

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 4月 12日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22792051

研究課題名（和文） 生体ライブイメージングを用いた骨組織への刺激に対する細胞間伝達機構の解明

研究課題名（英文） Direct imaging of flow-induced oscillatory calcium rise in living bone

研究代表者

石原 嘉人（ISHIHARA YOSHIHITO）

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：70549881

研究成果の概要（和文）：骨の代謝調節は、骨表面に存在する骨芽細胞と破骨細胞および骨深部に存在する骨細胞の3次元的情報伝達により起こると考えられている。しかし、周囲を堅い骨基質に覆われている細胞の特性上、骨組織中での動態の解明は国内外で未だ実現に至っていない。研究者らは本研究で生きた骨組織を用い、その中に存在する骨系細胞によって営まれるカルシウム応答をリアルタイムで解析し、さらに応答細胞がどのように周囲の細胞へ情報を伝えているのかの一部を解明した。

研究成果の概要（英文）：Bone cells form a complex three-dimensional network consisting of osteoblasts and osteocytes embedded in a mineralized extracellular matrix. Ca^{2+} acts as a ubiquitous secondary messenger in various physiological cellular processes and transduces numerous signals to the cell interior and between cells. However, the intracellular Ca^{2+} dynamics of bone cells have not been evaluated in living bone. In the present study, we developed a novel *ex-vivo* live Ca^{2+} imaging system that allows the dynamic intracellular Ca^{2+} concentration ($[Ca^{2+}]_i$) responses of intact chick calvaria explants to be observed without damaging the bone network. Our live imaging analysis revealed for the first time that both osteoblasts and osteocytes display repetitive and autonomic $[Ca^{2+}]_i$ oscillations *ex vivo*.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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

生体は、常に外界から様々なメカニカルストレスを受けている。特に骨組織は、メカニカルストレスに応答して骨量の維持および再構築がたえず行われている。そしてその代謝調節は、骨表面に存在する骨芽細胞と破骨細胞

および骨深部に存在する骨細胞とが3次元的な細胞性ネットワークを介して機械的刺激を感知し、協調的かつ連鎖的な情報伝達により自らの形成・維持を行うと考えられている。しかし、骨組織中での機械的刺激に対す

る細胞応答の観察は周囲を堅い骨基質に覆われている細胞の特性上非常に困難を極めており、その動態の解明は国内外で未だ実現に至っていない。

カルシウム (Ca^{2+}) は細胞内外における重要な情報伝達物質であり、メカニカルストレスを含めた様々な刺激に応じて周期的な Ca^{2+} 濃度の上昇を引き起こす。この現象は Ca^{2+} オシレーションと呼ばれ、その時空間的な特性は骨代謝調節を含む広範な生理機構に関与すると考えられている。しかし、3次元的な骨芽細胞-骨細胞ネットワークから成り立つ骨組織中での Ca^{2+} オシレーションの動態についても周囲の骨基質が障壁となるためこれまで不明であった。

2. 研究の目的

本研究は生きた骨組織を用いて Ca^{2+} イメージングを行い、その中に存在する骨芽細胞と骨細胞によって営まれる自律性細胞内 Ca^{2+} オシレーションの存在について時空間的な特性をリアルタイム解析することを第一の目的とした。またそれらの現象に対する制御機構について、応答細胞がどのように周囲の細胞へ情報を伝えているのかを、細胞内情報伝達系の一つである小胞体 Ca^{2+} ポンプと細胞間情報伝達の調節因子であるギャップ結合 (GJ) に着目して検討した。

3. 研究の方法

(1) ニワトリ胚頭蓋骨からの骨片採取

胎生 16 日齢のニワトリ胚から頭蓋骨を採取し、骨膜を取り除いた後 2x2 cm の大きさにトリミングを行った。胎生期の頭蓋骨は薄く、そのまま観察することが可能である。

(2) 蛍光染色および切片作成

トリミングされたニワトリ胚頭蓋骨を蛍光カルシウムインディケーター Fluo8-AM (10 μM) にて生きた状態のまま蛍光染色し、骨

組織内に存在する細胞を生きた状態のまま光学的に可視化させた。アセトキシメチル (AM) 基は電氣的に中性の分子で、細胞膜透過性を有する。一度細胞内に入ると、細胞内エステラーゼによって AM 基は切断され、色素は細胞内に保持される。その後 2%FBS 培養液へ入れ 37°C 5%CO₂ 環境下にて 60 分培養を行った後、培養液を α -MEM へ置換し、スライドガラス上で切片作成した。

