCTAGGTCTG-3'
	reverse	5'-GGTTGGGGTCTTCATCGC-3'
Housekeeping gene		
GAPDH-encoding gene	forward	5'-ACTTTGTCAAGCTCATTTC-3'
	reverse	5'-TGCAGCGAACTTTATTGATG-3'

カルシウムイオン (Ca^{2+}) 濃度の評価

Flox マウスと Ugcg マウスから得られた軟骨細胞の間で, 力学ストレスに対する感度の違いを調べるために力学ストレスにより変化する細胞内 Ca^{2+} 濃度を評価することにした. 3次元培養の方が理想的であるが, 3次元培養条件での Ca^{2+} oscillation 観察は技術的に困難であった. Ca^{2+} indicator である Fluo-4 acetoxymethyl ester (AM) は3次元培養モデルの scaffold であるコラーゲンタイプ 1 ゲルへの浸透が悪く, 観察が困難であった. 浸透し易くするためにゲルに小さな孔を明けて実験を行ったが, やはり困難であった. 次に軟骨細胞を Fluo-4 AM で染色した後にゲルに包埋したが, ゲルが固

まるまでの間に Fluo-4 AM の染色性が低下し、観察は困難であった。3 次元での観察は難しいと判断し、2 次元培養での観察を試みた。Flox マウス、Ugcg マウスの 2 種類のマウスから得られた軟骨細胞を 1 継代し、トリプシンで剥がした後に、 1.0×10^5 cells/cm² 濃度で底面をフィブロネクチンでコーティングしたストレッチチャンバーに蒔いた。軟骨細胞は顕微鏡で観察する前に 37°C、5% CO₂ 条件下で 24 時間前培養を行った。その後、暗所にて Fluo4- AM (5 μ M, ThermoFisher Scientific) と probenecid (2.5 mM, ThermoFisher Scientific) 入りの培地で 37°C、5% CO₂ 条件の下、30 分間培養した。培地を交換し、1.25 mM の probenecid を追加した。このチャンバーを細胞変形評価で用いた共焦点レーザー顕微鏡 (Nikon A1R system) 付きの力学負荷装置²⁷にセットした。さらにカートリッジ式のヒーターを 2 つ、チャンバーに挿入し、共焦点イメージングの間、チャンバーの温度を 37°C 一定に保った。

20 倍の対物レンズ (Nikon) を用いて、レーザーの励起波長を 488 nm に設定し細胞を観察した。蛍光標識された軟骨細胞を観察するのに適した 1 視野 (635 μ m $\times$ 635 μ m) を選択した。イメージングスピードを 1 fps に設定し、蛍光標識された軟骨細胞の力学負荷前の蛍光強度として 5 分間のイメージングを行い、この結果をコントロールとした。続いて、軟骨細胞に 0%, 5%, 10%, 16% の CTS を 1Hz、10 秒間負荷し、その直後より、同じ視野で、刺激後の蛍光強度を 5 分間計測した。幾つかのケースでは同じチャンバーで数回、この工程を繰り返した。その際、1 つ前の工程で負荷した CTS の影響を無くし、蛍光強度を初期の状態に戻すため、インターバルを 15 分間設けた。さらに、1 つ前の工程で照射されたレーザーによる蛍光退色の影響を避けるために、同じチャンバー内で視野を変更して行った。5 分間の観察で Ca²⁺ oscillation を認めた細胞数の力学負荷前後での増加率を oscillation ratio として定義した^{36,37}。

統計分析

全てのデータは平均値と 95% 信頼区間 (95% confidence intervals, 以下 CI) をもって表記した。全てのデータは正規性を Shapiro-Wilk test にて、等分散性を Bartlett's test にて検定した。2 群間のデータの比較は 2 群間の等分散性に従って Student's *t*-test もしくは Welch's *t*-test を用いて検定した。3 群以上の比較においては、one-way analysis of variance (ANOVA) 検定を初めに行い、統計的有意性が認められた場合に Tukey-Kramer multiple comparison tests を用いて多重検定を行った。正規性が保たれない時は、Kruskal-Wallis test および Dunn's post hoc test を用いて検定した。判定は *p* 値 < 0.05 で有

意差ありとした．全ての統計解析は統計解析ソフト JMP Pro 11.0 （SAS Institute, USA）を用いて行なった．

実験結果

GSLs が培養軟骨細胞のアクチン細胞骨格に及ぼす評価

GSLs が接着した軟骨細胞の力学的性質に及ぼす影響を評価するため、軟骨細胞のアクチン細胞骨格を評価した。Flox マウス, Ugcg マウス, 双方の軟骨細胞において、継代を重ねるに連れてアクチンストレスファイバーの形成を認めた。しかしながら、それぞれの継代条件において、アクチンストレスファイバー形成は両群間で差を認めなかった (Figure 22)。

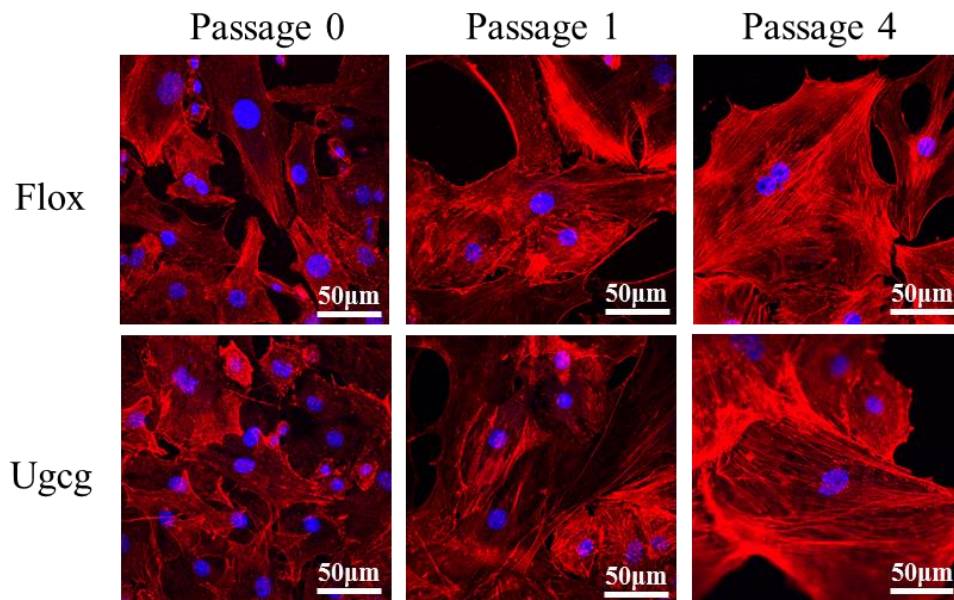


Figure 22 Flox マウス, Ugcg マウスから採取した軟骨細胞のアクチン細胞骨格 (赤) と細胞核 (青) を共焦点レーザー顕微鏡で観察したイメージ。

