

令和元年6月7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：17K17307

研究課題名(和文) 骨の力学刺激感知・伝搬機構におけるアクチン連結細胞接着装置の機能と相互作用の解明

研究課題名(英文) The function and interaction of focal adhesion and adherens junction in bone mechanosensing and mechanotransduction.

研究代表者

金原 正敬 (Kinbara, Masayuki)

東北大学・歯学研究科・大学院非常勤講師

研究者番号：00637960

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)：プライマリー骨細胞および骨芽細胞におけるFA・AJ構成分子の発現・分布パターンとAFM細胞刺激システムによる力学刺激負荷部位によるカルシウム応答性の違いが明らかとなった。また、力学刺激負荷細胞のみならず、周囲細胞でもカルシウム応答を認め、一連の伝播パターンが観察された。培養ディッシュのコート条件を調整することでビンキュリンの発現低下に伴うFAの形成抑制が認められ、FA形成抑制下ではカルシウム応答率が低下することが示された。また、細胞密度調整によってAJ形成が抑制され、FA・AJへのビンキュリン集積の低下、カルシウム応答率の低下が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、AFMを応用した新規の細胞刺激系を用いて骨の力学刺激応答機構の解明を目指す。本手法は、従来解析が困難とされた力学刺激伝搬性までも詳細に解析が可能であり、得られる成果の新規性は極めて大きい。本研究によって得られる知見は、骨代謝制御の基盤確立の重要な一助となり、歯科、医科を中心とした多くの関連分野の発展に大きく貢献するものと思われ、予想される益は極めて大きい。さらには、骨関連疾患の新規治療法の開発や、矯正歯科治療における効果的かつ精密な歯の移動が可能となることが期待され、人類の健康増進に寄与する点で大きな意義を持つ。

研究成果の概要(英文)：The expression of FA and AJ constituent molecules were observed in primary osteocytes and osteoblasts. There was the differences in calcium response depending on the site of application of mechanical stimulation by the AFM cell stimulation system. In addition, not only mechanical stressed, but also surrounding cells showed calcium response and observed a series of propagation patterns. By adjusting the coating conditions of culture dishes, it was observed that FA formation was suppressed along with the decrease in expression of vinculin, and that the calcium response rate was reduced under FA formation suppression. It was also shown that cell density adjustment suppresses AJ formation, resulting in reduction of vinculin accumulation in FA and AJ, and reduction in calcium response rate.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：骨細胞 focal adhesion adherens junction mechanical stress AFM

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

矯正歯科治療により歯に矯正力が負荷されると、周囲の歯根膜と歯槽骨において圧迫と牽引が生じる。これらの力学刺激に反応して、破骨細胞による骨吸収反応と骨芽細胞による骨形成反応とが協調する骨リモデリング機構が機能し、歯は一定方向に移動できる。矯正歯科治療はこの骨リモデリング機構を基盤としており、本機構の解明は極めて重要な課題である。

骨基質中に埋没して存在する骨細胞は、その存在意義が長年不明であったが、近年、研究代表者らのグループは、骨リモデリング機構への中心的な関与を報告し (Terai et al., *J Bone Miner Res*, 1999)、さらに、骨細胞および骨芽細胞の力学刺激応答能を明らかにしてきた (Kamioka et al., *J Bone Miner Res*, 2006; Adachi et al., *J Biomech*, 2009)。これらの研究から、骨細胞および骨芽細胞は、骨への力学刺激を感知し、骨系細胞の活動を調節するメカノセンサーとして機能すると考えられているが、その詳細は未だ不明な点が多い。前述の研究に加えて、研究代表者らのグループは、骨の力学刺激応答において、アクチン細胞骨格やアクチン連結細胞接着装置 Focal adhesion (FA)、アクチン結合蛋白質ピンキュリンが関連することも見出し (Sugawara et al., *Bone*, 2008)、骨細胞・骨芽細胞の力学刺激応答機構にはアクチン細胞骨格を介した細胞接着が重要に関わるものと推測される。細胞内に張り巡らされたアクチン細胞骨格は、インテグリンを介する細胞-細胞外基質間接着装置である FA とカドヘリンを介する細胞-細胞間接着装置である Adherens junction (AJ) に連結することが知られる。近年、上皮細胞等を用いた研究によって、FA と AJ の力学センサーとしての機能が明らかにされつつあり、これらの装置に共通して局在するピンキュリンが張力依存的に集積すること、また、FA と AJ がアクチン細胞骨格を介して互いにクロストークすることが報告されている (Yonemura et al., *Nat Cell Biol.*, 2010; Atherton et al., *Nat Commun.*, 2015; Mui et al., *J Cell Sci.*, 2016)。骨芽細胞にも AJ が発現し、AJ 形成が骨芽細胞分化に必要であるといった報告もあることから (Guntur et al., *Bone*, 2012)、骨細胞・骨芽細胞の力学刺激応答機構においても、FA、AJ が相互に作用を及ぼしながら力学センサーとして機能するものと予測されるが、その詳細は未だ不明である。一方で、研究代表者らのグループは、骨細胞が骨基質中で多数の細胞突起を伸ばして骨細胞同士あるいは骨組織表面の骨芽細胞と連結して密な細胞間ネットワークを形成していることも報告してきた (Kamioka et al., *Bone*, 2001; Sugawara et al., *Calcif Tissue Int*, 2011)。これらのネットワーク構造から、骨細胞・骨芽細胞が感知した力学刺激を周囲細胞へと伝搬する機構が存在するものと推測されるが、これまでに骨の力学刺激応答の伝搬性までを詳しく調べた研究はなく、その詳細も不明のままである。