(3) 共焦点レーザー顕微鏡によるリアルタイム観察

観察は共焦点レーザー顕微鏡システム

FLUOVIEW FV500 (OLYMPUS) を用い、3秒間隔100回連続でのタイムラプス撮影によって行った。共焦点レーザー顕微鏡は、共焦点の位置にピンホールを置くことによって焦点以外からの光をカットし、焦点からの光のみを検出する。そのため通常の蛍光顕微鏡と比べ分解能が高く、深部の骨細胞の観察に適している。

(4) 時空間的解析

共焦点レーザー顕微鏡から得られた連続画像から全細胞中におけるカルシウム応答を示した細胞の割合、その応答の強さ、頻度という時空間的な特性を解析した。また、骨組織表面に存在する骨芽細胞と、深部に存在する骨細胞について比較検討を行った。

(5) 細胞間伝達因子との関連性の検討

細胞内情報伝達系の一つである小胞体 Ca^{2+} ポンプと細胞間情報伝達の調節因子であるギャップ結合 (GJ) に着目し、それぞれの因子に対する阻害剤を前投与し、細胞応答の比較検討を行った。

(6) 統計解析

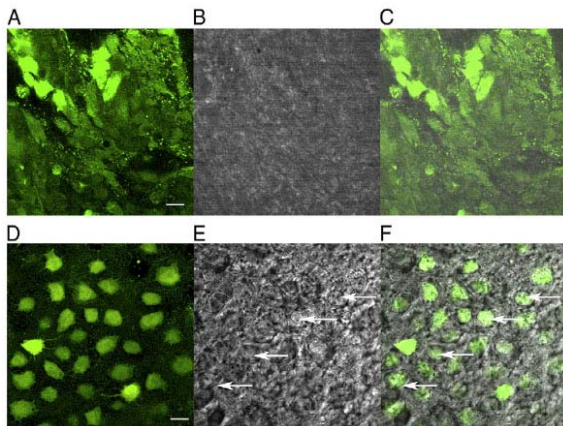
すべての結果はノンパラメトリック法であるマンホイットニーUテストにより統計処理

した。

4. 研究成果

(1) 生骨組織におけるカルシウムインディケーターの染色

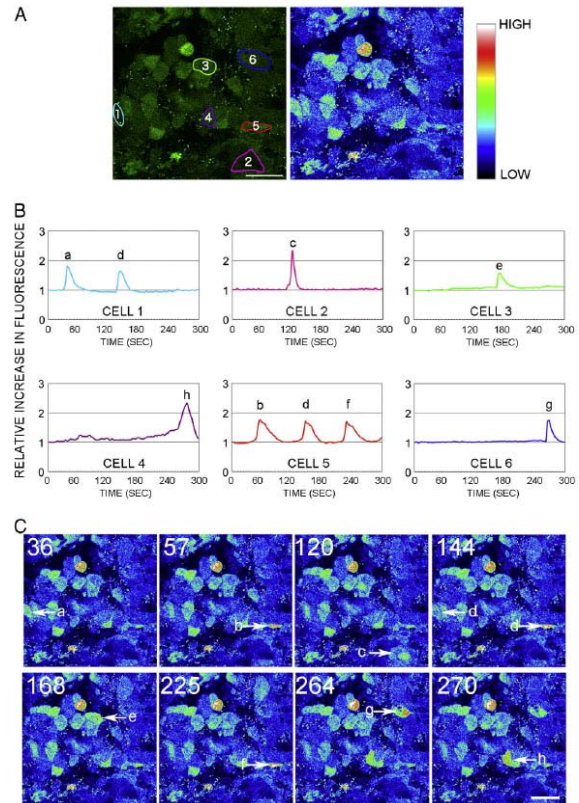
ニワトリ胚頭蓋骨をカルシウムインディケーターFluo8-AMにて蛍光染色した。図のA-Cは骨組織表面の骨芽細胞層を示し、D-Fは表面から15um深部に位置する骨細胞層を示す。



上記図のA, DはFluo8による蛍光染色像、B, Eは同部の微分干渉顕微鏡像、C, Fはそれぞれの重ね合わせ像である (Bar = 10um, 矢印は骨小腔を示す。) ニワトリ胚頭蓋骨中の骨芽細胞および深部の骨細胞は均一にFluo8による蛍光染色がされており、骨小腔部に蛍光染色された細胞が位置することからも深部で観察された細胞が骨細胞であると定義出来た。

