

令和元年5月29日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K17303

研究課題名(和文)メカニカルストレス下における骨細胞アポトーシスとp53、CCN2の関与

研究課題名(英文) Possible role of p53 and CCN2 in osteocyte apoptosis under mechanical stress loading

研究代表者

吉澤 光弘 (Yoshizawa, Mitsuhiro)

東北大学・歯学研究科・大学院非常勤講師

研究者番号：40792164

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：矯正歯科治療において矯正力が負荷されると骨リモデリングが惹起され歯が移動する。矯正力による骨リモデリングには、骨細胞アポトーシスが関与する可能性が示唆されているが、その詳細なメカニズムは不明である。本研究では、マウス頭頂骨と骨細胞様細胞株MLO-Y4細胞に圧縮力を負荷し、骨細胞アポトーシスに対するp53、CCN2の関与を検討した。その結果、マウス頭頂骨骨細胞では、p53、CCN2が圧縮力負荷により上昇しTUNEL陽性骨細胞も増加した。MLO-Y4細胞を用いたin vitroの研究では、圧縮力によりp53、CCN2、アポトーシス関連因子であるCaspase-3が増加することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

矯正歯科治療中の歯の移動は、矯正力が歯を介して歯槽骨に伝わり、歯槽骨内で骨リモデリングが誘導されることによって生じる。骨リモデリングは、破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成によって行われるが、矯正力による骨リモデリングは、骨細胞がメカノセンサーとしてメカニカルストレスを感知することによって制御されることが示唆されているが、骨細胞が骨基質内に存在するため、これまで骨細胞に関する研究は困難であった。本研究では、骨細胞の機能をin vivo、in vitro両方で検討し、骨細胞がメカニカルストレス下においてアポトーシスを誘導し、骨リモデリングに関与している可能性を示唆することができた。

研究成果の概要(英文)：When a force is applied onto teeth in orthodontic treatment, bone remodeling is induced in the alveolar bone, leading to orthodontic tooth movement. Although osteocyte apoptosis might play an important role in regulating bone remodeling during orthodontic tooth movement, the underlying mechanisms of this phenomenon is not fully understood. We investigated the possible role of p53 and CCN2 in the osteocyte apoptosis induced by compressive force to murine parietal bones and osteocyte-like cell line, MLO-Y4. We found that compressive force increased p53 and CCN2 protein expressions in osteocytes in the murine parietal bones. In addition, osteocyte apoptosis, detected by TUNEL staining, was induced by compressive force in the murine parietal bones. Consistent with in vivo findings, compressive force-applied MLO-Y4 cells showed increased p53 and CCN2 expressions, and caspase-3 activity in vitro.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：歯学 メカニカルストレス 骨細胞 アポトーシス p53

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

1. 研究開始当初の背景

矯正歯科治療においてメカニカルストレスが負荷されると、歯根膜圧迫側では破骨細胞による骨吸収が促進され、牽引側では骨芽細胞による骨形成が誘導されて骨リモデリングが生じ、歯が移動する。矯正歯科治療における骨リモデリングは、メカノセンサーとして機能する骨細胞が歯に加えられた矯正力を感じることにより制御されていることが知られており、さらに、骨細胞は破骨細胞の分化に必要なタンパク質である RANKL を多く発現し、骨吸収に重要な役割を担っていることが示唆されている。

CCN2 は、結合組織成長因子(CTGF)としても知られ、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞の培養上清中から単離された成長因子で、CCN1-6 からなる CCN ファミリーに属している。CCN2 は骨格系の組織にも発現し、細胞の増殖・分化、遊走、接着の促進作用を有しており、骨リモデリングにも関与することが知られている。また、CCN2 は、圧縮力を負荷した骨細胞に発現し、骨細胞のアポトーシスを誘導することが明らかとなっている。

一方、p53 は、がん抑制遺伝子として報告され、アポトーシスの誘導等を調節する転写因子である。また、p53 は、メカニカルストレスや CCN2 と関係を有している可能性が示唆されている。しかしながら、メカニカルストレス負荷による骨細胞のアポトーシスが骨吸収を誘導する詳細な分子メカニズムには未だ不明な点が多い。

2. 研究の目的

矯正歯の移動時に生じるメカニカルストレス負荷時の破骨細胞による骨吸収のメカニズムを解明するために、メカニカルストレス負荷時の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マウスおよび培養細胞を用いて *in vivo*, *in vitro* で解析する。

3. 研究の方法

(1) マウス頭蓋骨圧縮力負荷モデルの作製

6 週齢の雄性 ICR マウスに、吸入麻酔を併用した全身麻酔を行った。頭皮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後、ラウンドスチールバーを用いて注水下に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 5mm 間隔で開け、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。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) 圧縮力負荷マウス頭蓋骨における p53、CCN2 の免疫組織学的検索

