

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K19257

研究課題名(和文) 機械的刺激による骨細胞のRANKL産生をplectinとPPP1r18が制御する

研究課題名(英文) Plectin and PPP1r18 regulate RANKL production of osteocytes by mechanical stress

研究代表者

前田 敏博 (Maeda, Toshihiro)

東北大学・歯学研究科・大学院非常勤講師

研究者番号：50792149

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)：確立したライブイメージング実験系を用いることで、機械的刺激負荷を感知したカルシウム応答陽性骨細胞においては、アクチンリモデリングと細胞形態の変化を生じることを明らかとした。また、同様の機械的刺激負荷装置を用いることで、機械的刺激負荷によってプライマリー骨細胞のRANKLのmRNA、タンパク質の発現が上昇した。さらに、機械的刺激負荷を受けたプライマリー骨細胞と破骨細胞前駆細胞との共培養実験により、機械的刺激負荷を受けた群では、破骨細胞の分化を促進することを明らかとした。機械的刺激が骨細胞におけるplectinとPPP1r18の発現に影響を与えることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、機械的刺激による骨細胞におけるRANKL発現増加の分子メカニズム解明のため、これまで骨細胞における発現と機能が未知なplectinとPPP1r18に着目し解明を行う点に独自性がある。本研究により、骨細胞のmechanotransductionメカニズムの解明につながることを期待される。

本研究による機械的刺激が促す破骨細胞分化の分子メカニズムの解明は、健常者だけでなく、大理石骨病や骨粗しょう症への薬物療法など、歯の動きが遅延することが知られる症例における矯正歯科治療の効率化にもつながり、本研究は臨床応用への展開が期待される基礎研究として、大きな意義を持つ。

研究成果の概要(英文)：Using our established live imaging experimental system, it was clarified that actin remodeling and changes in cell morphology occur in calcium response-positive cells that sense mechanical stress. In addition, by using this mechanical loading device, the expression of RANKL mRNA and protein in primary osteocytes was increased by mechanical stress. Furthermore, co-culture experiments with mechanically stimulated primary osteocytes and osteoclast progenitor cells revealed that osteoclast differentiation was promoted in the mechanically stimulated group. It was confirmed that mechanical stress affects the expression of plectin and PPP1r18 in osteocytes.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：骨細胞 機械的刺激 RANKL PPP1r18 Plectin

1. 研究開始当初の背景

矯正歯科治療において、歯の移動方向の圧迫側で、破骨細胞の分化が亢進し歯槽骨が吸収され、持続的な歯の移動が進行する。一方、大理石骨病等の破骨細胞分化抑制が認められる患者では、歯の移動が遅延する。そのため、効率的な歯の移動を行うには、機械的刺激に応答した破骨細胞分化メカニズムの解明が重要である。

破骨細胞の分化は、破骨細胞分化誘導因子 receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) により誘導される。従来、RANKL は骨芽細胞や間質細胞で発現することが知られていたが、生理的状态において骨細胞が RANKL を強く発現することが明らかとなった (Nakashima et al., Nat Med, 2011)。骨細胞は、メカノセンサーとして骨への機械的刺激を感知し、機械的刺激が促す骨代謝を制御する。近年、マウス実験的歯の移動モデルにおいて骨細胞の RANKL 産生が重要であること (Shoji et al., Sci Rep, 2017) や、機械的刺激が負荷された骨細胞様細胞株 MLO-Y4 において、RANKL 発現が上昇することが報告された (Li et al., J Orthop Res, 2013)。以上の知見から、矯正的歯の移動の圧迫側において機械的刺激が負荷された骨細胞は、RANKL 発現を増加して破骨細胞分化を促し、骨吸収を亢進すると考えられる。

