

# 静水圧作用下における軟骨細胞の DNA 損傷-修復メカニズムの解明

## DNA damage response in murine chondrocytes under hydrostatic pressure

東京大学	牧 功一郎
派遣期間	2018 年 4 月 1 日～2018 年 11 月 25 日
研究機関	Helsinki Institute of Life Science, University of Helsinki, Finland Helsinki, 00290, Finland
研究指導者	Prof. Sara Wickström

Articular cartilage, which is found at the tip of bone joints, not only constitutes the slippery joints but also buffers mechanical loading due to animal body weight and movement. Chondrocytes in cartilage produces abundant extracellular matrix, such as collagens, to make the tissue slippery and moisture to manage mechanical forces such as frictional force, compression force, and hydrostatic pressure. Interestingly, hydrostatic pressure is known to assist the chondrocytic differentiation. It is therefore reasonable to hypothesize that some signaling pathways are activated/inactivated under hydrostatic pressure to regulate the differentiation genes for chondrogenesis, though there is still no break-through which clearly explains this phenomenon. In this research, we focus on DNA damage response, which may remodel chromatin architecture and gene expression. DNA damage is caused by cellular stress such as UV exposure, and its excessive accumulation in nucleus, which is not affordable for cells to repair, leads to apoptosis. On the other hand, at certain extent of DNA damage, a variety of proteins accumulate near the site of damaged DNA and make a molecular complex that mediate the following signaling pathways, which includes chromatin remodeling. Chromatin is a high-order architecture, which mainly consists of DNAs and histones, and integrate the overall gene expression in cells. In this research, we investigated DNA damage response in chondrocytes under hydrostatic pressure.

### 研究目的

関節軟骨は、関節の骨端表面に存在し、そのスムーズな可動や荷重の緩衝を担う組織である。関節軟骨に存在する軟骨細胞は、コラーゲンなどの細胞外基質を豊富に産生することにより、潤滑な機能的構造を維持している。近年の研究によると、生体の荷重や運動に由来した静水圧の負荷により、間葉系細胞から軟骨細胞への分化が促進されることが知られている。このことから、静水圧の作用下において種々のシグナル経路が活性化・不活性化され、特定の遺伝子の転写が制御されることが想像されるが、このメカノバイオロジー現象を統合的に説明するメカニズムが未だ示されていない。本研究では、静水圧のもとで遺伝子発現が調整される際に生じる上流の経路として、DNA の損傷・修復応答に着目した。DNA 損傷は紫外線などの種々の外的ストレスにより生じ、

その過剰な蓄積はアポトーシスを引き起こすことが知られる。その一方で、細胞活動を維持できる程度の損傷においては、損傷 DNA の近傍には DNA 損傷の感知・修復に関与するタンパク質が複合体を形成し、クロマチン構造のダイナミクスにも影響を与えることが近年の研究から明らかとなっている。クロマチンは主に DNA とヒストンから構成され、遺伝子発現を統合的に制御する高次構造体である。

以上のことから、本研究では、次の作業仮説を立てた：(1) 静水圧のもとで軟骨細胞に DNA の損傷が生じる。(2) 損傷 DNA の感知・修復プロセスを介してクロマチン構造が変化する。(3) クロマチン構造の変化により細胞分化に関わる遺伝子が活性化される。この大きな仮説を検証する第一歩として、本研究では、静水圧作用下における軟骨細胞の DNA 損傷プロセスを明らかにすることを目的とした。

## 研究経過

### (1) マウスからの軟骨細胞の単離および不死化

Sara Wickström 先生とのディスカッションにおいて、軟骨細胞様のセルライン (ATDC5 細胞) ではなく、動物から単離した軟骨細胞に対して検討を行う方が生物学としての重要性が高まるのではないかと示唆を受けた。そこで、マウスの股関節から軟骨細胞の単離を行い、取得した初代培養細胞に対して、SV-40 large T antigen をレトロウイルスにより導入することにより、軟骨細胞の不死化を行った。その結果、ノンコートペトリディッシュ上で均一に増殖する不死化軟骨細胞を樹立した。本細胞は、ATDC5 セルラインと比較して極めて高い軟骨細胞マーカー (Collagen 2、Sox 6、Aggrecan 1) の遺伝子発現を示しており、より生体内の軟骨細胞に近い特徴を有しているものと判断した。一方で、継代にしたがって脱分化が生じることも見出したため、ATDC5 細胞に比して高い軟骨細胞マーカーの発現量を示す継代数の細胞に対して検討を行った。