GSLs が軟骨細胞のヤング率に及ぼす影響

GSLs が浮遊した軟骨細胞の力学的性質に及ぼす影響を評価するため、軟骨細胞のヤング率を評価した。初代軟骨細胞のヤング率は、Flox マウスで 0.24 ± 0.07 kPa (平均 $\pm$ SD), Ugcg マウスで 0.22 ± 0.09 kPa ($p = 0.26$)。1 継代した細胞においては、Flox で 0.29 ± 0.07 kPa, Ugcg で 0.31 ± 0.08 kPa ($p = 0.58$)。4 継代した細胞においては、

Flox で 0.30 ± 0.05 kPa, Ugcg で 0.31 ± 0.08 kPa ($p = 0.96$) であった。したがって、初代, 1 継代, 4 継代した軟骨細胞において, 両群間で有意差な差を認めなかった (Figure 23)。

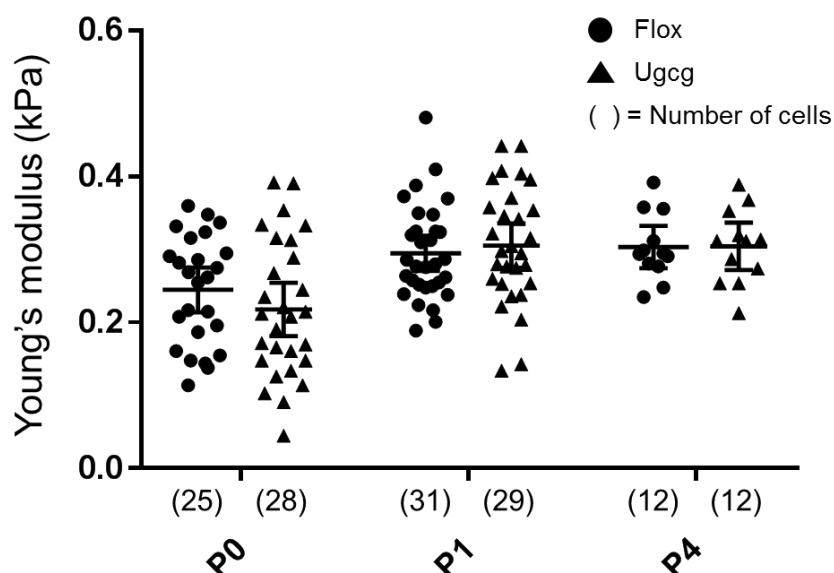


Figure 23 それぞれのマウス軟骨細胞におけるマイクロピペット吸引にて算出したヤング率. 平均値と 95% CI を表記.

コラーゲンゲル内での軟骨細胞の変形

伸張力を負荷した際にゲル内の軟骨細胞にしっかりと伸長力が負荷されていることを確認する目的で顕微鏡下に細胞の変形を評価した. 長時間の CTS を負荷する前後で評価し, 長時間の力学負荷後であってもゲル内の軟骨細胞に変わらず伸長力が負荷されていることを確認する目的でもあった. Group 1 では, WT マウス軟骨細胞をゲル全体に包埋し, 1Hz, 16%, 24 時間の CTS 負荷をかけたところ, 全てのゲルがチャンバーから徐々に剥がれてしまった. 一方, Group 2 では WT マウス軟骨細胞を 4 本のポストに囲まれた立方体の領域に包埋し, CTS を負荷する前に予めゲルをチャンバーから剥がし, 4 本のポストによって力学ストレスを負荷した. Group 1 では CTS 負荷前の 10%, 16%において縦横比がそれぞれ 1.19 ± 0.09 , 1.29 ± 0.10 であり, 0% (1.00 ± 0.09) と比較して有意に高かった (共に $p < 0.0001$). しかし, 負荷後においてはどのレベルにおいても有意な差を認めなかった. 一方, Group 2 では CTS 負荷前の 10%, 16%において縦横比がそれぞれ 1.12 ± 0.08 , 1.17 ± 0.08 であり, 0% (1.00 ± 0.10) と比較して

有意に高かった（共に $p < 0.0001$ ）。さらに負荷後においても 10%, 16%において縦横比がそれぞれ 1.14 ± 0.11 , 1.22 ± 0.11 であり, 0% (1.00 ± 0.10) と比較して有意に高い結果となった ($p = 0.011$, $p < 0.0001$) (Figure 24).

