

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20634

研究課題名(和文) 機械的刺激下の骨リモデリングにおける骨細胞のアポトーシスとp53,CCN2の関与

研究課題名(英文) Association of osteocytes apoptosis, p53 and CCN2 during mechanical-dependent bone remodeling

研究代表者

高野 郁子 (TAKANO, Ikuko)

東北大学・大学病院・医員

研究者番号：90770462

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：歯科矯正臨床において歯の移動は歯槽骨の吸収と形成(骨リモデリング)により引き起こされる。骨組織に存在する骨細胞のアポトーシスが骨吸収に関与する可能性が示唆されている。マウス頭蓋冠へ圧縮力負荷によりCCN2、p53の発現および、アポトーシス細胞の割合が増加した。骨細胞様細胞株MLO-Y4へのメカニカルストレス負荷により、CCN2、p53、アポトーシス関連因子BaxおよびCaspase-3の発現量が増加傾向を示した。以上より骨細胞への圧縮力負荷はCCN2およびp53の発現を誘導し、アポトーシスを促進するカスパーゼシグナルを活性化する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Bone remodeling, resorption and formation in alveolar bone, occur during orthodontic tooth movement. It was suggested that osteocytes apoptosis associated with bone resorption. Compressive force applied mouse cranial sutures increased the protein expression of CCN2 and p53, and a rate of apoptosis cell. Mechanical stresses induced the expression level of CCN2, p53, apoptosis regulator Bax and Caspase-3 in osteocyte-like cell line MLO-Y4. These findings suggest that compressive force induces the expression of CCN2 and p53 in osteocyte and may enhance apoptosis through activation of caspase signal.

研究分野：歯学

キーワード：歯学 機械的刺激 骨リモデリング p53 CCN2

1. 研究開始当初の背景

骨組織に最も多く存在する骨細胞はメカノセンサーとして骨リモデリングに関与しており、さらに骨細胞のアポトーシスが骨吸収に重要な役割を果たしている可能性が示唆されている。しかしながら、これらの関係の詳細については不明な点が多い。これらのことから、マウス頭蓋骨および骨細胞様細胞株 MLO-Y4 細胞に圧縮力を負荷し、メカニカルストレス下における骨細胞のアポトーシスに対する p53、CCN2 の関与を *in vivo*、*in vitro* で検討することとした。

2. 研究の目的

本研究課題では、矯正的歯の移動時の骨リモデリングにおける骨細胞の役割の解明に向け、メカニカルストレス下における骨細胞のアポトーシスに対する CCN2、p53 の分子制御メカニズムを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) マウス頭蓋骨圧縮力負荷モデルの作成

実験動物として 6 週齢の雄性 ICR マウス (CLEA Japan, Japan) を用いた。動物への負担軽減のため、施術はイソフルラン (Intervet, Japan) による吸入麻酔を併用し、生理食塩液 (Otsuka, Japan) にて希釈したペントバルビタール (Kyoritsu-seiyaku, Japan) にて腹腔内注射し、全身麻酔下で行った。実験群マウスの頭頂骨を正中線で矢状方向に切開して、左右に展開し頭頂骨を露出させた。スチールバー (ラウンド 005 #1/4, MORITA, Japan) を用いて注水下にて左右の頭頂骨に穴を開けた。穴は頭頂骨矢状縫合部を跨ぐようにして開け、矢状縫合部に対し垂直な面の水平方向に圧縮力が負荷されるようにスプリングを挿入したのちに、閉創した。スプリングは Titanium Molybdenum Alloy (TMA) ワイヤ (Ormco, USA) を用いて作製した。対照群は同様に頭頂骨に穴を開け、スプリングは挿入せずに閉創した。

(2) 組織切片の作成

マウス頭蓋骨への圧縮力負荷後に、イソフルラン吸入麻酔およびペントバルビタール腹腔内注射による全身麻酔の後、4% パラホルムアルデヒド (PFA) (nacalai tesque, Japan) にて灌流固定を行った。左右のマウス頭頂骨を摘出し、4% PFA に浸漬し、4 下で 12 時間固定した。20% (w/v) エチレンジアミン四酢酸 (EDTA, pH7.4) を使用して 4 下で 2 週間脱灰した。上昇エタノール系列およびキシレンによる脱水後にパラフィン包埋し、ミクロトーム (REM-710, YAMATO KOHKI, Japan) を用いて、厚さ 4.0 μm の前頭断連続切片を作成した。

(3) 組織学的・免疫組織学的検索

得られた組織標本はヘマトキシリン (Sigma-Aldrich, USA) およびエオシン (Wako,

Japan) を用いて、ヘマトキシリン-エオシン (HE) 染色を行った。脱パラフィン・親水化処理後に、ヘマトキシリン溶液に浸漬し、流水水洗を行った。続けてエオシン溶液に浸漬し、流水水洗を行った。脱水・透徹処理後に Mount-Quick (COSMO Bio, Japan) を用いて封入し、検鏡を行った。

