

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月17日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592594

研究課題名（和文） 人為制御された骨細胞ネットワークの機械的刺激応答能について

研究課題名（英文） Mechanical response in artificially controlled osteocyte network

研究代表者

上岡 寛 (KAMIOKA HIROSHI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：80253219

研究成果の概要（和文）：矯正治療における歯の移動において重要なメカノセンサーとして考えられている骨細胞が形成する細胞性ネットワークの役割はいまだ解明されていない。そこで、我々はナノパターニング法を用いて、骨細胞ネットワークの形成を人為的に制御し、微少培養液循環装置を用いて機械的刺激を受けた骨細胞の応答を検討した。

研究成果の概要（英文）：Osteocyte in bone are thought to be mechanosensory cells. They form cellular network. However, the role of osteocyte network is not well known. We employed the nano-patterning method to form artificially-formed osteocyte network and applied mechanical stress with fluid shear stress in micro-fluid flow chamber.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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、ナノパターニング、機械的刺激

1. 研究開始当初の背景

骨細胞は骨組織においてもっとも多く存在する細胞であり、骨の量、構造を制御する主たる細胞であると考えられている。骨細胞の特徴は、多数の突起で構成された細胞同士のネットワークであるが、このネットワークにより外的環境の変化に対して統合・同期した反応を行うことができると考えられている。し

かしながら、骨細胞は周囲を固い骨組織で囲まれていることから、機能的解析のアプローチには障壁があり、骨細胞の機械的刺激に、ネットワークが如何に関与しているかを検討することは困難であった。申請者は、先に、ニワトリ胚頭蓋骨から骨系細胞を単離し、この初代培養系に流体剪断応力を負荷し、骨系細胞の機械的応答能を比較した。骨細胞はメ

カノセンサーとしての主たる細胞であると考えられていることから、優位な感受性を期待したが、予想に反して単一細胞(ネットワークを形成していない細胞)の状態では、骨細胞は骨芽細胞に比べ流体剪断応力に対する感受性が著しく低かった。そこで、ネットワーク形成と細胞の外的刺激感受性になんらかの関係があると考えた

2. 研究の目的

矯正治療における歯の移動において重要なメカノセンサーとして考えられている骨細胞が形成する細胞性ネットワークの役割はいまだ解明されていない。そこで、我々はナノパターンニング法を用いて、ネットワークの形成を人為的に制御された骨細胞のメカニカル応答の変化を検討した。

3. 研究の方法

ナノパターンニングにより、まず、細胞を完全にシングルな状態から徐々にネットワークを広げていくように培養ガラス上での細胞接着様式を変えていく。そして、流体剪断応力を負荷することによって、骨細胞の機械的刺激への応答能の変化を追跡する。

4. 研究成果

パターンニングを行うための、装置の開発ならびにその装置により実際に細胞が配列し、長期の培養が可能かどうかを検討した。まず、パターンニングの鋳型から光重合樹脂を使用したフォトリソグラフィを用いて作成し、PDMSを流し込み、パターンニングのためのスタンプを作成した。作成したスタンプには細胞接着基質であるフィブロネクチンを付着させ、細胞培養をおこなうガラスに印記した。まず、パイロットスタディとして、骨芽細胞株 MC3T3-E1 を用いて、付着の検討を行った。そして、骨細胞は従来の我々の方法に従ってニワトリ胚頭蓋骨より単離した。培養開始3

0分で骨が細胞ならびに骨細胞の付着を確認し、フィブロネクチンコーティングしていない領域の細胞は、洗い流した。そうすることによって、骨芽細胞ならびに骨細胞のパターンニングが確認できた。細胞のネットワークを35マイクロメートル四方から、10マイクロメートル四方までのものを規則正しく整列させることができた。そして、より安定して、細胞に流体剪断応力を負荷するためにパターンニングに用いたPDMSを用いて、マイクロ流路を作製し、作製された骨細胞ネットワークに流体剪断応力をかけるための装置を新たに開発した。この装置により、細胞に0.8から3.0パスカルの流体剪断応力を負荷することができ、同時に長期に細胞を培養することができた。長期に培養された骨芽細胞ならびに骨細胞は培養10日目で石灰化がみられた。これは、機械的刺激を用いないコントロール群に比べて有意に早かった。

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9件) 全て査読有り

1. Ishihara Y, Sugawara Y, Kamioka H, Kawanabe N, Kurosaka H, Naruse K, Yamashiro T. In situ imaging of the autonomous intracellular Ca²⁺ oscillations of osteoblasts and osteocytes in bone. *Bone*, 50(4):842-52, 2012.
2. 上岡 寛, 山城 隆 骨細胞による機械的刺激の感知 月刊 Clinical Calcium(医薬ジャーナル社)21巻5号 97-104, 2012
3. Hayano H, Kurosaka H, Yanagita T, Kalus I, Fabian Milz, Ishihara Y, Islam MN, Kawanabe N, Saito M, Kamioka H, Adachi T, Dierks T, Yamashiro T. Roles of heparan sulfate sulfation in

