

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：27102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20511

研究課題名(和文)重力制御装置を用いた骨細胞メカノバイオロジー機構の解明

研究課題名(英文) Investigating the mechanism of osteocytic mechanobiology using a gravity controller

研究代表者

田村 暁子 (Tamura, Akiko)

九州歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：30762067

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、初期の骨芽細胞から成熟骨細胞まで、複数の分化段階を示す特徴のある株化骨細胞IDG-SW3およびマウス長管骨由来のプライマリーの骨細胞を、人工重力制御装置を用いて培養し、微小重力環境下での培養実験が可能かどうか検討した。

12時間ごとに人工重力制御装置を停止させて顕微鏡下で細胞を観察しながら48時間継続して培養したところ、細胞は、12時間、24時間、36時間、48時間後のいずれの時間経過においても、コントロールおよび実験群ともにフラスコに接着しており、細胞の生存に差異は認めなかった。

研究成果の概要(英文)：We tried to culture IDG-SW3, bone cell line cells, which replicates osteoblast to late osteocyte differentiation in vitro, and primary osteocyte from mouse long bone, in a gravity controller, which can create microgravity environment. We wanted to know if it is possible to culture IDG-SW3 cells in microgravity environment.

We stopped the gravity controller every 12 hours and observed under microscope for 48 hours, continuously. Cell adhesion to the flask wall was intact in both the control and the experimental group and we could not find any differences in the survival of the cells throughout the time course.

研究分野：歯科補綴学，口腔インプラント学

キーワード：骨細胞 微小重力

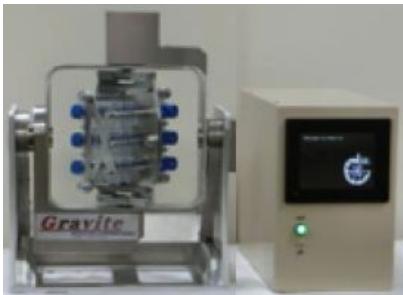
1. 研究開始当初の背景

骨組織の主要な細胞である『骨細胞』の機能については、徐々に解明されつつあるが、現在に至っても多くが謎に包まれたままである。しかし、骨細胞の役割として、生理的環境下では骨吸収を促すことがわかってきた。

骨細胞を特異的に死滅させたマウスに尾部懸垂を施し後肢に荷重がかからないようにすると、通常、正常なマウスでは荷重をかけないことにより起こる骨量の減少が、このマウスではほぼ完全に抑制されることが明らかになった (*Cell Metab.*5(6): 464-75, 2007)。すなわち骨細胞は、生理的骨吸収の司令塔になっている可能性が出てきた。

また、歯槽骨の吸収や移植骨の術後吸収には、共通要素として力学的刺激の欠如が密接に関わっており、メカニカルストレスに対する主要なコントロールを骨細胞が行っている可能性が極めて高いと考えられる。

これまで微小重力環境下における実験を実現させるための方法は試みられており、その最も現実に則した方法としてスペースシャトルや国際宇宙ステーションが用いられてきたが、その方法には制約が多いのも事実である。ところが、最近、人工重力制御装置 GraviTe が開発され、地球上の 1G 環境においても微小重力環境による様々な実験が可能になってきた。



重力制御装置「GraviTe®」

株式会社スペース・バイオ・ラボラトリーズホームページより

微小重力環境では、骨組織は様々な影響を受けることが知られており、中でも骨細胞は、そのメカノセンサーとしての役割が明らかになりつつあるものの、そのメカニズムにはいまだ解明の余地がある。

本研究においては、骨細胞株 IDG-SW3 を初めて重力環境制御装置中で培養し、その細胞動態を検証する。さらに、その上でプライマリー骨細胞を用いて同様の実験を行うことで、より生体に近い骨細胞における細胞動態の解明が期待できる。株化およびプライマリー骨細胞を用いて、微小重力環境のみでなく過重力環境を 1G 環境とほぼ同じ条件下で実現させて実験を行う本研究は、学術的に極めて特色があるといえる。

本研究が端緒となり、骨吸収のメカニズムがより明らかになれば、歯を失った患者のみ

でなく、腫瘍や外傷により失われた顎骨の、移植骨による再建術後の骨吸収を防ぐ画期的な薬物療法も可能になることが予想され、その波及効果は極めて大きなものと考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、株化された骨細胞およびプライマリーの骨細胞を用いて、重力環境制御下における細胞動態を通常の 1G 環境下の細胞と比較検討することで、重力環境制御下において交わされる細胞内、細胞間シグナルについて、そのシグナル伝達分子および受容体、またその伝達機序の一端を明らかにすることとした。

3. 研究の方法

確立された骨細胞株 IDG-SW3 (*J Bone Miner Res.* 26(11): 2634-2646, 2011.) を用いて、通常 1G 重力環境下における実験を実施した。1x10⁶ で凍結した IDG-SW3 を通常法に従い解凍し、コラーゲンコートした直径 150mm ディッシュを用いて増殖培地 (-MEM, 10% FBS, 100U/ml penicillin, 50 µg/ml streptomycin, 50U/ml INF-) に播種し、増殖させた。次に、実験用にコラーゲンコートしたペントキャップ付き 12.5T 培養フラスコ (FALCON 社) に 4 x 10⁴ cells/cm² にて播種し、5% CO₂, 37 環境下にて培養し、コンフルエントに達した後、培地を、分化培地 (INF- を含まず、50 µg/ml ビタミン C および 4mM グリセロリン酸を含む) に交換し、コントロールはインキュベータ内に平置し、実験群は GraviTe に搭載して、5% CO₂, 37 環境下にて培養した。培地を分化用の培地に交換した日を実験の Day0 とし、コントロール群に関しては 3 日ごとに培地交換した。0 日および 7, 14, 21, 28 日での N=3 でサンプルを回収し、GraviTe 群に関しては、サンプル採取と同時に培地を交換した。各回収日に顕微鏡下にて細胞および GFP 発現の写真撮影および total RNA の抽出を行い、IDG-SW3 細胞の分化段階で認められるマーカーを解析した。具体的には、蛍光発色により位相差顕微鏡下にて Dmp1 (GFP) の観察、リアルタイム PCR 法による RNA (E11/Gp38, Sost, Fgf23, MEPE, Phex, Dmp1) 発現の確認、ALP 活性 (ALP 活性アッセイキット) および免疫染色 (E11/Gp38) を行った。

