

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25年3月31日現在

機関番号：15301
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22592036
 研究課題名(和文) 機械的刺激による骨形成促進に関与するWnt/ β カテニンシグナルネットワークの解明
 研究課題名(英文) A role of Wnt/beta-catenin signal network on the stimulated bone formation under mechanical stress.
 研究代表者
 池亀 美華 (IKEGAME MIKA)
 岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授
 研究者番号：70282986

研究成果の概要(和文)：ネズミ頭蓋骨縫合部(骨と骨のつぎ目)に引張り力を加えると、骨が急速に沢山作られる。その過程で変化する骨の細胞活性に関係する因子の遺伝子発現について、とくにWnt/ β カテニン関連因子群について検討した。その結果、Wnt/ β カテニン関連因子群のみならず、その他の骨形成関連因子も含めて時間的・量的変化が明らかとなり、それらの因子間の重要性の度合いについて解明を進めることができた。

研究成果の概要(英文)：We can stimulate bone formation with tensile stress on a suture of mouse calvaria. Gene expressions of many factors, especially Wnt/beta-catenin family which are involved in bone-cell activity were examined during the stimulated bone formation. We could show the relative expression ratios of some factors at each time point of the experiment. Those results suggested which factors were more important at each stage of the stimulated bone formation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：形態学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：骨形成・機械的刺激・局所因子・サイトカイン・骨縫合部組織・Wnt

1. 研究開始当初の背景

これまでに、頭頂骨縫合部の器官培養系に持続的伸展刺激を加える系を用いて、機械的

刺激による骨形成促進過程において、骨芽細胞系細胞の細胞骨格の変化、特にアクチン細胞骨格の変化などを明らかにしてきた。その

中で細胞接着因子からのシグナルが骨芽細胞の増殖・分化促進に重要なのではないかと予測し研究を重ねているうち、細胞間接着因子であるカドヘリンに結合する β カテニンに着目するようになった。さらに、 β カテニンは細胞接着に関与するのみならず、Wnt シグナル系の重要な因子であり、Wnt/ β カテニンシグナル系が骨の機械的刺激による骨量調節に関与しているということが報告されるようになった。しかしながら、形態学的にWnt/ β カテニンシグナルの局在や機械的刺激によるその変化について調べた報告や、細胞間での相互作用についての報告はみあたらない。そこで、細胞間接着因子という観点のみならず、Wnt シグナル関連因子としての β カテニン、さらにはそのほかの関連因子についても、骨組織内での局在を含めて解明したいと考えるに到った。

2. 研究の目的

機械的刺激による骨形成促進機構へのWnt/ β カテニンシグナルの関与について解明を進めることで、骨粗鬆症などの骨量減少疾患の治療の開発や、矯正治療の改善などに貢献することを最終目的とする。

3. 研究の方法

(1) 反復的伸展刺激装置の開発：

より効果的な骨形成促進実験システムの開発のため、持続的伸展刺激に加えて、反復的伸展刺激装置の開発を試みる。

(2) Wnt/ β カテニンシグナル関連因子遺伝子の網羅的発現解析：

機械的刺激を与えた縫合部からmRNAを抽出し、数多く存在するWnt/ β カテニンシグナル関連因子を網羅的に解析し、それらのネットワークをGeneChipによって解明する。

(3) リアルタイムPCRによる遺伝子発現変化の確認：

GeneChipの結果から変化が認められる遺伝子について、とくに興味深いと考えられる因子について行う。可能であればIn situ hybridizationによって組織内局在変化を確認する。

4. 研究成果

(1) 反復的伸展刺激装置の開発：

金沢大学・北村准教授、根本教授の協力を得て、反復的伸展刺激装置の開発・作製を行った。

(図1)



(図1：反復骨刺激装置外観)

原理を簡単に述べると、骨組織を固定するためのピンを取り付けられたマイクロスライダのスライド部に、プーリを介して錘を取付け、ソレノイドによりスライダの拘束を開放し、錘の荷重をピンに伝える、という操作を反復することにより、反復的伸展刺激を縫合部組織に加えるというものである。錘の重さを変えることで、荷重を変化させることができる。スライダの拘束を解放する時間の長さや頻度を調節することにより、反復刺激を変化させることも可能である。

ただ、残念なことに、スライダ一部が故障するなど、脆弱な点が見つかりさらに改良が必要な段階にとどまっている。

本装置が稼働することにより、縫合部組織培養系で反復刺激を加える装置が初めて開発されることになり、実験系の幅を広げることができる。今後、改良を加え安定した結果を得ていきたい。

