

1. 研究課題名：ヒト歯根膜細胞の増殖分化の EGF、低酸素、メカニカルストレスに対する応答性と、それに伴うMAPKの選択的活性化
2. 研究機関：長崎大学アイソトープ総合センター
3. 研究者：松田尚樹
4. 共同研究者：森田直子（長崎大学医学部・原研放射）
松田和子（科学技術振興事業団・長崎研究室）
渡邊正己（長崎大学薬学部・放射線生命科学）
5. 研究期間：平成9年～平成10年
6. 要約

環境ストレスは、それに応答する種々の細胞内 MAPK (mitogen activated protein kinase) の活性化を介して細胞の機能に変化を及ぼすものと考えられるが、その経路の特異性については知られていない。そこで本研究では、骨芽細胞様性質を有するヒト歯根膜細胞にメカニカルストレス、増殖因子 EGF (epidermal growth factor) 刺激、あるいは低酸素ストレスを与え、細胞の増殖性、骨性分化、および3種の MAPK、すなわち extracellular-related kinase (ERK) 1/2、c-Jun N-terminal kinase/stress activated protein kinase (JNK)、p38 の活性化を調べた。細胞増殖は EGF 10ng/ml 刺激あるいは低酸素ストレス (5% O₂ - 41.5mmHg) により促進され、機械的伸張ストレス (9% strain - 6 cycles/min) により抑制された。その逆に、細胞の骨性分化を示す ALP 活性は機械的伸張ストレスにより上昇し、EGF と低酸素ストレスにより低下した。また EGF と低酸素ストレスは ERK1/2 を一過的に活性化させ、一方メカニカルストレスは JNK/SAPK を持続的に活性化させた。p38 にはこのような変化は見られなかった。以上の結果より、本細胞の増殖と骨性分化にはそれぞれ ERK1/2 および JNK/SAPK が選択的に関与しており、この両者の活性化経路のバランスが細胞の応答性を決定している可能性が示唆された。

7. 研究目的

近年、種々の環境ストレスに応答して細胞内ストレス応答分子の発現や活性化が起こり、その結果細胞の増殖や分化といった基本的機能が変化することが明らかになってきた。このようなストレスに応答して作動する信号伝達経路のうち、3種の異なる、しかしそれぞれが関連した mitogen activated protein kinases (MAPK) が哺乳類細胞においても同定されている^{1,2)}。これら3種の MAPK、すなわち extracellular-related kinase (ERK) 1/2、c-Jun N-terminal kinase / stress activated protein kinase (JNK) そして p38 は、それぞれのスレオニン残基およびチロシン残基がリン酸化 (dual-phosphorylation) を受けることにより活性化することが知られている。活性化した MAPK は次に Elk-1、c-Jun、ATF-1 などの転写因子群を基質として活性化し、選択的な遺伝子の転写が起こる。MAPK のすぐ上流に存在するストレス応答信号伝達経路から特異的な MAPK の活性化につながる機構、およびその結果である生物学的機能変化については極めて精力的に解析が進められているが³⁻⁵⁾、生理的なレベルのストレスを受けた場合におけるそれぞれの MAPK 経路の役割については未だ不明である。またストレスに応答する MAPK の選択的な活性化とともに、その MAPK 活性化以

降の生理的变化は細胞種により異なるかもしれない。

本研究では、骨性細胞としての性質を有するヒト歯根膜細胞を用いた。歯根膜は歯根と歯槽骨の中間に位置する組織で、歯牙を歯槽骨上に固定するとともに、これら石灰化組織の構造的恒常性を保つ上で重要な器官である。さらに歯根膜中には、骨芽細胞およびセメント芽細胞の起源細胞も含まれていると考えられている。この歯根膜細胞を培養すると、種々の細胞外からの刺激に应答して増殖あるいは分化することが知られている^{7,29)}。それらの刺激の中で、歯根膜には多くの EGF (epidermal growth factor) 受容体 (EGF-R) が存在することが *in vivo*、*in vitro* のいずれにおいても知られており、EGF の歯根膜に対する生理的な役割が示唆されている^{7,29)}。また矯正治療等における歯牙の移動に際しては、歯根膜中の酸素分圧の局所的な変化が歯槽骨のリモデリングに重要であることが知られている⁸⁾。さらに歯根膜は咬合圧を常に受けることにより、歯根膜中の細胞はメカニカルストレスによる変形 (deformation) 力に晒されていることが考えられる⁶⁾。したがって臨床的あるいは生理的環境において、歯根膜細胞は EGF、低酸素、およびメカニカルストレスに晒されているものと考えられる。しかし、これらのストレスに対する歯根膜の MAPK の应答、およびその細胞増殖および分化における役割は知られていない。

