

令和 6 年 5 月 29 日現在

機関番号：32650

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09214

研究課題名（和文）骨形成を制御するメカニカルストレス伝達機構の解明

研究課題名（英文）Mechanical regulation of osteogenesis

研究代表者

中村 貴（Nakamura, Takashi）

東京歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：80431948

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では骨組織がメカニカルストレスに応じた柔軟な形態変化を起こす事に着目し、骨形態を任意に制御可能な骨再生技術の開発を視野に骨組織ストレス応答メカニズムの解明を試みた。メカニカルストレス刺激が間葉系幹細胞に与える影響を調べた結果、線維芽細胞増殖因子2 (FGF2)の発現誘導を介した間葉系幹細胞の増殖が骨形成を間接的に促進することを明らかにした。また、ストレス伝達への関与が示唆される細胞骨格関連因子の遺伝子破壊マウスを作出したところ、骨形成の低下を伴う骨量減少を示す事が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

超高齢化社会を迎えた我が国では寝たきりなどメカニカルストレスの低下に伴う骨量減少が問題となっており、新たな予防・治療法の開発の基盤となるメカニカルストレス作用機構の理解が重要である。本研究では骨形成促進にはたらく新規メカニカルストレス応答分子の特定に成功したほか、新規メカニカルストレス伝達候補分子の同定にも成功しており、さらなる研究の発展によりこれら分子を基軸とした新規予防・治療法の開発が期待できる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we attempted to elucidate the mechanical response of bone tissue. We found that mechanical stress-induced fibroblast growth factor 2 (FGF2) promotes proliferation and consequently induces osteoblast differentiation in mesenchymal stem cells. Furthermore, we generated knockout mice for cytoskeleton-related factors implicated in stress transmission and found that they exhibit bone loss accompanied by decreased bone formation.

研究分野：骨代謝学

キーワード：骨代謝 メカニカルストレス

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1)骨は異なる起源と特異的機能をもつヘテロな細胞集団によって構成される複合組織であり、重力・圧縮・伸展など細胞内外からのさまざまな機械刺激(メカニカルストレス)に応じてその形を柔軟かつ適切に変化させる事で、身体を支持する組織である。メカニカルストレスは接着タンパク質やイオンチャネル、細胞骨格分子などによって感知され、細胞内で生化学的シグナルへと変換されることで生理作用を発揮すると考えられている。しかしながら骨芽細胞において決定的といえるストレス感知・伝達メカニズムやメカニカルストレスに応答する作用分子の特定には未だ至っていない。

(2)骨芽細胞の増殖や分化もまたメカニカルストレスによる制御を受けると考えられているが、骨芽細胞分化は非常に多くの分子による制御を受けながら時間をかけてゆっくりと進む。そのためメカニカルストレスによる分化制御機構の解明は容易ではなかった。我々は線維芽細胞増殖因子受容体2(FGFR2)の遺伝子変異に起因するApert症候群の患者では頭蓋骨や手指などの限られた特定の骨においてのみ骨形成亢進を示し、全身の多くの骨では目立った骨形成の変化を示さない事に着目し、Apert症候群における局所的な骨形成には全身の細胞で起きたFGFR2の遺伝子変異だけではなく、局所的因子の存在が必要と考え、メカニカルストレスがApert症候群の発症を引き起こす局所因子の正体ではないかと考えた。

### 2. 研究の目的

(1)骨組織におけるメカニカルストレス応答機構の解明を目的に、アクチン細胞骨格やその相互作用分子である核膜タンパク質がメカノトランスデューサーの構成分子であるとの仮説のもと、候補分子の遺伝子ノックアウトマウスを作製し、骨組織に起こる変化を解析する事で、メカニカルストレスの受容から伝達、遺伝子発現制御へと至る情報伝達システムの制御メカニズムの包括的理解を目指した(図1)。