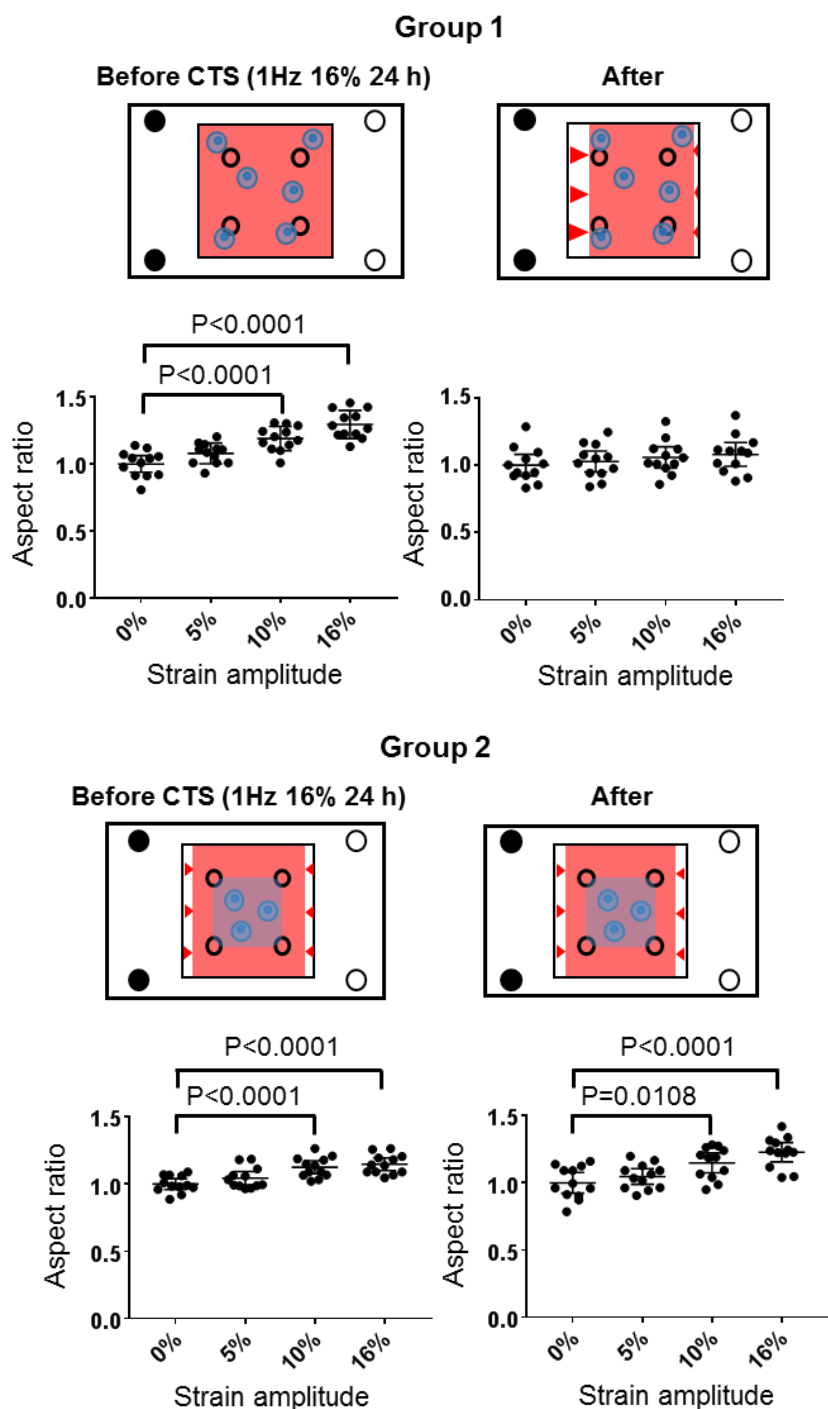


Figure 24 Group1 と 2 それぞれにおける CTS (1 Hz, 16%, 24 時間) 負荷前と負荷後の縦横比. 平均値と 95% CI を表記. (n 数はそれぞれのグループで 12 samples ずつ)

力学ストレスが野生型マウス軟骨細胞の遺伝子発現に及ぼす影響

野生型マウス軟骨細胞に 5% CTS を負荷すると、3 時間の Col2a1 の発現が有意に上昇 ($p = 0.029$) し、3 時間の ADAMTS-5 と 24 時間の MMP-13 の発現が有意に低下した ($p = 0.045$, $p = 0.016$) (Figure 25). 一方、10% CTS 負荷においては、24 時間の Col2a1, MMP-13 の発現が低下した ($p = 0.012$, $p < 0.001$). そして、16% CTS 負荷においては、3 時間の Aggrecan の発現が低下し ($p = 0.01$), 24 時間の ADAMTS-5 と MMP-13 の発現が上昇した ($p = 0.034$, $p = 0.013$).

