

平成 23 年 5 月 12 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20249081

研究課題名（和文） 生きた骨中骨細胞の分化過程とメカニカルストレスによる制御に関する
基盤的研究研究課題名（英文） Regulatory mechanisms of differentiation and mechano-response in
the osteocyte lineage.

研究代表者

山本 照子 (TAKANO-YAMAMOTO TERUKO)

東北大学・大学院歯学研究科・教授

研究者番号：00127250

研究成果の概要（和文）：

原子間力顕微鏡を用いて単一の細胞へ部位特異的に定量的なメカニカルストレス負荷を行うシステムを確立し、ニワトリ頭蓋冠由来の骨芽細胞、骨細胞に対しメカニカルストレス負荷を行ってその後のカルシウム応答反応のタイムラプス画像取得を行い解析した。骨芽細胞でみられた接着阻害ペプチドによる弾性率の低下と接着領域の減少が骨細胞ではみられず、細胞の機械的特性が細胞接着に関与していることを見出した。

研究成果の概要（英文）：

We established an experimental system that apply the mechanical stimulus to a single osteocyte and an osteoblast using an atomic force microscope and we examined mechanically induced site-dependent calcium responses. The different responses to extracellular stimuli among osteoblasts, osteoid osteocytes and mature osteocytes might be related to the differences in their mechanical properties and focal adhesions.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	25,300,000	7,590,000	32,890,000
2009年度	7,200,000	2,160,000	9,360,000
2010年度	5,800,000	1,740,000	7,540,000
年度			
年度			
総計	38,300,000	11,490,000	49,790,000

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：骨細胞、骨芽細胞、メカニカルストレス、三次元ネットワーク、細胞骨格、原子間力顕微鏡、カルシウム応答

1. 研究開始当初の背景

歯科矯正治療による歯の移動は歯周組織の活発なリモデリングを伴い、矯正力に対して骨が自らの形を変化させて応答することによって行われている。申請者らはラットの実験的歯の移動において in situ hybridization により、歯槽骨中の骨細胞は

歯周組織中にある他の多くの細胞に先駆けてオステオポンチン遺伝子を発現し、機械的刺激に非常に迅速に応答することを見出した (JBMR 1999,)。このように歯の移動を制御するための鍵となる細胞は骨細胞であることを世界に先駆けて報告した。しかしながら、骨細胞のもつ特異的な環境、すなわち、

周囲を堅い骨組織に囲まれた長い樹枝状の無数の突起をもっているという条件のため、その3次元構造を観察することさえ困難であり、骨細胞の分化過程に関する研究や骨細胞の機能に関する研究はほとんど進められてこなかった。骨細胞の細胞性ネットワークは、骨基質の力学環境の変化に伴う骨基質の変形や損傷を感知し、骨代謝を担う他の骨系細胞にその情報を伝達する機能を可能とするものであると考えられている。近年の研究により、徐々に骨細胞のメカノセンサーとしての役割が解明されようとしているが、どのような機序で力を感じているのか明確な結論には至っていない。一方、骨細胞の形態的变化あるいは機械的刺激に対する応答は細胞を裏打ちしているアクチン線維の再構成によっておこなわれると考えられている。申請者らのグループは骨中骨細胞がアクチン線維に富んでいることに着目し、アクチン線維を蛍光染色することによって骨細胞の3次元形態計測を行う方法を確立した(Bone 2005)。さらに、骨細胞の細胞骨格の細部構造に関する報告している(JBMR 2004)。そこで、これらの手法を生かし、本研究ではタイムラプス顕微鏡システムによるリアルタイム解析と原子間力顕微鏡を単一の細胞へのメカニカルストレス負荷装置として応用し、培養骨細胞の分化過程とメカニカルストレス制御に関する基盤的研究を着想するに至った。

2. 研究の目的

- (1) 骨組織中の骨細胞の詳細な形態学的解析と、骨芽細胞から骨細胞への分化過程での形態および細胞骨格の変化についての解析を行う。
- (2) 原子間力顕微鏡(AFM)を用いて、単一の細胞へ部位特異的に定量的なメカニカルストレス負荷を行うことが可能なシステムを確立する。
- (3) (2)のシステムを用いて、ニワトリ頭蓋冠由来の骨系細胞を対象として部位特異的にメカニカルストレスを負荷し、カルシウム応答を指標としメカニカルストレスに対する細胞の感受性を解析する。