(2) 生骨組織中の骨芽細胞における自律性細胞内Ca²⁺オシレーションのリアルタイム観察

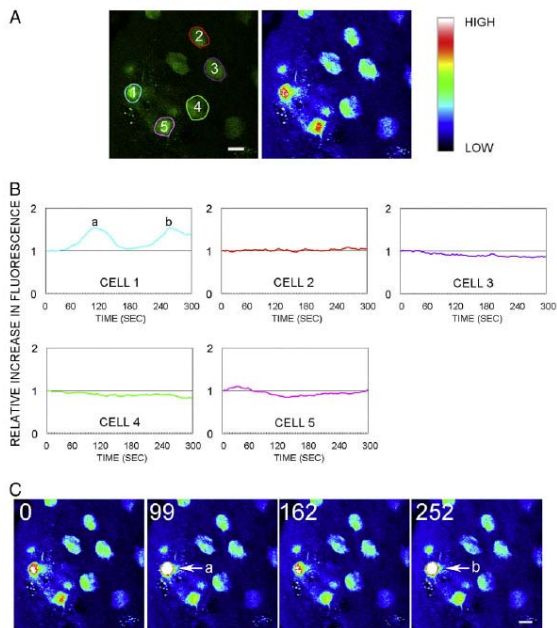
共焦点レーザー顕微鏡を用い、生骨組織表層の骨芽細胞について3秒間隔100回連続でのタイムラプス撮影を行った一例を示す。



上記図のA左はFluo8による骨芽細胞蛍光染色像、右は輝度値に応じて疑似化した像である。BはAで示した細胞1-6について300秒の連続撮影を行った輝度値の変化を示す。CはBのグラフからカルシウム反応を示したa-hにおける疑似蛍光像である (Bar = 50um, 矢印は反応を示した細胞を示す)。定常状態における骨芽細胞は、様々なパターンで周期的カルシウム濃度の上昇を引き起こす事が示された。

(3) 生骨組織中の骨細胞における自律性の細胞内Ca²⁺オシレーションのリアルタイム観察

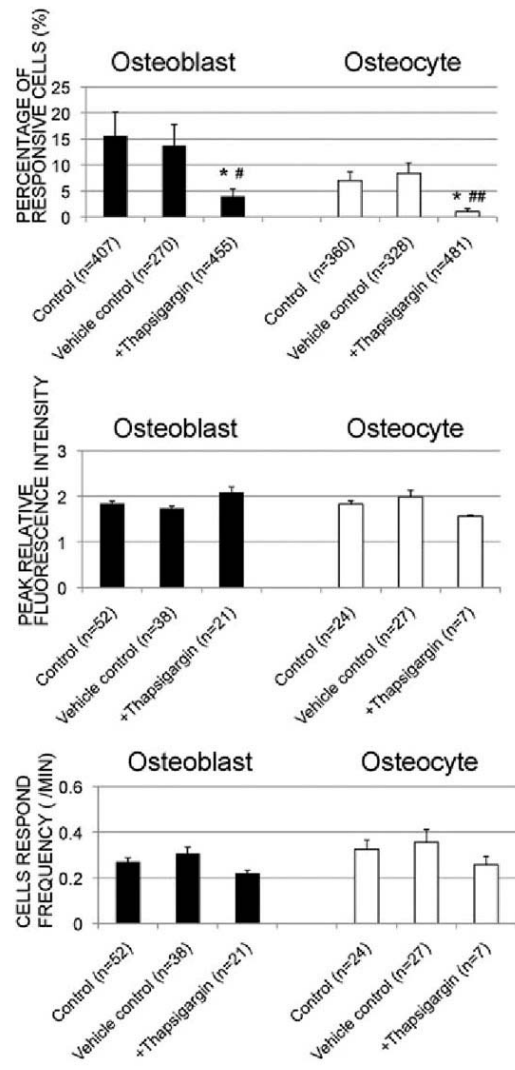
共焦点レーザー顕微鏡を用い、生骨組織表層の骨細胞について3秒間隔100回連続でのタイムラプス撮影を行った一例を示す。