細胞を用いた力学刺激負荷実験については、これまで重力や流体剪断応力、高張液、静水圧といった様々な系が試みられてきたが、その殆どが試料細胞全体に刺激を負荷する実験系である。力学刺激応答の伝搬性まで明らかにするには、単一細胞のみへの局所的な刺激が可能、かつ細胞間ネットワークを形成する周囲細胞を含めたリアルタイム解析が可能な実験系が必須であるが、これらの条件を満たす実験系はこれまで存在しなかった。原子間力顕微鏡/Atomic force microscopy (AFM) は、カンチレバーにて試料表面へ接触し、表面形態や弾性率等の機械的性質を解析することができる装置であるが (Liu et al., *Scanning*, 2010)、近年、その機能を応用して、単一細胞へ力学刺激を直接負荷する目的にも用いられ始めている (Charras GT et al., *Biophys J*, 2002)。最近、研究代表者らは、この AFM の機能に着目し、AFM を応用した新規の細胞刺激系の確立に成功した。これらの AFM 細胞刺激系と蛍光顕微鏡とを組み合わせた実験系では、細胞局所に任意強度の力学刺激を負荷できるほか、刺激細胞周囲の複数細胞を含めた蛍光リアルタイム解析も可能であるため、力学刺激応答の伝搬性までも詳細に解析できる。さらに、試料細胞への薬剤等の添加や遺伝子導入処理も容易に行えるため、生化学的・分子生物学的アプローチを組み合わせた分子機能解析実験も展開しやすい。

2. 研究の目的

本研究の目的は、最近研究代表者らが確立した原子間力顕微鏡を応用した新規細胞刺激系を用いて、骨細胞・骨芽細胞における力学刺激感知伝搬機構を解明するとともに、本機構における FA、AJ の機能および相互作用を解析することである。

3. 研究の方法

(1) マウスプライマリー骨細胞および骨芽細胞の単離

近年、骨細胞特異的に蛍光蛋白質 Topaz を発現する DMP1-Topaz transgenic マウスが作製されており (Kalajzic et al., *Bone*, 2004)、入手可能である。本研究では、DMP1-Topaz transgenic マウスの骨細胞および骨芽細胞を酵素処理およびセルソーターを用いて単離し、以下の実験に使用した。

(2) 骨細胞・骨芽細胞における FA および AJ 構成分子の発現・分布の解析

単離した骨細胞・骨芽細胞を 24h 培養後、固定し、FA および AJ 構成分子の発現パターンについて、各種標識抗体を用いた細胞染色により解析する。骨細胞は DMP1-Topaz、骨芽細胞は ALP 活性を指標に細胞種を同定した。

(3) AFM 細胞刺激システムを用いた骨細胞・骨芽細胞の力学刺激感知・伝搬性の解析

AFM のコンタクトモードを用いて細胞の上方から力学刺激を負荷する際には、負荷する力の任意の設定が可能である。また、AFM はカメラと連動制御されるため、細胞の任意の部位への正確な刺激も可能となる。研究代表者は、AFM のこれらの機能を応用した細胞刺激系“AFM 細胞刺激システム”をこれまでに確立してきている。本研究では、本システムを用いた

