

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 19 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20578

研究課題名(和文)骨のメカニカルストレス応答機構におけるアドヘレンスジャンクションの機能の解明

研究課題名(英文)Role of adherens junction on cell mechanosensing system in bone

研究代表者

金原 正敬(KINBARA, MASAYUKI)

東北大学・歯学研究科・助教

研究者番号：00637960

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、骨細胞および骨芽細胞による骨のメカニカルストレス応答機構における Adherens junction (AJ) の関与について検討した。骨細胞、骨芽細胞ともに、ピンキュリンの発現およびCa応答率は、中密度および高密度培養条件で同程度であった一方、低密度培養条件ではいずれも低下が認められた。また、AJ形成を阻害したところ、中密度および高密度培養条件においてCa応答率の低下が認められた。以上より、骨細胞および骨芽細胞による骨のメカニカルストレス応答機構におけるAJの関与が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, the involvement of adherens junction (AJ) in the response to mechanical stress in osteocytes and osteoblasts was examined. In both osteocytes and osteoblasts, the expression of vinculin and the percentage of responsive cells were comparable in medium density and high density culture conditions, whereas in low density culture conditions, both were lowered. In addition, the inhibition of AJ formation resulted in a decrease in the percentage of responsive cells in medium density and high density culture conditions. These findings suggest that AJ is involved in cell mechanosensing system in bone.

研究分野：医歯薬学

キーワード：骨 メカニカルストレス応答 アドヘレンスジャンクション

1. 研究開始当初の背景

矯正歯科治療において歯に矯正力が負荷されると、牽引側と圧迫側それぞれの歯根膜および歯槽骨に伸展と圧迫が生じる。歯槽骨ではメカニカルストレスに応答して、牽引側の骨芽細胞による骨形成と圧迫側の破骨細胞による骨吸収による骨のリモデリングが起こり、歯が一定方向に移動する。これらの生体反応は矯正歯科治療の基盤をなすものであり、メカニカルストレスに応答する骨のリモデリングのメカニズムの解明は極めて重要な課題である。

近年、私達は、骨のリモデリングにおいて、骨芽細胞、破骨細胞に加えて、骨細胞が極めて重要に関わることを報告し、骨基質中に埋没した形で存在する骨細胞が、多数の細胞突起を伸ばして骨細胞同士あるいは骨組織表面の骨芽細胞と連結して細胞間ネットワークを形成していることを明らかにしてきた。このネットワーク構造の特性から、骨細胞および骨芽細胞は骨へのメカニカルストレスを感知し、骨系細胞の活動を調節するメカノセンサーとして機能すると考えられてきている。メカニカルストレス感知機構の基盤には細胞の構造があり、構造を維持する細胞骨格および相互作用分子がメカニカルストレス応答には重要であると考えられている。前述の研究に加えて、私達は、骨細胞および骨芽細胞の細胞間ネットワークを介したメカニカルストレス応答において、細胞骨格やアクチン結合蛋白質ピンキュリン、アクチン線維を介する細胞接着装置 Focal adhesion (FA) が重要に関わることを報告し、骨のメカニカルストレス応答機構にはアクチン線維を介する細胞接着が重要に関わることを明らかにしてきたが、その詳細は未だ不明のままである。

アクチン線維を介する細胞接着装置には、インテグリンを介する細胞-細胞外基質間の接着装置である FA の他に、カドヘリンを介

する細胞-細胞間の接着装置である Adherens junction (AJ) も知られ、いずれの接着装置にもピンキュリンは構成分子として発現する。近年、上皮細胞や線維芽細胞を用いた研究において、AJ に局在するピンキュリンが張力依存的に濃縮することが報告され、AJ およびピンキュリンの力学センサーとしての機能が注目されてきている。また、骨芽細胞にも AJ が発現し、AJ 形成が骨芽細胞分化に必要であるといった報告もある。これらの知見と、骨のメカニカルストレス応答機構にアクチン線維を介する細胞接着が重要であることを示した私達の過去の知見を併せて踏まえると、骨のメカニカルストレス応答機構においても AJ が重要に関与している可能性が推察されるが、このような研究はこれまで行われてきていない。

2. 研究の目的

本研究では、骨のメカニカルストレス応答においても AJ が重要に関わることを予測し、骨細胞および骨芽細胞による骨のメカニカルストレス応答機構における AJ の関与について検討した。

3. 研究の方法

(1) プライマリー骨細胞の単離・培養

DMP1-Topaz マウスより摘出された頭蓋骨を段階的に酵素処理し、骨細胞および骨芽細胞を単離した。酵素処理は Halleux らの方法を改変して行い、酵素処理溶液には collagenase 溶液、および EDTA 溶液を用いた。回収された細胞は FBS 添加 minimum essential medium 培地に懸濁し、細胞密度を調整して培養した。

