

令和元年6月24日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K11008

研究課題名(和文) 三次元細胞培養を用いた力学的負荷に対する骨細胞の機能解析

研究課題名(英文) Analysis of osteocyte function related to mechanical stress using three-dimensional culture system

研究代表者

佐藤 淳 (Sato, Sunao)

大阪大学・歯学研究科・講師

研究者番号：70335660

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：骨は、骨芽細胞により行われる骨の形成と破骨細胞により行われる骨の吸収により動的平衡状態を維持している。骨の動的平衡状態は、様々な要因の影響を受けて成り立っているが、それらの影響の中でも力学的負荷による影響は、近年大きく注目されている。本研究では、細胞株をコラーゲンゲル上に三次元的に培養することで、骨の組織を模した環境を作り出し、種々の検討を行った結果、Dmp1発現が細胞の分化を介して力学的負荷に対応している可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

力学的負荷が骨に与える影響を明らかにすることは、近年、老化等の原因による寝たきり患者数の増加に伴って重大な関心事項であるとともに、今後、人類が地球外へ進出し、宇宙で生活するようになった際の微小重力状態での影響を考える上でも重要である。本研究では、細胞株を用いてコラーゲンゲルで三次元的に細胞培養を行い、力学的負荷に対して骨を構成する細胞がどのように反応しているかの一部を明らかにすることが出来た。本研究結果により、力学的負荷の減少した患者あるいは環境ではどのように骨組織を維持していくかの一助となると考える。

研究成果の概要(英文)：Bone tissue maintains a dynamic equilibrium based on bone formation by osteoblast and bone resorption by osteoclast. Many factors formed the dynamic equilibrium of bone metabolism. Among many factors, mechanical stress is attracting the most attention recently. In this study, we made a three-dimensional collagen gel cell culture system that imitate bone tissue. Using this model, we did various experiments and concluded Dmp1 correspond to mechanical stress through cell differentiation.

研究分野：口腔病理

キーワード：骨細胞 培養

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

生体の骨組織は、破骨細胞による骨の吸収と、骨芽細胞による骨の形成を常に繰り返しながら骨組織としての動的平衡状態を維持している。この骨組織の動的平衡状態は、種々の要因により影響を受け、動的平衡の破綻が引き起こされ、その結果として骨量の減少になるような骨粗鬆症のような疾患が引き起こされる。それらの種々の要因の中でも、老化による寝たきり状態や宇宙環境における微小重力状態での力学的負荷ないし機械的刺激の減少に伴う骨組織の変化は、近年大きく注目されるようになってきている。

### 2. 研究の目的

力学的負荷に伴う骨組織の変化を検索することは、重要なことであるが、力学的負荷による骨組織内の骨芽細胞や骨細胞の変化を、生体組織を用いて検索しようとする際には、骨組織という硬組織を対象とするために、検索出来る手法に限りがあった。具体的には、骨組織の免疫組織化学染色法によりタンパク質発現の変化を検索する場合には、骨組織の脱灰処理が必要となり、この脱灰処理の影響により検索できるタンパク質に制限が生じてしまう。

そこで、本研究では、骨組織関連培養細胞株を用いて、生体を模したコラーゲンゲル三次元細胞培養条件下で、脱灰処理を必要とせず、形態変化を観察できる *in vitro* モデルで力学的負荷と関連するタンパク質の検索を行った。

### 3. 研究の方法

力学的負荷の減少による生体骨組織の変化の検討

運動領域を狭くしたケージ内でラットを飼育し、運動制限に伴う力学的負荷減少状態を生じさせ、ラットの骨組織の変化と骨関連タンパク質の発現変化を検索した。

三次元細胞培養条件の検討

骨生体組織を模したコラーゲンゲル三次元細胞培養の至適条件の検討のため、細胞株として骨芽細胞株 MC3T3、と骨細胞株 MLOA5 を用いて培養を行うとともに、複数のメーカー製によるコラーゲンゲルを用いて、培養条件およびコラーゲンゲル量の検討を行った。

力学的負荷による三次元細胞培養

三次元細胞培養した MC3T3 細胞に力学的負荷を与えて形態変化の観察を行った。

Dmp1 過剰発現マウス初代細胞培養株を用いた三次元細胞培養

Dmp1 過剰発現マウスから初代細胞培養株を採取し三次元細胞培養を行った。

細胞培養時のリン酸濃度に関する検討

細胞培養液に含まれるリン酸濃度と細胞の形態および分化の変化に関する検討を行った。

Dmp1 発現低下 MC3T3 細胞株の作製

遺伝子編集技術を用いて、Dmp1 発現低下 MC3T3 細胞株を作成し、三次元細胞培養を行った。

### 4. 研究成果

力学的負荷の減少による生体骨組織の変化の検討

運動制限に伴う力学的負荷減少ラットとコントロールラットから血清を経時的に採取するとともに飼育完了時の生体サンプルを用いて  $\mu$ CT による骨量の変化を検索した。海綿骨の骨量を比較すると、力学的負荷減少ラットではコントロールラットと比較して有意に骨量が減少していることが明らかとなった。経時的に採取した血清を用いて骨関連タンパク質の発現量を検索すると、検索した種々の骨関連タンパク質の中で Dmp1 発現がコントロール群と比較して有意に減少していることが明らかとなった。

三次元細胞培養条件の検討

コラーゲンゲルをミリセル内に注入し三次元状態を再現する条件と、6 well plate 内に直接コラーゲンゲルを注入し三次元状態を再現する条件の2条件を比較検討した。この条件での差違として、ミリセル内にコラーゲンゲルを注入し三次元状態を再現する場合には、ミリセル下部に存在する孔よりコラーゲンゲルに培地成分が供給されるという違いがある。加えて、用いる細胞株として、骨芽細胞株 MC3T3 と骨細胞株 MLOA5 を使用し、細胞の分化状態が異なる場合にはどのような違いが生じるかを検討した。