本研究では、環境ストレスが MAPK を介して細胞機能に影響をおよぼす経路の特異性を明らかにすることを目的とし、歯根膜細胞を EGF 存在下、低酸素環境、およびメカニカルストレス負荷の条件で培養し、その際の細胞増殖、分化、および MAPK のリン酸化および活性化について検討した。

8. 材料と方法

8-1. 細胞培養

ヒト歯根膜細胞は、治療のため抜去した 24 歳男性の第 3 大臼歯に付着残存していた歯根膜片より explant 法により初代培養した⁹⁾。培養には非必須アミノ酸、ビタミン類、およびピルビン酸ナトリウムを添加した DMEM (Gibco Laboratories, Grand Island, NY) /10% FBS (Intergen Co., Purchase, NY) を、また細胞の回収には 0.05%トリプシン - 0.53mM EDTA (Gibco) を用い、継代は 1:4 split ratio で行なった。なおすべての実験には継代数 3 から 5 の細胞を用いた。

8-2. ストレス負荷

メカニカルストレスの実験モデルとしては、細胞をフレキシブルボトムプレート (FLEX-I culture plate, Flexcell International Corp., McKeesport, PA) 上に植え、37 °C、5% CO₂ - 95% air の条件で培養し、Flexercell Strain Unit Model FX-2000 を用いて、細胞に断続的に伸縮ストレス (cyclic stretch) を加えた。伸縮回数は 5 秒間伸展、5 秒間弛緩の 1 分間あたり 6 サイクル (6CPM) とし、伸縮率は 4.5%、9%および 18%を用いた。EGF は培養液中に直接ヒトリコンピナント EGF (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY) を最終濃度 0.1 ~ 50ng/ml となるように加えた。また低酸素ストレス環境にはマルチガスインキュベーター (BNR-110M, タバイエスベック, 大阪) を用い、5% CO₂ - 5% O₂ または 5% CO₂ -

10% O₂ の条件で細胞を培養した。GMS 社製酸素モニター (GMS, Kiel-Mielkendorf, Germany) による計測結果では、5% CO₂ - 5% O₂ の条件における pO₂ は 41.5mmHg であった。

8-3 . 細胞増殖

Flex-I プレートあるいは通常の 3.5cm シャーレ上に 5.0×10^4 個の細胞を植え、DMEM/10%FBS で 24 時間培養後、DMEM/1%FBS に培養液を交換し、各ストレス負荷を開始した。培養 2、4、6 日後に細胞を回収し、血球計算盤で細胞数をカウントした。

8-4 . 細胞分化

コンフルエントな細胞を 50mg/ml アスコルビン酸および 10mM β -glycerophosphate (和光純薬工業、大阪) を含む DMEM/1% FBS で 24 時間培養し、それぞれのストレスを 2、4、6 日間負荷した。歯根膜細胞の分化の指標として、細胞溶解液中のアルカリ性フォスファターゼ (ALP) 活性を *p*-nitrophenylphosphate (和光) を基質にして測定した⁷⁾。

8-5 . MAPK のリン酸化および活性化

MAPK およびリン酸化された MAPK に対する抗体を用いた Western blot 法により MAPK リン酸化を調べた。ERK1/2、JNK、p38 のリン酸化部位はそれぞれ Tyr204、Thr183/Tyr185、Thr180/Tyr182 である。すべての抗体はウサギ・ポリクローナルで、New England Biolabs, Inc. (Beverly, MA) より入手した。サブコンフルエントな細胞に各ストレスを 15、30、60 分、DMEM/1%FBS 中で負荷し、RIPA バッファー (1% NP-40, 0.25% sodium deoxy-cholate, 150mM NaCl, 1mM EGTA, 1mM phenylmethyl-sulfonyl fluoride, 1mg/ml aprotinin, leupeptin, pepstatin, and 1mM sodium orthovanadate in 50 mM Tris-HCl, pH 7.4) で細胞を溶解した。タンパク 15mg に相当する溶解物を 7.5% SDS-PAGE にて分離し、PVLF 膜に転写した。5%スキムミルクでブロッキング後、各一次抗体、続いてビオチン化抗ウサギ Ig 二次抗体で膜を処理し、ALP-streptavidin により発色させた。なお実験は 3 度行い、データには典型的なプロットを示した。