(2) Wnt/ β カテニンシグナル関連因子遺伝子の網羅的発現解析：

機械的刺激を加え（伸展刺激群）、あるいは静置状態で（コントロール）、3時間あるいは6時間、培養したマウス頭頂骨縫合部組織から、それぞれRNAを抽出し、GeneChipによってそれぞれのタイムコースにおける遺伝子発現変化を2回繰り返し検討した。2回目の結果、コントロールと比べて伸展刺激群の遺伝子発現変化量が、1.5倍以上の変化を示し、raw dataの値が300を超えるものは、3時間で増加したものが228個、減少したものが443個、そして6時間で増加したものが238個、減少したものが546個であった。増殖に関与する遺伝子群、移動、接着に関与する遺伝子群などが多かった。

(3) リアルタイムPCRによる遺伝子発現変化の確認：

変化した遺伝子の中でWnt/ β カテニンシグナルに関連のある因子についてリアルタイムPCRによって発現変化を確認した。Wnt因子では、Wnt2(3時間 x1.4, 6時間 x2), Wnt4(3時間 x1.5, 6時間 x1.6), Wnt5b(3時間 x1.7, 6時間 x2.1)、Wnt受容体では、Fzd1(3時間 x1.5, 6時間 x1.7), Fzd9(3時間 x1.5, 6時間 x2)、Wnt阻害因子では、Wif1(3時間 x0.95, 6時間 x0.8), Dkk1(3時間 x1.2, 6時間 x1), Dkk2(3時間 x1.9, 6

時間 x2.1), SFRP4(6時間 x1.2)、という変化率であった。発現変化としては3時間よりも6時間のほうが顕著であるが、それでも2倍程度の変化にとどまっていた。また、阻害因子の中には減少するものもあったが、増加を示すものもあり、単純にWntシグナルが増加する方向に変化をしている訳ではないことが示された。

以上の他に、いくつかの骨形成関連因子についてもリアルタイムPCRで変化を確認したところ、伸展刺激を与えて3時間では、Wntファミリー以外の骨形成促進に関与すると考えられる増殖や骨芽細胞分化促進に関わる局所因子・サイトカイン（BMPファミリー関連因子、EGFファミリー関連因子）について2.5倍以上の発現増加が確認された。これらの局所因子に比して、前述のようにWntファミリー因子の変化はそれほど大きなものではなかった。

従って、機械的刺激による骨形成促進機構におけるWntシグナルの関与は比較的后半期にみられるものであり、それ以前に細胞増殖を促進する因子として、BMP, EGFファミリーの貢献が大きい可能性が示された。

機械的刺激による遺伝子発現変化については、細胞培養系を用いた研究は多いが、多種の細胞が含まれる実際の組織での局所因子やサイトカインの網羅的変化についてのデータは少ない。本研究で示された膜内骨化が営まれる組織におけるデータは他に例を見ない。細胞単独ではなく、骨組織としてどのような反応を示すのかを知るために重要なデータである。今後、さらに骨形成に重要と考えられる因子について、組織内局在を明らかにし、機械的刺激による実際の骨組織内の細胞間相互作用を含めた骨形成促進機構を解明していきたい。

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)

[学会発表] (計1件)

① Mika Ikegame (代表), Mariko Kawai, Yoshiaki Tabuchi, Yukihiro Furusawa, Takashi Kondo, Masaki Nakano, Atsuhiko Hattori and Toshio Yamamoto,

A comprehensive analysis of mechanical stress-regulated gene expression in mouse cranial sutures.

IBMS/JSBMR 第2回合同国際会議,

2013年05月28日～2013年06月01日,

神戸

[その他]

ホームページ等

2012年業績集として掲載予定

(http://www.okayama-u.ac.jp/user/med/Gyoseki/Gyoseki_md/index.htm)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池亀 美華 (IKEGAME MIKA)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：70282986

(2) 研究分担者

北村 敬一郎 (KITAMURA KEIICHIRO)

金沢大学・保健学系・准教授

研究者番号：80283117

(H23→H24：研究連携者)

田渕 圭章 (TABUCHI YOSHIAKI)

富山大学・生命科学先端研究センター・准教授

研究者番号：20322109

(H22：研究連携者)

河井 まりこ (KAWAI MARIKO)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：40379839

(3) 連携研究者

山本 敏男 (YAMAMOTO TOSHIO)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：30107776

根本 鉄 (NEMOTO TETSU)

金沢大学・保健学系・准教授

研究者番号：90126243