

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 23 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24792281

研究課題名(和文) 生骨組織内4Dイメージングを用いた骨細胞NOシグナリングの解明

研究課題名(英文) 4D ex-vivo imaging of NO signaling in osteocytes

研究代表者

石原 嘉人 (ISHIHARA, Yoshihito)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号：70549881

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：骨は、メカニカルストレスを感受し、認識・応答することで組織としての恒常性を維持しており、その調節には3次元的な細胞間ネットワークが重要な役割をもつと考えられている。細胞内カルシウム(Ca²⁺)は多様な細胞機能を仲介する情報伝達物質であり、骨代謝調節を含む広範な生理機構に関与する。しかし、骨組織中での動態は、周囲の骨基質が障壁となるためこれまで不明であった。我々は、骨組織をまるごと生きた状態のままCa²⁺イメージングする事に成功し、メカニカルストレスに対する骨芽細胞と骨細胞の機能について報告した。

研究成果の概要(英文)：Bone cells respond to mechanical stimuli by producing a variety of biological signals, and intracellular calcium (Ca²⁺) is an important secondary messenger controlling many cellular processes. Its variety of oscillatory signaling is thought to act in the regulation of many different cell functions including bone metabolisms. However, it has not been entirely clear the behavior and connectivity of the [Ca²⁺]_i signaling networks in mechanotransduction between osteoblasts and osteocytes in integrated bone tissues due to complex bone matrices surrounding bone cells. To address this issue, we have developed a novel ex vivo live Ca²⁺ imaging system, which made it possible to observe the mechanical stress-induced Ca²⁺ oscillations.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学、矯正・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

生体の骨は、外界から常に様々な種類のメカニカルストレスを受けている。骨組織中の細胞は、各種ストレスを刺激として認識し、感受・応答することで骨量の維持および再構築を絶えず繰り返し、組織としての恒常性を保つ。そしてその代謝調節は、骨表面に存在する骨芽細胞と破骨細胞および骨深部に存在する骨細胞とが3次元的な細胞性ネットワークを介したクロストークが関与すると考えられている。しかしながら骨に負荷されたメカニカルストレスに対する細胞応答について、「どのような形」で「どの細胞」に最初に届き、骨の生理的な応答を行うトリガーとして働いているのかは未だ明らかではない。とりわけ、メカニカルセンサーとしての中心的役割が提起されてきた骨細胞は、基質中の骨小腔と骨細管の空隙に細胞突起を伸ばして分布しており、培養細胞の微小環境とは著しく異なっている。従って、実際の骨組織により近い状況で営まれるリアルタイムな細胞応答を検討する実験系の構築が期待されてきたが、細胞周囲を硬い骨基質に覆われている骨細胞の特性上、その実現は困難と考えられてきた。

カルシウム(Ca^{2+})は細胞内外における重要な情報伝達物質であり、メカニカルストレスを含めた様々な刺激に応じて周期的な Ca^{2+} 濃度の上昇を引き起こす。この現象は Ca^{2+} オシレーションと呼ばれ、その時空間的な特性は骨代謝調節を含む広範な生理機構に関与すると考えられている。しかし、3次元的な骨芽細胞-骨細胞ネットワークから成り立つ骨組織中での Ca^{2+} オシレーションの動態についても周囲の骨基質が障壁となるためこれまで不明であった。

2. 研究の目的

本研究は生きた骨組織を用いて Ca^{2+} イメージングを行い、その中に存在する骨芽細胞と骨細胞によって営まれる機械的刺激に起因した Ca^{2+} オシレーションについて時空間的な特性をリアルタイム解析することを第一の目的とした。またそれらの現象に対する制御機構について、応答細胞がどのように周囲の細胞へ情報を伝えているのかを、主要な細胞内情報伝達系の一つであるギャップ結合(GJ)に着目して検討した。

3. 研究の方法

(1) ニワトリ胚頭蓋骨からの骨片採取
胎生 16 日齢のニワトリ胚から頭蓋骨を採取し、骨膜を取り除いた後 2x2 cm の大きさにトリミングを行った。胎生期の頭蓋骨は薄く、そのまま観察することが可能である。