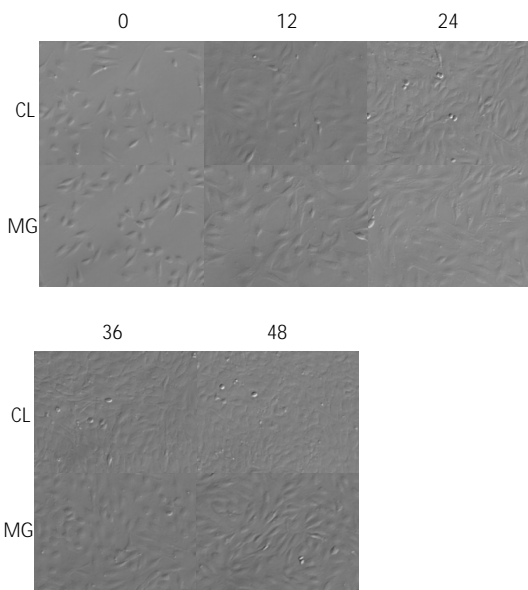
また、トランスジェニックマウスを野生型と交配し、ジェノタイプングにより遺伝子導入を確認しながら繁殖し、必要数を安定獲得した。その上で、プライマリー骨細胞の単離法を獲得した。具体的には、トランスジェニックマウスより長管骨 (大腿骨、脛骨、上腕骨) を摘出し、周囲組織を取り除いた上で骨を適度に分割し、37 °C, 5%CO₂ 環境下でシェーカーにかけながらコラゲナーゼ分解および EDTA 脱灰を繰り返し、内包されていた細胞を獲得した。細胞は 37 °C, 5%CO₂, 至適培地 (MEM with 5%FBS, 5%CS, 1% P/S) にて培

養し、骨細胞の単離を確認するために IDG-SW3細胞をコントロールに用いて骨細胞マーカーを分析した。

4. 研究成果

1) 株化骨細胞の微小重力環境における培養
株化骨細胞 (IDG-SW3) の培養には、培養用プラスチックディッシュ、プレートおよびフラスコに rat tail collagen type I を用いてコラーゲンコートをして用いた。細胞を起こす際は 150 mm のディッシュを用い、その後、実験には 10 mm のディッシュ、12 well プレートおよび 12.5 T フラスコを用いた。人工重力制御装置に搭載する場合には、フラスコ内に培地を充満させるため、通常の重力環境下でもフラスコを培地で充満させた状態で培養できることを確認した。

IDG-SW3の分化開始を 0 時間とし、2時間、24時間、36時間、48時間後のいずれの時間経過においても、コントロールおよび実験群ともにフラスコに接着しており、細胞の生存に差異は認めず、形態学的には正常に培養できているものと判断された。



(位相差顕微鏡写真 左より 0,12,24,36,48 時間培養後の IDG-SW3)

なお、IDG-SW3 が正常に分化しているかどうかについては、Dmp1 発現に伴う GFP 蛍光発色により確認した。

2) 初代培養骨細胞の微小重力環境における培養

マウス長管骨 (大腿骨および上腕骨) から骨髓や骨膜などを除去して皮質骨のみに残り、細かい骨片に砕き、コラーゲナーゼによる酵素処理およびキレート剤 (EDTA 溶液) を交互に用いて溶解・脱灰処理した。骨片を浸漬し、シェーカーにかけて細胞を溶出させたコラーゲナーゼおよび EDTA 溶液をその都度回

収した。Bonewaldらの方法に従い、回収した 9 段階中最後の 3 段階分の溶液から抽出した骨細胞分画を実験に用いて、人工重力制御装置による培養を試みたが、フェノタイプの同定が困難であったことから、初代培養の骨細胞が微小重力環境下で培養できるかどうかを明らかにすることはできていない。

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 0 件)

[学会発表](計 2 件)

岩鍋裕次郎, 田村暁子, 三隅沙緒理, 柄慎太郎, 向坊太郎, 近藤祐介, 正木千尋, 細川隆司: 物理療法を用いたインプラント周囲軟組織に対する治癒促進効果 低出力超音波パルスが歯肉上皮細胞に与える影響 - 第 46 回公益社団法人日本口腔インプラント学会学術大会 名古屋 平成 28 年 9 月 16-18 日

Yujiro Iwanabe, Akiko Tamura, Saori Misumi, Shintaro Tsuka, Taro Mukaibo, Yusuke Kondo, Chihiro Masaki, Ryuji Hosokawa: The effects of low-intensity pulsed ultrasound (LIPUS) on soft tissue healing - an in vitro study, The 11th Scientific Meeting of the Asian Academy of Osseointegration, Thailand, June 3-4, 2016.

[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

田村 暁子 (TAMURA, Akiko)
九州歯科大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号：30762067

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

岩鍋 裕次郎 (IWANABE, Yujiro)
小早川 美輝 (KOBAYAKAWA, Miki)