サイトリンカープロテインである plectin は、上皮や筋などで発現し、アクチンと結合してシグナル調節を行うことが知られる。これまで、大動脈平滑筋細胞において、plectin がアクチンのリモデリングを抑制することが知られる (Gad et al., Cell Motil Cytoskeleton, 2008)。申請者らは、破骨細胞において plectin が Src と結合して破骨細胞分化とアクチンリング形成を促進することを初めて明らかとした (Matsubara et al., Biochem Biophys Res Commun, 2017)。一方、protein phosphatase 1 regulatory subunit 18 (PPP1r18) は、アクチンと結合し、その伸長を抑制する (Wang et al., Int J Mol sci., 2012)。最近申請者らは、PPP1r18 が破骨細胞の成熟とアクチンリング形成を抑制することを報告した (Matsubara et al., Mol Cell Biol, 2018)。したがって、plectin と PPP1r18 は、アクチン制御とともに破骨細胞の分化、成熟を制御する重要な因子と考えられるが、骨細胞における発現と役割は知られていない。

一方、申請者が所属するグループは、骨細胞のアクチン線維に富む細胞突起において機械的刺激感受性が高いことを報告 (Adachi et al., J Biomech, 2009) し、骨細胞の機械的刺激応答におけるアクチンの重要性を示してきた。興味深いことに、申請者らは機械的刺激に応答した骨細胞のアクチンリモデリングが、RANKL の発現を促す新規分子メカニズムであることを見出した (論文作成中)。しかし、骨細胞におけるアクチンリモデリングを介した RANKL 発現を制御する因子は不明である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、機械的刺激により促される骨細胞の RANKL 発現における、plectin と PPP1r18 の機能と、アクチンリモデリングとの相互作用を解明することである。

3. 研究の方法

(1) 骨細胞における plectin と PPP1r18 の発現の解析

6週齢マウスから臼歯を含む上顎歯槽骨を摘出し組織切片を作製後、歯根周囲歯槽骨の骨細胞での plectin と PPP1r18 発現を、免疫組織化学と in situ hybridization により解析する。

骨細胞マーカー DMP1 プロモーター下流に Topaz が組み込まれた DMP1-Topaz レポーターマウス頭蓋骨のコラゲナーゼ処理により骨細胞を採取し、Topaz 陽性骨細胞をセルソー

ティングにより分取する。この初代骨細胞と骨細胞様細胞株 MLO-Y4 における plectin と PPP1r18 の発現を免疫蛍光染色、リアルタイム PCR、western blot により解析する。

(2) 機械的刺激が負荷された骨細胞における plectin と PPP1r18 発現変化の解析

申請者が所属するグループの報告に準じ (Sakai, J Dent Res, 2009)、6週齢マウスの上顎第一臼歯に矯正力を負荷し、実験的歯の移動を行う。臼歯を含む上顎歯槽骨を採取し、圧迫側歯槽骨の骨細胞に着目して、(1)- と同様の方法で plectin と PPP1r18 の発現を解析する。

初代骨細胞とMLO-Y4に、申請者がこれまで活用してきたシェアストレス負荷培養装置を用いてシェアストレスを負荷し、plectin と PPP1r18 の発現を(1)- と同様に解析する。またマイクロアレイ解析により、plectin と PPP1r18 に関連する分子の網羅的発現解析を行う。

(3) 機械的刺激が負荷された骨細胞の RANKL 発現に対する plectin と PPP1r18 の機能

初代骨細胞と MLO-Y4 において plectin と PPP1r18 のノックダウン、過剰発現を行う。Plectin の shRNA 発現用プラスミド、PPP1r18 の shRNA と過剰発現用プラスミドは作製済みであり (Matsubara et al., Biochem Biophys Res Commun, 2017; Mol Cell Biol, 2018) plectin 過剰発現用プラスミドは遺伝子組み換え技術により作製する。骨細胞にシェアストレスを負荷し、RANKL と (2)- のマイクロアレイで明らかとなる plectin と PPP1r18 関連分子の発現をリアルタイム PCR、western blot、ELISA、免疫蛍光染色により解析する。

申請者が既に確立した、シェアストレス負荷後の骨細胞上にマクロファージ様破骨細胞前駆細胞株 RAW264.7 を播種する共培養実験系を用い、plectin と PPP1r18 の発現亢進と抑制が破骨細胞分化に及ぼす影響を TRAP 染色、リアルタイム PCR、western blot で解析する。

