

平成21年3月31日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19791579

研究課題名（和文）

骨組織でのアクチンダイナミクスの観察～骨芽細胞から骨細胞への形態変化の解明～

研究課題名（英文）

Morphological change including actin filament from osteoblast to osteocyte

研究代表者

菅原 康代（SUGAWARA YASUYO）

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：70379775

研究成果の概要：

骨細胞は分化する際に、立方体の骨芽細胞から、ダイナミックな形態変化を引き起こして、突起を持った星状の骨細胞に形態変化を起こす。この形態変化に関して、骨芽細胞から骨細胞へ分化する際には、アクチンのダイナミックな変化があることが分かり、各分化の段階で弾性も変化することが本研究により分かった。さらに突起が骨芽細胞と接触している詳細および、分化に伴う細胞接着の変化もとらえた。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,500,000	0	2,500,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	270,000	3,670,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学、矯正・小児系歯学

キーワード：歯科矯正学

1. 研究開始当初の背景

骨細胞は骨系の細胞の中で最も数の多い細胞である。その形態は非常に特徴的で、長い突起を持って骨細胞同士、および骨芽細胞とネットワークを形成している。骨細胞はその突起によるネットワークをいかして、メカニカルストレスを感知し、骨代謝を制御しているといわれているがその詳細は不明である。なぜならば骨細胞は周囲を堅い骨基質に被覆されているため、その3次元構造を観察

することさえ困難であったからである。まず、骨中の骨細胞、骨芽細胞を蛍光色素と共焦点レーザー顕微鏡を用いて3次元的に観察する方法を考案した。次に、骨中の骨細胞を単離培養することにより、骨細胞はアクチン線維に富んでおりアクチン結合タンパク質の変化があることを突き止めた(J Bone Miner Res, Kamioka, Sugawara et al, 2004)。さらに細胞骨格に重要であるアクチン線維を

蛍光染色することにより、骨中の骨細胞、骨芽細胞を三次元構築し形態計測する手法を確立した(Bone, Sugawara et al, 2005)。骨細胞の突起は骨中に張り巡らされネットワークを築いていることがわかった。これらの結果を得たことによって、次に骨芽細胞から骨細胞への形態変化の詳細を調べるに至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は骨組織中の立方体の骨芽細胞が突起を持った星状の骨細胞へダイナミックな形態変化を引き起こす。この際どのような変化が起こっているのかは不明であった。そこで本研究では骨芽細胞から骨細胞へ形態変化を引き起こす過程で、どのような変化が起こっているのかの詳細を明らかにする事が目的である。さらに骨細胞は骨細胞同士、骨芽細胞とネットワークを築いているため、このネットワークの詳細を知ることによって機能の面からもどのような変化が起こっているのかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) ニワトリ胚頭蓋骨からの骨片採取と蛍光染色

胎生16日齢のニワトリ胚頭蓋骨から頭蓋骨を採取し、骨膜を取り除いた後3×3 mmにトリミングする。その後、モノクローナル抗体OB7.3とインキュベートした後、パラホルムアルデヒドにて固定する。細胞膜を溶解後、二次抗体を使用して骨細胞を蛍光標識した。さらに細胞骨格をTexas Red-X ファロイジンにて染色した。

(2) 共焦点レーザー顕微鏡による観察および三次元構築

共焦点レーザー顕微鏡にて0.3 μmごとに表層から観察した。表層から0~10.3 μmまでをコンピュータソフトにて3次元構築す

る。

(3) 骨芽細胞、類骨骨細胞、成熟骨細胞の各分化度における細胞の単離、Force-curveの測定および蛍光標識

16週齢ニワトリ胚頭蓋骨からコラゲナーゼおよびEDTAを用いて骨細胞を単離し、培養する。1日培養後Force-curveを原子間力顕微鏡(AFM)にて測定する。コントロール群の測定および細胞接着阻害剤を投与後の細胞の経時的変化を測定する。測定後、骨芽細胞、類骨骨細胞、成熟骨細胞を蛍光標識により区分する。像は蛍光顕微鏡にて観察する。

(4) アクチン線維の染色、細胞接着領域の染色および接着領域の計測

単離した細胞のアクチン線維をファロイジンにて染色すると共に、ビンキュリンを免疫蛍光染色した。蛍光顕微鏡で観察後、WinROOFを用いて2値化し、細胞接着領域を計測する。また、細胞接着阻害剤投与後の経過を計測する。