- dentinogenesis. *J Biol Chem*, 287(15):12217-29, 2012
4. Kawanabe N, Murata S, Fukushima H, Ishihara Y, Yanagita E, Ono M, Kurosaka H, Kamioka H, Itoh T, Kuboki T, Yamashiro T. Stage-specific embryonic antigen-4 identifies human dental pulp stem cells. *Exp Cell Res*, 318(5)453-463, 2012.
 5. Ishihara Y, Kamioka H, Takano-Yamamoto T, Yamashiro T. A case report of a patient with nonsyndromic bilateral and multiple impacted teeth and dentigerous cysts. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, 141(2)228-241, 2012.
 6. Kumada A, Matsuka Y, Spigelman I, Maruhama K, Yamamoto Y, Neubert JK, Nolan TA, Watanabe K, Maekawa K, Kamioka H, Yamashiro T, Kuboki T, Oguma K. Intradermal injection of botulinum toxin type A alleviates infraorbital nerve constriction-induced thermal hyperalgesia in an operant assay. *J Oral Rehabilitation*, 39(1)63-72, 2012.
 7. Shintaku Y, Murakami T, Yanagita T, Kawanabe N, Fukunaga T, Matsuzaki K, Matsuoka S, Yoshida Y, Kamioka H, Takano-Yamamoto T, Takada K, Yamashiro T. Sox9 expression during fracture repair. *Cells Tissues Organs*, 194(1)38-48, 2011.
 8. Sugawara Y, Ando R, Kamioka H, Ishihara Y, Honjo T, Kawanabe N, Kurosaka H, Takano-Yamamoto T, Yamashiro T. The three-dimensional morphometry and cell-cell communication of osteocytes network in chick and mouse embryonic calvaria. *Calcified Tissue International*, 88(5)416-424, 2011.
 9. Kamioka H, Adachi T. Application of bioimaging to osteocyte biology. *Clinical Review in Bone and Mineral Metabolism*, 8(4):170-178, 2010.
- [学会発表] (計8件)
1. 上岡 寛 骨細胞のバイオイメージングによる機能解析 京都大学再生医科学研究所 第8回バイオメカニクスセミナー 平成23年11月16日 京都市
 2. 上岡 寛 骨細胞のイメージングによる機能解析 国立長寿医療研究センター運動器疾患研究部主催セミナー 平成23年10月27日 大府市
 3. 菅原康代、上岡 寛、石原嘉人、藤澤直子、山城 隆 マウス大腿骨中の三次元骨細胞ネットワークは外部環境によって変化する 第70回日本矯正歯科学会大会&第4回国際会議 平成23年10月17-20日 名古屋市
 4. 石原嘉人、菅原康代、上岡 寛、川邊、山城 隆 生体ライブイメージングを用いた骨組織中における自律性細胞内カルシウムオシレーションの検討 第70回日本矯正歯科学会大会&第4回国際会議 平成23年10月17-20日 名古屋市
 5. 吉川祐介、石原嘉人、今井裕一、川邊紀章、上岡 寛、山城 隆 ヒト歯根膜細胞におけるギャップ結合を介した細胞間コミュニケーション 第69回日本矯正歯科学会大会 平成22年9月27-29日、横浜市
 6. 石原嘉人、菅原康代、上岡 寛、川邊紀章、成瀬恵治、山城 隆 骨組織内ライブイメージングを用いた機械的刺激に対する細胞内カルシウム応答の検討 第69回日本矯正歯科学会大会 平成22年9月27-29日、横浜市
 7. Ishihara Y, Sugawara Y, Kamioka H, Honjo T, Kurosaka H, Kawanabe N, Yamashiro T Direct Imaging of Flow-induced Oscillatory Calcium Rise in Living Bone. JADR Hatton award competition, 2010/1/25, Tokyo.
 8. 青沼 有紀、平 圭佑、安達 泰治、北

條 正樹、上岡 寛 力学刺激に対する
単離骨細胞の情報伝達特性に関する考
察 第 22 回バイオエンジニアリング講
演会平成 22 年 1 月 9-10 日 岡山市

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：細胞培養システム

発明者：上岡 寛 他

権利者：同上

種類：特許

番号：特願2011-K1110184

出願年月日：23年10月4日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上岡 寛 (KAMIOKA HIROSHI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准
教授

研究者番号：80253219

(2) 研究分担者

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

(H22~H23)

片野坂 友紀 (KATANOSAKA YUKI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助
教

研究者番号：60432639

(H21~H22)

(3) 連携研究者