

令和 3 年 6 月 28 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09828

研究課題名(和文) 骨細胞が産生する内因性鎮痛因子MENKは機械的刺激が促す骨代謝を制御するか

研究課題名(英文) Roles of methionine enkephalin produced by osteocytes in mechanical stress-induced bone metabolism

研究代表者

竹下 信郎 (Takeshita, Nobuo)

東北大学・歯学研究科・助教

研究者番号：50431515

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：機械的刺激を受容した骨細胞による骨代謝制御に、骨細胞自身のアポトーシスによる骨吸収がある。神経性因子methionine enkephalin (MENK)は、骨代謝制御とアポトーシスに関わる。本研究では、機械的刺激が促す骨細胞のアポトーシスにおけるMENKの役割を明らかにすることを目的として解析を行った。その結果、骨への圧縮力負荷により、MENK発現が減少すること、このMENK減少はCCN2/CTGFにより誘導されることが示された。また、圧縮力による骨細胞のアポトーシスは、MENKがカルシウムシグナリングとNFATc1核内移行の制御を介して、抑制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

近年、神経性因子の骨代謝制御が注目されるが、骨細胞により産生される神経性因子の機能の多くは不明である。我々が世界で初めて示した、MENKによる骨細胞のアポトーシス制御機構は、骨細胞と神経性因子に着目した骨代謝機序研究の新展開につながる。また、機械的刺激に応答する骨代謝や骨細胞アポトーシスにおけるMENKを基軸とした制御機序の解明により、これらの骨の異常を防ぐ新たな治療法開発につながる基盤的知見となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Mechanical stimuli induce osteocyte apoptosis, followed by bone resorption. A neural factor, methionine enkephalin (MENK), is involved in bone metabolism and apoptosis. In this study, we clarified the role of MENK in the osteocyte apoptosis promoted by mechanical stimuli. Our data showed that MENK expression was reduced by compressive force loading on the parietal bones, and that this reduction in MENK expression was regulated by CCN2/CTGF. In addition, the apoptosis of osteocytes induced by compressive force was suppressed by MENK through the regulation of calcium signaling and NFATc1 nuclear translocation.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：骨細胞 アポトーシス methionine enkephalin 機械的刺激

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々の日常生活で、骨には様々な機械的刺激が負荷される。その結果、骨の形成と吸収による骨代謝が促され、骨の恒常性が維持される。また矯正歯科治療において、矯正力が歯に負荷されると、歯の移動方向にあたる圧迫側の歯槽骨が吸収すると同時に、反対側の牽引側では骨形成が亢進し、骨リモデリングが持続的に生じることにより、歯の移動が達成される。

骨細胞は、メカノセンサーとして骨への機械的刺激を受容し、骨の形成や吸収に関わるシグナルの調節により機械的刺激が促す骨代謝を制御する。驚くべきことに、骨細胞は生きた健全な状態でのみならず、アポトーシスを起こした状態となっても、骨吸収の誘導を介して、骨代謝を制御することが知られる。骨細胞のアポトーシスを促す要因として機械的刺激が知られ、その分子制御の解析は、未知の骨代謝機序を解明するうえで重要である。

CCNファミリーに属するCCN2/CTGFは、メカノレスポンス因子として知られ、機械的刺激が負荷された細胞において発現が上昇し、増殖、分化、基質産生など多彩な機能を発揮する。我々のグループは、マウス実験的歯の移動モデルにおいて、圧迫側の骨細胞においてCCN2/CTGFの発現が亢進するとともに、TUNEL陽性骨細胞数が増加することを示した。さらに、ニワトリ骨細胞への機械的刺激負荷実験の結果、圧縮力は骨細胞のCCN2/CTGF産生を促し、骨細胞自身のアポトーシスを誘導することを報告した。これらの知見は、機械的刺激が促す骨細胞のアポトーシスにおいて、CCN2/CTGFが重要な制御因子であることを示すものである。