### (2) 静水圧負荷装置のセットアップ

東京大学牛田研究室で開発していた小型の静水圧負荷装置をヘルシンキ大学にてセットアップした (持ち出し申請済み)。静水圧負荷実験の概要は以下のとおりである。はじめに、軟骨細胞をガラスボトムディッシュに播種した。次に、細胞播種の 24 時間後に、ディッシュ内の培地を取り除き、ディッシュを新しい培地で満たしたプラスチックバッグに封入した。さらに、ディッシュを封入したプラスチックバッグを圧力チャンバー内に設置した。そして、高圧ポンプを稼働し、圧力チャンバー内に送液を行った。圧力チャンバー下流の電磁バルブは、流路内の静水圧が閾値を超えると開くよう制御し、これにより、周期的な静水圧を実現した。

### (3) 静水圧作用下における損傷 DNA の評価

静水圧作用下における軟骨細胞の DNA 損傷を評価するため、リン酸化ヒストン  $\gamma$ H2AX の免疫染色および共焦点顕微鏡観察を行った。ディッシュの封入

およびインキュベーター外での培養環境の影響、および、静水圧負荷の効果を明らかにするため、以下の 3 つの条件を検討した: (A) 封入なし・インキュベーター内で 6 時間静置、(B) 封入あり・圧力チャンバー内で 6 時間静置、(C) 封入あり・圧力チャンバー内で 6 時間静水圧負荷。

図 1 a に  $\gamma$ H2AX 染色の結果を示す。まず、染色画像において極めて高い蛍光輝度を示している細胞は、複製期の細胞と考えられる。DNA の複製本研究では DNA の DAPI 染色画像を二値化し、細胞核の領域内における  $\gamma$ H2AX 染色の輝度を評価した (図 1 b)。条件 A と B を比較することにより、プラスチックバッグへの封入およびインキュベーター外での培養環境の影響により、複製期の細胞の割合が増加することが明らかとなった。本結果に関しては、細胞が産生する各種の増殖因子がプラスチックバッグ内で直ちに拡散することが原因の一つと考察した。一方で、静水圧を負荷した条件 C においては、条件 B と同様に DNA 複製が促進される環境にもかかわらず複製期の細胞の割合が少なくなっている、つまり、DNA の複製が抑制されていることが明らかとなった。

静水圧のもとで DNA 複製の抑制が生じる機構を明らかとするため、顕著な DNA 複製を示していない細胞に対して核内における  $\gamma$ H2AX のフォーサイの数を評価した (図 1 c)。その結果、静水圧の作用下における DNA の損傷が、DNA 複製の抑制を誘導するシグナルを活性化している可能性が示唆された。