(5) 単離細胞への流体専断応力付与

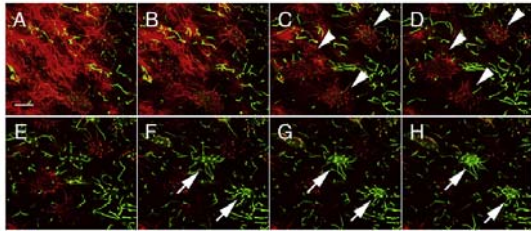
単離骨細胞、骨芽細胞に流体専断応力を付与し、細胞内カルシウム反応を観察する。さらに細胞接着阻害剤を投与した細胞に、同様の流体専断応力を負荷し、コントロール群と比較する。

(6) 単離細胞同士の細胞間コミュニケーションの観察

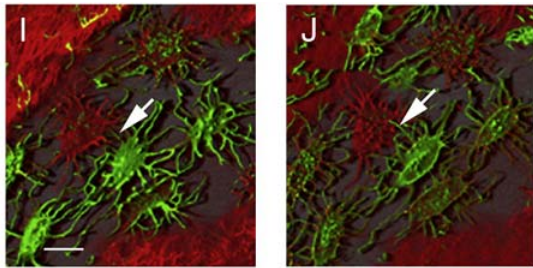
単離骨芽細胞、単離骨細胞のネットワークのギャップジャンクションの観察をコネキシン43の蛍光染色にて行う。また、FRAP法を用いて単離骨芽細胞と単離骨細胞のネットワークコミュニケーション機能を観察する。

4. 研究成果

(1) 骨基質中の各分化度における骨芽細胞、類骨骨細胞および成熟骨細胞の同定

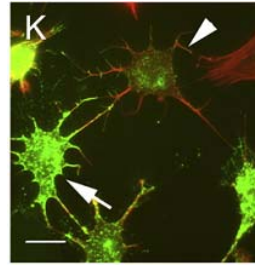


A-Hは実際の骨基質中の細胞の共焦点レーザー顕微鏡での観察像を示している。骨芽細胞層から、 $3\mu\text{m}$ (A)、 $3.6\mu\text{m}$ (B)、 $4.2\mu\text{m}$ (C)、 $4.8\mu\text{m}$ (D)、 $5.4\mu\text{m}$ (E)、 $6.0\mu\text{m}$ (F)、 $6.6\mu\text{m}$ (G)、 $7.2\mu\text{m}$ (H)の部位の観察像である。Aの赤く染まっている場所が骨芽細胞層である。Cでは一部緑色に染色された赤い星状の細胞が見られる(矢頭)。赤い部分はアクチン線維である。さらに深部になると矢印のように緑に染色された星状の細胞が観察されるようになる。E, F, Gではほとんどの正常細胞は緑色の細胞である。



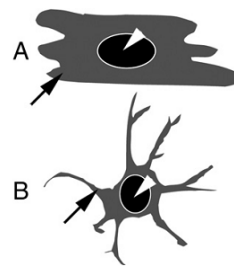
共焦点画像を三次元構築ソフトにて構築した図が、I, Jである。Iは骨芽細胞層から構築したもので、Jは同部位を骨細胞層から構築したものである。矢印は緑色の突起を示している。矢印の突起は部分的に緑色に染色された骨細胞よりも深層にあることが分かる。これらのことから全体的に緑色に染色された骨細胞は、部分的に緑色に染色された骨細胞よりもより、石灰化層に存在していることが分かった。

次に骨芽細胞と骨細胞をニワトリ胚頭蓋骨から単離した。単離した細胞を *in vivo* と同様に染色した図が以下のようなものである(K)。



単離した骨細胞でも部分的に緑色に染色された細胞と、全体的に緑色に染色された骨細胞が存在していることが分かった。これらの結果から、部分的に緑色に染色されている細胞を類骨骨細胞、全体的に緑色に染色されている細胞を成熟骨細胞と定義した。従って、骨系細胞を *in vivo*, *in vitro* とともに骨芽細胞、類骨骨細胞、成熟骨細胞と分化段階によって3つに区分することが出来た。細胞骨格はアクチン線維を染色し、赤く示した。

(2) 分化度による骨系細胞の弾性率の変化



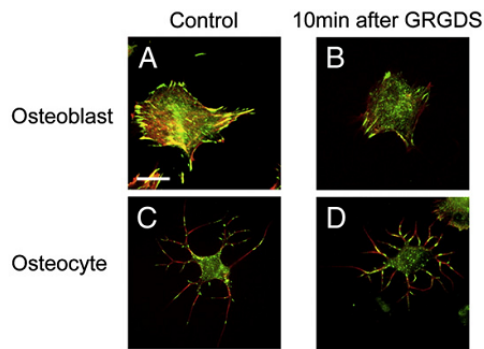
Aは骨芽細胞、Bは骨細胞を示す。それぞれの分化度の違いによる単離細胞の核領域(白矢頭)、辺縁領域(黒矢印)の部位