また上記細胞溶解物中の ERK1/2 活性および JNK 活性を、[³²P]-ATP (specific activity < 100TBq/mmol, Amersham Pharmacia Biotech., Tokyo, Japan) 存在下における基質のリン酸化反応 (phosphotransfer) により調べた。ERK1/2 は特異的ペプチドを基質として用い、リン酸化反応 (30 °、30 分) 後、ニトロセルロースフィルターでリン酸化ペプチドのみを分離し、液体シンチレーションカウンターで放射活性を測定した (p42/44 MAP kinase assay system, Amersham)。JNK 活性は、c-Jun (1-169)-GST fusion protein (Upstate) を基質とし、反応後、リン酸化タンパクを 5% SDS-PAGE にて分離し、autoradiography 後、bio-imaging analyzer (BAS5000、富士写真フィルム、東京) により検出、定量化した。

9. 結果

9-1. 細胞の増殖

歯根膜細胞は通常 DMEM/10% FBS の条件で継代維持するが、細胞の増殖は血清の影響を除くため 1% FBS の条件で行った。この条件において歯根膜細胞が多くの細胞増殖因子に反応することはすでに報告済みである⁹⁾。Fig. 1 には各ストレス負荷時における細胞増殖曲線を示した。コントロールでは培養 4 日目まで緩やかに細胞数が増加したが、メカニカルストレスはこの増殖を抑制した。伸張率 9%、18%いずれも同様の結果を示したので、ここでは 9%のデータを記載した。なお、顕微鏡下では死細胞は観察されなかった。一方 EGF は有意に細胞増殖を促進し、その作用は 1ng/ml 以上で用量依存的となり 10ng/ml でプラトーに達した。Fig. 1 には 10ng/ml の結果を示した。また低酸素ストレスも細胞増殖を有意に促進したが、その作用は他の細胞^{8,11)}で報告されているように 5% O₂の方が、10% O₂よりも効果的であった。Fig. 1 は 5% O₂の結果である。

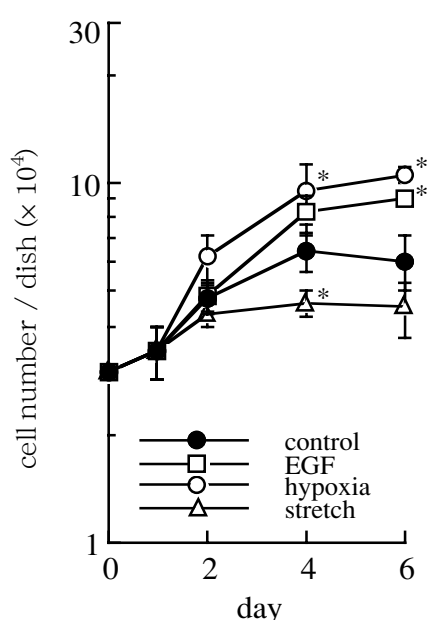


Fig.1 各ストレス負荷時の細胞増殖曲線 (p<0.05, ANOVA)

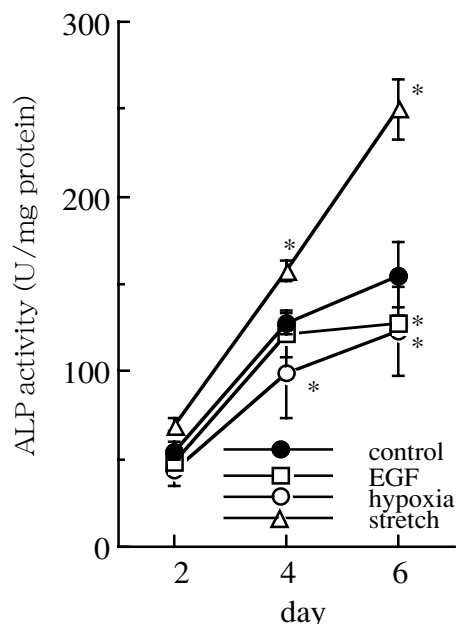


Fig.2 各ストレス負荷時の ALP 活性の変化 (p<0.05, ANOVA)

9-2. 細胞の分化

コンフルエントな細胞を 50mg/ml アスコルビン酸および 10mM β -glycerophosphate を含む DMEM/1% FBS で培養することにより、細胞の ALP 活性は培養 2~6 日にかけて徐々に上昇した (Fig. 2)。この培養条件は我々がこれまで歯根膜細胞の骨性分化を誘導するのに必要な環境として樹立してきたもので、得られた ALP 活性の上昇結果も従来の結果と同様である⁷⁾。Fig. 2 には、Fig. 1 と同じ量の各ストレスを負荷した場合の ALP 活性の変化を示した。メカニカルストレスを負荷された ALP 活性はコントロールと比較して培養 4、6 日で有意に高く、その逆に EGF あるいは低酸素ストレスにより ALP 活性はコントロール以下

