

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K10070

研究課題名(和文)骨基質蛋白質Dmp1の力学的負荷に関する機能解析

研究課題名(英文)Functional analysis of bone matrix protein Dmp1 on mechanical loading

研究代表者

佐藤 淳(Sato, Sunao)

大阪大学・大学院歯学研究科・講師

研究者番号：70335660

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)：三次元コラーゲンゲル培養条件下で、Dmp1発現低下MC3T3(Dmp1(-)MC3T3細胞)に力学的負荷装置で100 kPa、2週間の力学的負荷を与えると、コントロール群と比較して好酸性の細胞外基質の産生が増加していた。さらにコントロール細胞では、力学的負荷により石灰化能が上昇する一方で、Dmp1(-)MC3T3細胞では、力学的負荷の影響は見られなかったが、Dmp1ペプチドとともにDmp1(-)MC3T3細胞に力学的負荷を付与すると石灰化能の上昇が見られた。本研究から、力学的負荷がDmp1を介して石灰化物形成能を上昇させ、細胞や骨組織の恒常性を維持する機能を担っている可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯科臨床では、力学的負荷に対する骨組織の恒常性維持は重要な問題の一つであり、例えば、矯正治療で歯牙を移動させる際に異常な力が与えられ、歯槽骨の形成と吸収のバランスが崩れ、骨組織の恒常性維持が保てなくなると適切な歯牙移動が出来なくなる。また、義歯やインプラント治療を行う場合にも、歯槽骨に異常な力学的負荷が加わり、骨組織の恒常性維持が出来なくなってしまうと、骨吸収を招き、義歯やインプラントの適切な維持が出来なくなってしまう。Dmp1が力学的負荷に反応して骨組織の恒常性を維持している可能性が示されたことで、基礎研究のみならず、臨床治療へのDmp1の応用可能性が示される意義があった。

研究成果の概要(英文)：Under three-dimensional collagen gel culture conditions, mechanical loading of Dmp1-expressing decreased MC3T3 (Dmp1(-) MC3T3) with a mechanical loading device at 100 kPa for 2 weeks resulted in increased production of eosinophilic extracellular matrix compared to the control MC3T3. Furthermore, while mechanical loading increased calcification capacity in control cells, no effect of mechanical loading was observed in Dmp1(-) MC3T3, but Dmp1 peptides increased calcification capacity when mechanical loading was applied to Dmp1(-) MC3T3.

These results suggests that mechanical loading may play a function in maintaining cell and bone tissue homeostasis by increasing calcification capacity with Dmp1.

研究分野：口腔病理

キーワード：力学的負荷 骨 石灰化

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

骨組織を構成する細胞の一つである骨細胞は、骨芽細胞が分化した細胞であり、分化段階において自らが産生した骨基質中の骨小腔内に閉じ込められた状態で骨組織中に存在している。骨芽細胞の細胞寿命が約 3 ヶ月とされているのに対して、骨細胞の細胞寿命は長いものでは何十年にもなり、1mm<sup>3</sup> の骨組織には約 2 万個の骨細胞が存在し、骨組織を構成する骨芽細胞や破骨細胞よりもはるかに多く骨組織中に骨細胞は存在している。