アポトーシス *in situ* 検出キット (Wako, Japan) を用いて Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP

(2'-Deoxyuridine, 5'-Triphosphate) nick end labeling (TUNEL) 染色を行った。脱パラフィン・親水化処理後に Protein Digestion Enzyme 希釈液に浸して、タンパク質分解処理を行った。PBS にて洗浄を行った後、TdT 反応液を滴下し、DNA 3' 末端の標識を行った。PBS にて洗浄を行った後、3% (v/v) H₂O₂ に浸し、内因性ペルオキシダーゼ不活化処理を行った。PBS にて洗浄を行った後、

POD-Conjugated antibody 希釈液を滴下し、標識抗体反応を行った。PBS にて洗浄を行った後、DAB 基質キット (NICHIREI, JAPAN) を用いて発色反応を行った。脱水・透徹処理後に Entellan (Merck Millipore, Germany) を用いて封入し、検鏡を行った。

M.O.M. Immunodetection Kit (VECTOR, USA) を用いて、p53 に対する免疫染色を行った。脱パラフィン・親水化処理後に、3% (v/v) H₂O₂ に浸し、内因性ペルオキシダーゼ不活化処理を行った。PBS にて洗浄を行った後、Mouse Ig Blocking Reagent を滴下しインキュベートした。PBS にて洗浄を行った後、M.O.M. Diluent で反応させた。一次抗体には、p53 (1C12, Mouse, Cell Signaling Technology, USA) を使用した。PBS にて洗浄を行った後、Biotinylated Anti-Mouse IgG Reagent で反応させた。PBS にて洗浄を行った後、VECTASTAIN® Elite ABC Kit (VECTOR, USA) を用いて、アビジン-ビオチン標識酵素複合体を反応させた。PBS にて洗浄を行った後、DAB 基質キット (NICHIREI, JAPAN) を用いて発色反応を行った。脱水・透徹処理後に Mount-Quick (COSMO Bio, Japan) を用いて封入し、検鏡を行った。

Can Get Signal immunostain Solution (Toyobo, Japan) およびシンプルステインマウス MAX-PO (R) (NICHIREI, JAPAN) を用いて、CTGF に対する免疫染色を行った。脱パラフィン・親水化処理後に、3% (v/v) H₂O₂/Methanol に浸し、内因性ペルオキシダーゼ不活化処理を行った。PBS にて洗浄を行った後、3% (v/v) Goat serum in PBS (VECTOR, USA) を滴下し、インキュベートした。PBS にて洗浄を行った後、一次抗体には Anti-CTGF antibody (abcam, United Kingdom) を使用し、反応させた。PBS にて洗浄を行った後、シンプルステインマウス MAX-PO (R) を滴下し、反応させた。PBS にて洗浄を行った後、DAB 基質キット (NICHIREI, JAPAN) を用いて発色反応を行った。脱水・透徹処理後に Entellan を用いて封入し、検鏡

を行った。陰性対照として Rabbit IgG (Sigma-Aldrich, USA)を用いて同様の実験を行った。

観察には正立型顕微鏡 DMRBE(Leica, Switzerland)を使用し、撮影は高精細顕微鏡デジタルカメラ DP72(OLYMPUS, Japan)を使用した。

(4) 培養細胞への圧縮力負荷

本研究では、培養細胞に圧縮力を負荷するために、生化学用伸展装置 (STB-40-10, STREX, Japan)を用いた(図1)。シリコンチャンパー(STB-CH-10, STREX, Japan)を伸展した状態で装置に装着し、伸展力を弱めることで圧縮力を負荷した。



図1. 生化学用伸展装置

(5) 細胞培養

骨細胞様細胞株 murine long bone osteocyte(MLO-Y4)をシリコンチャンパーに播種し、5%FBS(Fetal Bovine Serum) (Sigma-Aldrich, USA)および5%BS(Bovine Serum) (Invitrogen, USA)入りのMEM (Wako, Japan)を用いて、37℃、5% CO₂条件下に培養を行った。メカニカルストレスは、細胞播種の2日後に負荷した。

(6) Western blotting

シリコンチャンパーに播種した MLO-Y4 細胞を Triton SDS lysis buffer (1% (v/v) Triton X-100/ 0.1% (w/v) SDS) に溶解し回収した後、BCA Protein Assay Kit(Thermo Scientific, USA)を用いてタンパク定量を行った。5×SDS Sample Buffer(5%(w/v) SDS) に溶解し、Mini-PROTEAN TGX Gels 4-15% (Bio-Rad, USA)を用いて Mini-PROTEAN Tetra Electrophoresis System(Bio-Rad, USA)による電気泳動により分離した後、Trans-Blot Turbo Transfer Pack 0.2 μm PVDF Membrane (Bio-Rad, USA)を用いて Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad, USA)により転写した。転写したメンブレンをブロッキング液 (4%(w/v) ブロックエース (DS PHAMA BIOMEDICAL, Jpan)) に浸漬した後、一次抗体反応を行った。一次抗体には、p53 (1C12, Mouse, Cell Signaling Technology)、