神経性因子であるオピオイドペプチド methionine enkephalin (MENK)は、内因性鎮痛因子として知られる。一方、過去の報告から、MENKの骨代謝制御への関与が示唆されるが、機械的刺激が負荷された骨組織における、MENKの発現や機能は不明である。我々は、MENKとその受容体 δ opioid receptor が、マウス頭蓋骨の骨細胞に発現する知見を得た。さらに、骨細胞様MLO-Y4細胞が、MENK前駆体 proenkephalinのmRNAを発現することを示した。興味深いことにMENKは、細胞種や周囲環境に応じて、アポトーシスを正負両面で制御する。以上のことから我々は、機械的刺激が骨細胞アポトーシスを誘導する際、CCN2/CTGFとともにMENKがその制御に関わると仮説を立てた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、機械的刺激が促す骨細胞のアポトーシスにおけるMENKの役割を、CCN2/CTGFとの相互作用に着目して解析することである。

3. 研究の方法

(1) マウス頭蓋骨への圧縮力負荷

6週齢マウスの頭頂骨に圧縮力負荷用のスプリングを装着し、0.2 Nの圧縮力を6時間負荷した。薬剤投与実験においては、頭頂骨部皮下にCCN2/CTGF中和抗体またはMENKを投与して、圧縮力を負荷した。

(2) 免疫染色

圧縮力負荷後にマウスの頭頂骨を摘出し、パラフィン切片を作製し、MENK または NFATc1 抗体を用いて、タンパク質発現を解析した。核染色のために、DAPI を用いた。

(3) TUNEL 染色

アポトーシスの検出のために、Apoptosis in situ Detection Kit を用いて、メーカーのプロトコルに従って、TUNEL 染色を行った。

(4) MLO-Y4 細胞培養

骨細胞様 MLO-Y4 細胞をコラーゲンコートした培養ディッシュに播種し、5%FBS と 5%BS 含有 α MEM を用いて培養した。MENK を作用させたのち、MLO-Y4 細胞から RNA を精製した。

