

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19760064
 研究課題名（和文） 骨細胞の力学刺激感知・情報伝達メカニズムにおける
 アクチン細胞骨格メカニクス
 研究課題名（英文） Actin Cytoskeletal Mechanics on Mechanosensory Mechanism
 of Osteocyte
 研究代表者
 田中 基嗣（TANAKA MOTOTSUGU）
 金沢工業大学・工学部・講師
 研究者番号：30346085

研究成果の概要：

骨細胞に対する局所力学刺激付与方法，変形量の測定方法，および細胞応答のその場観察方法を確立し，骨細胞においては，細胞体よりも細胞突起の力学応答特性が顕著に高いことを明らかにした。また，骨組織内部の骨細胞と周囲組織の力学刺激付与による変位量の測定方法と，内部骨細胞と周囲組織の変形および細胞応答をその場観察するシステムを構築し，生骨組織に対する変形付与によって内部骨細胞がカルシウム応答を示した瞬間の，内部骨細胞および周囲組織のひずみ量を評価できた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	0	2,100,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	360,000	3,660,000

研究分野：材料力学・複合材料学・バイオメカニクス・バイオマテリアル

科研費の分科・細目：機械工学 機械材料・材料力学

キーワード：

骨細胞・メカノセンシング・カルシウム応答・細胞バイオメカニクス・リモデリング

1. 研究開始当初の背景

骨は，骨系細胞（骨細胞・破骨細胞・骨芽細胞）の生化学的活動の結果として，周囲の力学環境に対して絶えずその構造を適応的に変化・再構築（リモデリング）させている。これらの骨系細胞のなかでも，骨基質内に埋蔵する骨細胞は，骨梁に対する力学負荷にともなう生じる骨基質の変形・損傷場を感知し，ギャップジャンクションにより三次元的に形成した複雑な骨細胞ネットワークにより情報を伝達する働きを持っていると考えられている。また，骨細胞ネットワークによ

って感知・伝達された力学刺激情報は，骨梁周囲に存在する破骨細胞や，骨梁表面に存在しかつ骨細胞ネットワークの末端に位置する骨芽細胞に伝達されると考えられている。最終的に，破骨細胞および骨芽細胞の生化学的代謝活動（骨吸収および骨形成）によって，力学刺激に適応した骨梁構造のリモデリングが達成されると考えられている。すなわち，骨細胞の力学刺激感知メカニズムおよび骨細胞ネットワークにおける力学刺激情報伝達メカニズムを解明することが，骨の適応的リモデリングメカニズムを解明する上で重

要なキーポイントとなる。

そのため、国立診療所兵庫中央病院・九州産業大学・神奈川歯科大学・明海大学、フライエ大学（オランダ）・ニューヨーク市立大学（米国）・テキサス大学健康科学センター（米国）・クリーブランドクリニック（米国）等の諸大学・研究医療機関において、骨細胞の力学刺激感知メカニズムを解明するための試みが、多数なされてきた。なかでも、フライエ大学の Klein-Nulend らは、ニワトリ胚頭蓋冠組織から単離した初代骨細胞を用いて、細胞全体に一樣に付与した流体せん断刺激と破骨細胞阻害因子・骨芽細胞誘導因子（NO および PGE2）産生量の関係を明らかにした。これらの研究は、いずれも細胞全体に一樣に付与された各種の力学刺激に対する骨細胞の生化学的応答に関するものである。骨細胞への分化前の前駆細胞である骨芽細胞をはじめとする種々の細胞における力学刺激感知過程において細胞内骨格構造の一種であるアクチン細胞骨格の関与が示唆されていること、および、単離した初代骨細胞のアクチン細胞骨格が細胞体には存在せず細胞突起に局在していることを考慮すると、骨細胞の力学刺激感知メカニズムおよび骨細胞ネットワークにおける力学刺激情報伝達メカニズムを解明するためには、単一の初代骨細胞の各部位に対して局所的に力学刺激を付与し、力学刺激付与部位と生化学的細胞応答を関連付ける研究が望まれる。