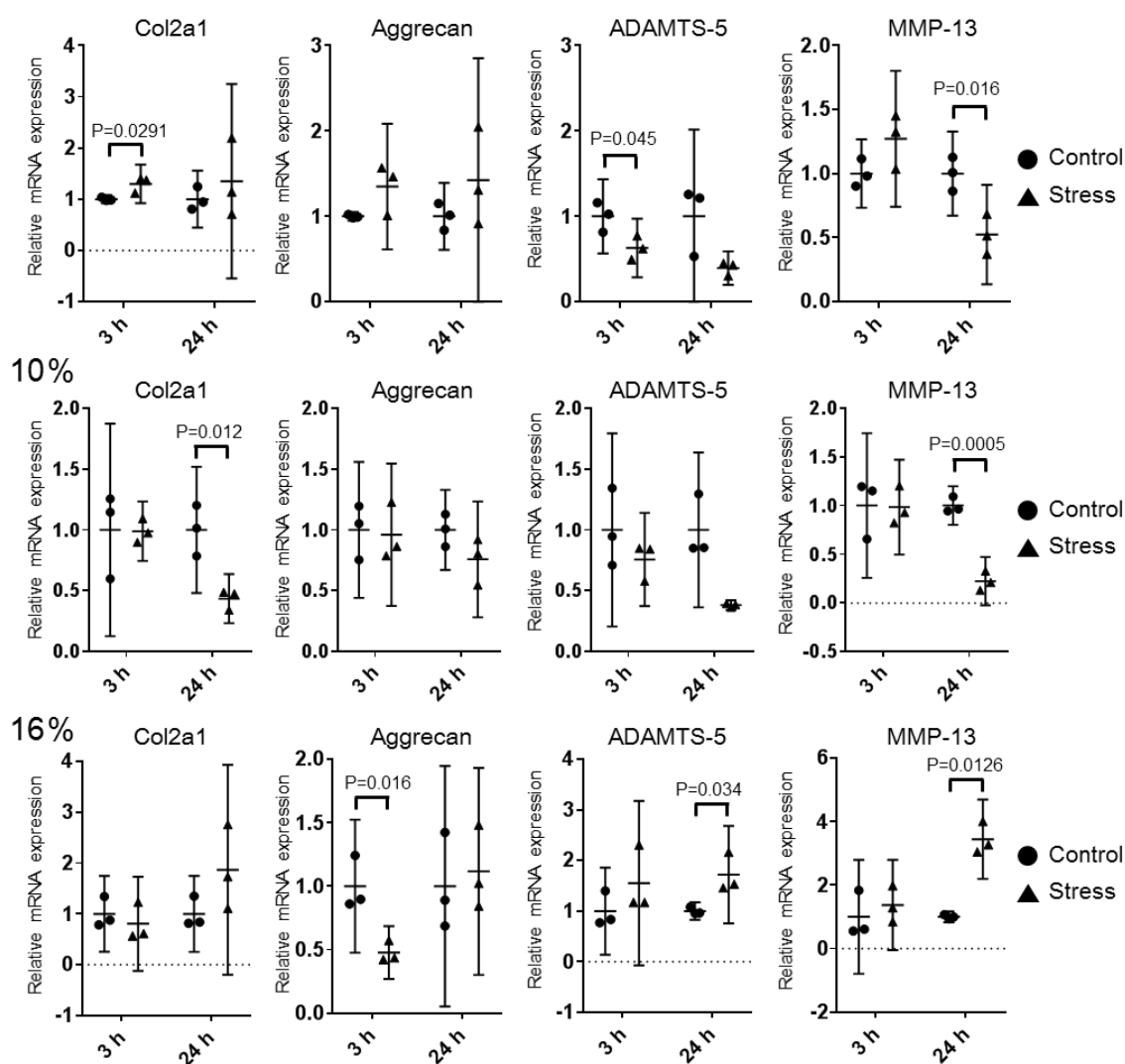


Figure 25 WT マウス軟骨細胞における anabolic factors (Col2a1, Aggrecan) と catabolic factors (ADAMTS-5 と MMP-13) の遺伝子発現. データは 3 時間, 24 時間におけるコントロール群に対する相対的な発現量として表現. 平均値と 95% CI を表記. (n 数は全てのグループで 3 samples ずつ)

GSLs 欠損は力学ストレス応答において catabolism を増強させる

静置培養条件 (Non-stress) では, Flox, Ugcg 両群間において 3 時間, 24 時間それぞれのタイムポイントで遺伝子発現に差を認めなかった (Figure 26). 5% CTS 負荷において, Flox 群と比較して Ugcg 群で 3 時間の Col2a1 と AggreCAN の発現が有意に低下 ($p = 0.004$, $p = 0.011$) する一方で, 3 時間の MMP-13 の発現も有意に低下した ($p = 0.032$). 10% CTS 負荷においては, Ugcg 群で 24 時間の ADAMTS-5 と 24 時間の MMP-13 の発現が有意に上昇した ($p = 0.019$, $p = 0.008$). さらに 16% CTS 負荷においては, Ugcg 群で 3 時間の Col2a1 と AggreCAN の発現が減少する傾向を示した ($p = 0.0765$, $p = 0.057$).

Non-stress

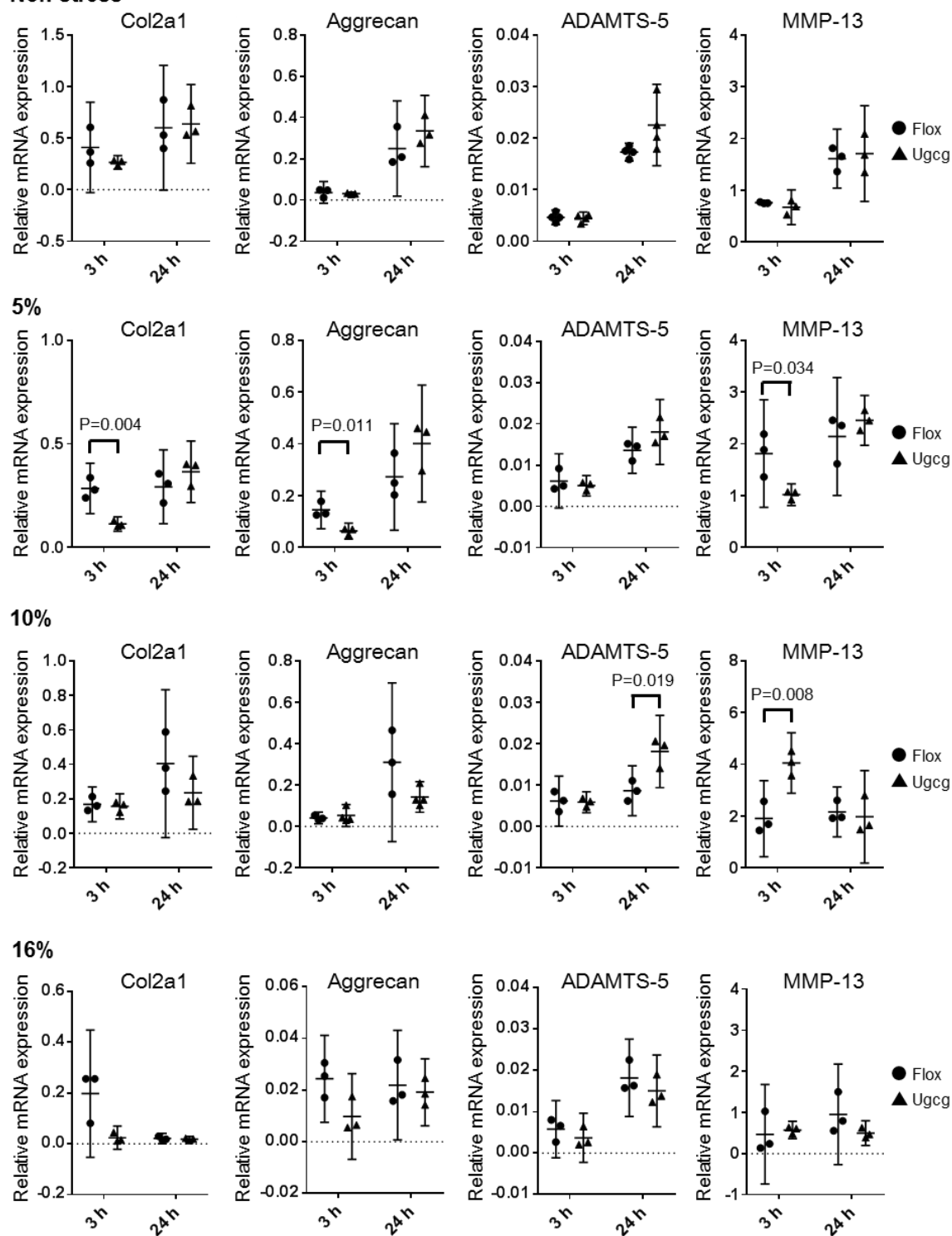


Figure 26 Flox マウス, Ugcg マウス, それぞれの軟骨細胞における anabolic factors (Col2a1, Aggreacan)と catabolic factors (ADAMTS-5 と MMP-13)の遺伝子発現。データは GAPDH をレファレンスとして使用し補正された相対値で表した。平均値と 95% CI を表記。(n 数は全てのグループで 3 samples ずつ)