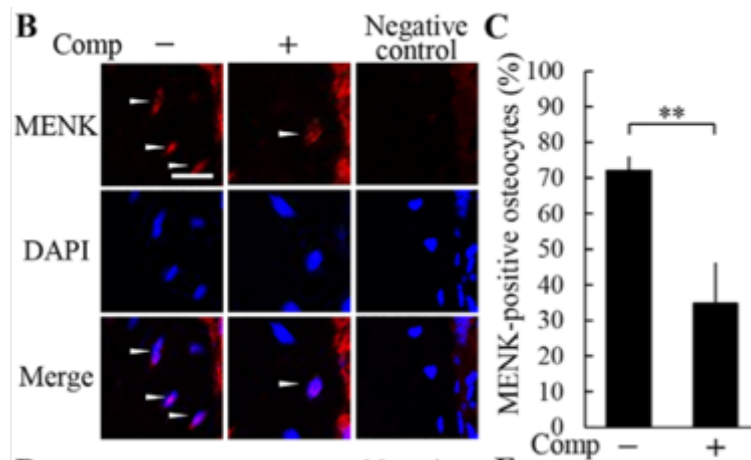
(5) リアルタイム PCR

MLO-Y4 細胞から精製した RNA を用いて cDNA を合成し、リアルタイム PCR によりカルシウムシグナリング関連因子の発現を解析した。

4. 研究成果

(1) 圧縮力が負荷された頭頂骨の骨細胞における MENK の発現

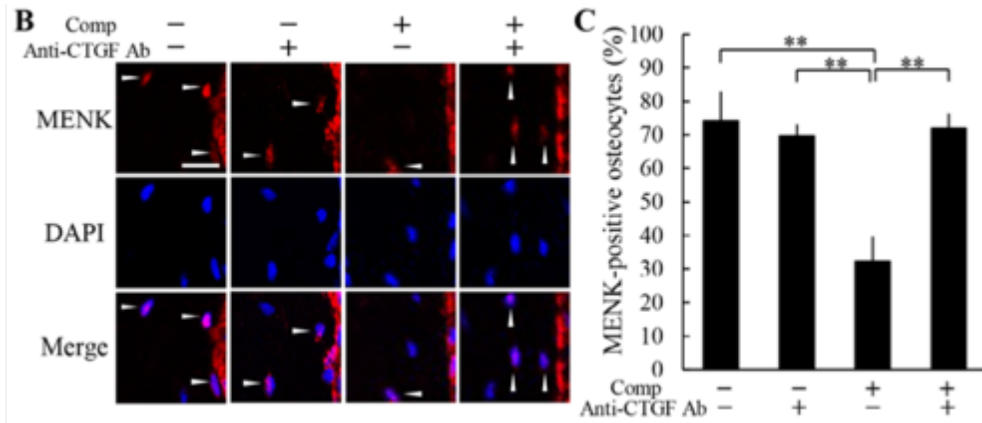
圧縮力を 6 時間負荷した頭頂骨の骨細胞における MENK の発現を免疫染色により解析した結果、圧縮力非負荷群と比較して、MENK の有意な発現減少が認められた。



(Sogi, Takeshita et al., 2020, JBMR Plus)

(2) 圧縮力による骨細胞の MENK 発現減少に CCN2/CTGF が及ぼす影響

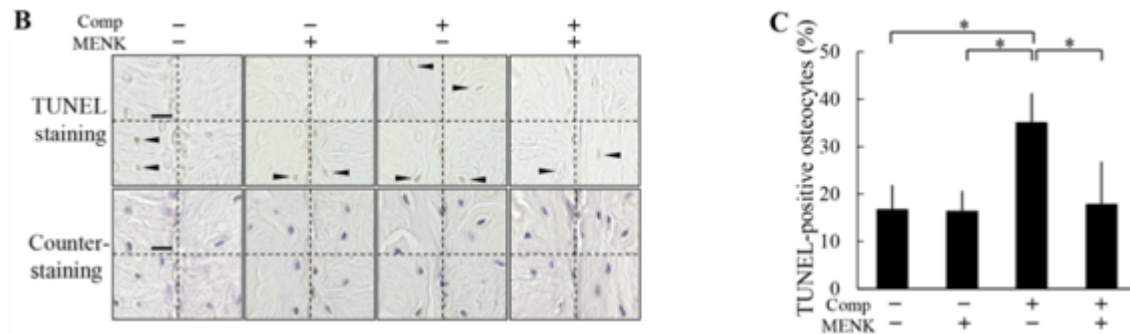
CCN2/CTGF 中和抗体を投与して頭頂骨に圧縮力を負荷した結果、圧縮力による骨細胞の MENK 発現減少が抑制された。



(Sogi, [Takeshita et al., 2020, JBMR Plus](#))

(3) 圧縮力が誘導する骨細胞のアポトーシスに対する MENK の作用

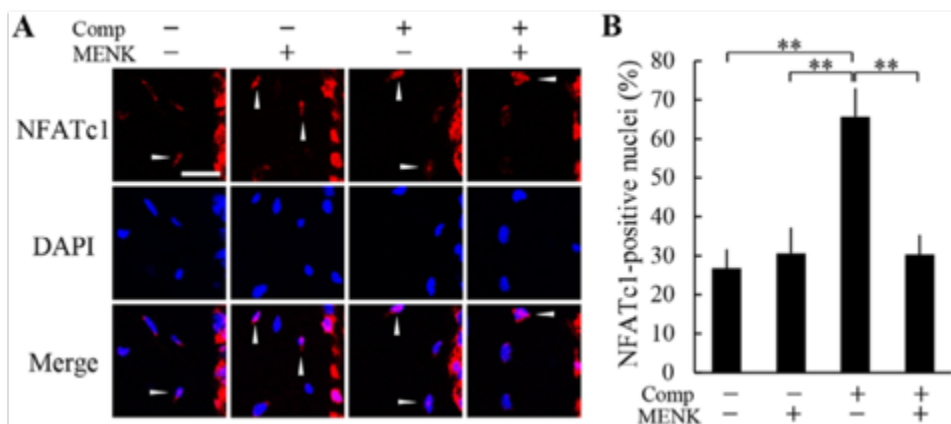
頭頂骨に圧縮力を負荷した結果、TUNEL 陽性骨細胞が増加したことから、圧縮力による骨細胞のアポトーシス亢進が示された。一方、MENK の投与により、このアポトーシスの亢進は抑制された。