(2)Apert症候群における骨形成異常は頭蓋骨の早期癒合や骨性手指の癒合など、一部の骨に限局した異常な骨形成の亢進によるものであり、全身性の明確な骨代謝異常は観察されない。このことから、Apert症候群患者の全身の細胞で起きていると思われるFGFR2の遺伝子変異だけでは疾患の発症に不十分であり、疾患部位特異的に作用する未知因子がApert症候群の発症に関与していると考えられた。骨癒合が起こる部位の特徴から骨組織に集中するメカニカルストレスが骨形成異常の引き金となる可能性を考え、骨芽細胞分化におけるメカニカルストレスとFGFシグナルの関連について明らかにする事を目的に、局所的に作用する未知骨形成促進因子の特定とその作用機序について解明する事を目的とした。

### 3. 研究の方法

(1)Nesprin-1は大きな分子量をもつ細長い紐状のタンパク質であり、細胞骨格を形成するアクチンと核膜を連結するように存在する。Nesprin-1は主に筋組織の細胞において核形態や核の位置決定に関与することが知られているが、骨組織における役割は完全に不明である。最近我々はNesprin-1高次機能を明らかにする目的でfloxed Nesprin-1マウスを樹立する事に成功したことから、全身性Nesprin-1ノックアウトマウスを作製する事でまずは骨組織におけるNesprin-1機能を調べる事にした。全身性Cre発現マウスであるCAG-Creを交配する事で全身性Nesprin-1ヘテロ欠損マウスを作製し、ヘテロ欠損個体同士の交配によってホモ欠損個体を得た。これらのマウスから骨組織を摘出し、骨形態計測、マイクロCT、遺伝子発現解析等を通じて骨組織で起こる変化について調べた。

(2)メカニカルストレスとApert症候群の関連を調べるため、骨芽細胞の前駆細胞として間葉

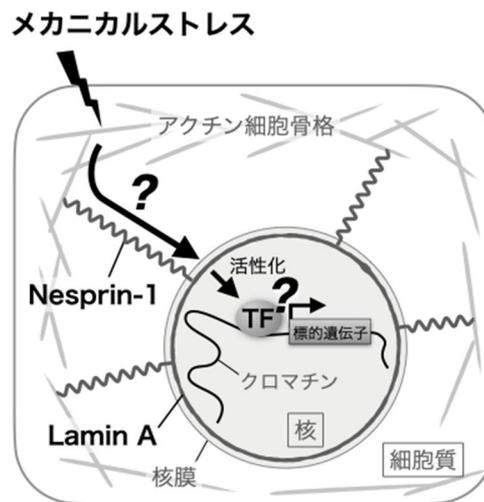


図1.本研究における仮説.細胞骨格が受容したメカニカルストレスは細胞骨格や核膜タンパク質を介して核へと直接伝達され、遺伝子発現を制御する。

系間細胞を対象に培養下でメカニカルストレス負荷を行った。プログラマブル培養細胞伸展システム・ShellPa Pro (メニコンライフサイエンス社) と専用のシリコンゴム製ストレッチチャンパーを用いて市販の正常ヒト間葉系幹細胞に対する周期的な伸展刺激によるメカニカルストレス負荷を行い、メカニカルストレスがヒト間葉系幹細胞の増殖や FGFR2 と結合しうるリガンドの発現、骨芽細胞分化や石灰化結節の形成に対する作用について解析を行なった。

#### 4. 研究成果

(1) 作製した全身性 Nesprin-1 ノックアウトマウスは出生直後に約半数が死亡した。また、生存個体も成長遅延を示した。ノックアウトマウスは明確な骨格異常を示さなかったものの、大腿骨遠位部における骨量低下がみられ、骨形態計測の結果、骨梁数の有意な低下が観察された。さらにカルセイン投与をおこない骨形成速度を調べたところ、ノックアウトマウスで骨形成速度の低下が起きている事が明らかとなった(図2)。これは無重量状態における骨に酷似した表現型であることから、全身性 Nesprin-1 ノックアウトマウスはメカニカルストレス応答の低下に伴う骨代謝異常が起きている可能性が示唆された。引き続き詳細な解析を行なう事で、骨代謝における Nesprin-1 高次機能の解明を試みる。