に抑制された。これらの結果は、ラット骨芽細胞の分化がメカニカルストレスにより促進され、低酸素ストレスにより抑制されるという報告^{8,12)}と一致するものである。最近我々は、メカニカルストレスが歯根膜細胞の後期分化マーカーの一つであるオステオカルシンの遺伝子発現を促進することも報告している²⁹⁾。さらに EGF により骨性分化が阻害されるという結果は、これまでの我々のラット歯根膜細胞およびラット骨髄間質細胞における結果^{7,13)}とも一致する。以上の結果をまとめると、我々の用いた実験条件においてヒト歯根膜細胞は EGF あるいは低酸素ストレスにより増殖の方向に、メカニカルストレスによっては分化の方向にベクトルが向かうことを示す。

9-3 . MAPK のリン酸化および活性化

MAPK のリン酸化および活性化は Fig. 1 および Fig. 2 で用いたものと同じ条件の各ストレスを負荷して調べた。Fig. 3 に示すように、44kDa の ERK1 タンパクおよび 42kDa の ERK2 タンパクに相当するバンドの太さと濃さに大きな変化はなかったが、EGF 刺激あるいは低酸素ストレスによってこれらのバンドが高分子側にシフトする傾向が見られ、リン酸化の可能性が示された。事実リン酸化 ERK1/2 抗体を用いると、EGF または低酸素ストレス負荷 5 分後にはリン酸化 ERK1/2 が急激に増加し、その後徐々に減少した。そのような ERK1/2 のリン酸化はメカニカルストレスを負荷した細胞では見られなかった。それに対してリン酸化 JNK はメカニカルストレス負荷によってのみ増加した。またデータには示さないが、この JNK の高いリン酸化レベルはストレス負荷 6 日目まで持続していた。一方 p38 タンパクを示すバンドは明確に検出されたが、リン酸化 p38 は極めて低いレベルしか検出されず、ストレスによる変化も見られなかった。

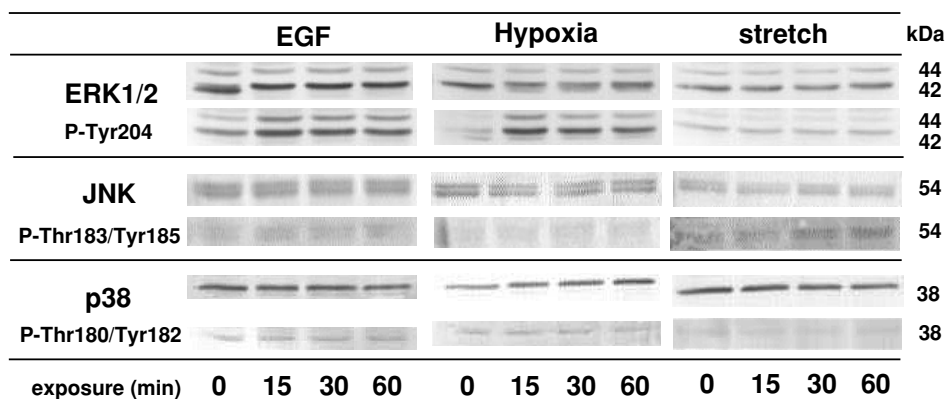


Fig.3 各ストレスによる ERK1/2, JNK, p38 のリン酸化

リン酸化の見られた ERK と JNK について、さらに活性を調べた。Fig. 4 に示すように ERK は EGF と低酸素にตอบสนองして急激に活性化したが、メカニカルストレスに対しては全くตอบสนองしなかった、一方、JNK はメカニカルストレスによってのみ活性化し、EGF と低酸素にはตอบสนองしなかった。以上より、ERK および JNK は各ストレスによってリン酸化されると同時に活性化していることが示された。