3. 研究の方法

(1) 骨細胞の単離と同定

- ①胎齢16日のニワトリ胚頭蓋冠より、コラゲナーゼおよびEDTAを用いて段階的に基質を脱灰、溶解して骨細胞を単離し培養皿に播種する。
- ②単離した細胞について骨細胞特異的マーカーを認識する特異抗体OB7.3を用いて骨細胞を免疫組織化学的に同定する。

(2) 骨細胞、骨芽細胞の細胞骨格関連タンパクの局在の検討とAFMによる弾性率の測定

- ①細胞骨格関連タンパクである Actin, Tubulin 等、あるいはFocal adhesionに関する Vinculinの局在を免疫組織化学的に検討する。
- ②骨芽細胞、骨細胞の核の上部、細胞の辺縁、細胞突起部の弾性率を原子間力顕微鏡を用いて測定する。
- ③インテグリンによる細胞接着を阻害して、弾性率の変化、および細胞骨格の動態変化を解析する。

(3) ニワトリ頭蓋冠より超薄切切片を作成し、常用300万ボルト超高压電子顕微鏡にて観察し、3D再構築を行って骨細胞の突起の走行やネットワーク形成の解析を行う。

(4) ニワトリ頭蓋冠とマウス頭蓋冠、それぞれの骨細胞ネットワークを3D再構築後に比較解析を行う。

(5) 単離した培養骨系細胞にカルシウムインジケータを取り込ませ、原子間力顕微鏡にてメカニカルストレス負荷を行う。その後のカルシウム応答をメカニカルストレス感受性の指標として、部位特異的な応答レベルの解析を行う。

4. 研究成果

(1) 分化段階の異なる骨芽細胞と骨細胞を用いた検討では、高度に分化した骨細胞においては細胞辺縁部の弾性率が低い傾向にあった。接着阻害ペプチドを用いたインテグリンによる細胞接着を阻害すると、骨芽細胞では弾性率の低下と接着斑の減少がみられたが、骨細胞では弾性率の低下、接着斑の減少はみられず、細胞の機械的特性が細胞接着に関与していることを見出した。(図1)

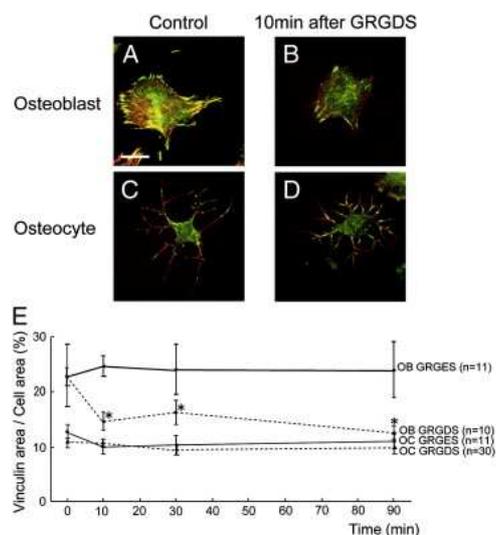


図1. Sugawara Y, Takano-Yamamoto T et al., Bone 2008 より抜粋。

(2) 骨組織の3次元細胞性ネットワークを詳細に解析するため $3\mu\text{m}$ という超薄切切片を作成し超高压電子顕微鏡にて観察することにより、長くのびた細い突起の走行やネットワーク形成を明らかにし、3次元的に再構築して1報を報告した。(図2)