そこで、申請者らはこれまでに、生体組織マトリクス（ニワトリ胚頭蓋冠組織）から単離・培養した初代骨細胞（単離骨細胞）に対してマイクロニードルによる局所力学刺激を付与し、細胞応答としてのカルシウム応答（細胞内 Ca^{2+} 濃度変化）をその場観察し、単離骨細胞がアクチン細胞骨格局在部位である細胞突起への局所力学刺激に対してのみ有意に応答を発現させることを示唆する結果を得た。また、生体組織マトリクスそのものに対して変形を加え、内部に埋在する骨細胞の Ca^{2+} 応答をその場観察し、生体組織マトリクスのマクロな変形と骨細胞のミクロな生化学的応答の関係を検討するための *ex vivo* 実験系の確立に着手してきた。そのため、単離骨細胞に対する局所力学刺激の定量的な制御・付与および生体組織マトリクス内の骨細胞の変形・ひずみの定量評価に基づいて、生理学的レベルの力学刺激と骨細胞のカルシウム応答を詳細に関連付け、アクチン細胞骨格の力学刺激感知メカニズムへの寄与を直接的に解明することが望まれる。また、個々の骨細胞の力学刺激感知だけではなく、骨細胞ネットワークの力学刺激情報伝達挙動について明らかにすることが望まれる。

2. 研究の目的

近年、骨の適応的リモデリング現象に関する研究が数多くなされ、将来的に周囲の力学環境に対して自ら適応的にふるまう材料・構造の創造が期待されている。しかし、現状においては、動物実験によるマクロな骨リモデリング現象の観察や、細胞個々に対するミクロな *in vitro* 実験・観察がほとんどである。実際には、マクロ・ミクロ現象をつなぐ中間（メゾ）領域の骨細胞ネットワークによる力学刺激情報伝達メカニズムが、骨のリモデリング現象に対して重要な役割を担うにもかかわらず、この領域での挙動は現象論的に取り扱われており、未知な点が多く残されている。

本研究では、アクチン細胞骨格メカニクスに着目して骨細胞ネットワークの複雑な力学刺激感知・情報伝達メカニズムを解明することを目的とした。具体的には、

- 1) 単離骨細胞の細胞突起に付与する局所力学刺激を定量的に評価・制御できる手法を確立する
- 2) 単離骨細胞が力学応答を発現させる力学刺激量の閾値を明らかにする
- 3) マクロな変形を受けた生体組織マトリクス内の骨細胞の細胞突起がミクロに受けるひずみ量を定量評価できる手法を確立する、
- 4) 骨細胞の力学刺激応答と付与力学刺激量およびアクチン細胞骨格の相関を明らかにする
- 5) 骨細胞ネットワークにおける力学刺激情報伝達挙動およびそれに及ぼすアクチン細胞骨格の影響をその場観察・定量評価することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 骨組織採取・培養方法

本研究では、13日齢ニワトリ胚より採取した頭蓋冠を用いた。骨組織表面の骨膜中には、骨芽細胞をはじめとする骨細胞以外の細胞が存在するため、Collagenase Type I 溶液中で振盪培養し、骨膜を除去した。次に、EDTA 溶液中で振盪培養する脱灰処理を施した。以上のようにして得られた生骨組織を、 α -MEM に FBS および抗生物質を添加した培養液中において培養した。

(2) 骨細胞単離・培養方法

13日齢ニワトリ胚より採取した頭蓋冠を用いて、Kamioka らの手法に準じ、骨細胞を単離した。単離した骨細胞を、poly-D-lysine および fibronectin でコーティングしたガラスボトムディッシュに播種した。培地として FBS を加えた α -MEM を用いた。

(3) 単離骨細胞への Ca^{2+} 蛍光指示薬の導入

Ca^{2+} 応答観察方法として、Ratiometry 法を用いた。2種類の Ca^{2+} 蛍光指示薬を細胞内に導入し、これらの蛍光輝度比を測定した。

(4) 単離骨細胞へのマイクロパーティクルの接着

骨細胞に付与する直接変形量評価のマーカーとして、 $\phi = 1.0 \mu\text{m}$ の無色マイクロパーティクルを細胞膜に付着させた。細胞膜とマイクロパーティクルとの接着を促進するため、ニワトリ由来の骨細胞膜上に存在するタンパク質に特異的に結合するマウスモノクローナル抗体 OB7.3 を用いて、マイクロパーティクルの表面にあらかじめコーティングした。マイクロパーティクルは、前述の Ca^{2+} 蛍光指示薬導入の際に培地中に懸濁することにより、骨細胞膜に付着させた。

(5) 単離骨細胞への局所的な直接変形付与に対する Ca^{2+} 応答観察

マイクロマニピュレータに接続した先端直径 $1 \sim 2 \mu\text{m}$ のマイクロニードルを、単一の骨細胞に付着させたマイクロパーティクルの近傍に直接押し込むことにより変形を与えた。アクチンフィラメントがほとんど存在しない細胞体部分とアクチンフィラメントが局在する細胞突起部分に対して局所変形を与えた。直接変形付与に対する Ca^{2+} 応答の同時観察には、共焦点レーザー走査型蛍光顕微鏡を用いた。マイクロパーティクルが移動を開始した時間を細胞膜の変形開始時間 $t = 0 \text{ sec}$ とし、 $t = 0 \text{ sec}$ からのマイクロニードル押し込み距離を骨細胞に対する力学刺激量と定義した。マイクロマニピュレータにリニアスライダとピエゾアクチュエータを設置した装置を用いて、マイクロニードル移動速度を制御 ($0.5 \mu\text{m}/\text{sec}$) した。