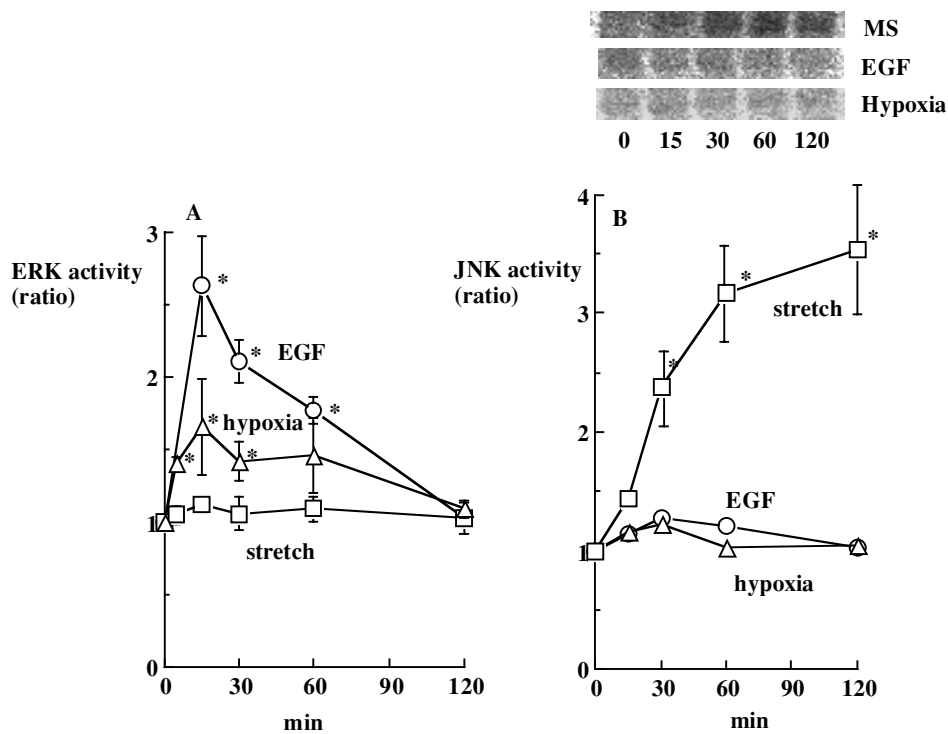


Fig.4 各ストレスによる EGF および JNK 活性の変化 (* $p < 0.05$)

10. 考察

今回の結果は、EGF および低酸素ストレスによる歯根膜細胞の増殖促進に、ERK1/2 の一時的かつ選択的な活性化が伴うことを示した。このうち EGF に関しては、その EGF-R との結合と自己リン酸化による EGF-R のチロシンキナーゼ活性化を引き金とし、ERK1/2 活性化を介して細胞増殖に向かう経路は比較的良く知られてい¹⁴⁾が、その一方、低酸素ストレスに応答して ERK1/2 活性化につながる経路については全く不明である。低酸素環境に応答し、多くの組織中でその発現が確認されている分子の一つとして転写因子 hypoxia-inducible transcription factor-1 (HIF-1) が知られている¹⁵⁾。低酸素ストレスは非レセプター型チロシンキナーゼである c-Src をリン酸化することから、HIF-1 の上流には c-Src が位置するものと考えられている¹⁶⁾。またこの c-Src 活性化は、G-protein 共役受容体から ERK1/2 活性化への経路に関わっていることも知られており¹⁷⁾、低酸素ストレスから ERK1/2 活性化につながる経路にも関与する可能性が考えられる。別の可能性として、低酸素ストレスが細胞内酸化状態を直接的に低下させ、その結果レドックス制御を受ける転写因子分子が応答したことも考えられる^{18,19)}。ただし ERK1/2 活性化との関連性は明らかでない。データは示さないが、dihydrorhodamine 123 染色²⁰⁾によれば、5% O₂環境で培養した歯根膜細胞内の酸化状態は50%以上低下していた。

メカニカルストレスに応答する細胞内信号伝達経路については未だ全貌は明らかにされていないが、細胞膜上のイオンチャンネルの活性化や焦点接着キナーゼ (focal adhesion kinase; FAK) をメカノセンサーとして ERK1/2 が活性化されることが、心筋細胞^{21,22)}および腎糸球体細胞²³⁾を用いた研究により報告されている。彼らの結果ではメカニカルストレスにより細胞増殖が促進されており、その意味で ERK1/2 活性化が起こったことは理解しやす

い。それとはきわめて対照的に、我々の今回の結果は、メカニカルストレスが FAK のリン酸化と JNK の活性化を介して細胞分化を誘導することを、骨性細胞において初めて示したものである。ERK1/2 とは異なり、JNK は細胞増殖の停止やアポトーシスに関与することが知られている^{1,2)}。事実、本研究においてもメカニカルストレスによる増殖阻害が見られたが、歯根膜細胞の *in vitro* 骨性分化は、増殖停止を起点として石灰化ノズル形成まで連続的に進行することが報告されている²⁴⁾。したがって、メカニカルストレスによる JNK を介した増殖停止の結果、細胞が分化に向かった可能性が考えられる。一方 JNK と同様に増殖停止に関与すると考えられている p38¹⁾ は、メカニカルストレスにまったく応答しなかった。このことは、p38 によっては制御を受けず、JNK によってのみ活性化を受ける下流の分子、例えば c-Jun、が骨性分化の表現形質に必要な遺伝子転写を促進する可能性を示唆している。