(Sogi, [Takeshita et al., 2020, JBMR Plus](#))

(4) 圧縮力による骨細胞における NFATc1 の核内移行亢進に MENK が及ぼす影響

頭頂骨に圧縮力を負荷した結果、骨細胞における NFATc1 の核内移行が亢進した。一方、MENK の投与により、この NFATc1 の核内移行は抑制された。

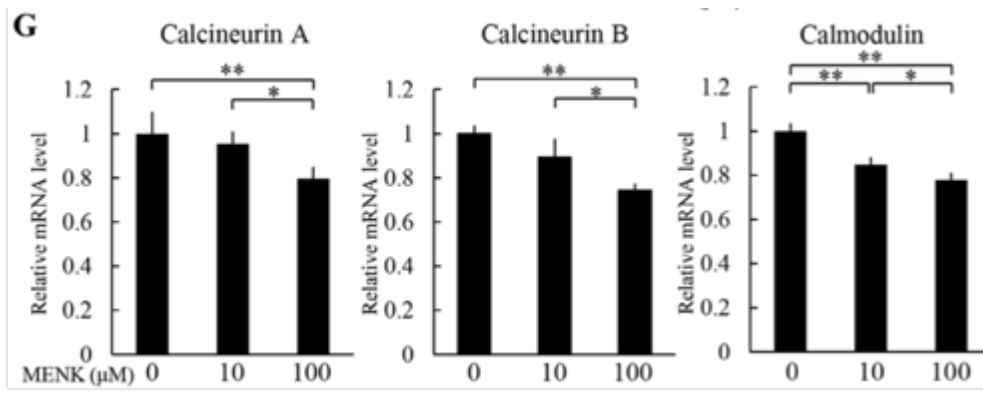


(Sogi, [Takeshita et al., 2020, JBMR Plus](#))