(2) 蛍光染色および切片作成

トリミングされたニワトリ胚頭蓋骨を蛍光カルシウムインディケーター Fluo8-AM (10 μM)にて生きた状態のまま蛍光染色し、骨

組織内に存在する細胞を生きた状態のまま光学的に可視化させた。アセトキシメチル(AM)基は電氣的に中性の分子で、細胞膜透過性を有する。一度細胞内に入ると、細胞内エステラーゼによってAM基は切断され、色素は細胞内に保持される。その後 2%FBS 培養液へ入れ 37 \square 5% CO_2 環境下にて 60 分培養を行った後、培養液を α -MEM へ置換えし、スライドガラス上で切片作成した。

(3) メカニカルストレスの付与

骨組織へのメカニカルストレスは、骨表面への流体刺激を用いた。その刺激に伴う骨細管内での液体の流れは、既報に基づき(Ishihara et al., J Bone Miner Res 2008)蛍光退色法にて確認を行った。

(4) 共焦点レーザー顕微鏡によるリアルタイム観察

観察は共焦点レーザー顕微鏡システム FLUOVIEW FV500(OLYMPUS)を用い、3秒間隔100回連続でのタイムラプス撮影によって行った。共焦点レーザー顕微鏡は、共焦点の位置にピンホールを置くことによって焦点以外からの光をカットし、焦点からの光のみを検出する。そのため通常の蛍光顕微鏡と比べ分解能が高く、深部の骨細胞の観察に適している。

(5) 時空間的解析

共焦点レーザー顕微鏡から得られた連続画像から全細胞中におけるカルシウム応答を示した細胞の割合、その応答の強さ、頻度という時空間的特性を解析した。また、骨組織表面に存在する骨芽細胞と、深部に存在する骨細胞について比較検討を行った。

(6) 細胞間伝達因子との関連性の検討

細胞間情報伝達の調節因子であるギャップ結合(GJ)に着目し、阻害剤を前投与し、細胞応答の比較検討を行った。

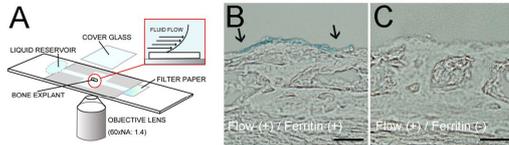
(7) 統計解析

すべての結果はステューデントt-テストおよびマンホイットニーUテストにより統計処理した。

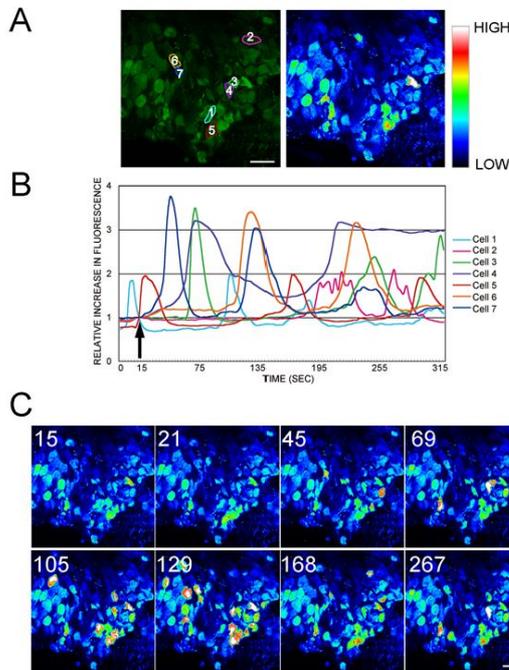
4. 研究成果

1) 生骨組織へのメカニカルストレス
ニワトリ胚頭蓋骨に対するメカニカルストレスの負荷に関して以下の図に示す。図のAは骨組織へのメカニカルストレス負荷方法の概略である。骨組織への流体刺激は濾紙と液体の表面張力の特性を利用した流体剪断応力を負荷した。B-Cは鉄粒子である Ferritin を含んだ流体を骨組織に与え、連続切片を作成後、同部を微分干渉顕微鏡で観察した像である(Bar = 10 μm , 矢印は Ferritin を示す。)。ニワトリ胚頭蓋骨中への流体剪断応力によるメカニカルストレスは、骨表面の骨芽細胞層