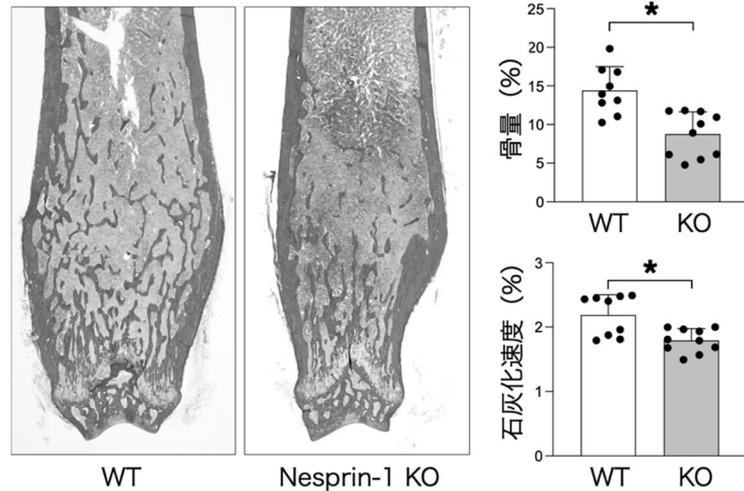


図2. 全身性Nesprin-1 ノックアウトマウスは骨量低下を示す。

(2) FGF 受容体 2 (FGFR2) の機能獲得型変異に起因する硬組織疾患である Apert 症候群の病態解析を通じて、力学的ストレス依存的な骨形成亢進には FGF2 の発現誘導が重要であることが明らかとなった。具体的にはメカニカルストレスには骨芽細胞分化を直接促進する作用は見られなかった。しかしながら、間葉系幹細胞によってメカニカルストレスが感知されると FGF2 の発現および分泌が誘導され、FGF2 が間葉系幹細胞に対してオートクライン/パラクラインに作用する事で間葉系幹細胞の増殖と細胞凝集を促進することがわかった。この間葉系幹細胞の増殖と凝集によって、骨芽細胞の分化が促進され、石灰化結節形成が促進される事が明らかとなった。興味深い事に増殖期における FGF2 の添加は結果的に石灰化結節形成を促進したが、分化期における FGF2 添加は骨芽細胞分化に対して抑制的であった。in vitro での骨芽細胞分化誘導実験における FGF 添加は、様々な骨芽細胞マーカー遺伝子の発現を抑制した。これらの結果から、メカニカルストレス負荷が多い場合は産生された FGF2 は間葉系幹細胞の増殖促進を介して間接的に骨形成を促進するが、骨形成が進み骨が完成に近づくにつれて細胞あたりのメカニカルストレス負荷が減少し、結果的に骨芽細胞分化を抑制することで骨形成を抑制するというメカニズムにくわえ、骨折などにより再びメカニカルストレス負荷が大きくなった場合は、骨芽細胞分化を抑制し、細胞増殖を促進すると考えられた。このように FGF2 はメカニカルストレスに応じた適切な量の骨を作る制御メカニズムを担う鍵因子である可能性が示唆された。(Ogura H, et al. BBRC 2023, 図3) Apert 症候群では力学的ストレスが FGF2 の局所的濃度上昇を誘導し、変異型 FGFR2 と協調して FGF シグナル系を過活性化することで部位特異的な骨癒合を引き起こしていると考えられ、力学的ストレス受容伝達分子が Apert 症候群の新たな治療標的となる可能性が示された。