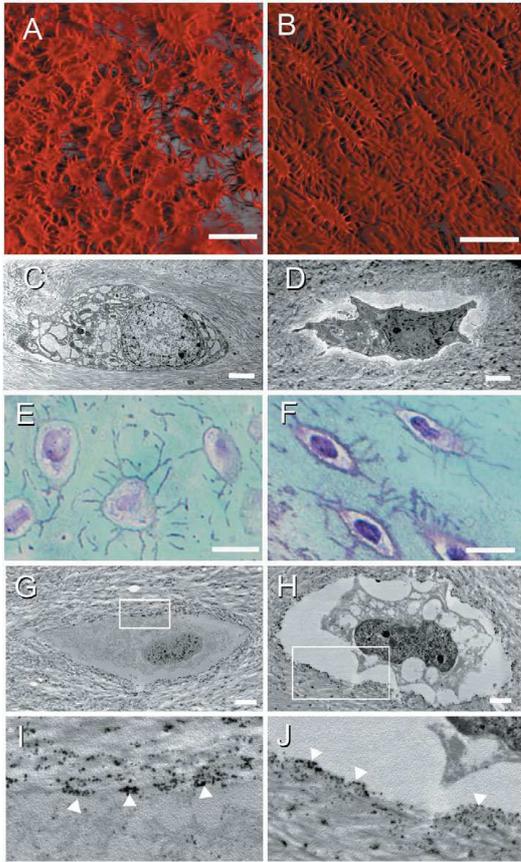


図2. Kamioka H, Takano-Yamamoto T et al., *Microscopy and Microanal.* 2009 より抜粋。

(3) 現在我々は骨細胞の単離法および同定法が確立されているニワトリ頭蓋冠由来の細胞を使用している。しかしながら、遺伝的背景が確立しており哺乳類であるマウスからのデータ取得も重要であることから両者の頭蓋冠を形態学的に比較解析し1報を報告した。(図3)

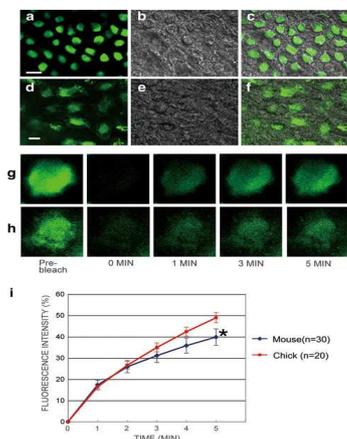


図3. Sugawara Y, Takano-Yamamoto T et al., *Calcif Tissue Int.* 2011より抜粋。

(4) 骨組織中に存在する細胞を単離した後、個々の細胞に定量的なメカニカルストレス負荷を行う装置として原子間力顕微鏡を用いた検討を行った。そしてカルシウム指示薬を用いた、メカニカルストレス応答時の細胞内カルシウム濃度の変化や、遺伝子導入技術を用いた蛍光タンパク質融合細胞骨格タンパク質および焦点接着斑関連タンパク質の強制発現によりメカニカルストレス負荷後の細胞のイメージングシステム構築を完了し、単一細胞を標的としたメカニカルストレス負荷とその後の応答性について検討した。すなわち骨組織を形成する種々の分化段階の細胞を対象として、どの細胞が機械的刺激の作用点であるのか、また細胞のどの部位が主としてメカニカルストレスを受容するのかを検討した。その結果、60nNのメカニカルストレスを負荷した場合においては、細胞の辺縁部や突起と比較して弾性率の低い細胞中心部でメカニカルストレス応答を示す細胞が多かった。