(6) 骨組織への変形付与方法

生体組織マトリクス (生骨組織) および組織内骨細胞の三次元的な変形を解析するのは困難であるため、骨組織に対して近似的に二次元的 (面内) とみなせる変形を付与することを試みた。ガラスマイクロニードルを 2 本用いて、ガラスボトムディッシュ底面に固定した骨組織の観察面 (x - y 平面) に面内せん断変形を与えた。一方のマイクロニードルの位置は固定したまま、移動用のマイクロニードルを水平方向に移動 ($1 \mu\text{m}/\text{sec}$) させた。なお、マイクロニードルは、先端直径 $2 \sim 5 \mu\text{m}$ の滑らかな状態になるよう加工したものをを用いた。

(7) 骨細胞・周囲組織のひずみ解析方法

骨細胞のひずみ解析にあたっては、その形状変化を容易に観察・抽出できるようにする必要がある。そこで、OB7.3 を一次抗体とし、Alexa Fluor 594 Goat Anti-Mouse IgG を二次抗体として、骨細胞膜に対して免疫蛍光染色を施した。次に、変形付与前後における蛍光観察画像を比較して細胞膜変位を導出する必要があるが、細胞突起は組織内に三次元的に伸展・分布しており、本手法においても若干の厚み方向 (z 方向) の変形が生じると考え

られる。そこで、共焦点レーザー走査型蛍光顕微鏡を用いて断層撮影し、注目する骨細胞の近傍 z 方向約 $15 \mu\text{m}$ 分 ($0.5 \mu\text{m}$ 間隔 30 枚) の観察画像を重ねあわせ、1 枚の x - y 平面画像に表示した。

このよう得られた変形付与前後の蛍光画像について、Particle Image Velocimetry (PIV) 画像解析ソフトウェアを用いて比較することにより、骨細胞の細胞膜変位場を求めた。また、骨細胞周囲の組織の変位解析には、共焦点レーザー走査型蛍光顕微鏡により蛍光観察画像と同時に取得した透過光観察画像を用いた。組織中には配向性を持ったコラーゲン線維が存在し、変形付与前後におけるこれらのパターンの移動をもって組織内の変位分布を比較的精度良く導出することができる。まず、細胞体については、細胞突起の根元を端点とする三角形要素に分割し、その Green ひずみを導出した。その妥当性を検討するために、観察対象の骨細胞周囲の $27 \mu\text{m}$ 四方の領域について、第一次近似的にその変形状態が均一であると仮定し、領域端点の変位より周囲組織のマクロな Green ひずみを求め、細胞体のひずみと比較した。次に、細胞突起を線分の集合とみなし、端点の変位より細胞突起線分の長手方向ひずみを導出した。また、細胞突起のひずみを求めたのとまったく同じ位置および長さの骨基質線分要素の長手方向ひずみを求め、細胞突起のひずみと比較した。

(8) Ca^{2+} 応答のその場観察方法

細胞内 Ca^{2+} 濃度変化を変形付与中の経時画像より同時観察した。細胞内 Ca^{2+} 濃度変化は、Ratiometry 法により観察した。マイクロニードル移動開始時間を $t = 0 \text{ sec}$ と定義した。

4. 研究成果

(1) 単離骨細胞および単離骨芽細胞の力学刺激応答

単離骨細胞に局所変形を与えた前後の蛍光輝度観察をおこなった結果を、以下に説明する。

骨細胞の細胞突起の根元部分に局所的な力学刺激を与えた際、蛍光輝度比が変形付与前に比べて 1.5 倍以上に増加し、変形付与にともなう Ca^{2+} 応答の発生が確認できた。これにより、骨細胞に対して精密マイクロマニピュレータシステムに取り付けたマイクロニードルを用いて局所力学刺激を付与し、細胞応答をその場観察するシステムを構築できたといえる。

次に、骨細胞の細胞体部位および細胞突起部位にそれぞれ付着したマイクロパーティクル近傍への局所的な直接変形付与に対する Ca^{2+} 応答発生を定量評価した。その結果、細胞体への局所力学刺激に対する応答細胞