骨細胞株 MLOA5 では、異なるメーカーによるゲルの種類や、ミリセル内にコラーゲンゲルを注入するか、6 well plate 内に直接コラーゲンゲルを注入するかの、およびゲル量などの種々の条件などに関わらず、コラーゲンゲル上に播種された細胞には、変性の所見が観察される結果となり、生体内の骨組織を模した形態変化の再現は出来なかった。

骨芽細胞株 MC3T3 では、異なるメーカーによるゲルの種類や、ミリセル内にコラーゲンゲルを注入するか、6 well plate 内に直接コラーゲンゲルを注入するかの、種々の条件などに関わらず、生体内の骨組織を模した組織像が観察され、石灰化培地の添加により、石灰化物の形成も認められた。コラーゲンゲル内部への細胞の侵入程度の違いから、ミリセル内へのコラーゲンゲル注入の場合は、1.2~1.5 mL 量が至適コラーゲンゲル量で、6 well plate 内への直接のコラーゲンゲル注入の場合には、2~5 mL 量が至適コラーゲンゲル量であると推測された。

力学的負荷による三次元細胞培養

コラーゲンゲル三次元細胞培養のゲルに力学的負荷を投与し、細胞形態の変化を検討しようと

試みたが、本研究内で種々の程度の方で圧を加えたすべての検討において、コラーゲンゲルに亀裂および破損が生じ三次元細胞培養条件下での検討が不可能であった。

#### Dmp1 過剰発現マウス初代細胞培養株を用いた三次元細胞培養

力学的負荷減少ラットでは、コントロールラットと比較して血清中の Dmp1 発現の低下が観察されたため、Dmp1 発現と力学的負荷との関連性を検索するため、遺伝子改変 Dmp1 過剰発現マウスから初代骨芽細胞を採取し、コラーゲンゲル三次元細胞培養を行った。遺伝子改変 Dmp1 過剰発現マウス由来骨芽細胞および、コントロール群としての野生型マウス由来骨芽細胞ともにコラーゲンゲル三次元細胞培養において、細胞自体の生育は可能であったが、この両者の間に明らかな形態学的違いは認められなかった。

#### 細胞培養時のリン酸濃度に関する検討

Dmp1 は、そのリン酸化状態が、機能に影響すると考えられており、また、石灰化培地中のリン酸濃度は、細胞の分化に影響すると考えられているため、培地中のリン酸化濃度に関する影響を検討した。初めに、二次元平面培養で、リン酸濃度を 0mM から 50mM の間で変化させ石灰化物形成能を検討した所、培養開始から 5 週間後の日数では、3mM 以上のリン酸濃度において、アリザリン染色陽性所見を示す明らかな石灰化物形成が認められた。そこで、次に三次元細胞培養条件下で、リン酸濃度を 10mM 濃度および 50mM 濃度として MC3T3 細胞の培養を行い、三次元細胞培養条件で、リン酸濃度が細胞形態および細胞分化に及ぼす影響を検討した。10mM 濃度および 50mM 濃度のいずれにおいても MC3T3 細胞は生存が可能で、細胞の形態観察の結果、リン酸濃度の上昇に伴う細胞変性、細胞壊死の増加等の細胞障害の影響は観察されなかった。さらに、リン酸濃度 10mM と 50mM で培養した三次元細胞培養条件下において、免疫組織化学染色により、転写因子および骨基質タンパク質の発現検索を行い、細胞の分化状態の検討を行った。10mM 濃度と 50mM 濃度の細胞分化の状態を比較すると 50mM 濃度では、分化の初期の指標と分化の進んだ指標となるタンパク質発現が混在して観察され、生体骨組織とはやや異なる状態が観察された。

#### Dmp1 発現低下 MC3T3 細胞株の作製

Dmp1 過剰発現マウス由来の初代骨芽細胞を用いた検討では、Dmp1 発現の有無による差が明らかではなかったため、MC3T3 細胞株を用いて遺伝子編集技術による Dmp1 発現低下細胞株の作製を行った。MC3T3 細胞に CRISPR-Cas9 での遺伝子編集を行い、Dmp1 遺伝子に変異を生じさせ、正常 Dmp1 の発現低下細胞株の樹立を目指した。編集を行った細胞を限界希釈方にてクローン化し、ウエスタンブロット法により、正常 Dmp1 タンパク質の発現検索を行い、正常 Dmp1 発現低下株の選択を行った。にて得られた結果から、リン酸濃度を 10mM とし三次元コラーゲンゲル培養を Dmp1 発現低下株で行い、コントロール細胞との比較を行った。コントロールと比較して、一部の Dmp1 発現低下細胞で、細胞がコラーゲンゲル上に留まり、ゲル内へは浸潤しない像が観察された。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

第 60 回 歯科基礎医学会学術大会

3 次元細胞培養モデルを用いた骨芽細胞から骨細胞への初期分化の検討

社領美紀、佐藤淳、宇佐美悠、廣瀬勝俊、白銀陽一郎、豊澤悟

2018 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：阿部 真土

ローマ字氏名：Abe Makoto

所属研究機関名：大阪大学

部局名：歯学研究科

職名：講師

研究者番号（8桁）：40448105

研究分担者氏名：岸野 万伸

ローマ字氏名：Kishino Mitsunobu

所属研究機関名：大阪大学

部局名：歯学研究科

職名：助教

研究者番号（8桁）：60346161

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。