

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20791575

研究課題名（和文）

骨系細胞はいかにして機械的刺激を感じるか？—アクチン結合タンパクの役割を探る—

研究課題名（英文）How do bone cell sense mechanical stress? - the role of the actin binding protein -

研究代表者

本城 正（HONJO TADASHI）

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：10379844

研究成果の概要（和文）：骨芽細胞は機械的刺激に対して、結合組織増殖因子（CTGF）を発現した。その発現は時間、強度依存的に比例した。さらに機械的刺激による CTGF の発現は、アクチンストレスファイバー（SF）の形成に比例して上昇した。つまり SF の発現をコントロールする small G タンパクである Rho の阻害剤を用いると、CTGF の発現は有意に減少した。さらに薬剤による SF 刺激に比例して CTGF の発現が上昇した。またアクチン重合阻害剤を用いたところ CTGF の発現が減少した。以上のことから CTGF の発現がアクチン重合と密接な関わりがあることが示唆された。

研究成果の概要（英文）： we evaluated the effect of FSS on ctgf expression and investigated its mechanism in MC3T3-E1 cells. The ctgf expression was induced by FSS in a dose dependent manner up to 1.5 Pa, at which more than 5-fold induction was observed. This effect was inhibited by a Rho GTPase inhibitor, Y27632. Moreover, inhibition of actin polymerization blocked the FSS-induced activation of ctgf, whereas forced F-actin formation by jasplakinolide and cytochalasin D enhanced the ctgf expression in the same cells. Collectively, these findings indicate the role of Rho signaling pathway in bone remodeling provoked by FSS through the induction of CTGF.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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

骨系細胞へ機械的刺激が加わると、骨リモデリングの亢進や分化の促進などが観察され、同時に様々な分子の発現の変化が認められる。しかし、細胞に加わる機械的刺激がどのように遺伝子発現に翻訳されるのかは明らかではない。

細胞は、その形態を維持するためにアクチンフィラメントに代表される細胞骨格を有している。そして、細胞に機械的刺激が加わると、細胞骨格の再構成が生じる。アクチン結合タンパクはアクチン繊維に結合するタンパクで、アクチン繊維への結合を介して高次構造の形成に中心的な役割を果たしているが、細胞に機械的刺激が加わった際にも、細胞骨格の再構成に応答して発現上昇することが知られている。機械的刺激に応じたアクチン結合タンパクの発現変化に関しては血管内皮細胞において検討されてきたが、骨芽細胞についての検討はほとんどなされていないため、本研究の着想へ至った。

2. 研究の目的

骨芽細胞は機械的刺激に応答してその機能を調節している。しかし、骨芽細胞がどのような機序で機械的刺激を感じ、細胞内で情報伝達するのか、いまだ解明されていない。本研究では、その鍵を握る分子としてアクチン結

合タンパクに注目する。アクチン結合タンパクは細胞自身が形を変えて移動するための中心的役割を果たし、機械的刺激を受け細胞の形が変化した際に、それに応答して発現上昇することも知られている。しかし、骨組織におけるアクチン結合タンパクの役割はほとんど知られていない。本研究では、機械的刺激に即時に反応することが知られているCTGFの発現を指標に、アクチン結合タンパクが機械的刺激をいかにして細胞内情報伝達に翻訳するのかを明らかにする。このメカニズムを解明すれば効果的な歯の移動の開発のみならず、骨組織の再生応用や骨疾患の治療法の開発につながる可能性がある。

3. 研究の方法

(1). 骨芽細胞の単離、培養

胎生16日胚のマウス頭蓋骨を取り出し、コラゲナーゼで細胞外組織を、EDTAで骨の基質を溶かして骨芽細胞を単離する。それらの細胞をコーティングしたカバーグラス上で10%ウシ胎児血清含有 α -MEM培地を用いて培養する。

(2). アクチン結合タンパク遺伝子の siRNA による機能阻害

フィンブリン等各種アクチン結合タンパク質の合成を阻害するために siRNA ベクターを用いて骨芽細胞に遺伝子導入する。一般に骨

系細胞は細胞外基質を分泌するためリポゾーム法では遺伝子導入効率が低い。しかし最近発売されたマイクロポレーターという専用試薬を用いた電氣的遺伝子導入装置を用いることで約60%という高い導入効率を得ることが出来る。更に siRNA 末端を蛍光修飾することでフローサイトメトリーを用いて遺伝子導入効率95%以上の細胞を用いる事が出来る。

(3). 流体剪断応力の負荷

実験に使用する約12時間前に、0.5%ウシ胎児血清含有 a-MEM 培地に交換し、スライドガラス上の培養細胞に、専用の流体剪断応力負荷装置にて流体剪断応力を負荷する。適切な時間の後、細胞を回収、トータル RNA を採取する。

(4). 機械的刺激受容に関する遺伝子の検出
回収したサンプルを逆転写反応にかけ、Lightcycler (Roche) を用いたリアルタイム PCR にて CTGF の発現変化を解析する。

4. 研究成果

骨芽細胞は機械的刺激に対して、結合組織増殖因子 (CTGF) を発現した。その発現は時間、強度依存的に比例した。さらに機械的刺激による CTGF の発現は、アクチンストレスファイバー (SF) の形成に比例して上昇した。つまり SF の発現をコントロールする small G タンパクである Rho の阻害剤を用いると、CTGF の発現は有意に減少した。さらに薬剤による SF 刺激に比例して CTGF の発現が上昇した。またアクチン重合阻害剤を用いたところ CTGF の発現が減少した。以上のことから CTGF

の発現がアクチン重合と密接な関わりがあることが示唆された。本結果は国内外における骨細胞研究において始めて明らかとなった知見である。本研究により骨芽細胞が機械的刺激によって CTGF 発現上昇をする際、重要な役割を果たすアクチン結合タンパクの種類が詳細に解析されることが予想される。更に機械的刺激によって発現する他の様々な分子についても、どのアクチン結合タンパクが深く関与するかを解明する必要がある。

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2件)

① Charoenchaikorn K, Yokomizo T, Rice DP, Honjo T et al, Runx1 is involved in the fusion of the primary and the secondary palatal shelves. *Developmental Biology*, 査読有、VOL. 15:326(2), 2009, pp. 392-402

② Hiruma Y, Honjo T, Jelinek DF, Windle JJ, Shin J, Roodman GD, Kurihara N, Increased signaling through p62 in the marrow microenvironment increases myeloma cell growth and osteoclast formation., *Blood*, 査読有、VOL. 14:113(20), 2009, pp. 4894-4902.

[学会発表] (計2件)

1. 石原嘉人, 上岡寛, 本城正, 菅原康代, 安藤涼子, 山城隆 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大会 2008

2. 本城正, 植田紘貴, 上岡寛, 山本照子,
山城隆骨芽細胞株MC3T3-E1 細胞におい
て流体剪断応力はMAPKを介してCTGFの
発現を増大させる 第67回日本矯正
歯科学会大会 2008

6. 研究組織

(1) 研究代表者

本城 正 (HONJO TADASHI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助
教

研究者番号 : 10379844