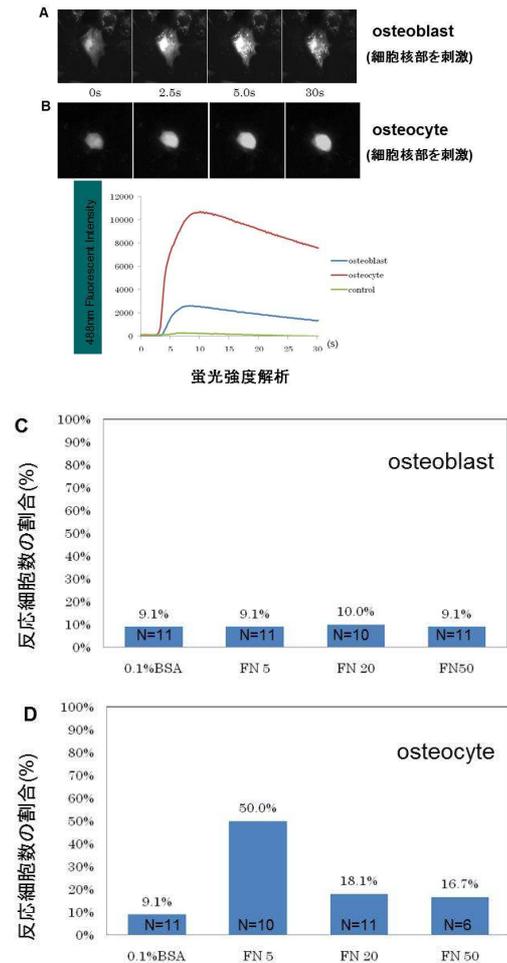


図4. 骨芽細胞、骨細胞のメカニカルストレス負荷後のカルシウム応答

さらに、チロシン脱リン酸化阻害剤を用いてメカニカルストレスを負荷しその後の細胞応答を比較検討した結果、骨芽細胞と骨細胞の機械的刺激応答に焦点接着斑が寄与しておりその傾向は骨芽細胞においてより顕著であった。以上の成果をまとめ投稿準備中である。さらにメカニカルストレス強度や刺激部位を変えて、細胞の感受性の相違や、メカニカルストレス負荷後の細胞骨格の動態についてもタイムラプスにて検討中である。

(5) 我々はマウスの歯の移動時の歯槽骨圧迫側骨細胞におけるアポトーシスに結合組織成長因子(Connective Tissue Growth Factor; CTGF)が作用している可能性を示唆した(Sakai Y, Takano-Yamamoto T et al., J Dent Res. 2009)。これにもとづき、これまで不明であったメカニカルストレス負荷による骨細胞のアポトーシスのメカニズムについてCTGFとの関連から細胞・分子生物学的に検討することにした。

まず、単離した骨細胞に圧縮力負荷を行い、アポトーシスを誘導する系を確立した(図5-1)。圧縮力を負荷された骨細胞においてはCTGF遺伝子の発現が有意に上昇した(図5-2)。現在、骨細胞のアポトーシスとCTGFとの関連を検討中である。

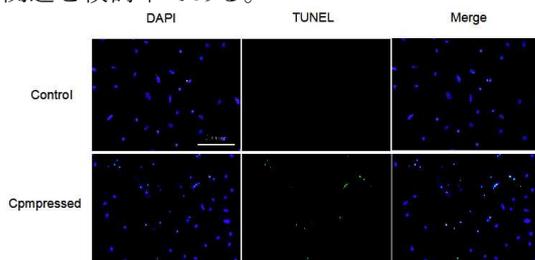


図5-1. 圧縮力負荷による骨細胞のアポトーシスの誘導

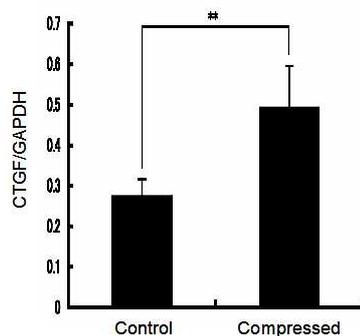


図5-2. 圧縮力負荷による骨細胞におけるCTGFの発現の変化

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 54 件)

(1) The three-dimensional morphometry and cell-cell communication of the osteocyte network in chick and mouse embryonic calvaria. Sugawara Y, Ando R, Kamioka H, Ishihara Y, Honjo T, Kawanabe N, Kurosaka H, Takano-Yamamoto T, Yamashiro T. Calcif Tissue Int. 2011 88(5):416-424. 査読有

(2) Sox9 Expression during Fracture Repair. Shintaku Y, Murakami T, Yanagita T, Kawanabe N, Fukunaga T, Matsuzaki K, Uematsu S, Yoshida Y, Kamioka H, Takano-Yamamoto T, Takada K, Yamashiro T. Cells Tissues Organs. 2011 (in press) 査読有