Phospho-p53 (Ser15) (Rabbit, Cell Signaling Technology, USA)、CCN2 (Rabbit, abcam, United Kingdom)、Caspase-3 (Rabbit, Cell Signaling Technology, USA)、Actin (I-19, Goat, Santa Cruz, USA)を使用した。TBS-T(0.1%(v/v) Triton X-100)にて洗浄、その後 Tris Buffered Saline(TBS)にて洗浄を行った後、二次抗体反応を行った。二次抗体には、Peroxidase AffiniPure Donkey Anti-Mouse IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch, USA)、Donkey Anti-Rabbit IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch, USA)、Donkey Anti-Goat IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch, USA)を使用した。TBS-Tにて洗浄、その後 TBS にて洗浄を行った後、Amersham ECL Select Western Blotting Detection Reagent(GE Healthcare, USA)または p-Coumaric acid (Sigma-Aldrich, USA) および Luminol (Wako, Japan)を用いて、ペルオキシダーゼ活性を検出した。観察には高感度化学発光検出装置 VersaDoc5000 (Bio-Rad, USA)を使用した。

4. 研究成果

(1) 圧縮力負荷時におけるマウス頭蓋骨での p53、CCN2 の発現とアポトーシスの変動

p53 タンパク質はマウス頭頂骨骨細胞に発現し、圧縮力負荷 0 時間後(対照群)と比較して、圧縮力負荷 3 時間後で有意に上昇し、圧縮力負荷 6 時間後では対照群と同レベルまで減少した。CCN2 タンパク質は、p53 と同様に、圧縮力負荷 3 時間後で有意に上昇し、圧縮力負荷 6 時間後では対照群と同レベルまで減少した。TUNEL 陽性骨細胞率は対照群と比較して、圧縮力負荷 3 時間後では有意差を認めなかったが上昇し、圧縮力負荷 6 時間後では対照群と比較して有意に増加した。

(2) 骨細胞様細胞株 MLO-Y4 細胞への圧縮力負荷による p53、CCN2 の発現とアポトーシス関連タンパクの変動

MLO-Y4 細胞に圧縮力を負荷したところ、MLO-Y4 細胞には著明な形態的变化は認められなかった。

p53 およびその活性型である p-p53(Ser15) のタンパク質発現量は圧縮力負荷後に増加傾向を示した。

CCN2 の発現量は、p53 およびその活性型の発現量と同様に圧縮力負荷後より増加傾向を示した。

p53 の下流標的因子の一つであり、アポトーシス誘導因子である Bax の発現量も圧縮力負荷後より増加傾向を示した。一方、アポトーシス関連因子 Caspase-3 の発現量は圧縮力負荷後より時間依存的に増加傾向を示した。

以上より、骨細胞への圧縮力負荷は p53 の発現および活性化、CCN2 の発現を誘導し、アポトーシスを促進するカスパーゼシグナルを活性化することが示唆された。

5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計1件)

Takeshita N, Hasegawa M, Sasaki K, Seki D, Seiryu M, Miyashita S, Takano I, Oyanagi T, Miyajima Y, Takano-Yamamoto T., In vivo expression and regulation of genes associated with vascularization during early response of sutures to tensile force. J Bone Miner Metab. 2017 Jan;35(1):40-51. doi: 10.1007/s00774-016-0737-z. 査読有り

〔学会発表〕(計3件)

竹下信郎、佐々木紀代、関大輔、清流正弘、宮下俊郎、高野郁子、大柳俊仁、長谷川正和、山本照子：CCN2/CTGF は牽引力が負荷された頭蓋縫合における骨および血管の形成を制御する、第75回日本矯正歯科学会大会、徳島、2016年、11月7-9日、日本語、ポスター

竹下信郎、関大輔、清流正弘、木村晴地、高野郁子、大柳俊仁、吉田倫子、長谷川正和、山本照子：機械的刺激が促す骨形成過程における前駆骨芽細胞凝集へのCCN2/CTGFの影響、第8回日本CCNファミリー研究会、岡山、2016年8月27日、日本語、口演

竹下信郎、佐々木紀代、関大輔、宮下俊郎、高野郁子、大柳俊仁、山本照子：CCN2/CTGF は牽引力が負荷された頭蓋縫合における血管および骨の形成を制御する、第34回日本骨代謝学会学術集会、大阪、2016年7月20-23日、日本語、ポスター

〔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：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

高野郁子(Takano Ikuko)(東北大学・大学病院・医員)

研究者番号：90770462

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()