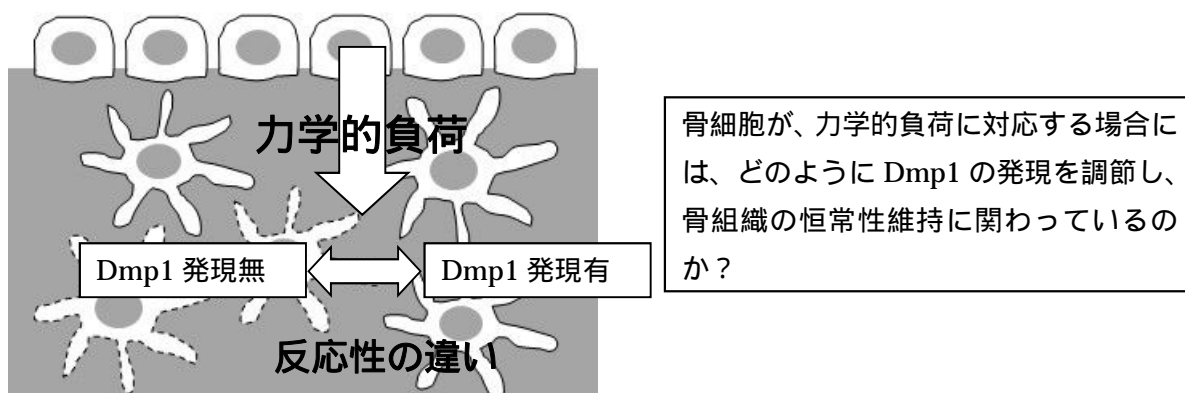
骨組織中に数多く存在し細胞寿命も長い骨細胞であるが、その詳細な機能に関しては、いまだ不明な点も多い。骨細胞が骨細胞同士あるいは骨芽細胞へと張りめぐらせたネットワークの存在から、骨細胞には、骨組織に加えられた力学的負荷を感知するメカノセンサーとしての役割が存在し、骨組織の形態や骨量を調節し、骨の恒常性を維持する機能があると考えられている。

この骨細胞が特異的に産生する骨基質蛋白質が Dentin matrix protein 1 (以下、Dmp1) であり、Dmp1 が欠損したマウスにおいては、骨芽細胞から骨細胞への分化の抑制が生じ、骨組織中の類骨成分が増加して骨組織の石灰化度合いが低下することが報告されている(Dmp1-deficient mice display severe defects in cartilage formation responsible for a chondrodysplasia-like phenotype. Ye et al. J. Biol. Chem. 2005;280(7):6197-6203)。

我々のこれまでの研究から、力学的負荷が減少したラットでは、血清 Dmp1 値が有意に低下することを明らかにしており、骨細胞は生体に加えられた力学的負荷に反応して Dmp1 の発現を調節することで、Dmp1 を介して骨組織の恒常性を維持する機能を担っているのではないかと考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究では、Dmp1 発現を欠損した骨芽細胞株を遺伝子編集技術を用いて作成し、Dmp1 発現の有無により力学的負荷に対する反応がどう変化するかを検討するとともに、三次元細胞培養で骨への分化がどのように変化するかを検討し、骨細胞が Dmp1 を介して骨組織の恒常性維持に果たしている機能を細胞レベルおよび生体レベルで明らかにすることを目的とする。



### 3. 研究の方法

はじめに、遺伝子編集技術により Dmp1 発現を減弱させた骨芽細胞株 MC3T3 (以下、Dmp1(-)MC3T3 細胞) を作製する。この作製した Dmp1(-) MC3T3 細胞に力学的負荷を加えると、コントロールと比較して Dmp1 発現の有無によりどのような違いが生じるのかを検討し、骨細胞が Dmp1 を介して力学的負荷にどのように反応しているのかを明らかにする。

次に、三次元コラーゲンゲル上で Dmp1(-) MC3T3 細胞を培養し、二次元平面培養条件下では観察できない、骨芽細胞から骨細胞への分化過程を再現した状態で、力学的負荷を加え、各分化過程における詳細な細胞形態の変化を明らかにする。この三次元コラーゲン細胞培養では、生体から採取した検体とは異なり、非脱灰で切片の作製が可能となるため、抗原性を保った良好な条件下で免疫組織化学的検索を行い、硬組織形成因子の検索や力学的負荷に反応する因子の発現変化を明らかにすることが出来る。

さらに、Dmp1(-)MC3T3 細胞に Dmp1 の合成ペプチドを付与した状態で力学的負荷を与え、Dmp1 の有無により力学的負荷に対する反応がどのように変化するかを検討し、Dmp1 の力学的負荷に対する機能の詳細を明らかにする。