へ負荷されることが定義出来た。

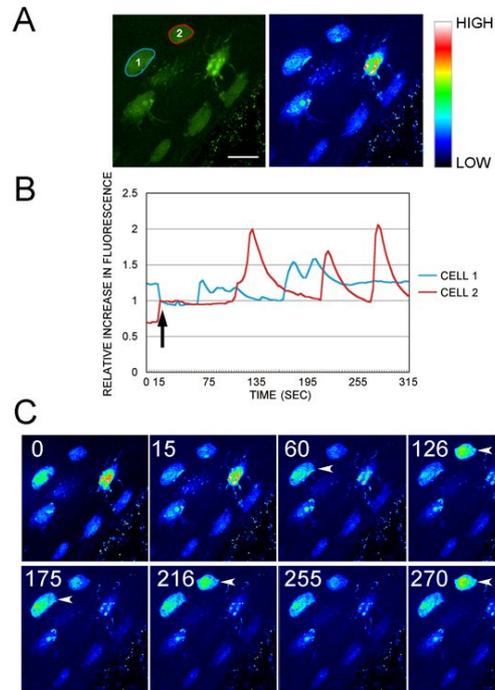


2) 生骨組織中の骨芽細胞におけるメカニカルストレスに対する細胞内 Ca^{2+} オシレーションのリアルタイム観察
共焦点レーザー顕微鏡を用い、生骨組織表層の骨芽細胞についてメカニカルストレス負荷後 3 秒間隔 100 回連続でのタイムラプス撮影を行った一例を示す。



上記図の A 左は Fluo8 による骨芽細胞蛍光染色像、右は輝度値に応じて疑似化した像である。B は A で示した細胞 1-7 についてメカニカルストレス負荷前 15 秒および負荷後 300 秒の連続撮影を行った輝度値の変化を示す。C は B のグラフからカルシウム反応を示した時間における疑似蛍光像である (Bar = 50um)。メカニカルストレス負荷後の骨芽細胞は、負荷直後から様々なパターンで周期的カルシウム濃度の上昇を引き起こす事が示された。

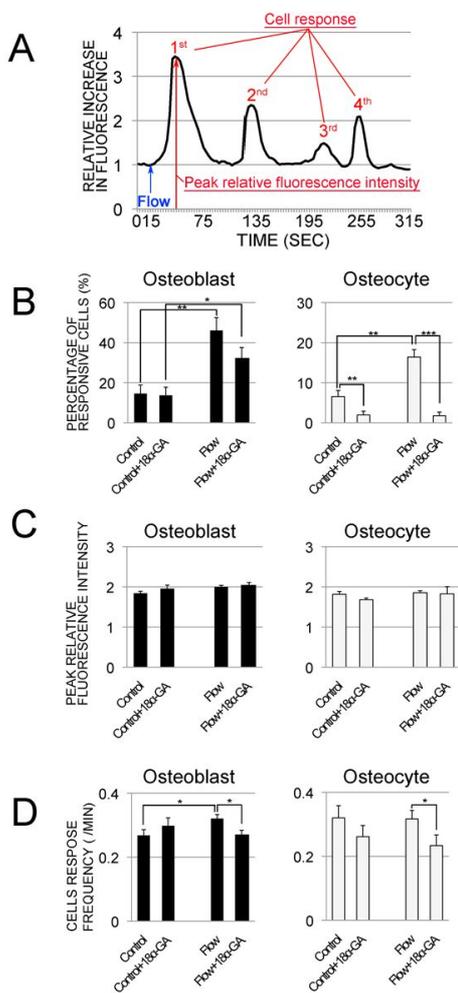
3) 生骨組織中の骨細胞におけるメカニカルストレスに対する細胞内 Ca^{2+} オシレーションのリアルタイム観察
共焦点レーザー顕微鏡を用い、生骨組織表層の骨細胞について同様のタイムラプス撮影を行った一例を示す。



上記図の A 左は Fluo8 による骨細胞蛍光染色像、右は輝度値に応じて疑似化した像である。B は A で示した細胞 1-2 についてメカニカルストレス負荷前 15 秒および負荷後 300 秒の連続撮影を行った輝度値の変化を示す。C は B のグラフからカルシウム反応を示した時間における疑似蛍光像である (Bar = 10um, 矢頭は反応を示した細胞を示す)。メカニカルストレス負荷後の骨細胞においても、周期的カルシウム濃度の上昇を引き起こす事が示されたが、反応しない細胞も認められた。