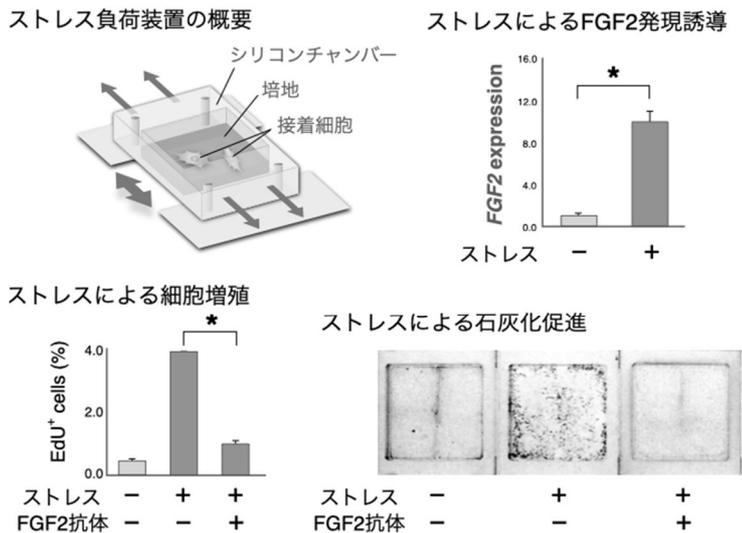


図3. メカニカルストレスは FGF2 の発現誘導を介して骨芽細胞分化を促進する。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nakamura Takashi, Honda Sayako, Ito Shinichirou, Mizoguchi Toshihide, Yamamoto Takehiro, Kasahara Masataka, Kabe Yasuaki, Matsuo Koichi, Suematsu Makoto	4. 巻 41
2. 論文標題 Generation of bicistronic Dmp1-Cre knock-in mice using a self-cleaving 2A peptide	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Bone and Mineral Metabolism	6. 最初と最後の頁 470 ~ 480
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00774-023-01425-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ogura Hiroyuki, Nakamura Takashi, Ishii Takenobu, Saito Akiko, Onodera Shoko, Yamaguchi Akira, Nishii Yasushi, Azuma Toshifumi	4. 巻 684
2. 論文標題 Mechanical stress-induced FGF-2 promotes proliferation and consequently induces osteoblast differentiation in mesenchymal stem cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 149145 ~ 149145
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2023.149145	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ono Takehito, Denda Ryosuke, Tsukahara Yuta, Nakamura Takashi, Okamoto Kazuo, Takayanagi Hiroshi, Nakashima Tomoki	4. 巻 10
2. 論文標題 Simultaneous augmentation of muscle and bone by locomimimeticism through calcium-PGC-1 signaling	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bone Research	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41413-022-00225-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Tsukasaka Masayuki, Komatsu Noriko, Negishi-Koga Takako, Huynh Nam Cong-Nhat, Muro Ryunosuke, Ando Yutaro, Seki Yuka, Terashima Asuka, Pluemsakunthai Warunee, Nitta Takeshi, Nakamura Takashi, Nakashima Tomoki, Ohba Shinsuke, Akiyama Haruhiko, Okamoto Kazuo, Baron Roland, Takayanagi Hiroshi	4. 巻 13
2. 論文標題 Periosteal stem cells control growth plate stem cells during postnatal skeletal growth	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-022-31592-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Aoki Hideto, Suzuki Eiichi, Nakamura Takashi, Onodera Shoko, Saito Akiko, Ohtaka Manami, Nakanishi Mahito, Nishimura Ken, Saito Atsushi, Azuma Toshifumi	4. 巻 55
2. 論文標題 Induced pluripotent stem cells from homozygous Runx2-deficient mice show poor response to vitamin D during osteoblastic differentiation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Medical Molecular Morphology	6. 最初と最後の頁 174 ~ 186
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00795-022-00317-w	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Matsunaga Mayumi, Kimura Maki, Ouchi Takehito, Nakamura Takashi, Ohyama Sadao, Ando Masayuki, Nomura Sachie, Azuma Toshifumi, Ichinohe Tatsuya, Shibukawa Yoshiyuki	4. 巻 12
2. 論文標題 Mechanical Stimulation-Induced Calcium Signaling by Piezo1 Channel Activation in Human Odontoblast Reduces Dentin Mineralization	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Physiology	6. 最初と最後の頁 X ~ X
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fphys.2021.704518	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------