(2) 蛍光免疫染色

単離した骨細胞および骨芽細胞を播種、培養し、ホルマリン/PBS 溶液にて固定した。続いて、Triton X-100, BSA/PBS 溶液にてブロッキング処理と細胞膜の浸透化処理、各種

抗体を用いた一次抗体および二次抗体反応を行い、封入後、高解像度顕微鏡にて観察した。

(3) カルシウムイメージング

単離した骨細胞および骨芽細胞をガラスボトムディッシュに播種した後、蛍光カルシウム指示薬である Fura-2 AM で処理し、シェアストレス負荷装置に装着した。その後シェアストレスを負荷し、経時的に蛍光顕微鏡にて観察を行った。MetaFluor ソフトウェアを用いて制御した高速 CCD カメラにて、ストレス負荷直前より一定時間にかけてタイムラプス画像を取得し、細胞内へのカルシウム流入速度、蛍光輝度変化、応答細胞の割合を解析し、メカニカルストレス応答性を比較した。

(4) AJ 形成抑制

AJ は細胞膜外にあるカドヘリンが細胞間で互いに接着することで形成されるが、カドヘリンブロック抗体を使用すると、この細胞外のカドヘリン同士の結合を直接阻害できる。骨細胞および骨芽細胞を培養する際に、N-cadherin ブロック抗体を用いて AJ 形成を抑制した。

4 . 研究成果

(1) 骨細胞・骨芽細胞におけるビンキュリンおよび細胞骨格分子の発現・分布の解析

プライマリー骨細胞および骨芽細胞の単離、骨細胞・骨芽細胞におけるビンキュリンおよび細胞骨格分子の発現・分布の解析を検討した。マウス頭蓋骨よりマウスプライマリー骨細胞・骨芽細胞を単離する手法を確立し、単離された骨細胞および骨芽細胞において細胞辺縁領域でのビンキュリンの強い局所的発現を観察するとともに、これらの領域でのビンキュリンとアクチンとの共局在を認めた。

(2) 細胞間接着調整（細胞密度調整）によるビンキュリン発現およびメカニカルストレ

ス応答性の変化

プライマリー骨細胞および骨芽細胞における細胞間接着調整（細胞密度調整）に伴うビンキュリン発現およびメカニカルストレス応答性の変化について検討した。骨細胞、骨芽細胞いずれにおいても、中密度および高密度条件ではビンキュリンの発現強度は同程度であったが、低密度条件ではビンキュリンの発現強度の低下が認められた。また、メカニカルストレス負荷実験を行い、Ca 応答率を比較したところ、中密度および高密度条件では Ca 応答率は同程度であった一方、低密度条件においては低い Ca 応答率が観察された。

(3) 上記変化に対する AJ 形成阻害の効果

細胞間接着調整（細胞密度調整）によるメカニカルストレス応答性の変化に対する AJ 形成阻害の効果について検討した。N-cadherin ブロック抗体を用いて AJ 形成阻害下でのメカニカルストレス負荷実験を行ったところ、中密度および高密度条件において Ca 応答率の低下が認められた。

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)

Kinbara M, Bando K, Shiraishi D, Kuroishi T, Nagai Y, Ohtsu H, Takano-Yamamoto T, Sugawara S, Endo Y: Mast cell histamine-mediated transient inflammation following exposure to nickel promotes nickel allergy in mice, *Exp Dermatol.* 25(6), 466-71, 2016, 査読有, doi: 10.1111/exd.12985

Kuroishi T, Bando K, Tanaka Y, Shishido K, Kinbara M, Ogawa T, Muramoto K, Endo Y, Sugawara S: CXCL4 is a novel nickel-binding protein and augments

nickel allergy , Clin Exp Allergy , (in press) , 査読有 ,doi: 10.1111/cea.12926

〔学会発表〕(計 3 件)

金原正敬、菅原俊二、遠藤康男、山本照子、ニッケルアレルギー発症過程におけるヒスタミンの関与、第 75 回日本矯正歯科学会、2016 年 11 月 7-9 日、徳島
清流正弘、真山敦、金原正敬、解良洋平、宮下俊郎、出口徹、山本照子、歯科矯正用アンカースクリューを併用した上顎前方牽引装置の効果について、第 74 回日本矯正歯科学会、2015 年 11 月 18-20 日、福岡
Kuroishi T、Bando K、Shishido K、Tanaka Y、Kinbara M、Endo Y、Sugawara S、CXCL4 is a novel nickel binding protein and augments nickel allergy at elicitation phase、第 44 回日本免疫学会、2015 年 11 月 18-20 日、札幌

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

金原正敬 (KINBARA MASAYUKI)

東北大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号：00637960