率が 8.0 %であったのに対し、細胞突起への局所力学刺激に対する応答細胞率は 35.0 %であった。すなわち、細胞突起への直接変形付与に対する Ca^{2+} 応答が、細胞体への直接変形付与に対してきわめて高い確率で発生した。また、応答発生に要した局所力学刺激量（マイクロビーズの移動量）は、細胞体に局所力学刺激を付与した場合は平均 5 μm 程度であったのに対し、細胞突起に局所であった。すなわち、細胞突起部位においては、細胞体部位と比べて小さい刺激量によって Ca^{2+} 応答の発生に至ったことがわかる。以上より、細胞突起の力学応答特性が顕著に高いことを明らかにした。

従来、骨基質中の骨細胞は、置かれる力学環境の違いによって、部位ごとに異なる力学刺激応答挙動を示すことが考えられていた。一方、本実験では、骨基質内における不均衡な力学環境要因がない状態で、細胞突起部位における高い Ca^{2+} 応答発生率と少ない刺激量での Ca^{2+} 応答発生が観察された。このことは、骨細胞の力学刺激感知特性が、骨基質内での力学環境によるものだけではなく、骨細胞自身の部位における構造の違いに起因することを示唆する結果であるといえる。細胞に付与される力学刺激が、細胞内への Ca^{2+} 動員を発生させる機構においては、アクチンフィラメントなどの細胞骨格構造の存在が重要な役割を果たすと考えられている。本実験において観察された、単離骨細胞の細胞突起部位における鋭敏な力学刺激感知特性は、単離骨細胞における細胞突起部位に局在したアクチンフィラメント構造との関連を示唆するものであり、骨細胞におけるアクチンフィラメント構造と Ca^{2+} 応答発生との関連性を初めて示した結果であるといえる。

(2) 生体組織マトリクス中の骨細胞および周囲組織のひずみ解析

まず、生体組織マトリクス内部の骨細胞と周囲組織の力学刺激付与による変位量を免疫蛍光染色および画像解析により抽出する方法の確立を目指した。具体的には、生体組織マトリクスへの局所変形負荷により細胞突起線分に生じた長手方向ひずみおよび細胞体に生じた主ひずみを評価した。なお、細胞突起線分に生じた長手方向ひずみについては、細胞突起線分の長さごとに整理した。また、骨細胞周囲の組織のひずみについても評価した。その結果、骨細胞周囲の生体組織マトリクスのひずみは、ピークを示す角度およびピーク値の正負が想定される変形場（二次元的な局所せん断変形）に定性的に対応した。よって、骨細胞周囲の組織におけるひずみを定性的に評価できたといえる。

次に、5.4 μm 以上の長さを有する細胞突起線分においては、その長手方向ひずみ値が、

周囲組織のひずみ値と比較的近い分布形状を示した。一方、5.4 μm 以下の長さの細胞突起線分における長手方向ひずみ値は、その正負については周囲組織のひずみ値と同様の傾向を示すものの、その値が周囲組織のひずみ値から大きく離れているものも多くみられた。これは、組織の不均一性を考慮していないことと、短い細胞突起線分においては解像度の限界に起因する評価誤差が大きく影響を及ぼしていることが原因と考えられる。以上より、特に 5.4 μm 以上の長さを有する細胞突起線分においては、長手方向ひずみの評価結果は妥当といえる。

また、細胞体における主ひずみの平均値もあわせて評価した。細胞体に生じる主ひずみ値は、周囲組織のひずみ値と比較的良く対応した。以上のように、マイクロニードルを用いて、組織およびその内部の骨細胞に二次元的な局所せん断変形を付与することができた。また、本研究で考案したひずみ解析手法により、周囲組織のひずみ、細胞突起線分の長手方向ひずみおよび細胞体の主ひずみを導出することができたといえる。

