

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：32703

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25350542

研究課題名(和文)異なるインテグリンユニットによる骨の力学的刺激受容の特異性と多様性の制御

研究課題名(英文) Different integrins are essential to the specific responses of bone cells to variable mechanical stimuli

研究代表者

高垣 裕子 (Mikuni-Takagaki, Yuko)

神奈川県大学・歯学研究科(研究院)・特任教授

研究者番号：60050689

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：骨組織の力学的刺激受容は骨折治癒を促進する低出力超音波パルス(LIPUS)刺激と骨細胞を標的とする伸展刺激を使い分けるが、骨芽細胞の骨細胞への分化に伴って変化するインテグリンのユニットが調節しているという作業仮説を立てた。マウスから単離した骨芽細胞と骨細胞細胞に上述の刺激を24時間おきに負荷した結果、LIPUS刺激を負荷された骨芽細胞が骨細胞に分化し、伸展刺激を司る $\alpha$ 5 $\beta$ 3インテグリンの発現がリン酸化酵素ERK1/2非依存的に上昇した。さらに $\alpha$ 5 $\beta$ 1インテグリン関与の下、RANKLやBCI-2の発現がアポトーシスを防ぐと共に骨のリモデリングを遂行させると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Previous studies of our own and others showed that  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 integrin is involved in the mechanical response of osteoblasts to low-intensity pulsed ultrasound (LIPUS) and  $\alpha$ 5 $\beta$ 3 integrin is involved in that of osteocytes to stretching, respectively. In this study, we further show that differentiation of osteoblasts to osteocytes was accelerated by LIPUS resulting in the increased expression of  $\alpha$ 5 $\beta$ 3 integrin. Treating isolated osteoblasts with neutralizing antibody to  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 integrin prior to the LIPUS exposure inhibited both mechanical response to LIPUS and the increased expression of  $\alpha$ 5 $\beta$ 3 integrin. Prior treatment with the inhibitor of Mitogen-Activated Protein Kinase ERK1/2, PD98059, however, did not. LIPUS prevents apoptosis and induce bone remodeling also through  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 integrin by the increased expression of BCI-2 and RANKL in the mandibular osteoblasts, in which mechanical loading is essential for homeostasis.

研究分野：硬組織と力学刺激

キーワード：骨細胞(osteocyte) 骨芽細胞(osteoblast) 力学刺激 インテグリン 細胞分化

### 1. 研究開始当初の背景

LIPUS は、1998 年以降我が国においても遷延性の骨折の治療に保険適用されてきた。我々は、LIPUS は細胞外からのCa<sup>2+</sup> の流入と細胞増殖を伴わずに骨芽細胞を分化させること、伸展刺激の受容は骨細胞内へのCa<sup>2+</sup> の流入を伴い、産生されたタンパクが骨芽細胞の骨形成を促すことを示してきた(Miyauchi et al., J Biol Chem, 2000, Naruse et al., J Bone Miner Res, 2003)。又その際 関与するインテグリンは前者が 5 1 を含む 1 インテグリン、後者の場合 v 3 インテグリンであることも報告した(Watabe et al., Exp Cell Res 2011 および Miyauchi et al., J Bone Miner Metab 2006)。顎骨から単離した骨芽細胞は、殆ど負荷を受けない頭蓋骨(由来は外胚葉で顎骨に類似)及び下肢骨(由来は中胚葉で異なるが、力学的環境は顎骨に類似)の細胞と異なり、LIPUS 刺激を負荷した時のみ、5 1 インテグリン依存的にRANKL と BCL-2 を発現して正常なリテリングを行なうことが可能となる。力学的負荷を受けたインテグリンが機能して下流の情報伝達が起きることがなければ、リテリングの停滞とアポトーシスが起ると推測された。

### 2. 研究の目的

同じフィブリネクチンをリガンドとする異なるインテグリン 5 1 と v 3 を力学刺激の受容に利用する骨芽細胞と骨細胞が、骨細胞の分化に伴って v 3 インテグリンを獲得し、異なった力学刺激(実験的にはLIPUS 刺激と伸展刺激)の受容という機能を発現できるようになることを明らかにする。