(4) 機械的刺激が負荷された骨細胞におけるアクチンリモデリングが plectin と PPP1r18 発現に及ぼす影響の解析

初代骨細胞とMLO-Y4 において plectin および PPP1r18 とアクチンを免疫蛍光染色し、従来の顕微鏡の2倍解像度で画像取得が可能な超解像蛍光顕微鏡を用いて、共発現を解析する。

骨細胞にアクチン重合阻害剤 Cytochalasin D と Rho A 阻害剤 C3 transferase を作用させた後シェアストレスを負荷する。アクチンの免疫蛍光解析、plectin と PPP1r18 発現のリアルタイム PCR、western blot、免疫蛍光による解析を行う。

(5) 機械的刺激が負荷された骨細胞における plectin と PPP1r18 がアクチンリモデリングに及ぼす影響の解析

初代骨細胞と MLO-Y4 に遺伝子導入し、plectin と PPP1r18 を過剰発現とノックダウンした後、シェアストレスを負荷し、(4)- と同様に解析する。また、生細胞イメージングプローブを骨細胞に導入し、申請者が既に確立したアクチンのライブセルイメージングを行い、アクチンリモデリングへの影響を解析する。

4. 研究成果

初年度は、骨細胞における機械的刺激負荷とアクチンリモデリングの関与を示すためのライブイメージング実験系の確立および同実験系における骨細胞の機械的刺激に対する感受性について検討を行った。骨細胞様細胞株MLO-Y4細胞を用い、機械的刺激負荷を感知した細胞を選別したうえでアクチンリモデリングを解析可能な実験系を確立した。DMP1-Topaz レポーターマウス頭蓋骨のコラゲナーゼ処理により採取したプライマリー骨細胞を用いて、機械的刺激負荷に対する感受性をカルシウムイメージングにて解析した。この実験系によりプライマリー骨細胞に機械的刺

激を負荷すると、骨組織へ直接機械的刺激を行った過去の報告と同程度の機械的刺激への感受性を示すことを明らかとした。また、プライマリー骨細胞において、 plectin と PPP1r18 の発現を確認した。

次年度は、昨年度に確立したライブイメージング実験系を用いて、プライマリー骨細胞において、機械的刺激負荷を感知した細胞を選別したうえでアクチンリモデリングを解析した。この実験によりプライマリー骨細胞に機械的刺激を負荷すると、機械的刺激負荷を感知したカルシウム応答陽性細胞においては、アクチンリモデリングと細胞形態の変化を生じることを明らかとした。また、同様の機械的刺激負荷装置を用いることで、機械的刺激負荷によってプライマリー骨細胞の RANKL の mRNA、タンパク質の発現が上昇した。さらに、機械的刺激負荷を受けたプライマリー骨細胞と破骨細胞前駆細胞との共培養実験により、機械的刺激負荷を受けた群では、破骨細胞の分化を促進することを明らかとした。

最終年度は、DMP1-Topaz レポーターマウス頭蓋骨のコラゲナーゼ処理により採取したプライマリー骨細胞を用いて、機械的刺激が負荷された骨細胞における plectin と PPP1r18 の発現を解析した。両分子ともに機械的刺激が発現に影響を与えることを確認した。また、プライマリー骨細胞を用いて、本研究における機械的刺激負荷による RANKL の発現変化の解析を行った。これにより、プライマリー骨細胞に機械的刺激を負荷すると、RANKL の発現が誘導されることが示された。さらに、機械的刺激負荷した骨細胞とマクロファージ様破骨細胞前駆細胞株 RAW264.7 を播種する共培養実験系により、発現が誘導された RANKL が破骨細胞を誘導することが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Sogi Chisumi, Takeshita Nobuo, Jiang Wei, Kim Siyoung, Maeda Toshihiro, Yoshida Michiko, Oyanagi Toshihito, Ito Arata, Kimura Seiji, Seki Daisuke, Takano Ikuko, Sakai Yuichi, Fujiwara Ikuma, Kure Shigeo, Takano Yamamoto Teruko	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 -
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 Jiang Wei, Takeshita Nobuo, Maeda Toshihiro, Sogi Chisumi, Oyanagi Toshihito, Kimura Seiji, Yoshida Michiko, Sasaki Kiyoo, Ito Arata, Takano-Yamamoto Teruko	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 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
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 -

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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