(3) 生体組織マトリクスの変形にともなう骨細胞の力学刺激量と生化学応答の同時計測・観察

生体組織マトリクス（生骨組織）に対して骨細胞周辺部位に局所変形を加えた際の骨細胞の蛍光輝度比変化観察結果を、以下に説明する。

まず、骨細胞が Ca^{2+} 応答を発現させた瞬間における骨細胞および周囲組織のひずみの評価を試みた。マイクロニードル移動による周囲組織および骨細胞の変形は、マイクロニードル移動量に対して線形に増加すると仮定し、骨細胞がカルシウム応答を発現させた瞬間における骨細胞および周囲組織のひずみを内挿により求めた。ただし、変形付与前における蛍光輝度比の 1.1 倍がノイズのレベルであり、はじめて蛍光輝度比がノイズレベルを越えた瞬間 ($t = 2.5 \text{ sec}$ の時点) を Ca^{2+} 応答発生時刻と定めた。解像度の影響による誤差が少ないことが期待される 3.6 μm 以上の長さの線分要素のみについて評価したところ、骨組織の変形にともなうカルシウム応答発生時において、骨細胞の細胞体には、最大主ひずみで 2 %、および最小主ひずみで -0.6 %程度のひずみが生じていることがわかる。また、このとき細胞突起には、-6~2 %程度のひずみが生じていることがわかる。すなわち、組織内骨細胞において、細胞体あるいは細胞突起に数%オーダーのひずみが生じたときに、 Ca^{2+} 応答が発生した。

過去の *in vitro* での研究例においては、骨系細胞の生化学応答発生に必要なひずみ量は 1~10 %のオーダーであると言われている。特

に、Youらは、伸展性のある基質上で骨細胞樹立株 MLO-Y4 を培養し、1 Hz の繰り返しひずみを与えたところ、0.1 % のひずみ（生理的レベル）ではカルシウム応答が見られなかったのに対して、10 % のひずみで Ca^{2+} 応答を示す細胞数が顕著に増加したことを報告している。これらの報告は、*ex vivo* 実験系を用いた本実験結果とほぼ一致しており、直接的な変形によるカルシウム応答発生のためには、数%程度の大きいひずみが必要であることが示唆された。

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2件）

① ADACHI TAIJI, AONUMA YUKI, TANAKA MOTOTSUGU, HOJO MASAKI, TAKANO-YAMAMOTO TERUKO, KAMIOKA HIROSHI, Calcium Response in Single Osteocytes to Locally Applied Mechanical Stimulus: Differences in Cell Process and Cell Body, *Journal of Biomechanics*, in print, 査読有

② AONUMA YUKI, ADACHI TAIJI, TANAKA MOTOTSUGU, HOJO MASAKI, TAKANO-YAMAMOTO TERUKO, KAMIOKA HIROSHI, Mechanosensitivity of A Single Osteocyte: Difference in Cell Process and Cell Body, *Journal of Biomechanical Science and Engineering*, Vol.2, Suppl.1, p.S165 (2007), 査読有

〔学会発表〕（計6件）

① AONUMA YUKI, ADACHI TAIJI, TANAKA MOTOTSUGU, HOJO MASAKI, TAKANO-YAMAMOTO TERUKO, KAMIOKA HIROSHI, Site-Dependence of Mechanosensitivity in Isolated Osteocytes, The 13th International Conference of Biomedical Engineering, 2008年12月3～6日, Singapore

② 青沼有紀, 安達泰治, 田中基嗣, 北條正樹, 山本照子, 上岡寛, 骨マトリクスの変形に対する骨細胞のカルシウム応答観察, 第26回日本骨代謝学会学術集会, 2008年10月29～31日, 大阪国際会議場

③ ADACHI TAIJI, AONUMA YUKI, TANAKA MOTOTSUGU, HOJO MASAKI, TAKANO-YAMAMOTO TERUKO, KAMIOKA HIROSHI, Mechanical Stimulus in Isolated Osteocytes, 第31回日本バイオ

レオロジー学会年会, 2008年6月5～6日, 東京大学小柴ホール

④ 青沼有紀, 安達泰治, 田中基嗣, 北條正樹, 山本照子, 上岡寛, 骨基質の変形にともなう骨細胞の変形およびカルシウム応答の観察, 日本機械学会バイオエンジニアリング部門第20回バイオエンジニアリング講演会, 2008年1月25～26日, 芝浦工業大学豊洲キャンパス

⑤ AONUMA YUKI, ADACHI TAIJI, TANAKA MOTOTSUGU, HOJO MASAKI, TAKANO-YAMAMOTO TERUKO, KAMIOKA HIROSHI, Mechanosensitivity of A Single Osteocyte: Difference in Cell Process and Cell Body, The 3rd Asian Pacific Conference on Biomechanics, 2007年11月5～8日, 東京大学生産技術研究所

⑥ 青沼有紀, 安達泰治, 田中基嗣, 北條正樹, 山本照子, 上岡寛, 単離骨細胞の細胞突起／細胞体の力学的刺激に対するカルシウム応答の違い, 第25回日本骨代謝学会学術集会, 2007年7月19～21日, 大阪国際会議場

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等：なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

田中 基嗣 (TANAKA MOTOTSUGU)

金沢工業大学・工学部・講師

研究者番号：30346085

(2)研究分担者：なし

(3)連携研究者：なし