(5) MENK による MLO-Y4 細胞におけるカルシウムシグナリング関連因子の発現変化

MLO-Y4 細胞に MENK を作用させた結果、calcineurin A と B、および calmodulin の mRNA 発現

が MENK 濃度依存的に減少した。



(Sogi, Takeshita et al., 2020, JBMR Plus)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Jiang W, Takeshita N, Maeda T, Sogi C, Oyanagi T, Kimura S, Yoshida M, Sasaki K, Ito A, Takano-Yamamoto T	4. 巻 11
2. 論文標題 Connective tissue growth factor promotes chemotaxis of preosteoblasts through integrin 5 and Ras during tensile force-induced intramembranous osteogenesis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 2368
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-82246-9.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Chisumi Sogi, Nobuo Takeshita, Wei Jiang, Siyoung Kim, Toshihiro Maeda, Michiko Yoshida, Toshihito Oyanagi, Arata Ito, Seiji Kimura, Daisuke Seki, Ikuko Takano, Yuichi Sakai, Ikuma Fujiwara, Shigeo Kure, Teruko Takano Yamamoto	4. 巻 4
2. 論文標題 Methionine Enkephalin Suppresses Osteocyte Apoptosis Induced by Compressive Force through Regulation of Nuclear Translocation of NFATc1	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 JBMR Plus	6. 最初と最後の頁 e10369
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jbm4.10369.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Daisuke Seki, Nobuo Takeshita, Masahiro Seiryu, Toru Deguchi, Teruko Takano-Yamamoto	4. 巻 73
2. 論文標題 Improvement of open bite and stomatognathic function in an Axenfeld-Rieger syndrome patient by orthodontic sectional arch mechanics: Clinical considerations to risk of orthodontic tooth movement	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Acta Medica Okayama	6. 最初と最後の頁 255-262
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18926/AMO/56869.	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 Ida H, Seiryu M, Takeshita N, Iwasaki M, Yokoyama Y, Tsutsumi Y, Ikeda E, Sasaki S, Miyashita S, Sasaki S, Fukunaga T, Deguchi T, Takano-Yamamoto T	4. 巻 1
2. 論文標題 Biosafety, stability, and osteogenic activity of novel implants made of Zr70Ni16Cu6Al8 bulk metallic glass for biomedical application	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Acta Biomater	6. 最初と最後の頁 505-517
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.actbio.2018.05.020.	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 Oyanagi T, Takeshita N, Hara M, Ikeda E, Chida T, Seki D, Yoshida M, Seiryu M, Takano I, Kimura S, Oshima M, Tsuji T, Takano-Yamamoto T	4. 巻 23
2. 論文標題 Insulin-like growth factor 1 modulates bioengineered tooth morphogenesis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 368
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-36863-6.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sakamoto M, Fukunaga T, Sasaki K, Seiryu M, Yoshizawa M, Takeshita N, Takano-Yamamoto T	4. 巻 20
2. 論文標題 Vibration enhances osteoclastogenesis by inducing RANKL expression via NF- B signaling in osteocytes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bone	6. 最初と最後の頁 56-66
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bone.2019.03.024.	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8件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 坂本麻由里、福永智広、佐々木紀代、清流正弘、吉澤光弘、竹下信郎、山本照子
2. 発表標題 振動刺激は破骨細胞前駆細胞の増殖と骨細胞のNF- Bを介したRANKL発現の亢進により破骨細胞形成を促進する
3. 学会等名 第78回日本矯正歯科学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坂本麻由里、福永智広、佐々木紀代、竹下信郎、山本照子
2. 発表標題 振動刺激は骨細胞におけるNF- Bシグナルを介したRANKL発現の上昇により破骨細胞形成を促進する
3. 学会等名 第37回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 曾木千純、竹下信郎、伊藤新、吉田倫子、大柳俊仁、藤原幾磨、山本照子
2. 発表標題 MENKは圧縮力による骨細胞のアポトーシスを抑制する
3. 学会等名 第37回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐々木紀代、福永智広、坂本麻由理、清流正弘、竹下信郎、山本照子
2. 発表標題 振動刺激による歯の移動促進効果における破骨細胞に対するTGF β の役割
3. 学会等名 第77回日本矯正歯科学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高野郁子、竹下信郎、関大輔、大柳俊仁、吉田倫子、木村晴地、川津正慶、山本照子
2. 発表標題 Odz3はRhoA、アクチン制御を介した遊走促進および分化の促進により、ATDC5の軟骨細胞分化を調整する
3. 学会等名 第77回日本矯正歯科学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 井田裕人、清流正弘、竹下信郎、岩崎将也、横山嘉彦、堤祐介、池田悦子、佐々木聡史、宮下俊郎、佐々木周太郎、福永智広、出口徹、山本照子
2. 発表標題 新素材Zr70Ni16Cu6Al8金属ガラス製スクリューの生体安定性、骨形成能および生体安定性について
3. 学会等名 第77回日本矯正歯科学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Toshihito Oyanagi, Nobuo Takeshita, Mamiko Hara, Etsuko Ikeda, Toko Chida, Daisuke Seki, Michiko Yoshida, Masahiro Seiryu, Ikuko Takano, Seiji Kimura, Masamitsu Oshima, Takashi Tsuji, Teruko Takano-Yamamoto
2. 発表標題 IGF1 regulates morphogenesis of bioengineered teeth via proliferation and differentiation of dental epithelial and mesenchymal cells
3. 学会等名 5th Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society World Congress (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 竹下信郎、高野郁子、関大輔、大柳俊仁、吉田倫子、山本照子
2. 発表標題 Ten-m/Odz3はFGF2によるRhoA活性制御を介してATDC5のアクチン再構成、遊走、分化を促す
3. 学会等名 第36回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	山本 照子 (Takano-Yamamoto Teruko) (00127250)	東北大学・歯学研究科・名誉教授 (11301)	
研究分担者	吉田 倫子 (Yoshida Michiko) (80746818)	東北大学・大学病院・助教 (11301)	
研究分担者	関 大輔 (Seki Daisuke) (90758442)	東北大学・歯学研究科・大学院非常勤講師 (11301)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	高野 郁子 (Takano Ikuko) (90770462)	東北大学・歯学研究科・大学院非常勤講師 (11301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関