GSLs 欠損は力学ストレスにより誘導される Ca^{2+} oscillation を増強させる

GSLs が軟骨細胞の力学ストレスに対する感度に及ぼす影響を調べるために、力学ストレスにより変化する細胞内 Ca イオン濃度を評価した。静置培養条件 (0% strain) と 5% strain においては、Flox 群と Ugcg 群で有意な差を認めなかった (Figure 27)。一方、10%においては、Flox 群 (1.45 ± 0.13) と比較して Ugcg 群 (1.92 ± 0.47) で有意に oscillation ratio が上昇する結果となった ($p = 0.005$)。さらに16%においても、Flox 群 (1.55 ± 0.35) と比較して Ugcg 群 (2.15 ± 0.43) で有意に oscillation ratio が上昇した ($p = 0.006$)。

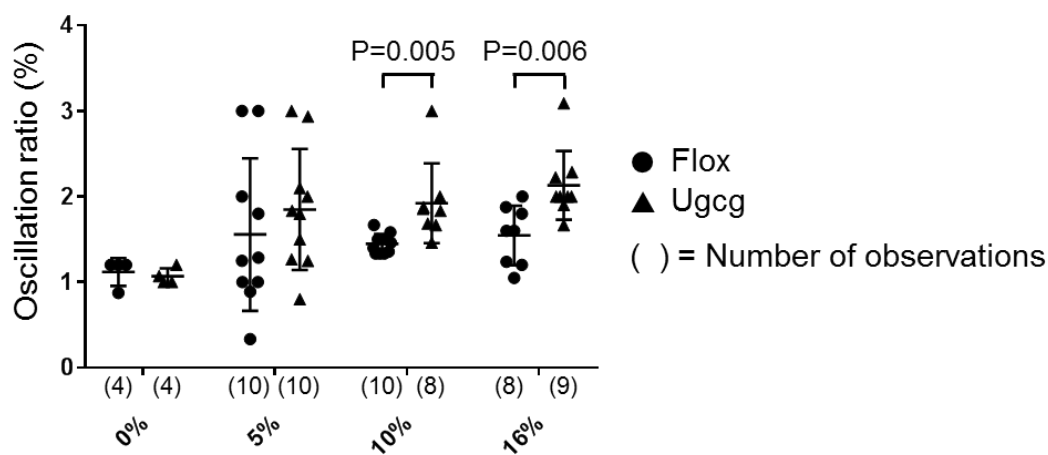


Figure 27 Flox マウス, Ugcg マウス, それぞれの軟骨細胞における Ca^{2+} oscillation . 5 分間の観察で Ca^{2+} oscillation を認める細胞数の力学負荷前後での増加率を oscillation ratio と定義した. 平均値と 95% CI を表記.

考 察

細胞膜で見られるようなラフト構造を含む脂質二重層の特性が細胞の圧縮弾性率と曲げ弾性率に影響を及ぼす²²。また GSLs の 1 つである ganglioside GM3 が細胞骨格構成要素の 1 つである中間径フィラメントと共局在を示すとする報告があり²³, GSLs が細胞骨格における構造変化を介して軟骨細胞の力学的性質に影響を及ぼしていることが示唆されている。一方で、清藤らは原子間力顕微鏡 (AFM) を用いて評価した軟骨細胞の剛性に対して、GSLs 欠損が影響を及ぼさないことを報告した¹⁷。本研究におけるアクチン細胞骨格染色でも GSLs 欠損群とコントロール群で差がないことが示され、少なくとも 2 次元培養において GSLs 欠損は接着した軟骨細胞の力学的性質に影響を及ぼさないことが示唆された。これらの結果は、軟骨細胞が培養皿に接着することでアクチンファイバーが合成されることを反映している可能性があり、GSLs 欠損が浮遊した軟骨細胞の力学的性質に及ぼす影響については不明なままであった。そこで本研究では浮遊した軟骨細胞の弾性を調べるためにマイクロピペット吸引を用いてヤング率を評価した。結果、浮遊した GSLs 欠損マウス軟骨細胞の弾性率はコントロール軟骨細胞と比べて同等であった。従って、GSLs は浮遊した条件においても軟骨細胞の弾性率に影響を及ぼさなかった。

GSLs は細胞内シグナルに関与する受容体に作用し、ストレス応答を調節していることが知られている¹⁵。また清藤らは *in vivo* の実験で、GSLs が欠損すると過度な力学ストレスによる OA 進行がさらに助長されることを報告した¹⁷。私は GSLs が軟骨細胞の力学ストレス応答に影響を及ぼすと仮定した上で、GSLs 欠損軟骨細胞における力学ストレス応答の評価を最終的な目標と定め、まず初めに力学負荷モデルの確立を目指した。多くの研究において、その単純さと簡便さから 2 次元培養下での実験が行われてきた^{33,38,39}。3 次元培養下の方がより生体内の環境に近いことは知られており、力学負荷モデルにおいて理想的な実験系であることは知られている。しかし、一方で基質の可塑性と脆弱性により力学ストレスに対して空間的、時間的不均一性が生じ、実験の再現性を得ることが難しいと言われている⁴⁰⁻⁴²。そこで私はこの問題をクリアするために条件に合うようカスタマイズした細胞/ゲル構造体を作製し、軟骨細胞に対して均一な力学ストレスを負荷できる新たな 3 次元培養モデルを開発した。本研究における縦横比を用いた細胞変形評価の結果はこのモデルが細胞に時間的、空間的に均一な力学ストレスを負荷できることを示唆している。さらに本モデルにおいて、5%の CTS 条件では軟骨細胞は anabolic 効果を、16%の CTS 条件では catabolic 効果を示した。一般的に、生体内において適度な力学ストレスは軟骨保護作用を、一方で過度な力学

ストレスは軟骨変性作用を示すとされている^{5,6,11}。従って本研究で用いたの3次元培養下力学負荷モデルは anabolic 効果を示す適度な力学ストレス環境と catabolic 効果を示す過度な力学ストレス環境という2つの環境における軟骨細胞の応答性を評価できるモデルであることが示唆された。

本モデルを用いて力学ストレス環境における GSLs 欠損軟骨細胞を評価する前に、静置培養環境における機能を評価した。静置培養環境においては、GSLs 欠損軟骨細胞は通常の軟骨細胞を比較して、anabolic factors, catabolic factors 双方の遺伝子発現で差を認めなかった。一方、力学ストレス環境、特に 10%, 16% CTS 負荷環境において、GSLs 欠損軟骨細胞ではそれぞれ catabolic factors が増加し、anabolic factors が低下する傾向を示した。この結果は、強度の高い力学ストレス応答において GSLs 欠損は軟骨変性作用を増強させることを示唆した。従って、GSLs 欠損は力学ストレス環境において軟骨細胞の過度な応答を誘導し、この結果、OA の進行が助長されと考えられた。言い換えると、軟骨細胞にとって力学ストレス応答における anabolic な反応と catabolic な反応のバランスをとり、軟骨組織の恒常性を維持するために GSLs が必要である、と考えられた。