を原子間力顕微鏡にて計測する。計測後、すべての細胞を染色し、結果(1)の成熟度による細胞に区分し、それぞれの弾性率を求めた。その結果表1示すように辺縁領域は分化度が進むにつれてその弾性率は低下した。核領域においては骨芽細胞が一番高く、類骨骨細胞と成熟骨細胞は変わらなかった。

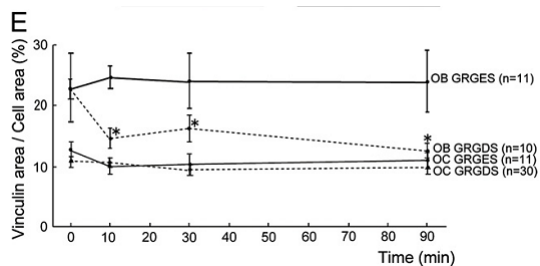
Table 1
The elastic modulus of osteoblasts, osteoid osteocytes and mature osteocytes

	Edge (Pa)	Center (Pa)
Osteoblasts	12053 ± 934	8308 ± 401^a
Osteoid osteocytes	7971 ± 422^a	$3167 \pm 280^{c,d}$
Mature osteocytes	$4471 \pm 198^{a,b}$	$2670 \pm 281^{c,e}$

(3) 細胞接着阻害時における骨芽細胞骨細胞の各分化度における細胞の弾性率変化



上記の図において細胞接着領域を緑色に、細胞の骨格を赤色に染色している。骨芽細胞は細胞接着阻害剤 (GRGDS) 投与後 10 分で細胞接着領域を低下させているが (A, B)、骨細胞は変化させなかった (C, D)。



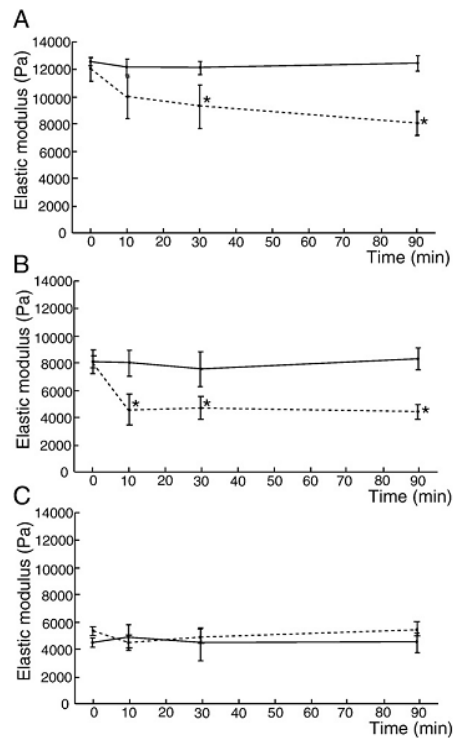
細胞接着阻害剤 GRGES とそのコントロール GRGES を投与した後の 10、30、90 分後の細胞辺縁部の弾性率を計測した図を上記 E に示す。骨芽細胞 (OB) は阻害剤の影響を受けて減少しているが、骨細胞 (OC) は変化しなかった。

(4) 細胞接着阻害させたときの骨芽細胞、類骨骨細胞、成熟骨細胞の各分化度における弾性率の変化

各分化度により分類した細胞にそれぞれ細胞接着阻害剤とそのコントロール剤を投与した場合の 10、30、90 分後の細胞辺縁部の弾性率を計測した。

A は骨芽細胞、B は類骨骨細胞、C は成熟骨細胞の弾性率変化を示す。実線がコントロール剤投与後の変化、点線が細胞沿っちゃくそ外在後の変化を示す。骨芽細胞と類骨骨細胞は細胞接着阻害剤の影響を受けて弾性率を低下させたのに対して、成熟骨細胞は変化し

なかった。



細胞の弾性率はアクチン線維の状態と密接にかかわっており、アクチンのダイナミックな変換がこの差を生み出している可能性が考えられる。

(4) 単離細胞への流体専断応力負荷時のカルシウム反応の変化

単離した骨芽細胞、骨細胞を蛍光色素で標識し、そのカルシウム反応を輝度と密度の変化を用いて共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。その結果骨細胞は 1.2Pa の応力にて 5.5%、2.4Pa の応力にて 14% の細胞が反応を示した。一方骨芽細胞はほとんどの細胞が流体専断応力に反応した。これらのことから、骨細胞の方が骨芽細胞に比べて流体専断応力に対するカルシウム反応が低いことが分かった。