4) 生骨組織中におけるメカニカルストレスに対する細胞内 Ca^{2+} オシレーションの制御機構 -ギャップ結合について-

下記図 A は、共焦点レーザー顕微鏡から得られた連続画像から全細胞中におけるカルシウム応答を示した細胞の割合、その応答の強さ、頻度という時空間的解析を行なう手法に関しての概略図である。ギャップ結合は、骨細胞同士や骨芽細胞同士だけでなく、骨細胞と骨芽細胞とをシンクロナイズさせる細胞間情報伝達因子である。



ギャップ結合阻害剤である 18 alpha-glycyrrhetic acid (18 α-GA) を前投与した場合における骨芽細胞および骨細胞の細胞応答について解析結果を上図 B-D に示す。メカニカルストレスを負荷した場合の骨芽細胞と骨細胞の Ca²⁺ オシレーションの反応率は、定常状態と比較しそれぞれ約 3 倍と 2 倍に上昇した (図 B)。一方で、応答細胞群におけるオシレーションの反応頻度は、骨芽細胞はメカニカルストレスによって上昇傾向を示したが、骨細胞では変化は認められなかった (図 D)。これらの結果から、骨組織へのメカニカルストレスに対するカルシウム応答には、細胞種による差異がある可能性が示された。

18 α-GA を投与した場合の骨芽細胞の定常状態における Ca²⁺ 応答率は、対照群と 18α-GA 前投与群間でほぼ同値を示した。また、メカニカルストレスを負荷した場合における Ca²⁺ 応答率は 18α-GA 前投与群で減少傾向を示したものの、統計学的有意差は認められなかった。逆に骨細胞の定常状態およびメカニカルストレスを負荷した場合における Ca²⁺ 応答率は、著明に減少した (図 B)。応答の強さに関しては全ての群において有意な差を認めなかった (図 C)。18α-GA 前投与群における定常状態でのオシレーションの頻度は、骨芽細胞、骨細胞とも対照群と比較して有意な変化を示さな

かったが、メカニカルストレスを負荷した場合において骨芽細胞、骨細胞とも著明な減少が認められた (図 D)。これらの結果は、骨細胞での Ca²⁺ 応答に対するギャップ結合の関与が骨芽細胞と骨細胞によって異なり、骨細胞での Ca²⁺ 伝播にギャップ結合がより深く関与している可能性を示唆するものである。

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 14 件)

1. Ishihara Y, Sugawara Y, Kamioka H, Kawanabe N, Naruse K, Yamashiro T. Oscillatory intracellular Ca²⁺ responses in living bone. *J Oral Biosci*. 2014; in press 査読有
2. Ishihara Y, Kuroda S, Sugawara Y, Kurosaka H, Takano-Yamamoto T, Yamashiro T. Long-term stability of implant-anchored orthodontics in an adult patient with a Class II Division 2 malocclusion and a unilateral molar scissors-bite. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2014; 145(4): S100-113. doi: 10.1016/j.ajodo.2013.07.016. 査読有
3. 石原嘉人, 菅原康代, 上岡寛, 川邊紀章, 成瀬恵治, 山城隆. 蛍光ライブイメージングを用いた骨組織中における細胞内カルシウムオシレーションの計測 *日本骨形態計測学会雑誌* 2014; 24巻1号: 15-22 査読有
4. Ishihara Y, Sugawara Y, Kamioka H, Kawanabe N, Hayano S, Balam TA, Naruse K, Yamashiro T. Ex vivo real-time observation of Ca²⁺ signaling in living bone in response to shear stress applied on the bone surface. *Bone*. 2013; 53(1): 204-215. (Title on Cover) doi: 10.1016/j.bone.2012.12.002. 査読有
5. Ishihara Y, Kuroda S, Sugawara Y, Balam TA, Takano-Yamamoto T, Yamashiro T. Indirect usage of miniscrew anchorage to intrude overerupted mandibular incisors in a Class II patient with a deep overbite. *Am J Orthod Dentofac Orthop*. 2013; 143(4): S113-124. doi: 10.1016/j.ajodo.2012.09.001. 査読有
6. Ishihara Y, Kuroda S, Sumiyoshi K, Takano-Yamamoto T, Yamashiro T. Extraction of the lateral incisors to treat maxillary protrusion: Quantitative evaluation of the stomatognathic functions. *Angle Orthod*. 2013; 83(2): 341-354. doi: 10.2319/042412-343.1. 査読有
7. Sugawara Y, Kamioka H, Ishihara Y, Fujisawa N, Kawanabe N, Yamashiro T. The early mouse 3D osteocyte network in the presence and absence of mechanical loading. *Bone*. 2013; 52(1): 189-96. doi: 10.1016/j.bone.2012.09.033. 査読有

