

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 4月10日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23792412

研究課題名（和文）骨細胞に対する機械的刺激による CTGF の発現とアポトーシスに関する研究

研究課題名（英文）Relationship between mechanical stress-induced CTGF expression and apoptosis in osteocytes.

研究代表者

星 健治（HOSHI KENJI）

東北大学・病院・助教

研究者番号：90569964

研究成果の概要（和文）：我々は、骨細胞のメカニカルストレス応答について CTGF とアポトーシスに着目して検討した。圧縮力負荷を行った骨細胞において CTGF の発現が上昇し、アポトーシスを誘導することがわかった。さらに CTGF は ERK1/2 を活性化させ、アポトーシスを誘導することがわかった。本研究の結果よりメカニカルストレス負荷に伴う骨細胞による骨リモデリングの調整の機序の一端が解明された。

研究成果の概要（英文）：We examined osteocyte response to mechanical stress focusing on CTGF and apoptosis. Compressive force loading increased CTGF expression, thereafter, apoptosis were induced in osteocytes. Moreover, we demonstrated that CTGF induces osteocyte apoptosis through activation of ERK1/2 pathway. These results, at least in part, revealed the mechanism of bone remodeling regulated by osteocytes under mechanical stress.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学、矯正歯科・小児系歯学

キーワード：歯科矯正学

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時、歯槽骨牽引側での骨形成と歯槽骨圧迫側での骨吸収により骨リモデリングが起こり、歯が一定方向へ移動する。骨リモデリングは、主に骨芽細胞と破骨細胞により行われると考えられているが、その分子メカニズムについては不明な点が多い。よってこれを解明し、骨リモデリングの調整を行うことができるようになれば、歯の移動効率を向上させることが可能となる。

骨芽細胞、破骨細胞に加え、骨組織中の主要な細胞群の一つとして骨細胞が挙げられ

る。骨細胞は成熟骨組織中で最も多い細胞群であり、細い細胞突起を介した細胞間ネットワークを形成し骨基質中に存在している。こうした骨細胞を取り巻く環境からも、骨細胞は骨へのメカニカルストレスが負荷された際、これらを検知するメカノセンサーとして働いていると考えられる。

ラットの歯の移動時の歯槽骨圧迫側において骨細胞のアポトーシスが增加することが報告された (Hamaya et al., Calcif. Tissue Int. 2002)。ラット尺骨への圧縮力負荷時、骨細胞

のアポトーシスが起こり、これが破骨細胞による骨吸収を誘導する可能性を示唆する報告(Cardoso et al. J. Bone Miner. Res. 2009)があることから、歯の移動においても、骨細胞のアポトーシスが歯槽骨圧迫側での破骨細胞による骨吸収を誘導している可能性がある。

実験的な歯の移動時、歯槽骨中の骨細胞における様々な遺伝子の発現が報告されており、その中の一つにCTGFが挙げられる。CTGFの生理的機能は、骨芽細胞(Nishida et al., J. Cell. Physiol. 2000)や軟骨細胞(Nishida et al., J. Cell. Physiol. 2003)における増殖と分化の促進、血管内皮細胞の接着、増殖、遊走の促進(Shimo et al., J. Biochem. 1999)など様々である。さらに、ラットの歯の移動時の歯槽骨圧迫側と牽引側の骨細胞でCTGF遺伝子の発現が上昇することが報告されており(Yamashiro et al., J. Dent Res. 2001)、CTGFは骨細胞のメカニカルストレス伝達機構に関与していると考えられる。

申請者らはマウスの歯の移動時の歯槽骨圧迫側の骨細胞で、CTGF遺伝子の発現の上昇が起こり、その後、アポトーシスの誘導、さらに破骨細胞の増加が起こることを報告した(Sakai et al., J. Dent. Res. 2009.)。したがって、歯の移動時、特に歯槽骨圧迫側におけるCTGFの発現の上昇と骨細胞のアポトーシスの増加が関連性を有し、骨リモデリングを調整している可能性がある。