ERK1/2、JNK、p38 の 3 種の MAPK には共通の標的基質があるため、MAPK の下流の経路はある程度オーバーラップしていることが考えられる。そこで MAPK 活性化の細胞機能上における結果が、異なる MAPK 経路間のバランスに依存するとする考え方²⁵⁾ は魅力的である。また MAPK 活性化の時系列的な流れや活性化の持続性も、細胞機能変化に影響を及ぼすであろう²⁶⁾。骨芽細胞においては、ALP や osteocalcin など多くの骨分化マーカー遺伝子のプロモーター領域には転写因子 AP-1 (activating protein -1) が存在している。一方 AP-1 は c-fos など細胞増殖に関わる遺伝子のプロモーター領域にも多く存在する。この AP-1 は通常 c-Fos ファミリーと c-Jun ファミリーの 2 つのタンパク群の中からそれぞれ選ばれたタンパクの複合体として形成される。そこで AP-1 の関わる細胞の増殖と分化の相反的な関係を、AP-1 複合体の選択的な組成変化により説明する試みがなされている²⁸⁾。ERK1/2 の活性化は c-Fos ファミリー、JNK の活性化は c-Fos および c-Jun ファミリーのタンパク合成につながることを¹⁾ を考え合わせると、ERK1/2 経路と JNK 経路のバランスは、具体的には AP-1 複合体の組成を規定し、その結果 AP-1 の働きを制御しているのかもしれない。

歯根膜細胞を用いた今回の我々の実験系では、比較的区別しやすいシグナル伝達経路が観察された。すなわち、EGF 刺激と低酸素刺激は一時的で選択的な ERK1/2 の活性化を引き

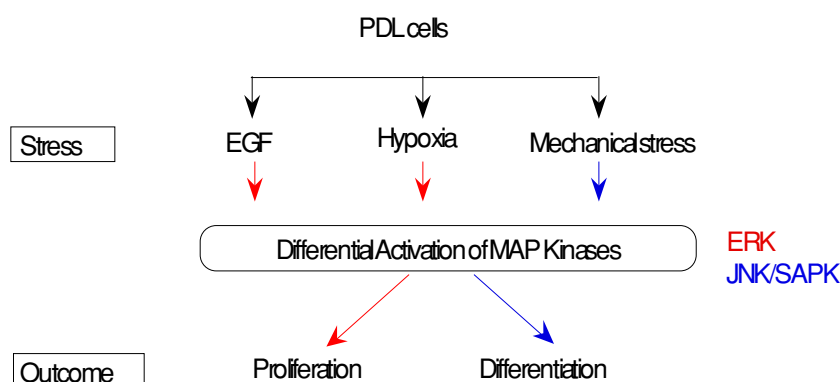


Fig.5 ERK1/2とJNK/SAPKの選択的活性化が歯根膜細胞の増殖と分化を制御する可能性

起こし、細胞増殖は促進された。それとは対照的に、メカニカルストレスは JNK を持続的に活性化し、細胞の増殖が停止し、分化が誘導された。これを最終的に証明するには *in vivo* における実験データが決め手となるが、少なくとも今回の *in vitro* の結果をもとに、我々は、環境ストレスに応答するシグナル伝達経路、特に ERK1/2 と JNK 間のバランスが歯根膜細胞のその後の運命を決定付けている可能性を提案する (Fig. 5)。さらにこのバランスが、ひいては歯根膜組織の機能的、組織的バランスを維持する上で重要な役割を担っていることも考えられる。

11. 今後の展開

MAPK の選択的活性化と細胞のストレス応答性の間については、酸素ストレスおよび紫外線ストレスに着目してさらに詳細に検討を重ねたが、その結果については別稿で述べる。今後は、歯根膜細胞における本研究の結果が、骨性細胞一般に、さらに分化能を有する培養細胞にも普遍的に当てはまるものか否かを検討する方向、および、MAPK をノックアウトもしくは *overexpression* させた場合の応答性を検討する方向、の二通りの攻め方を考えている。