マウス頭蓋骨組織切片の作製

マウス頭蓋骨への圧縮力負荷 0、3、6 時間後に、全身麻酔下で、4%パラホルムアルデヒドにて灌流固定を行った。左右のマウス頭頂骨を摘出し、4%パラホルムアルデヒドに浸漬し、4 下で 12 時間後固定した。20%エチレンジアミン四酢酸(EDTA)を使用して脱灰後、上昇エタノール系列およびキシレンによる脱水を行い、パラフィン包埋した。ミクロトームを用いて、厚さ 5 μm の前頭断連続切片を作製した。得られた組織標本は、ヘマトキリン-エオシン(HE)染色を行い、圧縮力負荷後の骨組織を観察した。

骨細胞アポトーシスの検出

骨細胞アポトーシスを検索するために、アポトーシス *in situ* 検出キット(Wako, Japan) を用いて、添付文書に従い、Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP (2'-Deoxyuridine, 5'-Triphosphate) nick end labeling(TUNEL)染色を行った。発色反応には、DAB 基質キット(NICHIREI, JAPAN)を用いた。

p53 に対する免疫組織学的検索

M.O.M. Immunodetection Kit(VECTOR, USA)を用いて、添付文書に従い、p53 に対する免疫染色を行った。一次抗体には p53 (1C12, Mouse, Cell Signaling Technology, USA)を使用し、発色反応には、DAB 基質キット(NICHIREI, JAPAN)を用いた。

CCN2 に対する免疫組織学的検索

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、添付文書に従い、CCN2(CTGF)に対する免疫染色を行った。一次抗体には Anti-CTGF antibody(abcam, UK)を使用し、発色反応には、DAB 基質キット(NICHIREI, JAPAN)を用いた。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。

(3) 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(STB-CH-10, STREX, Japan)に播種し、5%Fetal Bovine Serum (FBS)および 5% Bovine Serum (BS)入りの MEM を用いて培養した。シリコンチャンパーには、Poly-D-Lysine および Collagen Type I-A を用いて表面コーティングを施した。培養開始 2 日後に、生化学用伸展装置 (STB-40-10, STREX, Japan)を用いてシリコンチャンパーを 12%圧縮し、MLO-Y4 細胞にメカニカルストレスを負荷した。

(4) Western blotting

シリコンチャンバーに播種した MLO-Y4 細胞を protease/phosphatase inhibitors cocktail を含有した RIPA Buffer、に溶解し、得られたタンパク質を BCA Protein Assay Kit を用いて定量した。等量のタンパク質を 4-15%のグラディエントゲルに電気泳動して分離した後、PVDFメンブレンに転写した。転写したメンブレンをブロックエース(DS PHAMA BIOMEDICAL, Japan)にてブロッキング後、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, UK)、Caspase-3 (Rabbit, Cell Signaling Technology, USA)、Actin (I-19, Goat, Santa Cruz, USA)を使用した。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。Amersham ECL Select Western Blotting Detection Reagent(GE Healthcare, USA)を用いて、ペルオキシダーゼ活性を検出し、高感度化学発光検出装置 VersaDoc5000(Bio-Rad, USA)を使用して観察した。

4. 研究成果

(1) 圧縮力負荷時のマウス頭蓋骨における骨細胞アポトーシスと p53、CCN2 の発現

圧縮力負荷時における骨細胞アポトーシスへの p53 と CCN2 の関与を検討する目的で、マウス頭頂骨に 3 時間あるいは 6 時間圧縮力を負荷した。

マウス頭頂骨に対する圧縮力負荷 0 時間後(対照群)では、左右の頭頂骨間に線維性の頭蓋矢状縫合が観察された。圧縮力負荷 3 時間後では、圧縮力負荷 0 時間後に比べ、左右の頭頂骨間距離が大きく減少していた。圧縮力負荷 6 時間後では、左右の頭頂骨間距離は、圧縮力負荷 0 時間後に比べ、引き続き減少していたが、圧縮力負荷 3 時間後と比較すると、大きな差は認められなかった。以上より、本実験モデルでは、実験開始後 3 時間でマウス頭頂骨に圧縮力が負荷され、6 時間まで継続して圧縮力が負荷されていることが確認できた。

次に、マウス頭頂骨における p53 タンパク質の発現を免疫組織学的に検索した。p53 タンパク質は、圧縮力負荷 0 時間後に比較して、圧縮力負荷 3 時間後では、陽性骨細胞の割合が有意に上昇していた。圧縮力負荷 6 時間後では、p53 陽性骨細胞の割合は、圧縮力負荷 3 時間後に比べて有意に減少し、圧縮力負荷 0 時間後の対照群と同レベルまで減少した。なお、陰性対照では p53 の発現を認めなかった。