8. Kato R, **Ishihara Y**, Kawanabe N, Sumiyoshi K, Yoshikawa Y, Nakamura M, Imai Y, Yanagita T, Fukushima H, Kamioka H, Takano-Yamamoto T, Yamashiro T. Gap junction-mediated communication in human periodontal ligament cells. *J Dent Res*. 2013; 92(7): 635-640. doi: 10.1177/0022034513489992. 査読有
9. **Ishihara Y**, Sugawara Y, Kamioka H, Kawanabe N, Kurosaka H, Naruse K, Yamashiro T. In situ imaging of the autonomous intracellular Ca^{2+} oscillations of osteoblasts and osteocytes in bone. *Bone*. 2012; 50(4): 842-852. doi: 10.1016/j.bone.2012.01.021. 査読有
10. Hayano S, Kurosaka H, Yanagita T, Kalus I, Milz F, **Ishihara Y**, Islam MN, Kawanabe N, Saito M, Kamioka H, Adachi T, Dierks T, Yamashiro T. Roles of heparan sulfate sulfation in dentinogenesis. *J Biol Chem*. 2012; 287(15): 12217-12229. doi: 10.1074/jbc.M111.332924. 査読有
11. Kawanabe N, Murata S, Fukushima H, **Ishihara Y**, Yanagita T, Yanagita E, Ono M, Kurosaka H, Kamioka H, Itoh T, Kuboki T, Yamashiro T. Stage-specific embryonic antigen-4 identifies human dental pulp stem cells. *Exp Cell Res*. 2012; 318(5): 453-463. doi: 10.1016/j.yexcr.2012.01.008. 査読有
12. Fukushima H, Kawanabe N, Murata S, **Ishihara Y**, Yanagita T, Balam TA, Yamashiro T. SSEA-4 is a marker of human deciduous periodontal ligament stem cells. *J Dent Res*. 2012; 91(10): 955-60. (Title on Cover) doi: 10.1177/0022034512458123 査読有
13. Honjo T, Kubota S, Kamioka H, Sugawara Y, **Ishihara Y**, Yamashiro T, Takigawa M, Takano-Yamamoto T. Promotion of Ccn2 expression and osteoblastic differentiation by actin polymerization, which is induced by laminar fluid flow stress. *J Cell Commun Signal*. 2012; 6(4): 225-32. doi: 10.1007/s12079-012-0177-z. 査読有
14. **Ishihara Y**, Kuroda S, Nishiyama A, Sasaki A, Takano-Yamamoto T, Yamashiro T. Functional improvements following orthodontic-surgical reconstruction in a patient affected by multiple maxillofacial fractures: a case report. *Am J Orthod Dentofac Orthop*. 2012; 142(4): 534-535. doi: 10.1016/j.ajodo.2011.02.029. 査読有

〔学会発表〕(計 17 件)

【シンポジウム】

1. 石原嘉人 3次元蛍光ライブイメージングで見る骨組織内の細胞応答 第8回東北大学大学院歯学研究科顎口腔矯正学分野セミナー 仙台 2013年5月8日
2. 石原嘉人, 菅原康代, 上岡寛, 成瀬恵治, 山城隆 生きた骨組織中で起こる細胞応答のイメージング 第33回骨形態計測学会 浜松 2013年7月4-6日

3. 石原嘉人 骨組織中でのライブイメージングを用いた自律性細胞内カルシウムオシレーションの検討 第55回歯科基礎医学会学術大会・総会(歯科基礎医学会賞受賞記念講演)岡山 2013年9月20-22日