さらに細胞接着阻害剤投与時には、骨芽細胞は阻害剤の影響を受けてカルシウム反応を低下させたのに対して、骨細胞は変化しなかった。

(5) 単離細胞同士の細胞間コミュニケーションについて

単離細胞同士にギャップジャンクションを介した細胞間コミュニケーションが存在しているかを調べるためにコネキシン 43 にて染色した。その結果、骨芽細胞と骨細胞および骨細胞同士にコネキシン 43 の発現が見られた。

次に単離した骨細胞に FRAP 法を用いてその蛍光回復を調べた。その結果、細胞が蛍光回復しているのが分かった。それに対してギャップジャンクション阻害剤を投与した場合は蛍光色素の回復が認められなかった。これらのことから単離骨系細胞同士にはギャップジャンクションを介した細胞間コミュニケーションが存在していることが分かった。

一連の実験は骨芽細胞から骨細胞へ分化する際にどのような変化が起こっているのかを明らかにした。骨芽細胞から骨細胞へ分化していく際には、ダイナミックな形態変化があるが、それにアクチンダイナミクスは密接にかかわり、かつ弾性率も変化させていることを世界に先駆けて解明した。またこれらの結果は国際誌等に投稿し、受理された。

今後さらなる研究の発展により、骨芽細胞および骨細胞の機能や、分化に伴う変化を解明できると考える。

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 4 件)

① Sugawara Y., Ando R., Kamioka H., Ishihara Y., Murshid SA., Hashimoto K., Kataoka N., Tsujioka K., Kajiya F., Yamashiro T., Takano-Yamamoto T. The alteration of a mechanical property of

bone cells during the process of changing from osteoblasts to osteocytes. Bone, 43(1): 19-24, 2008. 査読有

② Takano-Yamamoto T., Kamioka H., Sugawara Y., Less response of osteocyte than osteoblast to mechanical force: implication of different focal adhesion formation. Interface, Oral Health Science, 149-158, 2007. 査読有

③ Kamioka H., Ishihara Y., Ris H., Murshid SA., Sugawara Y., Takano-Yamamoto T., Lim S. Primary culture of chick osteocytes retain functional gap junctions between osteocytes, and between osteocytes and osteoblasts. Microsc Microanal, 13(2): 108-117, 2007. 査読有

④ Murshid SA., Kamioka H., Ishihara Y., Ando R., Sugawara Y., Takano-Yamamoto T., Actin and microtubule cytoskeletons of the processes of 3D-cultured MC3T3-E1 cells and osteocytes. J Bone Miner Metab, 25(3): 151-158, 2007. 査読有

[学会発表] (計 9 件)

① 菅原康代、胎生期と 6 週齢マウス長管骨中の 3 次元骨細胞ネットワークの比較、第 67 回日本矯正歯科学会、2008 年 9 月 16-18 日、幕張

② 安藤涼子、菅原康代、ニワトリとマウスの骨細胞ネットワークの三次元的形態計測、第 67 回日本矯正歯科学会、2008 年 9 月 16-18 日、幕張

③ 石原 嘉人、上岡 寛、本城 正、菅原 康代、細胞内カルシウムが生骨組織中における細胞間コミュニケーションの調節へ与える影響、第 67 回日本矯正歯科学会、2008 年 9 月 16-18 日、幕張

④ Ando R., Sugawara Y., The three-dimensional morphometry of

osteocytes network in chick and mouse calvaria, The 1st international symposium of medical and dental education, 2008年2月1日, Okayama

⑤菅原康代、骨芽細胞から骨細胞への弾性的変化について、日本矯正歯科学会、2007年9月19-21日、大阪

⑥Sugawara Y., The elastic modulus of osteoblasts and osteocytes, The American Society for Bone and Mineral Research, 2007年9月16-19日, Honolulu

⑦菅原康代、ニワトリ胚頭蓋骨中の骨細胞の三次元的形態計測、岡山歯学会、2007年8月18日、岡山

⑧山本照子、上岡寛、菅原康代、骨細胞における機械的刺激への応答能-focal adhesionと細胞弾性率の関与、日本骨代謝学会、2007年7月19-21日、大阪

⑨菅原康代、骨芽細胞から骨細胞への弾性的変化について、日本骨代謝学会、2007年7月19-21日、大阪

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菅原 康代 (SUGAWARA YASUYO)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号：70379775

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし