

平成21年 5月 26日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19791444

研究課題名（和文） 骨芽細胞様細胞への圧縮力により誘導されるHsp25の機能解析

研究課題名（英文） Functional analysis of Hsp25 induced by compressing force in a mouse osteoblast-like cell

研究代表者

長尾 大輔 (NAGAO DAISUKE)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教

研究者番号：90432749

研究成果の概要： マウス骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 細胞に対して持続的圧縮力を加えることにより、Hsp25 の mRNA、タンパクの発現量が増加した。圧縮力により誘導された Hsp25 は、caspase 3 の活性を抑制し、骨芽細胞のアポトーシスを抑制していることが示された。またカルシウムイオンチャンネルも圧縮力を感知する機構のひとつであることが示唆された。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	800,000	0	800,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,700,000	270,000	1,970,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：補綴理工系歯学

キーワード：持続的圧縮力, Hsp25, Cox-2, カルシウムイオンチャンネル, アポトーシス

## 1. 研究開始当初の背景

生体内では、さまざまな組織や細胞が力学的負荷（メカニカルストレス）に曝されている。細胞が力学的負荷に対して、どのように応答するかは多くのことが未知である。特に骨は、宇宙における無重力状態や長期寝たきり状態などのメカニカルストレスの減少した状態では、骨形成が減少して骨量、骨強度

の低下がもたらされる一方、運動など適度なメカニカルストレスが加わった状態では骨形成が促進され骨量、骨強度が増大する。しかし、過度のメカニカルストレスに対しては骨破壊を起こす。このように骨には、生理的なメカニカルストレスの幅を感知するメカノセンサーが存在すると考えられている。機

能圧を直接周囲骨で支持する歯科インプラントにおいても、適切な咬合力の負荷はインプラント周囲骨の形成を促進させる。逆に咬合力が過度に大きいと、周囲骨が吸収され、インプラント体と骨とのオッセオインテグレーションの喪失につながる。このように機能圧の適正な付与は、インプラント周囲骨の早期形成とその維持において重要である。以前に、骨芽細胞様細胞 (MC3T3-E1) にガラスシリンダーを用いて直接細胞に持続的圧縮力を加える実験系を用い、マイクロアレイ法により発現の上昇する遺伝子を網羅的に解析した。その結果、プロスタグランジン合成酵素である COX-2 遺伝子や、アルカリフォスファターゼ遺伝子 (ALP)、Bone Morphogenetic protein (BMP) など、骨芽細胞の分化に関係する遺伝子の発現が上昇し、圧縮力により骨芽細胞様細胞の分化が促進されることを示した。さらに、インテグリンが圧縮力を感知し、FAK (focal adhesion kinase) を活性化し MAPKinase シグナル伝達系である MEK から ERK を介して Hsp25 (heat shock protein 25) の発現を誘導していることも見出した。そこで、本研究では圧縮力における Hsp25 の機能を明らかにすることを目的とするとともに、メカニカルストレスを感知する機構を明らかにし、インプラント体への適切な力学的負荷量の指標をつくることを目的とした。

## 2. 研究の目的

Hsp25 は細胞に熱や放射線などの物理学的ストレスや、亜ヒ酸やシンバスタチンなどの化学物質、活性酸素などの化学的ストレスが加わることにより誘導され、再度のストレスに対する耐性の獲得や細胞機能の制御に関与したり、細胞内分子シャペロンとして知られているが、その他の機能については不明な点が多く、解明することは分子生物学的に

重要なことである。

本実験において発現誘導された Hsp25 もこのような機能を有しているのか、その他の機能を有しているのかは明らかではない。本研究では、持続的圧縮力を受けた骨芽細胞細胞における Hsp25 の機能 (抗アポトーシス作用) を明らかにする。またインテグリンだけではなく、カルシウムイオンチャンネルもメカニカルストレスを感知する機構 (メカノセンサー) のひとつと考えられているため、本研究の持続的圧縮力においてもインテグリンと同様にカルシウムイオンチャンネルもメカノセンサーのひとつになりえるのか検討を行った。

## 3. 研究の方法

(1) 骨芽細胞様細胞への持続的圧縮力による Hsp25 の機能の検討: MC3T3-E1 細胞に対し、siRNA により Hsp25 mRNA をノックダウンしたものを 70%コンフルエントになるまで通法に従い培養し、ガラスシリンダーにて細胞に圧縮力を 294 Pa の力で 24 時間加え培養し、圧縮力を加えた細胞から通法に従い溶解バッファーにてタンパクを抽出し、caspase3、Hsp25 の抗体を用いてウェスタンブロッティングを行い、アポトーシスに関与する活性型 caspase3 の増加量を検討した。また、Cell counting kit-7 (同仁化学) を用いて細胞の生死を培地の吸光度 450 nm の波長で測定することで判定した。

(2) 持続的圧縮力を感知するカルシウムイオンチャンネルの検討: メカニカルストレスに関して代表的なカルシウムイオンチャンネルである SA チャンネル (stretch activated calcium ion channel)、L type voltage-sensitive  $Ca^{2+}$  チャンネル (L-VSCC) に着目し、SA チャンネルの阻害剤である gadolinium chloride (GdCl<sub>3</sub>)、L-VSCC の阻

害剤である nifedipine, また細胞内カルシウムをキレートする BAPTA/AM を培地中に適正濃度添加し、MC3T3-E1 に圧縮力を加え、Hsp25 の mRNA, タンパクの発現量、COX-2 の mRNA の発現量をそれぞれリアルタイム PCR 法, ウェスタンブロッティングにより調べた。

