

平成 21 年 4 月 21 日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19592112  
 研究課題名（和文） 伸展刺激受容時の骨縫合部組織細胞の細胞骨格・細胞接着装置に関する形態学的解析  
 研究課題名（英文） Morphological studies on cytoskeleton and adherent molecules of the cells in mechanically stretched bone sutures.  
 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：

頭頂骨縫合部器官培養系に伸展刺激を加えて骨芽細胞の分化を促進させ、その過程における細胞骨格、細胞接着因子の変化を観察した。結果、アクチンフィラメントは刺激後 3～6 時間で線維芽細胞において太さを増し、伸展方向に配列した。骨芽細胞では主として細胞皮質にアクチンが局在したが、伸展刺激によりストレスファイバー様のアクチン線維も出現した。 $\beta$  カテニンは伸展刺激により、骨芽細胞の膜への局在が促進された。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：機械的刺激、骨芽細胞、細胞骨格、細胞接着装置、骨形成、免疫組織化学

## 1. 研究開始当初の背景

細胞の機械的刺激受容機構の研究に関しては、細胞膜に存在するイオンチャネル（Stretch-activated チャネルなど）や細胞骨格・細胞接着装置などが機械的刺激受容装置の候補として考えられ、多くの研究が行わ

れてきた。しかしながらそれらの研究の大部分は、培養細胞を培養皿上に接着させて、各種の機械的刺激を与えるというものであった。その結果、細胞学的なデータはある程度積み重ねられてきたが、培養皿の中では、他の細胞や細胞外基質との接着などの生体内

で見られる細胞微小環境が再現されないため、実際の組織の中で生じている現象を捉えきれないという欠点があった。

我々はこれまでの研究で、マウス頭頂骨矢状縫合部に持続的伸展刺激を加え、骨芽細胞の分化ならびに骨形成が促進されること、その過程にはBMP4の発現上昇が関与していることなどを明らかにしてきた。さらに、縫合部の成熟骨芽細胞の細胞皮質部には、厚いアクチンの層が裏打ちしている事も明らかにしてきた。この系では細胞微小環境が細胞外基質、他の細胞との接触などの点で生体に近く、さらに比較的単純な組織であるため解析が容易という利点を持つ。

## 2. 研究の目的

機械的刺激は、細胞の変形として感受されると考えられ、細胞骨格・細胞接着装置が重要な役割を果たすと考えられるが、その詳細は不明である。本研究では、マウス頭頂骨縫合部を用い、伸展刺激により骨縫合部組織細胞に生じる変化を、可及的に生体に近い細胞環境における細胞骨格・細胞接着装置の機械的刺激受容・応答機構における反応ならびに役割を、主として形態学的手法を用いて解明することを目的とした。

具体的には主として以下の分子について伸展刺激による形態変化について検索した。

- ①細胞骨格：アクチン線維
- ②細胞基質接着因子： $\beta$ 1インテグリン
- ③細胞間接着因子：カドヘリンおよび $\beta$ カテニン

さらに、細胞骨格のオーガナイゼーション、細胞間および細胞接着装置からのシグナル伝達に關与する因子について、リン酸化状態をウェスタンブロットによって検索し、生体に近い環境下で機械的刺激への反応にどのようなシグナル分子が関与しているかにつ

いても解明する。

## 3. 研究の方法

(1) 伸展刺激を負荷した器官培養系  
生後3-4日齢 ddY マウスをジエチルエーテル麻酔後、断頭し、頭頂骨を左右一塊として採取してバネ装置(Ikegame M et. al, JBMR 16: 24, 2001)を装着。

BGJb 培地中で1時間、3時間、6時間培養。コントロールとして、培養しない切り出し直後の試料、またはバネ装置をテープで固定して伸展刺激を加えずに培養した試料を作製。

(2) アルカリ性ホスファターゼ活性  
骨芽細胞の分化の指標としてアルカリ性ホスファターゼ活性を酵素組織化学により検出した。

### ①アゾ色素法による検出

4%パラホルムアルデヒド溶液により固定し、凍結切片作製。光学顕微鏡観察。

### ②蛍光色素による検出

4%パラホルムアルデヒド溶液により固定し、凍結切片作製(水平断)。ELF97 Endogenous Phosphatase Detection Kit (Molecular Probe) により検出。

次に述べるアクチンと二重染色も行い、蛍光顕微鏡観察

### (3) アクチン細胞骨格

縫合部の線維芽細胞様細胞から、骨芽細胞へと分化する過程におけるアクチン細胞骨格の変化を明らかにし、さらに伸展刺激による変化を明らかにする。

#### ①蛍光組織化学

4%パラホルムアルデヒド溶液により固定。凍結切片作製、あるいは丸ごとのまま、Alexa 488 標識ファロイジンによってF-アクチンを蛍光染色する。共焦点レーザー顕微鏡観察。

#### ②透過型電子顕微鏡観察

グルタルアルデヒド混合溶液にて固定。  
通法に従い EPON 包埋後、超薄切片作製。  
透過型電子顕微鏡にて観察。

(4) 細胞接着因子 ( $\beta 1$  インテグリン、ビンキュリン、 $\beta$  カテニン、カドヘリンなど) 伸展刺激時の縫合部組織における、骨形成系細胞の細胞-細胞接着・細胞-基質接着の、経時的局在変化を形態学的に明らかにする。