上記図のA左はFluo8による骨細胞蛍光染色像、右は輝度値に応じて疑似化した像である。BはAで示した細胞1-5について300秒の連続撮影を行った輝度値の変化を示す。CはBのグラフからカルシウム反応を示したa-bにおける疑似蛍光像である(Bar = 10um, 矢印は反応を示した細胞を示す)。定常状態における骨細胞においても、周期的カルシウム濃度の上昇を引き起こす事が示されたが、反応しない細胞も認められた。

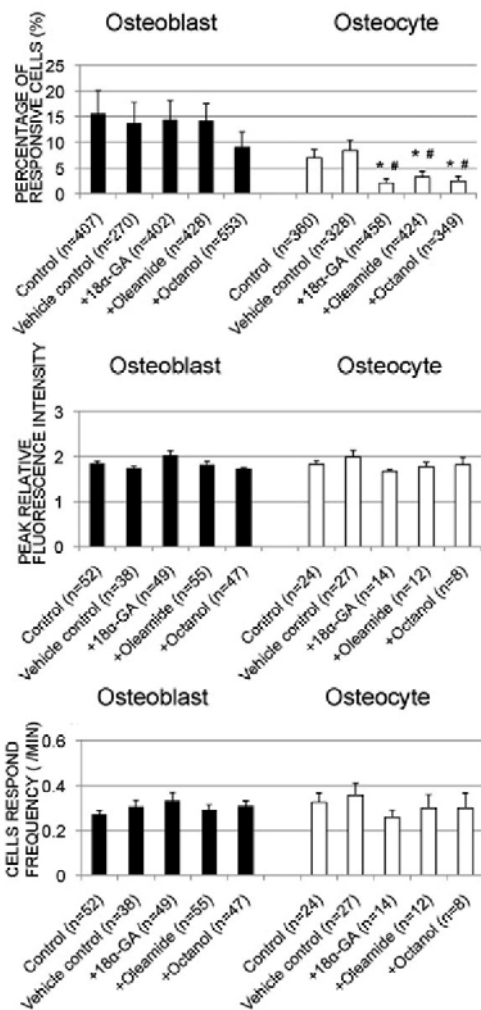
(4) 生骨組織中における自律性細胞内 Ca^{2+} オシレーションの制御機構 -小胞体カルシウムポンプについて-

共焦点レーザー顕微鏡から得られた連続画像から全細胞中におけるカルシウム応答を示した細胞の割合、その応答の強さ、頻度という時空間的特性を解析した結果を下図に示す。定常状態で15.6%の骨芽細胞および7.0%の骨細胞にカルシウムオシレーションを認めた。小胞体カルシウムポンプを阻害した結果、骨芽細胞と骨細胞の細胞応答率は有意な減少を示した。反応群におけるオシレーションの頻度と高さは、骨芽細胞および骨細胞において有意な変化を認めなかった。



(5) 生骨組織中における自律性細胞内 Ca^{2+} オシレーションの制御機構 -ギャップ結合について-

ギャップ結合は、骨細胞同士や骨芽細胞同士だけでなく、骨細胞と骨芽細胞とをシンクロナイズさせる細胞間情報伝達因子である。4)と同様にギャップ結合を阻害した場合におけるカルシウム応答を示した細胞の割合、その応答の強さ、頻度という時空間的特性について解析結果を下図に示す。骨芽細胞の細胞応答は変化を認めなかったが、骨細胞はその反応率において有意に減少した。反応群におけるオシレーションの頻度と高さは、骨芽細胞および骨細胞において有意な変化を認めなかった。



本研究からカルシウムを指標とした細胞単位の応答を異種細胞群の集合体からなる骨組織中で生きた状態のまま観察し、時空間的な比較検討を行う事に成功した。さらに、骨組織中の骨芽細胞および骨細胞には自律性の細胞内Ca²⁺オシレーションが存在する事を発見した。このオシレーションは小胞体カルシウムポンプやギャップ結合によって調節を受ける事が示唆され、伝達系の一部が明らかとなった。本実験系は細胞間コミュニケーションなどの生体システムを維持しており、より生体を反映した結果であると考え。今後はメカニカルストレスへの応答をリアルタイムで解析する装置の開発を行い、さらなる検討を行いたい。

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)

[雑誌論文] (計 4 件)