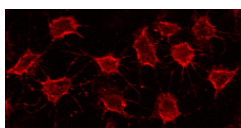
2. 研究の目的

培養骨細胞に対し圧縮力負荷を行い、CTGFの発現とアポトーシスとの関連を検討すること。

3. 研究の方法

(1) 骨細胞の単離・培養

15日齢のニワトリ胚の頭蓋骨に対し1mg/ml コラゲナーゼと5mMEDTAによる処理を行い、骨細胞を単離した。骨細胞の同定はニワトリ骨細胞の特異的抗体であるOB7.3を用いて行った。単離した骨細胞は2%FBS含有 α -MEM中で培養した。



単離した骨細胞のOB7.3染色像

(2) 圧縮力負荷培養

Masudaら(J. Biotechnol. 2008)の開発したメカニカルストレス負荷培養装置を改変し、これを用いた。圧縮力負荷は培養開始より24時間後に開始した。培養骨細胞には1.2から2.9%の圧縮歪みを与えた。

(3) 圧縮力負荷時のアポトーシスの検討

圧縮力負荷後、TUNEL染色、カスパーゼ3活性の計測、リアルタイムPCR法によるアポトーシス関連遺伝子(カスパーゼ3、8、9およびbcl-2)の発現の計測を行い、アポトーシスの検討を行った。

(4) 圧縮力負荷時のCTGFの発現の検討

圧縮力負荷後、CTGF遺伝子の発現をリアルタイムPCR法により、またCTGFタンパクの発現を免疫染色により検討した。またCTGFは分泌タンパクであることから培養上清中のCTGFタンパクの発現をウェスタンブロット法により検討した。

(5) アポトーシスとCTGFの関連の検討

①リコンビナントCTGFタンパク(rCTGF)

処理を行ったときのアポトーシスの検討

rCTGF処理後、TUNEL染色、カスパーゼ3活性の計測を行い、アポトーシスを検討した。

②CTGF中和抗体処理下で圧縮力負荷を行ったときのアポトーシスの検討

CTGF中和抗体処理下で圧縮力負荷を行い、負荷後TUNEL染色によりアポトーシスの検討を行った。

(6) アポトーシスへのCTGFの作用機序の検討

①圧縮力負荷を行ったときのMAPK(ERK1/2, p38 MAPK)の活性化の検討

圧縮力負荷後、ERK1/2、p38 MAPK、p-ERK1/2、p-p38 MAPKの免疫染色を行い、ERK1/2およびp38 MAPKの活性化を検討した。

②ERK1/2阻害剤およびp38 MAPK阻害剤処理下で圧縮力負荷を行ったときのアポトーシスの検討

各阻害剤処理下で圧縮力負荷を行った後、TUNEL染色を行いアポトーシスの検討を行った。

③rCTGF処理を行ったときのERK1/2, p38 MAPKの活性化の検討

rCTGF処理後、ERK1/2、p38 MAPK、p-ERK1/2、p-p38 MAPKの免疫染色を行い、ERK1/2およびp38 MAPKの活性化を検討した。

④CTGF中和抗体処理下で圧縮力負荷を行ったときのERK1/2, p38 MAPKの活性化の検討

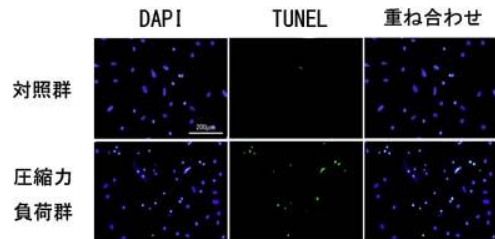
CTGF中和抗体処理下で圧縮力負荷を行った後、ERK1/2、p38 MAPK、p-ERK1/2、p-p38 MAPKの免疫染色を行い、ERK1/2

および p38 MAPK の活性化を検討した。

4. 研究成果

(1) 圧縮力負荷によるアポトーシスの誘導

圧縮力負荷に伴い、TUNEL 染色陽性細胞の割合、カスパーゼ3 活性およびアポトーシス関連遺伝子の発現の上昇が認められた。アポトーシス関連遺伝子のうち、抗アポトーシス作用を有する bcl-2 遺伝子の発現の上昇も認められたため、これに関しては以後検討が必要である。