#### 4. 研究成果

(1) 持続的圧縮力により誘導されたあ Hsp25 の機能について

siRNA により Hsp25 をノックダウンした MC3T3-E1 細胞に対し 294Pa の持続的圧縮力を 24 時間加えた後、溶解バッファーにてタンパクを抽出して、Hsp25, 活性化型 caspase3 の抗体を用いてウェスタンブロッティングによりタンパクの発現量を測定した。Hsp25 は siRNA によりノックダウンされており、圧縮力を加えた細胞で活性化型 caspase3 の増加が確認された (図 1)。



図1 siRNA により Hsp25 をノックダウンした時の caspase3 の活性

また、cell counting kit-7 を用いて圧縮力による細胞の生死について調べたところ、siRNA により Hsp25 をノックダウンした細胞では、圧縮力により細胞の生存が 70% あまり減少することが示された (図 2)。

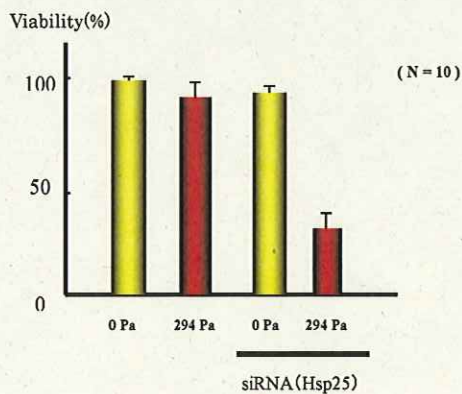


図2 圧縮力を加えた時の細胞の生存率

(2) 持続的圧縮力を感知するカルシウムイオンチャンネルの検討

SA チャンネルのブロッカーである GdCl<sub>3</sub>, L-VSCC のブロッカーである nifedipine, そして細胞内の Ca<sup>2+</sup> をキレートする BAPTA / AM を培地中に適正濃度添加して Hsp25, および COX - 2 mRNA の発現量をリアルタイム RT-PCR にて検討した。GdCl<sub>3</sub>, nifedipine あるいは BAPTA / AM 処理により圧縮力による Hsp25 の発現量は減少傾向を示し、COX - 2 の発現量は BAPTA / AM, GdCl<sub>3</sub> により減少傾向を示した (図 3, 4)。

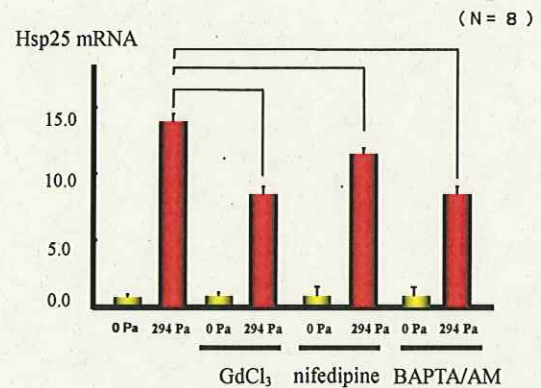


図3 Ca<sup>2+</sup>インヒビターによる Hsp25 mRNAの発現量への影響

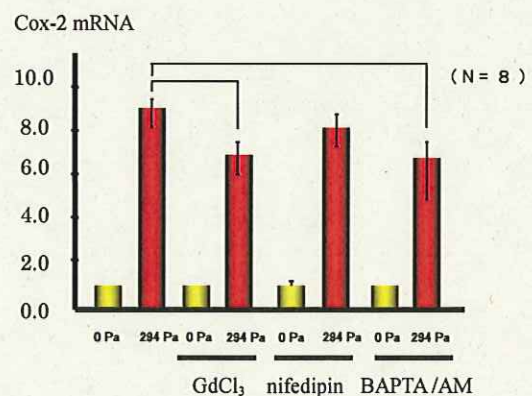


図4 Ca<sup>2+</sup>インヒビターによる COX-2 mRNAの発現量への影響

以上のことより

1. 圧縮力により発現誘導された Hsp25 は caspase3 の活性化を抑制し、骨芽細胞様細胞のアポトーシスを抑制している
  2. SA チャンネルも骨芽細胞様細胞において圧縮力を感知するメカノセンサーのひとつである
- ということが示唆された (図 5)。

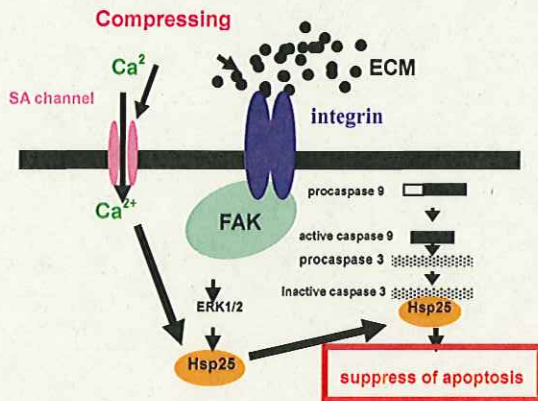


図 5. MC3T3-E1 細胞の圧縮力による Hsp25 発現誘導と機能のメカニズム

## 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)

[学会発表] (計 2 件)

- ① 日本口腔インプラント学会中国四国支部会 2007.12 高松: マウス骨芽細胞への圧縮力による Heat Shock Protein 25 の発現
- ② International Association for Dental Research 2008.7 Tront: Compressing force induces Hsp25 in a mouse osteoblast - like cell line

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

長尾 大輔 (NAGAO DAISUKE)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス  
研究部・助教

研究者番号: 90432749