(3) Fibroblast growth factor 10 regulates Meckel's cartilage formation during early mandibular morphogenesis in rats. Terao F, Takahashi I, Mitani H, Haruyama N, Sasano Y, Suzuki O, Takano-Yamamoto T. Dev Biol. 2011 350(2):337-347. 査読有

(4) Expression of Ten-m/Odz3 in the fibrous layer of mandibular condylar cartilage during postnatal growth in mice. Murakami T, Fukunaga T, Takeshita N, Hiratsuka K, Abiko Y, Yamashiro T, Takano-Yamamoto T. J Anat. 2010 217(3):236-244. 査読有

(5) Effects of CO₂ laser irradiation of the gingiva during tooth movement. Seiryu M, Deguchi T, Fujiyama K, Sakai Y, Daimaruya T, Takano-Yamamoto T. J Dent Res. 2010 89(5):537-542. 査読有

(6) Isolation of multipotent stem cells in human periodontal ligament using stage-specific embryonic antigen-4. Kawanabe N, Murata S, Murakami K, Ishihara Y, Hayano S, Kurosaka H, Kamioka H, Takano-Yamamoto T, Yamashiro T. Differentiation. 2010 79(2):74-83. 査読有

(7) Dynamic expression of Six family genes in the dental mesenchyme and the epithelial ameloblast stem/progenitor cells during murine tooth development. Nonomura K, Takahashi M, Wakamatsu Y, Takano-Yamamoto T, Osumi N.

J Anat. 2010 216(1):80-91. 査読有

(8) A method for observing silver-stained osteocytes in situ in 3-micron sections using ultra-high voltage electron microscopy tomography. Kamioka H, Murshid SA, Ishihara Y, Kajimura N, Hasegawa T, Ando R, Sugawara Y, Yamashiro T, Takaoka A, Takano-Yamamoto T. Microsc Microanal. 2009 15:377-383. 査読有

(9) Fully functional bioengineered tooth replacement as an organ replacement therapy. Ikeda E, Morita R, Nakao K, Ishida K, Nakamura T, Takano-Yamamoto T, Ogawa M, Mizuno M, Kasugai S, Tsuji T. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 106(32):13475-13480. 査読有

(10) Osteocyte calcium signaling response to bone matrix deformation. Adachi T, Aonuma Y, Ito S, Tanaka M, Hojo M, Takano-Yamamoto T, Kamioka H. J Biomech. 2009 42(15):2507-2512. 査読有

(11) Calcium response in single osteocytes to locally applied mechanical stimulus: differences in cell process and cell body. Adachi T, Aonuma Y, Tanaka M, Hojo M, Takano-Yamamoto T, Kamioka H. J Biomech. 2009 42(12):1989-1995. 査読有

(12) CTGF and apoptosis in mouse osteocytes induced by tooth movement. Sakai Y, Balam TA, Kuroda S, Tamamura N, Fukunaga T, Takigawa M, Takano-Yamamoto T. J Dent Res. 2009 88(4):345-350. 査読有

(13) Runx1 is involved in the fusion of the primary and the secondary palatal shelves. Charoenchaikorn K, Yokomizo T, Rice DP, Honjo T, Matsuzaki K, Shintaku Y, Imai Y, Wakamatsu A, Takahashi S, Ito Y, Takano-Yamamoto T, Thesleff I, Yamamoto M, Yamashiro T. Dev Biol. 2009 Feb 15;326(2):392-402. Epub 2008 Oct 29. Erratum 査読有

(14) 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 2008 43:19-24 査読有

[学会発表] (計 46 件)

(1) 水野光政、大島正充、小川美帆、山崎大道、中尾一久、山本照子、齋藤正寛、辻孝 再生歯による移植システムの開発 (1) 一再生歯ユニットの作製と成体顎骨への生着の解析— 第 10 回日本再生医療学会総会 2011 年 3 月 1-2 日 東京

(2) 藤井俊哉、北浦英樹、木村桂介、ザキ・ウェリ・ハカミ、山本照子 TNF-a による破骨細胞形成に対する IL-4 の作用についての in vivo での検討 第 32 回東北骨代謝研究会 2011 年 2 月 5 日 仙台