1. Yoshihito Ishihara, Yasuyo Sugawara, Hiroshi Kamioka, Noriaki Kawanabe, Hiroshi Kurosaka, Keiji Naruse, Takashi Yamashiro. *In situ* imaging of the autonomous intracellular Ca²⁺ oscillations of osteoblasts and osteocytes in bone **Bone** 2012 50(4):852-852 査読あり
2. Satoru Hayano, Hiroshi Kurosaka, Takeshi Yanagita, Ina Kalus, Fabian Milz, Yoshihito Ishihara, Md. Nurul Islam, Noriaki Kawanabe, Masahiro Saito, Hiroshi Kamioka, Taiji Adachi, Thomas Dierks, Takashi Yamashiro. Roles of Heparan Sulfate Sulfation in Dentinogenesis **Journal of Biological Chemistry** 2012 in press 査読あり
3. Noriaki Kawanabe, Satoko Murata, Hiroaki Fukushima, Yoshihito Ishihara, Takeshi Yanagita, Emmy Yanagita, Mitsuaki Ono, Hiroshi Kurosaka, Hiroshi Kamioka, Tomoo Itoh, Takuo Kuboki, Takashi Yamashiro. Stage-specific embryonic antigen-4 identifies human dental pulp stem cells. **Experimental Cell Research** 2012 318(5):453-63 査読あり
4. Yasuyo Sugawara, Ryoko Ando, Hiroshi Kamioka, Yoshihito Ishihara, Tadashi Honjo, Noriaki Kawanabe, Hiroshi Kurosaka, Teruko Takano-Yamamoto, Takashi Yamashiro. The three-dimensional morphometry and cell-cell communication in the osteocyte network in chick and mouse embryonic calvaria. **Calcified Tissue International** 2011 88(5):416-426 査読あり

〔学会発表〕(計 13 件)

1. 菅原 康代, 上岡 寛, 石原 嘉人, 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, 2011 年 10 月 18-20 日, 名古屋
 2. 石原 嘉人, 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, 2011 年 10 月 18-20 日, 名古屋
 3. 菅原 康代, 上岡 寛, 石原 嘉人, 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 53 回歯科基礎医学会学術大会・総会, 2011 年 9 月 30 日-10 月 1 日, 岐阜
 4. Ishihara Y., *Ex-vivo* imaging of the autonomous intracellular Ca^{2+} oscillations of osteoblasts and osteocytes in bone, The ASBMR 33th Annual Meeting, September 16-20th, 2011, San Diego, USA
 5. Kawanabe N., Murata S., Fukushima H., Ishihara Y., Stage-specific embryonic antigen-4 identifies human dental pulp stem cells, The ASBMR 33th Annual Meeting, September 16-20th, 2011, San Diego, USA
 6. 石原 嘉人, 骨組織内の *Ex vivo* 蛍光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リアルタイム解析, 第 52 回歯科基礎医学会学術集会, 2010 年, 9 月 20-22 日, 東京
 7. 今井 裕一, 上岡 寛, 石原 嘉人, 超高压電子顕微鏡を用いた骨基質と骨細胞突起の 3 次元再構築, 第 69 回日本矯正歯科学会大会, 2010 年 9 月 27-29 日, 横浜
 8. 石原 嘉人, 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, 2010 年 9 月 27-29 日, 横浜
 9. 吉川 祐介, 石原 嘉人, 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について, 第 69 回日本矯正歯科学会大会, 2010 年 9 月 27-29 日, 横浜
 10. 石原 嘉人, 骨組織内カルシウムイメージングを用いた機械的刺激に対する細胞応答のリアルタイム解析, 第 28 回日本骨代謝学会学術集会, 2010 年 7 月 21-23 日, 東京
 11. Kawanabe N., Murata S., Murakami K., Ishihara Y., SSEA-4 identifies human periodontal ligament stem cells, 88th International Association for Dental Research & American Association for Dental Research, Jul, 14-17th, 2010, Barcelona, Spain
 12. Ishihara Y., Direct Imaging of Flow-induced Oscillatory Calcium Rise in Living Bone, 88th International Association for Dental Research & American Association for Dental Research (IADR Hatton award competition), Jul, 14-17th, 2010, Barcelona, Spain
 13. 上岡 寛, Sakhr A Murshid, 石原 嘉人, 超高压電子顕微鏡による骨細胞の観察, 第 66 回日本顕微鏡学会, 2010 年 5 月 23-26 日, 名古屋
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
石原 嘉人 (ISHIHARA YOSHIHITO)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号: 70549881
 - (2) 研究分担者
 - (3) 連携研究者