GSLs 欠損軟骨細胞の過度な力学ストレス応答のメカニズムを調べるために力学ストレスにより生じる Ca^{2+} oscillation に着目した。GSLs は細胞膜の構成要素であり、細胞内シグナルカスケードの引き金となる細胞膜上の受容体と相互に関連しているとされているため¹⁵、細胞内の Ca^{2+} シグナルを介して軟骨細胞の力学応答に影響を及ぼしているのではないかと考えた⁴³。静置培養条件において GSLs 欠損は軟骨細胞の Ca^{2+} oscillation に影響を及ぼさない一方で、10%以上の伸張負荷に対する軟骨細胞の Ca^{2+} oscillation を増加させた。遺伝子発現の結果でも GSLs 欠損は 10% 以上の負荷に対して過度に応答している結果を示しており、 Ca^{2+} oscillation と同じ挙動を示した。この結果より細胞膜上に存在する GSLs は Ca^{2+} シグナルを介して軟骨細胞の力学応答に影響を及ぼしていることが示唆され、従って、GSLs 欠損における OA 助長は、過度な力学ストレスに対する軟骨細胞の応答が過剰に活性化することで生じていると考えられた。

過度な力学負荷は力学感受性イオンチャネル (SACs) に働き細胞外から細胞内への Ca^{2+} の流入を誘導し、インテグリン調節シグナル (integrin-mediated pathways) を介して ERK-MAPK pathway を活性化させる^{5,11}。この活性化した ERK-MAPK は転写因子である Activator protein-1 (AP-1) や NF- κ B の転写活性を亢進させ、IL-1, Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) などの炎症性サイトカインや MMP の発現を増加させる、と考えられる¹¹。今後、このような Ca^{2+} シグナルの下流に対するより詳細な評価が必要と考えられる。

本研究にはいくつかの限界が存在する。1 つ目は、軟骨組織内の軟骨細胞に負荷される力学ストレスは主に圧縮力であるにも関わらず、本研究では細胞応答の評価に伸張力を用いたことである。軟骨細胞に力学負荷を行う *in vitro* の実験において、一般的に 15~20%程の強い圧縮負荷を行っている^{44,47}。3 次元培養環境で長時間の力学負荷を行うためには弱い負荷の方が空間的、時間的均一性を維持するのに優れており、理想の実験モデルは弱い負荷で軟骨細胞の *anabolic*, *catabolic* 双方の反応を制御できるモデルである。伸張ストレスは軟骨細胞のシグナルトランスダクションに強く影響を及ぼし、圧縮ストレスよりもより軟骨変性に作用することが知られている^{48,49}。従って、比較的小さな負荷でも十分な力学刺激を与えることが出来る伸張負荷モデルを選択した。これまでの結果より、本モデルが適度な力学ストレス環境と過度な力学ストレス環境という 2 つの環境における軟骨細胞の応答性を評価できることが示唆され、*in vitro* における軟骨細胞の力学応答を評価するモデルとして適切であると考えている。

2 つ目は、 Ca^{2+} oscillation の評価が 2 次元培養で行われている点である。3 次元培養条件での Ca^{2+} oscillation 観察は色々と試行錯誤したもの、技術的に困難であった。特に、 Ca^{2+} indicator である Fluo-4 AM は 3 次元培養モデルの scaffold であるコラーゲンタイプ 1 ゲルへの浸透が悪く、観察が困難であった。

3 つ目として、本実験より GSLs が Ca^{2+} シグナルを介して軟骨細胞の力学応答を制御していることが示唆されたが、細胞内シグナル経路を含むメカノトランスダクションをこの GSLs がどのように制御しているかは分かっていない。我々は細胞膜上に存在する mechanosensitive Ca^{2+} channel が同じく細胞膜上に存在する GSLs に直接影響を及ぼすのではないかと考え、この Ca^{2+} に注目した。従って、軟骨細胞の Ca^{2+} シグナルを力学環境下で観察した。細胞膜上で GSLs がこの Ca^{2+} シグナルを制御している正確なメカニズムについては今後の研究課題として明らかにしていきたいと考えている。

これら 3 つの限界点はあるものの、本研究は GSLs が OA 発症に関連する軟骨細胞の力学応答を制御する役割を担っていることを強く支持する結果を示した。

総括および結論

- GSLs 欠損は力学環境下において軟骨細胞の catabolic な反応を過度に活性化すると考えられた.
- GSLs は Ca^{2+} シグナルを介して軟骨細胞の力学応答を制御していることが示唆された.
- GSLs が OA 発症に関連する軟骨細胞の力学応答を制御する役割を担っていることが示唆された.
- 本研究の結果は, GSLs が OA 治療の標的分子となり得ることを示した.

本研究は GSLs 欠損が力学環境下において軟骨細胞の catabolic な反応を過度に活性化することを示した. つまり, GSLs が Ca^{2+} シグナルを介して軟骨細胞の力学ストレスに対する生理的な応答を制御することに深く関わっていることが示唆された. この GSLs による制御機構は軟骨組織の恒常性維持に重要であると考えられ, GSLs が OA 治療における標的分子となり得ることを示している. 今後は Ca^{2+} シグナルを介した制御機構の詳細なメカニズムについてさらに研究を進めいきたいと考えている.