12. 参考文献

- 1) A. J. Whitmarsh and R. J. Davis: Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways, *J. Mol. Med.*, 74, 589-607 (1996)
- 2) C. E. Canman and M. B. Kastan: Three paths to stress relief, *Nature*, 384, 213-214 (1996)
- 3) C. Rosette and M. Karin: Ultraviolet Light and Osmotic Stress: Activation of the JNK Cascade Through Multiple Growth Factor and Cytokine Receptors, *Science*, 274, 1194-1197 (1996)
- 4) Z.-G. Liu, R. Baskaran, E. T. Lea-Chou, L. D. Wood, Y. Chen, M. Karin, & J. Y. J. Wang: Three distinct signalling responses by murine fibroblasts to genotoxic stress, *Nature*, 384, 273-276 (1996)
- 5) Y. Hannun: Functions of ceramide in coordinating cellular responses to stress, *Science*, 274, 1855-1859 (1996)
- 6) J. P. Coffey, W. N. Williams, G. E. Turner, P. E. Mahan, L. L. Lapointe & C. E. Cornell: Human bite force discrimination using specific maxillary and mandibular teeth, *J. Oral Rehabil.*, 16, 529-536 (1989)
- 7) N. Matsuda, N. M. Kumar, P. R. Ramakrishnan, R. J. Genco and M. I. Cho: Evidence for up-regulation of epidermal growth factor receptors on rat periodontal ligament fibroblastic cells associated with stabilization of phenotype *in vitro*, *Archs. oral Biol.*, 38, 559-570 (1993)
- 8) O. C. Tuncay, D. Ho and M. K. Barker: Oxygen tension regulates osteoblast function,

- Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop., 105, 457-463 (1994)
- 9) N. Matsuda, A. Takemura, S. Taniguchi, A. Amano and S. Shizukuishi: Porphyromonas gingivalis reduces mitogenic and chemotactic responses of human periodontal ligament cells to platelet-derived growth factor in vitro, J. Periodontol., 67, 1335-1341 (1996)
 - 10) A. Banes, J. Gilbert, D. Taylor and M. Olivier: A new vacuum-operated stress-providing instrument that applies static or variable duration cyclic tension or compression to cells in vitro, J. Cell Sci., 75, 35-42 (1985)
 - 11) M. Nomura, S. Yamagishi, S. Harada, Y. Hayashi, T. Yamashita, J. Yamashita and H. Yamamoto: Possible participation of autocrine and paracrine vascular endothelial growth factors in hypoxia-induced proliferation of endothelial cells and pericytes, J. Biol. Chem., 270, 28316-28324 (1995)
 - 12) R. Carvalho, J. Scott and E. Yen: The effects of mechanical stimulation on the distribution of beta-1 integrin and expression of beta-1 integrin mRNA in TE-85 human osteosarcoma cells, Archs. Oral. Biol., 40, 257-264 (1995)
 - 13) N. Matsuda, N. M. Kumar, P. R. Ramakrishnan and M. I. Cho: Role of epidermal growth factor receptor in osteoblastic differentiation of rat bone marrow stromal cells, J. Bone Miner. Metab., 14, 137-145 (1996)
 - 14) R. Seger and E. G. Krebs: The MAPK signaling cascade, FASEB J., 9, 726-735 (1995)
 - 15) K. Guillemin and M. A. Krasnow: The hypoxic response: Huffing and HIFing, Cell 89, 9-12 (1997)
 - 16) D. Mukhopadhyay, L. Tsiokas, X.-M. Zhou, D. Foster, J. S. Brugge and V. P. Sukhatme: Hypoxic induction of human vascular endothelial growth factor expression through c-Src activation, Nature, 375, 577-581 (1995)
 - 17) T. Van Biesen, B. E. Hawes, D. K. Luttrell, K. M. Krueger, K. Touhara, E. Porfiri, M. Sakaue, L.M. Luttrell and R. J. Lefkowitz: Receptor-tyrosine-kinase- and Gbg-mediated MAP kinase activation by a common signalling pathway, Nature, 376, 781-784 (1995)
 - 18) R. S. Bandyopadhyay, M. Phelan and D. V. Faller: Hypoxia induces AP-1-regulated genes and AP-1 transcription factor binding in human endothelial and other cell types, Biochim, Biophys. Acta, 1264, 72-78 (1995)
 - 19) D. E. Hutter, B. G. Till and J. J. Greene: Redox state changes in density-dependent regulation of proliferation, Exp. Cell Res., 232, 435-438 (1997)
 - 20) R. Huang, J.-X. Wu, Y. Fan and E. Adamson: UV activates growth factor receptors via reactive oxygen intermediates, J. Cell Biol., 133, 211-220 (1996)
 - 21) T. Yamazaki, K. Tobe, E. Hoh, K. Maemura, T. Kaida, I. Komuro, H. Tamemoto, T. Kadowaki, R. Nagai and Y. Yazaki: Mechanical loading activates mitogen-activated