細胞刺激を基本とした。

力学刺激が生化学シグナルに変換される過程における初期応答の一つとして、細胞内へカルシウムが流入するカルシウム応答がある。本研究では、このカルシウム応答を指標に力学刺激応答性の評価を行う。単離した骨細胞および骨芽細胞を 24h 培養した後、蛍光カルシウム指示薬 Fura2-AM を取り込ませ、AFM 細胞刺激システムにより、各々の細胞局所へ様々な強度の力学刺激を負荷し、刺激細胞および周囲細胞において誘導されるカルシウム応答を比較解析した。MetaFluor ソフトウェアを用いて制御した高速 CCD カメラにて、ストレス負荷直前より一定時間にかけてタイムラプス画像を取得し、刺激細胞および周囲細胞における細胞内へのカルシウム流入速度、蛍光輝度変化、応答細胞の割合を解析すると同時に、周囲細胞への伝搬パターンや伝搬速度についても詳しく解析した。

(4) FA 機能抑制における力学刺激応答性・ピンキュリン集積の解析

単離した骨細胞および骨芽細胞を培養する際に、コーティング条件を調整することで FA 機能を抑制する。この条件にて、AFM 刺激負荷およびカルシウム応答解析を行い、FA 機能調節による骨細胞・骨芽細胞の力学刺激応答性の変化について評価した。

(5) AJ 機能抑制条件における力学刺激応答性・ピンキュリン集積の解析

(4) の FA 機能の抑制実験と対比させて、AJ 機能の抑制実験を行った。単離した骨細胞および骨芽細胞を培養する際に、細胞密度調整、または N-cadherin ブロッキング抗体を用いた AJ 形成の抑制を行い、AJ 機能を調節する。これらの調節条件にて、4) と同様の実験を行い、AJ 機能調節による骨細胞・骨芽細胞の力学刺激応答性の変化を解析するとともに、AJ の機能調節が他方の FA の安定性や機能にどのような影響をもたらすか、AJ-FA の連動・相互作用性についても評価した。

4. 研究成果

初年度は、マウス頭蓋骨より単離したプライマリー骨細胞、骨芽細胞における FA および AJ 構成分子の発現・分布について解析し、また、AFM 細胞刺激システムを用いて、これらの細胞の力学刺激感知・伝搬性についてカルシウム応答を指標に検討した。その結果、プライマリー骨細胞および骨芽細胞における FA および AJ 構成分子の発現・分布パターンとこれらの細胞における各々の力学刺激負荷部位によるカルシウム応答性の違いが明らかとなった。また、力学刺激負荷細胞のみならず、周囲細胞でもカルシウム応答を認め、一連の伝播パターンが観察された。

次年度は、FA 機能抑制によるカルシウム応答性の変化について解析を行った。その結果、培養ディッシュのコーティング条件を調整することでピンキュリンの発現低下に伴う FA の形成抑制が認められ、FA 形成抑制下においては骨細胞のカルシウム応答率が低下することが示された。また、AJ 形成抑制によるピンキュリン発現、カルシウム応答性の変化について解析を行った。その結果、細胞密度調整によって AJ 形成が抑制され、FA・AJ へのピンキュリン集積の低下、カルシウム応答率の低下が認められた。さらに、N-cadherin ブロッキング抗体を用いて AJ 形成を抑制したところ、カルシウム応答率の低下が認められた。これらの知見から、FA・AJ 形成の減少に伴って、FA・AJ へのピンキュリン集積の低下が生じ、加えて、力学刺激応答性の低下にもつながることが示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 3 件)

1. 著者名 Matsubara T, Kokabu S, Nakatomi C, <u>Kinbara M</u> , Maeda T, Yoshizawa M, Yasuda H, Takano-Yamamoto T, Baron R, Jimi E	4. 巻 38(4)
2. 論文標題 The actin-binding protein PPP1r18 regulates maturation, actin organization, and bone resorption activity of osteoclasts	5. 発行年 2018 年
3. 雑誌名 Mol Cell Biol.	6. 最初と最後の頁 e00425-17
掲載論文の DOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/MCB.00425-17.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Matsubara T, <u>Kinbara M</u> , Maeda T, Yoshizawa M, Kokabu S, Takano-Yamamoto T	4. 巻 489(4)
2. 論文標題 Regulation of osteoclast differentiation and actin ring formation by the cytolinker protein plectin	5. 発行年 2017 年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 472-476

掲載論文の DOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2017.05.174	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kuroishi T, Bando K, Tanaka Y, Shishido K, Kinbara M, Ogawa T, Muramoto K, Endo Y, Sugawara S	4. 巻 47(8)
2. 論文標題 CXCL4 is a novel nickel-binding protein and augments nickel allergy	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Clin Exp Allergy	6. 最初と最後の頁 1069-1078
掲載論文の DOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cea.12926.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

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。