### 4. 研究成果

令和元年度は、Dmp1 の有無により、細胞の力学的負荷に対する反応がどのように変化するかを検討し、Dmp1 の機能を明らかにすることを目的とし、Dmp1 発現を低下させた細胞株の作製を実施した。作製を行った細胞は、Dmp1 発現を有し、さらに石灰化物形成能も有する骨芽細胞株 MC3T3 細胞を対象とした。CRISPR-Cas9 システムを用いて、MC3T3 細胞株に遺伝子編集を行い、Dmp1 発現低下 MC3T3 細胞株の樹立を目指した。遺伝子編集を行った MC3T3 細

胞群から、単一クローン株を樹立するために限界希釈法を実施した。限界希釈法により複数の単一クローン株を得ることが出来た。限界希釈法により単一クローン化した各クローン化細胞株から DNA を抽出し、シークエンスにより遺伝子配列に変異が生じているものを選択した。さらに、変異が確認された複数の単一クローン化細胞株の実際の Dmp1 発現状態を確認するためにウエスタンブロット法により Dmp1 タンパク質の発現状態を確認した。ウエスタンブロット法の結果から、単一クローン化された Dmp1 発現を低下させた MC3T3 細胞株 (Dmp1(-)MC3T3 細胞) を確認することが出来た。

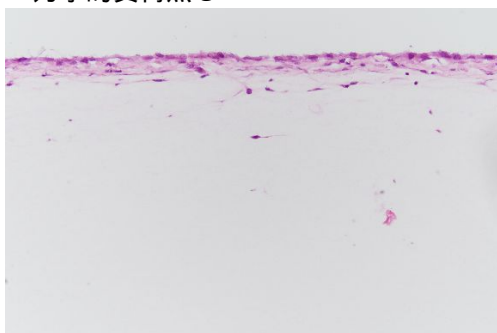
続く令和 2 年度は、力学的負荷を与える装置の開発と、その装置を用いた細胞培養を行い、力学的負荷により骨芽細胞培養株にどのような変化が生じるのかを検討した。

新規に開発を行った大気圧上昇による力学的負荷投与装置内で MC3T3 細胞を 4 日間、10 kPa の条件下でコラーゲンゲル内での細胞培養を実施した。この培養条件において、大気圧上昇による細胞傷害作用が生じていないかどうかを HE 染色により細胞形態を観察したところ、コラーゲンゲル内部での細胞の増殖が認められ、10 kPa 条件では大気圧上昇に伴う力学的負荷の投与による明らかな細胞傷害作用は生じない事を確認した。

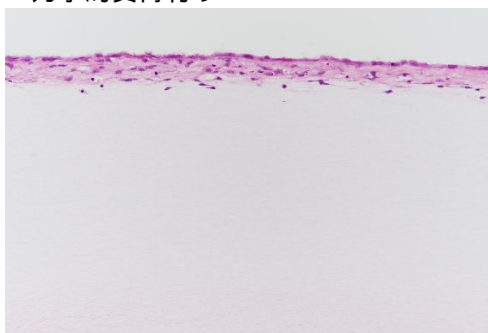
次に、適切な力学的負荷の検討のため大気圧の条件を 40 kPa に上昇させ、培養期間を 26 日間の設定として力学的負荷与え、長期間の培養実験を実施した。実験群の細胞と力学的負荷を与えないコントロールとの細胞で HE 染色による形態変化の観察を行った所、形態学的に明らかな差は見いだされなかった。

令和 3 年度は、昨年度令和 2 年度の条件をさらに検討すべく、力学的負荷を 100kPa にまで上昇できるように力学的負荷装置の改良を行った。条件検討のために、装置の最大値である 100kPa で 2 週間の細胞培養を行ったところ、細胞傷害性の変化は観察されなかった。またコントロール群と比較すると、好酸性の細胞外基質の産生の増加が観察され、力学的負荷による形態学的変化が認められた。