マウス頭頂骨における CCN2 タンパク質の発現では、p53 タンパク質と同様に、CCN2 陽性骨細胞の割合が、圧縮力負荷 3 時間後において、圧縮力負荷 0 時間後と比較して有意に増加していた。圧縮力負荷 6 時間後では、CCN2 陽性骨細胞の割合は、圧縮力負荷 3 時間後と比べて減少し、圧縮力負荷 0 時間後と同レベルまで減少していた。なお、陰性対照では CCN2 陽性骨細胞は認められなかった。

圧縮力負荷時のマウス骨細胞のアポトーシスを検出するために、TUNEL 染色を行った。マウス頭頂骨における TUNEL 陽性骨細胞の割合は、圧縮力負荷 0 時間後に比べて、圧縮力負荷 3 時間後では増加傾向を認めたが、有意な変化は認められなかった。しかし、圧縮力負荷 6 時間後では、TUNEL 陽性骨細胞は増加し、圧縮力負荷 0 時間後と比較して有意に増加していた。なお、陰性対照では TUNEL 陽性骨細胞は認められなかった。

(2) 圧縮力負荷時の MLO-Y4 細胞におけるアポトーシス関連タンパク質および p53、CCN2 の発現
培養細胞圧縮力負荷装置を用いて MLO-Y4 細胞に 12%の圧縮力を負荷し、経時的な細胞の形態変化を観察した。MLO-Y4 細胞は、圧縮力負荷 0 時間後の対照群において、長い細胞突起を有し、骨細胞様の形態を呈していた。MLO-Y4 細胞に圧縮力を負荷すると、圧縮力負荷後 0 時間と比較して、圧縮力負荷後 2 時間、4 時間、6 時間において、長い細胞突起を有する骨細胞様形態を維持し、著明な形態的变化は認められなかった。

次に、圧縮力負荷時の MLO-Y4 細胞における p53 および CCN2 タンパク質の発現を Western blotting 法にて検索した。その結果、p53 およびその活性型である phospho-p53(Ser15)タンパク質は、圧縮力負荷後 0 時間において発現を確認できた。圧縮力負荷すると、p53 および phospho-p53(Ser15)タンパク質は、圧縮力負荷後 1, 2, 3, 4, 5, 6 時間後において増加傾向を示した。また、CCN2 タンパク質も p53 およびその活性型である phospho-p53(Ser15)と同様に、圧縮力負荷後 0 時間において発現し、圧縮力負荷により増加傾向を示した。

圧縮力負荷による骨細胞アポトーシスの誘導を検討するために、アポトーシス関連因子 Caspase-3 の発現量を p53、phospho-p53(Ser15)、CCN2 と同様に Western blotting 法にて検索した。Caspase-3 タンパク質は、圧縮力負荷後 0 時間においても発現していたが、圧縮力負荷より、圧縮力負荷後 1, 2, 3, 4, 5, 6 時間後において、時間依存的に発現の増加傾向を認めた。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可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Matsubara T, Kokabu S, Nakatomi C, Kinbara M, Maeda T, Yoshizawa M, Yasuda H, Takano-Yamamoto T, Baron R, Jimi E: The Actin-Binding Protein PPP1r18 Regulates Maturation, Actin Organization, and Bone Resorption Activity of Osteoclasts, Molecular

and Cellular Biology, 査読有, 38, 2018, e00425-17. DOI: 10.1128/MCB.00425-17

Matsubara T, Kinbara M, Maeda T, Yoshizawa M, Kokabu S, Takano-Yamamoto T: Plectin, A Cytolinker Protein, Plays an Important Role in Differentiation and Actin Ring Formation in Osteoclasts, *Mathews Journal of Cytology and Histology*, 査読有, 1, 2018, 6

Matsubara T, Kinbara M, Maeda T, Yoshizawa M, Kokabu S, Takano Yamamoto T: Regulation of osteoclast differentiation and actin ring formation by the cytolinker protein plectin, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 査読有, 2017, 489, 472-476. DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.05.174

〔学会発表〕(計2件)

吉澤光弘、福永智広、清流正弘、黒木毅、宮島悠旗、山本照子：歯科矯正用アンカースクリューを併用して上顎骨前方牽引を行った骨格性 III 級症例、第 76 回日本矯正歯科学会学術大会、2017 年 10 月 18 日 - 20 日、札幌市

吉澤光弘、北浦英樹、福永智広、山本照子：歯科矯正用アンカースクリューを用いて水平的な咬合平面の傾斜を改善した正中離開症例、第 33 回東北矯正歯科学会大会、2017 年 5 月 13 日 - 14 日、秋田市

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：該当なし

ローマ字氏名：該当なし

所属研究機関名：該当なし

部局名：該当なし

職名：該当なし

研究者番号(8桁)：該当なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：該当なし

ローマ字氏名：該当なし

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。