【国際学会】

1. **Ishihara Y**, Sugawara Y, Kamioka H, Kawanabe N, Naruse K, Yamashiro T. *In situ* imaging of the autonomous intracellular Ca^{2+} oscillations of osteoblasts and osteocytes in bone. 1st Asia-Pacific Bone and Mineral Research Meeting with ANZBMS 22nd Annual Scientific Meeting, Perth, Australia 2012 September 2-5th
2. Kawanabe N, Fukushima H, Murata S, **Ishihara Y**, Yanagita T, Balam TA, Yamashiro T. Stage-specific embryonic antigen-4 is a marker of human deciduous periodontal ligament stem cells. The ASBMR 34th Annual Meeting Minneapolis, USA 2012 October 12-15th
3. **Ishihara Y**, Sugawara Y, Kamioka H, Kawanabe N, Naruse K, Yamashiro T. Live imaging of fluid flow-induced Ca^{2+} signaling of osteoblasts and osteocytes in bone: implications for gap junctional intercellular communication. The ASBMR 34th Annual Meeting Minneapolis, USA 2012 October 12-15th
4. Kato R, **Ishihara Y**, Kawanabe N, Sumiyoshi K, Yoshikawa Y, Nakamura M, Imai Y, Yanagita T, Fukushima H, Kamioka H, Takano-Yamamoto T, Yamashiro T. Gap junction-mediated communication in human periodontal ligament cells. NIH-Tohoku University-JSPS Symposium Sendai, Japan 2013 May 9th-10th
5. **Ishihara Y**, Sugawara Y, Kamioka H, Kawanabe N, Hayano S, Balam TA, Naruse K, Yamashiro T. *Ex vivo* real-time observation of Ca^{2+} signaling in living bone in response to shear stress applied on the bone surface. 2nd Joint Meeting of the International Bone and Mineral Society and the Japanese Society for Bone and Mineral Research Kobe, Japan 2013 May 28th- June 1st
6. Sugawara Y, Kamioka H, **Ishihara Y**, Fujisawa N, Kawanabe N, Yamashiro T. The early mouse 3D osteocyte network in the presence and absence of mechanical loading. 2nd Joint Meeting of the International Bone and Mineral Society and the Japanese Society for Bone and Mineral Research Kobe, Japan 2013 May 28th- June 1st
7. **Ishihara Y**, Sugawara Y, Kamioka H, Kawanabe N, Yamashiro T. *Ex-vivo* imaging of fluid flow-induced intracellular Ca^{2+} oscillations of osteoblasts and osteocytes in bone. 89th

【国内学会】

1. 石原嘉人, 菅原康代, 上岡寛, 川邊紀章, 成瀬恵治, 山城隆. 蛍光ライブイメージングを用いた骨組織における自律性細胞内カルシウムオシレーションの計測. 第32回骨形態計測学会大阪 2012年6月7-9日
2. 石原嘉人, 菅原康代, 上岡寛, 山城隆. 生体ライブイメージングを用いた骨組織における自律性細胞内カルシウムオシレーションの解析. 第30回日本骨代謝学会学術集会 東京 2012年7月19-21日
3. 加藤龍史, 石原嘉人, 上岡寛, 山本照子, 山城隆. 低酸素環境下におけるヒト歯根膜細胞間ギャップ結合の機能性および調節機構の検討. 第54回歯科基礎医学会学術大会・総会 福島 2012年9月14-16日
4. 石原嘉人, 菅原康代, 上岡寛, 川邊紀章, 柳田剛士, 住吉久美, 山城隆. イノシトール三リン酸は生きた骨組織中における細胞内カルシウム応答の必須因子である. 第71回日本矯正歯科学会大会 盛岡 2012年9月26-28日
5. 保崎留美子, 上岡寛, 今井裕一, 石原嘉人, 菅原康代, 山城隆. 電子トモグラフィ法による骨芽細胞のコラーゲン排出過程の観察. 第71回日本矯正歯科学会大会 盛岡 2012年9月26-28日
6. 加藤龍史, 石原嘉人, 川邊紀章, 上岡寛, 山本照子, 山城隆. ヒト歯根膜細胞間ギャップ結合の機能性および調節機構は低酸素環境下において抑制的に調節される. 第31回日本骨代謝学会学術集会 神戸 2013年5月28-6月1日
7. 加藤龍史, 石原嘉人, 上岡寛, 山本照子, 山城隆. ヒト歯根膜細胞におけるギャップ結合を介した細胞間コミュニケーションの検討. 第55回歯科基礎医学会学術大会・総会 岡山 2013年9月20-22日

【図書】(計 1 件)

石原嘉人, 上岡寛. メディカルレビュー社
The BONE 特集『骨バイオイメージング』 骨細胞の機能イメージング 2014; 28 巻 2 号: in press

【産業財産権】

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

【その他】

6. 研究組織

(1)研究代表者