力学的負荷無し



力学的負荷有り



令和 4 年度においては、力学的負荷に対する反応における Dmp1 の機能を検討するために、Dmp1(-)MC3T3 細胞に力学的負荷を付与した際に、Dmp1 ペプチドの有無により細胞の石灰化能がどのように変化するかを検討した。コントロール細胞と Dmp1(-)MC3T3 細胞に力学的負荷を 4 週間付与した所、コントロール細胞では、石灰化能に上昇が見られたのに対して、Dmp1(-)MC3T3 細胞では、明らかな石灰化能の変化は認められなかった。

コントロール MC3T3 細胞

力学的負荷無し



力学的負荷有り





Dmp1(-)MC3T3 細胞  
力学的負荷無し



力学的負荷有り



次にこれらの細胞に部位の異なる Dmp1 ペプチド 4 種類とともに力学的負荷を付与し、培養を行った所、コントロールの MC3T3 細胞では、力学的負荷による石灰化能の変化が認められなかったのに対して、Dmp1(-)MC3T3 細胞では、力学的負荷により特にペプチド で石灰化能の上昇が見出された。

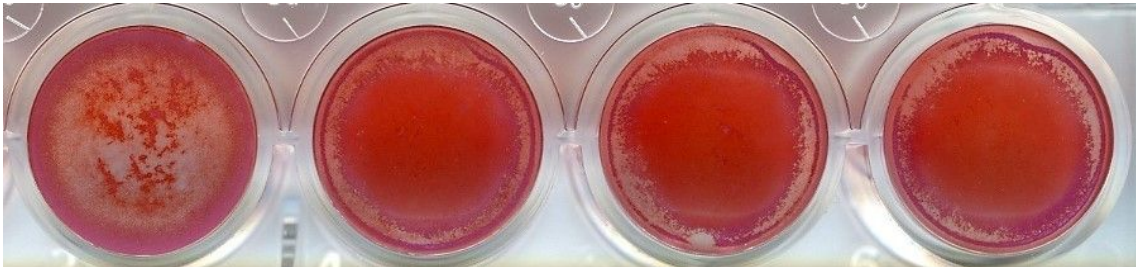
コントロール細胞で負荷無し  
ペプチド



コントロール細胞で負荷有り  
ペプチド



Dmp1(-)細胞で負荷無し  
ペプチド

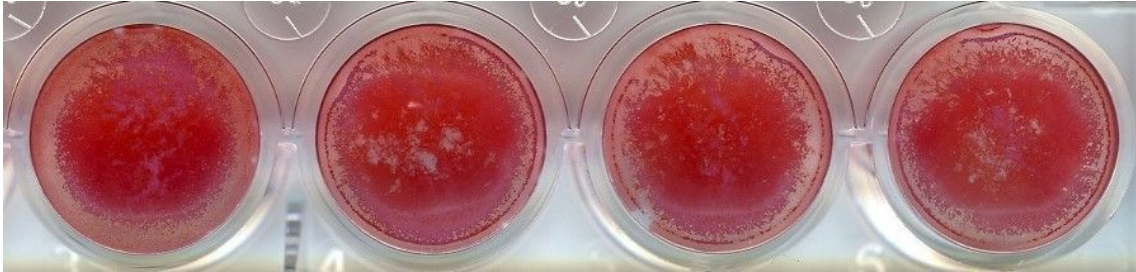


Dmp1(-)細胞で負荷投与  
ペプチド

ペプチド

ペプチド

ペプチド



研究全体を通じて、力学的負荷の付与が石灰化物形成能を上昇させていること、またこの石灰化物形成能の上昇には、Dmp1 が関与していることを明らかにすることが出来た。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	阿部 真土  (Abe Makoto)  (40448105)	大阪大学・大学院歯学研究科・講師   (14401)	
研究分担者	三浦 治郎  (Miura Jiro)  (70437383)	大阪大学・歯学部附属病院・助教   (14401)	

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
---------	---------