- protein kinase and S6 peptide kinase in cultured rat cardiac myocytes, *J. Biol. Chem.*, 268, 12069-12076, (1993)
- 22) J. Sadoshima, T. Takahashi, L. Jahn and S. Izumo: Roles of mechano-sensitive ion channels, cytoskeleton, and contractile activity in stretch-induced immediate-early gene expression and hypertrophy of cardiac myocytes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 9905-9909, (1992)
 - 23) K. Hamasaki, T. Mimura, H. Furuya, N. Morino, T. Yamazaki, I. Komuro, Y. Yazaki, and Y. Nojima: Stretching mesangial cells stimulate tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase pp125FAK, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 212, 544-549 (1995)
 - 24) P. Ramakrishnan, W. Lin, J. Sodek, J. and M. Cho: Synthesis of noncollagenous extracellular matrix proteins during development of mineralized nodules by rat periodontal ligament cells in vitro, *Calcif. Tissue Int.*, 57, 52-59 (1995)
 - 25) Z. Xia, M. Dickens, J. Raingeaud, R. J. Davis and M. E. Greenberg: Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis, *Science*, 270, 1326-1331, (1995)
 - 26) C. J. Marshall: Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation, *Cell*, 80, 179-185 (1995)
 - 27) N. Matsuda, W.-L. Lin, N. M. Kumar, M. I. Cho and R. J. Genco: Mitogenic, chemotactic, and synthetic responses of rat periodontal ligament fibroblastic cells to polypeptide growth factors in vitro, *J. Periodontol.*, 63, 515-525 (1992)
 - 28) L. R. McCabe, C. Banerjee, R. Kundu, R. J. Harrison, P. R. Dobner, J. L. Stein, J. B. Lian and G. S. Stein: Selective expression of fos- and jun-related genes during osteoblast proliferation and differentiation, *Endocrinol.*, 137, 4398-4408 (1996)
 - 29) N. Matsuda, K. Yokoyama, S. Takeshita and M. Watanabe: Role of epidermal growth factor and its receptor in mechanical stress-induced differentiation of human periodontal ligament cells in vitro, *Archs. Oral Biol.*, 43, 987-997 (1998)

13 . 研究業績

13-1 . 原著論文

- 1) N. Matsuda, N. Morita, K. Matsuda and M. Watanabe: Proliferation and differentiation of human osteoblastic cells associated with differential activation of MAP Kinases in response to epidermal growth factor, hypoxia and mechanical stress in vitro, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 249, 350-354 (1998)

13-2 . 総説など なし

13-3 . 国際学会発表 なし

13-4 . 国内学会発表

- 1) 松田尚樹：ヒト歯根膜細胞の増殖と分化の EGF、低酸素、および機械的ストレスに対する応答性と、それに伴う MAPK の選択的活性化, 第 16 回日本骨代謝学会, 平成 10 年 8 月 6 日-8 日, 東京.
- 2) 松田尚樹, 竹下哲史, 渡邊正己：低酸素ストレスに対する細胞の応答性, 第 34 回放射線影響懇話会, 平成 10 年 8 月 29 日, 長崎.
- 3) 松田尚樹：低酸素ストレスに対する歯根膜細胞の応答性, 第 39 回歯科基礎医学会学術大会, 平成 10 年 10 月 1 日-2 日, 北九州.

13-5 . 新聞など なし

13-6 . 特許 なし

14 .

(1) Proliferation and differentiation of human osteoblastic cells associated with differential activation of MAP kinases in response to epidermal growth factor, hypoxia and mechanical stress *In Vitro*.

(2) Nagasaki University Radioisotope Center

(3) Naoki Matsuda

(4) Naoko Marita (Nagasaki University School of Medicine)

Kazuko Matsuda (JST at Nagasaki)

Masami Watanabe (Nagasaki University School of Pharmaceutical Sciences)

(5) 1997 – 1998

(6) Abstract

In an attempt to elucidate the specificity of pathways from environmental stress to cellular outcome via mitogen activated protein kinases (MAPKs) activation, we examined the responsiveness of cultured human osteoblastic periodontal ligament (PDL) cells to epidermal growth factor (EGF), hypoxia and mechanical stress, in terms of cell proliferation, differentiation and associated activation of three different types of MAPK. Cell proliferation was promoted in the presence of 10ng/ml of EGF or in hypoxic conditions (5% O₂), whereas it was inhibited by cyclic stretch (9% strain, 6 cycles/min) which was used as a model of mechanical stress. Conversely, the alkaline phosphatase activity, a marker for osteoblastic differentiation of the cells, was increased by cyclic stretch but decreased by EGF and hypoxia. The mitogenic response of PDL cells to EGF or hypoxia was associated with the selective phosphorylation and activation of extracellular-related kinase (ERK) 1/2, while phosphorylation and activation of c-Jun N-terminal kinase (JNK) was observed in mechanical stretch loaded cells. No such changes were seen in p38 protein. These findings suggested that stress-responsive changes in proliferation

and osteoblastic differentiation of PDL cells are selectively mediated by ERK 1/2 and by JNK, respectively, and that a balance between these two pathways determines the cell fate.