#### ① 蛍光免疫組織化学

4%パラホルムアルデヒド溶液により固定。  
凍結切片作製、あるいは丸ごとのまま、1% TritonX-100 によって細胞膜に穴をあけ、抗体の浸透性を上げる。各種抗体を用いて蛍光免疫組織化学を行う。

アクチンと二重染色するため、二次抗体には Alexa594 標識した物を用いる。

・細胞間接着因子：PAN カドヘリン

$\beta$  カテニン

・細胞-基質間接着因子： $\beta 1$  インテグリン

ビンキュリン

その後、Alexa 488 標識ファロイジンによってアクチン細胞骨格を蛍光染色する。

共焦点レーザー顕微鏡観察。

(5) 細胞-細胞・細胞-基質接着装置関連シグナル伝達因子 (ERK, FAK, paxillin など) 細胞骨格のオーガナイゼーション、細胞間および細胞接着装置からのシグナル伝達に関する因子について、伸展刺激群および非刺激群において、縫合部タンパク質を採取して Western blot によりリン酸化状態を解析する。

## 4. 研究成果

### (1) アクチン細胞骨格の形態変化

蛍光免疫組織化学の結果

① 無処置対照群では、縫合部骨形成端の骨芽細胞は卵円形を呈し、アクチンは細胞膜を裏

打ちするように細胞皮質に密に分布した (Fig.1 上段)。前骨芽細胞と思われる細胞では骨芽細胞より量は少ないが細胞皮質にアクチンが分布していた。縫合中央部では、細胞膜を裏打ちするアクチンは不明瞭で、ストレスファイバー様のアクチン線維束が細胞質内に網目状に走行していた。骨膜線維層では、ストレスファイバー様構造が前頭方向にほぼ平行に走行した。

② 伸展刺激 3 時間群では、縫合部は拡大し細胞は伸展方向に伸長していた。骨芽細胞間および前骨芽細胞間の繊細なアクチン線維束、ならびに縫合中心部、骨膜線維層のアクチン線維束は、伸展方向に平行に配列する傾向が見られた。

③ 伸展刺激 6 時間群では、縫合部はさらに拡大し、骨形成端では骨芽細胞が伸展方向に長円形を呈し、その細胞皮質のアクチンが密度を増した (Fig.1 下段)。前骨芽細胞は数を増し、その細胞皮質におけるアクチンの密度は増加し、さらに細胞質内に伸展方向に配列するストレスファイバー様のアクチン線維束も認められた。縫合中央部ならびに骨膜線維層でもアクチン線維束は太さを増し、伸展方向に配列する傾向を強めた。

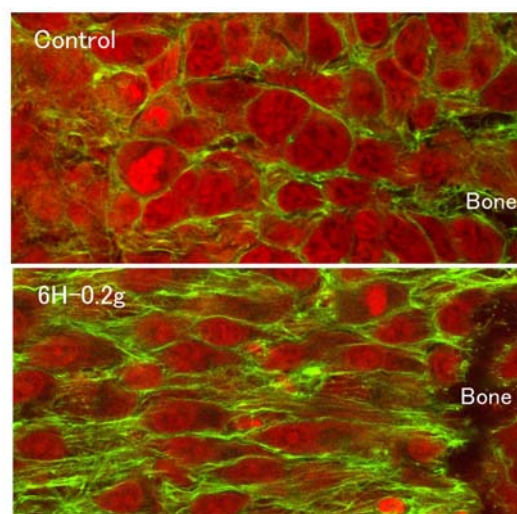


Fig. 1 F-アクチンの局在

F-アクチンは緑色で示される。

#### 電子顕微鏡観察の結果

アクチンフィラメントは骨芽細胞の細胞皮質ならびに細胞間に認められる細胞質突起内に主として認められた。線維芽細胞ではアクチンフィラメントは発達した細胞質突起中に束をなし、また細胞皮質にも認められた。伸展刺激によるアクチンの変化は電子顕微鏡観察では蛍光免疫組織化学の結果ほど明瞭には認められなかった。

### (2) 細胞接着因子の形態変化

#### 蛍光免疫組織化学の結果

##### ① $\beta$ カテニン、カドヘリン

0 時間群では、縫合部骨形成端の骨芽細胞は  $\beta$  カテニンもアクチン同様に細胞皮質に局在したが、細胞皮質にあまり明瞭な  $\beta$  カテニンの局在をみとめない骨芽細胞もしばしばみられた。縫合中央部、骨膜線維層では、 $\beta$  カテニンは点状に認められた。

伸展刺激後 3 時間では、縫合部骨形成端の骨芽細胞は伸展方向に引き伸ばされ、 $\beta$  カテニンが細胞皮質に明瞭に局在するようになった。6 時間後には、縫合部骨縁から縫合部中心に向かって互いに密接しながら配列する前骨芽細胞と考えられる細胞が増加し、それらの細胞では、 $\beta$  カテニンはやや不明瞭だが細胞皮質に局在した。