謝辞

本論文は、筆者が北海道大学大学院医学研究科 医学専攻 機能再生医学講座 整形外科学分野博士課程在学中に行った研究をまとめたものです。本研究に関して終始ご指導ご鞭撻を頂きました整形外科学分野教授 岩崎倫政先生に心より感謝いたします。

本研究を行うにあたり、さまざまなご助言、ご指導頂いた北海道大学大学院工学院 人間機械システムデザイン部門 マイクロバイオメカニクス研究室 教授 大橋 俊朗先生、同研究室 助教（現名古屋大学大学院工学研究科機械システム工学専攻 バイオメカニクス研究室 助教） 前田 英次郎先生に深く御礼申し上げます。

これまでの研究課程において数々のご指導を賜りました北海道大学医学部機能再生医学講座整形外科学分野講師の小野寺智洋先生をはじめ、整形外科学分野の諸先生方、実験助手の須山桃恵様、そして研究にご助力頂きました皆様に心よりの感謝を申し上げます。

引用文献

- 1 Cross, M., Smith, E., Hoy, D., Nolte, S., Ackerman, I., Fransen, M., Bridgett, L., Williams, S., Guillemin, F., Hill, C. L., Laslett, L. L., Jones, G., Cicuttini, F., Osborne, R., Vos, T., Buchbinder, R., Woolf, A. & March, L. The global burden of hip and knee osteoarthritis: estimates from the global burden of disease 2010 study. *Ann Rheum Dis* **73**, 1323-1330, (2014).
- 2 Bhatia, D., Bejarano, T. & Novo, M. Current interventions in the management of knee osteoarthritis. *J Pharm Bioallied Sci* **5**, 30-38, (2013).
- 3 Krsticevic, M., Jeric, M., Dosenovic, S., Jelacic Kadic, A. & Puljak, L. Proliferative injection therapy for osteoarthritis: a systematic review. *Int Orthop*, (2017).
- 4 Liu, Q., Hu, X., Zhang, X., Duan, X., Yang, P., Zhao, F. & Ao, Y. Effects of mechanical stress on chondrocyte phenotype and chondrocyte extracellular matrix expression. *Sci Rep* **6**, 37268, (2016).
- 5 Chen, C., Tambe, D. T., Deng, L. & Yang, L. Biomechanical properties and mechanobiology of the articular chondrocyte. *Am J Physiol Cell Physiol* **305**, C1202-1208, (2013).
- 6 Sanchez-Adams, J., Leddy, H. A., McNulty, A. L., O'Connor, C. J. & Guilak, F. The mechanobiology of articular cartilage: bearing the burden of osteoarthritis. *Curr Rheumatol Rep* **16**, 451, (2014).
- 7 Millward-Sadler, S. J. & Salter, D. M. Integrin-dependent signal cascades in chondrocyte mechanotransduction. *Ann Biomed Eng* **32**, 435-446 (2004).
- 8 Mobasheri, A., Barrett-Jolley, R., Carter, S. D., Martin-Vasallo, P., Schulze-Tanzil, G. & Shakibaei, M. In *Mechanosensitivity in Cells and Tissues* (eds A. Kamkin & I. Kiseleva) (2005).
- 9 Phan, M. N., Leddy, H. A., Votta, B. J., Kumar, S., Levy, D. S., Lipshutz, D. B., Lee, S. H., Liedtke, W. & Guilak, F. Functional characterization of TRPV4 as an osmotically sensitive ion channel in porcine articular chondrocytes. *Arthritis Rheum* **60**, 3028-3037, (2009).
- 10 Wann, A. K., Zuo, N., Haycraft, C. J., Jensen, C. G., Poole, C. A., McGlashan, S. R. & Knight, M. M. Primary cilia mediate mechanotransduction through control of ATP-induced Ca^{2+} signaling in compressed chondrocytes. *FASEB J* **26**, 1663-1671,

- (2012).
- 11 Bader, D. L., Salter, D. M. & Chowdhury, T. T. Biomechanical influence of cartilage homeostasis in health and disease. *Arthritis* **2011**, 979032, (2011).
 - 12 Hakomori, S. Bifunctional role of glycosphingolipids. Modulators for transmembrane signaling and mediators for cellular interactions. *J Biol Chem* **265**, 18713-18716 (1990).
 - 13 Ichikawa, S. & Hirabayashi, Y. Glucosylceramide synthase and glycosphingolipid synthesis. *Trends Cell Biol* **8**, 198-202, (1998).
 - 14 Lingwood, D. & Simons, K. Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science* **327**, 46-50, (2010).
 - 15 Degroote, S., Wolthoorn, J. & van Meer, G. The cell biology of glycosphingolipids. *Semin Cell Dev Biol* **15**, 375-387, (2004).
 - 16 David, M. J., Portoukalian, J., Rebbaa, A., Vignon, E., Carret, J. & Richard, M. Characterization of Gangliosides from Normal and Osteoarthritic Human Articular-Cartilage. *Arthritis Rheum* **36**, 938-942, (1993).
 - 17 Seito, N., Yamashita, T., Tsukuda, Y., Matsui, Y., Urita, A., Onodera, T., Mizutani, T., Haga, H., Fujitani, N., Shinohara, Y., Minami, A. & Iwasaki, N. Interruption of glycosphingolipid synthesis enhances osteoarthritis development in mice. *Arthritis Rheum* **64**, 2579-2588, (2012).
 - 18 Sasazawa, F., Onodera, T., Yamashita, T., Seito, N., Tsukuda, Y., Fujitani, N., Shinohara, Y. & Iwasaki, N. Depletion of gangliosides enhances cartilage degradation in mice. *Osteoarthritis Cartilage* **22**, 313-322, (2014).
 - 19 Mankin, H. J., Dorfman, H., Lippiell, L. & Zarins, A. Biochemical and Metabolic Abnormalities in Articular Cartilage from Osteo-Arthritic Human Hips .2. Correlation of Morphology with Biochemical and Metabolic Data. *J Bone Joint Surg Am A* **53**, 523-&, (1971).
 - 20 Mankin, H. J. Biochemical and Metabolic Abnormalities in Osteoarthritic Human Cartilage. *Fed Proc* **32**, 1478-1480, (1973).
 - 21 Goncalves, G., Melo, E. G., Gomes, M. G., Nunes, V. A. & Rezende, C. M. F. Effects of chondroitin sulfate and sodium hyaluronate on chondrocytes and extracellular matrix of articular cartilage in dogs with degenerative joint disease. *Arq Bras Med Vet Zoo* **60**, 93-102, (2008).
 - 22 Wang, L., Murphy-Ullrich, J. E. & Song, Y. Molecular insight into the effect of lipid bilayer environments on thrombospondin-1 and calreticulin interactions. *Biochemistry* **53**, 6309-6322, (2014).