骨細胞に対する圧縮力負荷によるアポトーシスの誘導

(2) 圧縮力負荷による CTGF の発現と産生の上昇

圧縮力負荷に伴い、CTGF 遺伝子の発現が有意に上昇した。また免疫染色による検討から、圧縮力負荷群において陽性細胞が多く観察された。さらに、培養上清中の CTGF タンパクの発現は圧縮力負荷群において経時的に上昇した。

(3) CTGF によるアポトーシスの誘導

rCTGF 処理により TUNEL 染色陽性細胞の割合およびカスパーゼ3 活性が有意に上昇した。また、CTGF 中和抗体処理下で圧縮力負荷を行ったところ、圧縮力負荷に伴うアポトーシスの誘導が有意に抑制された。

以上より、圧縮力負荷に伴う骨細胞のアポトーシスは CTGF により誘導されることがわかった。

(4) CTGF の ERK1/2 経路を介したアポトーシスの誘導

圧縮力負荷後の ERK1/2、p38 MAPK、p-ERK1/2、p-p38 MAPK の免疫染色像より、ERK1/2 は活性化し、p38 MAPK はほぼ変化しなかった。また、ERK1/2 阻害剤処理群においては圧縮力負荷に伴うアポトーシスの誘導が有意に抑制され、p38 MAPK 阻害剤処理群においては有意には抑制されなかった。rCTGF 処理後の ERK1/2、p38 MAPK、p-ERK1/2、p-p38 MAPK の免疫染色像より、ERK1/2 は活性化し、p38 MAPK はほぼ変化しなかった。最後に、CTGF 中和抗体処理下で圧縮力負荷を行った後、ERK1/2、p38 MAPK、p-ERK1/2、p-p38 MAPK の免疫染色を行ったところ、圧縮力負荷に伴う ERK1/2 の活性化は抑制され、p38 MAPK の発現に変

化は認められなかった。

以上より、圧縮力を負荷された骨細胞において CTGF の産生が増強され、これが ERK1/2 経路を活性化させ、アポトーシスを誘導することがわかった。

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)

① 星健治、出口徹、山本照子：顎口腔機能異常を伴う骨格性下顎前突症例における固定源としてのミニスクリーウの有用性、東北大学歯学雑誌、査読有、31、2012、27-38

② Harumi Kawaki, Satoshi Kubota, Akiko Suzuki, Makoto Suzuki, Kumiko Kohsaka, Kenji Hoshi, Toshiya Fujii, Nouredine Lazar, Toshihiro Ohgawara, Takeyasu Maeda, Bernard Perbal, Teruko Takano-Yamamoto, Masaharu Takigawa. Differential roles of CCN family proteins during osteoblast differentiation: involvement of Smad and MAPK signaling pathways. Bone 査読有; 49(5): 2011, 975-89

[学会発表] (計4件)

① 星健治、高橋一郎、益田泰輔、鈴木誠、加藤龍史、鈴木治、上岡寛、山城隆、山本照子、圧縮力負荷による骨細胞のアポトーシスへの CTGF の関与、第 71 回日本矯正歯科学会、2012 年 9 月 26 -28 日、盛岡

② 星健治、川木晴美、高橋一郎、益田泰輔、鈴木誠、加藤龍史、上岡寛、山城隆、鈴木治、山本照子、ニワトリ胚頭蓋骨由来培養骨細胞への圧縮力負荷による CTGF の発現とアポトーシスに関する研究、第 30 回日本骨代謝学会、2012 年 7 月 19-21 日、東京

③ 川木晴美、久保田聡、鈴木晶子、星健治、高山英次、神谷真子、前田健康、山本照子、近藤信夫、滝川正春、骨芽細胞分化

における CCN ファミリータンパク質の分布と機能解析、第 53 回歯科基礎医学会、2011 年 9 月 30 日、岐阜

- ④ 川木晴美、久保田聡、鈴木誠、高坂久美子、星健治、加藤龍史、高山英次、神谷真子、Bernard Perbal、山本照子、近藤信夫、滝川正春、CCN ファミリータンパク質によるMAPK 経路を介した骨芽細胞増殖・分化調節、第4回日本CCNファミリー研究会、2011年8月27日、岡山

6. 研究組織

(1) 研究代表者

星 健治 (HOSHI KENJI)

東北大学・病院・助教

研究者番号：90569964