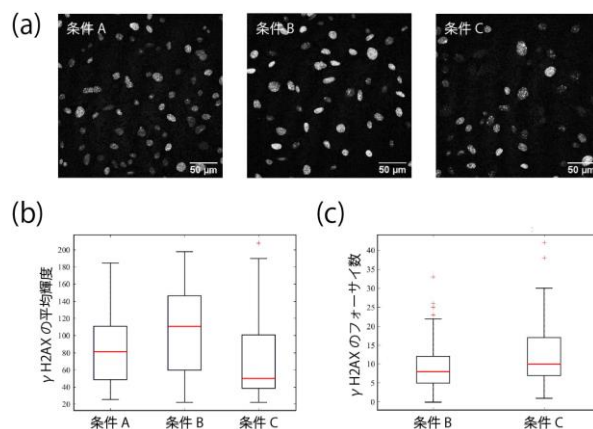


図 1.  $\gamma$ H2AX の免疫染色及び解析結果

#### (4) 核ラミナ構造のリモデリングに関する考察

近年の研究において、細胞核の外骨格として機能する核ラミナ構造が注目を浴びている。核ラミナは、中間系フィラメントであるラミンと膜タンパク質から構成されており、核の構造の安定化、および、クロマチンの組織化や遺伝子転写、DNA複製にも役割を担っている。本研究では静水圧の作用下で生じるDNA損傷とDNA複製を調節する構造体として核ラミナ構造に着目し、初期検討として、Lamin A/Cの免疫染色を行った。その結果、Lamin A/Cの蛍光輝度は、静水圧の作用下で顕著に下がっていることが観察された。このことから、DNA複製の抑制は、核ラミナ構造が不安定化することで生じていることが示唆された。核ラミナ構造の不安定化を誘導する分子メカニズムについては引き続き検討を続けるが、特に、損傷DNAの感知・修復を介したクロマチン構造の変化に着目する予定である。核内のクロマチン構造の変化が核ラミナ構造に与える効果は未だ不明な点が多く、核内で生じる各種反応が核ラミナ構造に伝達され、核と細胞質の間に生じるシグナルを介して核内にフィードバックされる新規のメカニズムの解明が期待される。

#### 考察

本研究においては、マウス関節軟骨から単離した軟骨細胞に対して、周期的な静水圧作用下におけるDNAの損傷メカニズムを検討した。その結果、静水圧の作用下で軟骨細胞にDNA損傷応答が生じること、および、DNA複製の抑制が生じることが明らかとなった。今後は、DNA損傷を起因としたクロマチン構造の変化に着目し、クロマチン免疫沈降法(ChIP)などのテクノロジーを駆使し、遺伝子発現への影響を検討する。さらに、静水圧の作用下でDNA損傷が誘導されるメカニズムに関しても、検討を進める予定である。静水圧に対する細胞の応答はこれまでも報告されているが、その最上流のシグナルに関しては未知である。静水圧は、胎生期から老年期まで、軟骨細胞にとどまらず、すべての体細胞に作用する重要な力学的因子であることから、細胞による静水圧の感知・応答機構を理解することは、ライフサイエンス・生体医工学分野において革新的知見をもたらすことが大いに期待される。

#### 研究の発表

1. Koichiro Maki, Katsuko Furukawa, Takashi Ushida, “Hydrostatic pressure-induced DNA breaks in chondrocytes and its relationship with chromatin architecture”, The Joint Meeting of ESCHM-ISB-ISCH, July 2nd-6th, 2018, Krakow, Poland
2. Koichiro Maki, Katsuko Furukawa, Takashi Ushida, “DNA breaks in chondrocyte progenitor cells under cyclic hydrostatic pressure”, The World Congress of Biomechanics 2018, July 8th-12nd, 2018, Dublin, Ireland

#### 謝辞

この度は、本長期間派遣におきまして、貴財団より多大なるご援助を賜りましたことに心からの御礼を申し上げます。Sara Wickström研究室は、2017年12月に発足した新しい研究室であり、私が2018年4月にヘルシンキに到着してからも研究室の立ち上げ作業が残っておりました。はじめは単純な実験に支障が出るなど厳しい期間もございましたが、メンバーが課題を共有し、チームワークが形成されていく過程に加わることができ、そのおかげでチームの輪に馴染むことができたように存じます。ワークスタイルに関しては、Sara先生のもと、“研究者としてのプロフェッショナルな行動とは何か”ということに自分に関心する機会を数多く持ちました。実験室の使い方、時間の使い方、周りの人たちとのコミュニケーション、データの解析・解釈、研究室会の準備・発表、すべてにおいて、自分の在り方を見つめなおす必要がございました。また、本研究では、日本から持ち込んだ静水圧負荷装置が研究のオリジナリティ・クオリティを担保する重要な役割を担っていましたが、ヘルシンキ到着後に様々なトラブルが生じてしまい、いつ日本に帰らねばなくなるかとの不安・無力感で一睡もできなかった夜もございました。そのような状況下で、貴財団の助成金より、装置の修理費の一部や工場への移動費を支出させていただき、最終的に研究を伸展させることが出来ました。あらためまして、ご援助に深謝いたします。今後、いかにライフサイエンス・医工学研究に貢献するかということに使命感とともに強く念頭に置き、歩んでゆく所存であります。この度は、誠に有難うございました。