以上より、骨芽細胞へと分化するのに従い、アクチンならびに  $\beta$  カテニンは細胞皮質に局在するようになること、さらに、伸展刺激によりその過程が促進されるが、アクチンの方が先に細胞皮質に局在すること、が明らかになった。

また、カドヘリンは骨芽細胞の分化が進行するに伴い、骨芽細胞の膜に強く検出されるようになったが、免疫局在があまり明瞭で

なく、検出感度にまだ課題が残っている。

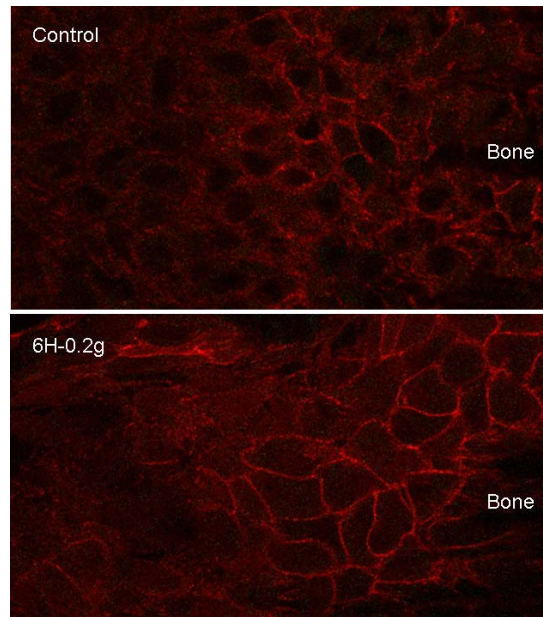


Fig. 2  $\beta$  カテニンの局在

$\beta$  カテニンは赤色で示される。

##### ② インテグリン、ビンキュリン

組織切片上では検出が難しく、さらに工夫が必要と思われた。

### (3) シグナル伝達分子

ウェスタンブロットのための条件検討を開始し、ERK, FAK および、それらのリン酸化状態をウェスタンブロットにより試験的に検出してみた。現在のところ、試料採取の方法や、ロードする蛋白量を均等化するなどの点でまだ課題がのこっており、対照群と実験群の間での差については結論を得ていない。

### (4) 得られた成果の国内外における位置付けとインパクト

アクチンが骨芽細胞の分化に伴い細胞皮質に集積すること、持続的伸展刺激によりアクチンのストレスファイバー様構造が伸展方向に配列し強化されること、さらに  $\beta$  カテニンは線維芽細胞では点状の分布であるのに比べ、骨芽細胞では細胞皮質に集積してお

り、それがアクチンにやや遅れて集積しているということなどは、培養細胞を用いた実験系では明らかにされていない、新しい情報である。これは細胞外基質が3次元的に存在し、またさまざまな骨芽細胞の分化段階の細胞が観察できるこの実験系ならではの成果と考えられる。

#### (5) 今後の展望

形態学的に伸展刺激により生体に近い組織内での細胞骨格、細胞接着装置の一部について変化を観察することができたが、それらの変化がどのようなシグナル伝達分子によって制御されているのか、またそれらの変化が機械的刺激に対する受容応答機構においてどのような意義をもつのかなどについて、今後検討が必要と考えられる。そのためにはこれらの変化に関与するシグナルを阻害するなどにより、機械的刺激にたいして骨芽細胞の分化が促進される過程への影響を検討することが1つの方法としてあげられる。

また、細胞基質接着因子の形態学的変化についてはこの系では明瞭に示すことがまだ不十分であり、インテグリンを介したシグナルについても阻害実験などにより検討することも必要であろう。

さらに、近年流動刺激によって骨芽細胞で $\beta$ カテニンが核へ移動しシグナル伝達に関与することが報告されているが、本研究で用いている伸展刺激など、その他の刺激でも同様な現象が起こる可能性について、今回は明らかにすることはできなかった。その点についてもさらに検討を行いたい。

#### 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 1件)

#### ①池亀美華、江尻貞一、山本敏男

伸展刺激による骨芽細胞の分化とアクチン細胞骨格の形態変化 日本実験力学会講演論文集 No. 8, 46-48 (2008)、査読無

[学会発表] (計 2件)

#### ①Mika Ikegame, Sadakazu Ejiri, Mariko Kawai and Toshio Yamamoto

Actin cytoskeleton and  $\beta$ -catenin localization in osteogenic cells of mouse cranial suture under tensile stress.

2nd Joint Meeting of the International Bone and Mineral Society and the Australian and New Zealand Bone and Mineral Society

March 21-25, 2009, Sydney, Australia

#### ②池亀美華、江尻貞一、山本敏男

伸展刺激による骨芽細胞の分化とアクチン細胞骨格の形態変化

日本実験力学会 2008 年度年次講演会

2008 年 6 月 30 日、7 月 1, 2 日 札幌

(基調講演)

#### 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

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

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

江尻 貞一 (EJIRI SADAKAZU)

朝日大学・歯学部・教授

研究者番号：40160361