(3) 大島正充、水野光政、今村彩、小川美帆、山崎大道、中尾一久、山本照子、齋藤正寛、辻孝 歯の機能的な再生 (I): 再生歯ユニットの作製と成体顎骨への生着の解析 第 33 回日本分子生物学会年会 2010 年 12 月 7-10 日 神戸

(4) 山本照子 自分の口を知る 第 4 回東北大学基礎ゼミ FD・ワークショップ 2010 年 11 月 15 日 仙台

(5) 水野光政、大島正充、今村彩、小川美帆、中尾一久、山崎大道、山本照子、齋藤正寛、辻孝 機能的な歯の再生 (I): 機能的な歯の構造体: 再生歯ユニットの作製技術の開発 第 8 回日本再生歯科医学会学術大会・総会 2010 年 10 月 30 日 名古屋

(6) 星健治、川木晴美、高橋一郎、益田泰輔、鈴木治、上岡寛、山城隆、山本照子 骨細胞に対する機械的圧縮力による CTGF の発現とアポトーシスに関する研究 する研究 第 69 回日本矯正歯科学会 2010 年 9 月 27-30 日 横浜

(7) 川木晴美、鈴木誠、藤井俊哉、久保田聡、滝川正春、山本照子 骨組織形成に関与する CCN2/CTGF のアンカーペプチドアダプターの設計とその有用性 第 69 回日本矯正歯科学会 2010 年 9 月 27-30 日 横浜

(8) 金原正敬、菅原俊二、遠藤康男、山本照子 マウス金属アレルギーモデルにおける交差反応: 高純度金属塩による検討 第 69 回日本矯正歯科学会 2010 年 9 月 27-30 日 横浜

(9) 金始瑛、山本照子、永井康裕、菅原俊二、遠藤康男 骨吸収抑制作用とは関連しない bisphosphonates (BPs) の鎮痛作用 第 52 回日本歯科基礎医学会 2010 年 9 月 21 日 神戸

(10) 山本照子、川木晴美、鈴木誠、Murshid SA、福永智広. メカニカルストレスと骨細胞. 第56回東北大学歯学会, 2010年2月19日, 仙台

(11) 池田悦子、中尾一久、石田研太郎、山本照子、小川美帆、水野光政、春日井昇平、辻孝 成体口腔内で成長した再生歯の長期安定性と機能の解析第32回 日本分子生物学会年会 2009年12月9-12日 横浜

(12) 池田悦子、中尾一久、森田梨津子、石田研太郎、小川美帆、水野光政、山本照子、春日井昇平、辻孝 生体顎骨内における再生歯の萌出と口腔機能の解析。第6回 東北大学バイオサイエンスシンポジウム および 第14回 学際ライフサイエンスシンポジウム 2009年6月16日 仙台

(13) 出口徹、清流正弘、台丸谷隆慶、山本照子 実験的歯の移動時における歯根吸収は歯槽骨吸収と密接に関与する。第6回 東北大学バイオサイエンスシンポジウム および 第14回 学際ライフサイエンスシンポジウム 2009年6月16日 仙台

(14) 川木晴美、鈴木誠、藤井俊哉、青沼智、滝川正春、山本照子 骨組織形成に関与するCCN/WISP1 遺伝子の発現調節機構の解析 第6回 東北大学バイオサイエンスシンポジウム および 第14回 学際ライフサイエンスシンポジウム 2009年6月16日 仙台

(15) Takano-Yamamoto T, Molecular and Cellular Mechanism of Orthodontic Tooth. 85th Congress of the European Orthodontic Societ 2009年6月11日 Helsinki, Finland

[その他]

ホームページ等

<http://orthod.dent.tohoku.ac.jp/orthod/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 照子 (TAKANO-YAMAMOTO TERUKO)
東北大学・大学院歯学研究科・教授

研究者番号：00127250

(2) 研究分担者

高橋 一郎 (タカハシ イチロウ)
九州大学・大学院歯学研究院・教授

研究者番号：70241643

(3) 研究分担者

出口 徹 (デグチ トオル)

東北大学・大学院歯学研究科・准教授

研究者番号：30346457