- 23 Gillard, B. K., Thurmon, L. T. & Marcus, D. M. Association of glycosphingolipids with intermediate filaments of mesenchymal, epithelial, glial, and muscle cells. *Cell Motil Cytoskeleton* **21**, 255-271, (1992).
- 24 Suresh, S. Biomechanics and biophysics of cancer cells. *Acta Biomater* **3**, 413-438, (2007).
- 25 Salvat, C., Pigenet, A., Humbert, L., Berenbaum, F. & Thirion, S. Immature murine articular chondrocytes in primary culture: a new tool for investigating cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* **13**, 243-249, (2005).
- 26 Gosset, M., Berenbaum, F., Thirion, S. & Jacques, C. Primary culture and phenotyping of murine chondrocytes. *Nat Protoc* **3**, 1253-1260, (2008).
- 27 Ohashi, T., Hagiwara, M., Bader, D. L. & Knight, M. M. Intracellular mechanics and mechanotransduction associated with chondrocyte deformation during pipette aspiration. *Biorheology* **43**, 201-214, (2006).
- 28 Sato, M., Levesque, M. J. & Nerem, R. M. An application of the micropipette technique to the measurement of the mechanical properties of cultured bovine aortic endothelial cells. *J Biomech Eng* **109**, 27-34, (1987).
- 29 Maeda, E., Tsutsumi, T., Kitamura, N., Kurokawa, T., Ping Gong, J., Yasuda, K. & Ohashi, T. Significant increase in Young's modulus of ATDC5 cells during chondrogenic differentiation induced by PAMPS/PDMAAm double-network gel: comparison with induction by insulin. *J Biomech* **47**, 3408-3414, (2014).
- 30 Theret, D. P., Levesque, M. J., Sato, M., Nerem, R. M. & Wheeler, L. T. The application of a homogeneous half-space model in the analysis of endothelial cell micropipette measurements. *J Biomech Eng* **110**, 190-199, (1988).
- 31 Argatov, I. & Mishuris, G. Pipette aspiration testing of soft tissues: the elastic half-space model revisited. *Proc Math Phys Eng Sci* **472**, 20160559, (2016).
- 32 Hirano, Y., Ishiguro, N., Sokabe, M., Takigawa, M. & Naruse, K. Effects of tensile and compressive strains on response of a chondrocytic cell line embedded in type I collagen gel. *J Biotechnol* **133**, 245-252, (2008).
- 33 Bleuel, J., Zaucke, F., Bruggemann, G. P. & Niehoff, A. Effects of cyclic tensile strain on chondrocyte metabolism: a systematic review. *PLoS One* **10**, e0119816, (2015).
- 34 Maeda, E., Hagiwara, Y., Wang, J. H. & Ohashi, T. A new experimental system for simultaneous application of cyclic tensile strain and fluid shear stress to tenocytes in vitro. *Biomed Microdevices* **15**, 1067-1075, (2013).
- 35 Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using

- real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods* **25**, 402-408, (2001).
- 36 Pingguan-Murphy, B., Lee, D. A., Bader, D. L. & Knight, M. M. Activation of chondrocytes calcium signalling by dynamic compression is independent of number of cycles. *Arch Biochem Biophys* **444**, 45-51, (2005).
- 37 Pingguan-Murphy, B., El-Azzeh, M., Bader, D. L. & Knight, M. M. Cyclic compression of chondrocytes modulates a purinergic calcium signalling pathway in a strain rate- and frequency-dependent manner. *J Cell Physiol* **209**, 389-397, (2006).
- 38 Agarwal, S., Deschner, J., Long, P., Verma, A., Hofman, C., Evans, C. H. & Piesco, N. Role of NF-kappaB transcription factors in antiinflammatory and proinflammatory actions of mechanical signals. *Arthritis Rheum* **50**, 3541-3548, (2004).
- 39 Saito, T., Nishida, K., Furumatsu, T., Yoshida, A., Ozawa, M. & Ozaki, T. Histone deacetylase inhibitors suppress mechanical stress-induced expression of RUNX-2 and ADAMTS-5 through the inhibition of the MAPK signaling pathway in cultured human chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* **21**, 165-174, (2013).
- 40 Benya, P. D. & Shaffer, J. D. Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. *Cell* **30**, 215-224, (1982).
- 41 Homminga, G. N., Buma, P., Koot, H. W., van der Kraan, P. M. & van den Berg, W. B. Chondrocyte behavior in fibrin glue in vitro. *Acta Orthop Scand* **64**, 441-445, (1993).
- 42 Uchio, Y., Ochi, M., Matsusaki, M., Kurioka, H. & Katsube, K. Human chondrocyte proliferation and matrix synthesis cultured in Atelocollagen gel. *J Biomed Mater Res* **50**, 138-143, (2000).
- 43 Zhou, Y., David, M. A., Chen, X., Wan, L. Q., Duncan, R. L., Wang, L. & Lu, X. L. Effects of Osmolarity on the Spontaneous Calcium Signaling of In Situ Juvenile and Adult Articular Chondrocytes. *Ann Biomed Eng* **44**, 1138-1147, (2016).
- 44 Mauck, R. L., Soltz, M. A., Wang, C. C., Wong, D. D., Chao, P. H., Valhmu, W. B., Hung, C. T. & Ateshian, G. A. Functional tissue engineering of articular cartilage through dynamic loading of chondrocyte-seeded agarose gels. *J Biomech Eng* **122**, 252-260, (2000).
- 45 Chowdhury, T. T., Bader, D. L. & Lee, D. A. Dynamic compression inhibits the synthesis of nitric oxide and PGE(2) by IL-1beta-stimulated chondrocytes cultured in agarose constructs. *Biochem Biophys Res Commun* **285**, 1168-1174, (2001).
- 46 Chowdhury, T. T., Bader, D. L. & Lee, D. A. Dynamic compression counteracts IL-1 beta-induced release of nitric oxide and PGE2 by superficial zone chondrocytes

- cultured in agarose constructs. *Osteoarthritis Cartilage* **11**, 688-696, (2003).
- 47 Ng, K. W., Mauck, R. L., Wang, C. C., Kelly, T. A., Ho, M. M., Chen, F. H., Ateshian, G.
A. & Hung, C. T. Duty Cycle of Deformational Loading Influences the Growth of
Engineered Articular Cartilage. *Cell Mol Bioeng* **2**, 386-394, (2009).
- 48 Liu, J., Liu, T., Zheng, Y., Zhao, Z., Liu, Y., Cheng, H., Luo, S. & Chen, Y. Early
responses of osteoblast-like cells to different mechanical signals through various
signaling pathways. *Biochem Biophys Res Commun* **348**, 1167-1173, (2006).
- 49 Huang, J., Ballou, L. R. & Hasty, K. A. Cyclic equibiaxial tensile strain induces both
anabolic and catabolic responses in articular chondrocytes. *Gene* **404**, 101-109, (2007).