### 3. 研究の方法

(1) 8 週齢のC57BL6/Jマウスから、すでに一般的な方法を用いて初代の骨芽細胞を調製するが、その際併せてコラゲナーゼと 4 mM EGTA処理の組み合わせを繰り返す方法(Mikuni-Takagaki et al., J Bone Miner Res 1995 および Miyagawa et al., PLoS ONE 2014) で骨細胞を単離した。

(2) 骨芽細胞を標的とするLIPUS 刺激と骨細胞を標的とする伸展刺激を一日一回負荷した骨芽細胞の骨細胞への分化はケラトカンの発現の減少やFGF23の発現の増加により検証した。力学刺激はこれまで報告した通り24時間おきに与え、継時的に細胞を回収した。細胞

にそれぞれの刺激を与える際、異なるインテグリン阻害剤(5 1 と v 3 に対する中和抗体や各種MAPK阻害剤)で前処理を行う群を設け、シグナル伝達経路の検討に供した。インテグリンの発現も検討した。

(3) 固定後の免疫染色でタンパク質の発現を、回収したmRNA からは遺伝子発現の変化を解析した。

### 4. 研究成果

(1) 正常な咬合などの力学刺激の代替と考えられる LIPUS 刺激負荷の条件下では、LIPUS 刺激に応じて骨芽細胞が骨細胞の方向へ分化し、骨細胞を標的とする伸展刺激を司る v 3 インテグリンがタンパク質・mRNA 共に増加していくのが確認された。

(2) LIPUS 5 1 インテグリン RANKL・BCL-2 の経路により ERK1/2 非依存的に情報が伝達され、アポトーシスを防ぐと共に骨のリテリングが遂行できる可能性が示された。

(3) 一方で、伸展刺激を負荷された骨細胞においては、v 3 インテグリンに同様の増加傾向がみられたが、(1)の骨芽細胞のような著明な変化ではなかった。

(4) 骨芽細胞は、力学的負荷を受けることにより分化し、v 3 インテグリンを獲得し、伸展刺激の受容という機能を発現できるようになると考えられる。

### 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 7 件)

Nakamura H, Aoki K, Masuda W, Alles N, Nagano K, Fukushima H, Osawa K, Yasuda H, Nakamura I, Mikuni-Takagaki Y, Ohya K, Maki K, Jimi E, Disruption of NF- $\kappa$ B1 Prevents Bone Loss Caused by Mechanical Unloading. Journal of Bone and Mineral Research, 査読有, 2013, 1457-1467

DOI: 10.1002/jbmr.1866

Miyagawa K, Yamazaki M, Kawai M, Nishino J, Koshimizu T, Ohata Y, Tachikawa K, Mikuni-Takagaki Y, Kogo M, Ozono K, Michigami T, Dysregulated

Gene Expression in the Primary Osteoblasts and Osteocytes Isolated from Hypophosphatemic Hyp Mice, PLoS ONE, 査読有, 9(4): e93840  
DOI:10.1371/journal.pone.0093840,  
Heeckt P, Goost H, Lin SS, McKinley TO, Mehta S, Mikuni-Takagaki Y, A not-so-systematic review. Can J Surg, 査読有, 57(5), 2014, E150-151  
DOI:10.1503/cjs.009514  
Mikuni-Takagaki Y, Introduction: The 17th Annual Meeting of the Japanese Research Society of Ultrasound Stimulation for Fracture Repair. J Orthop Trauma, 査読なし(招待), 2014, 28(6), pS1  
DOI: 10.1097/BOT.000000000000118  
Hidaka K, Miyamoto C, Wada-Takahashi S, Saita M, Kawata A, Kawamata R, Maehata Y, Minabe M, Takahashi S-S, Mikuni-Takagaki Y: Humoral response to therapeutic low-intensity pulsed ultrasound (LIPUS) treatment of rat maxillary socket after the removal of a molar tooth. Int J Anal Bio-Sci, 査読有, 3(1), 2015, 17-24,  
<http://plaza.umin.ac.jp/~e-jabs/3/3.17.pdf>  
Suzuki N, Hanmoto T, Yano S, Furusawa Y, Ikegame M, Tabuchi Y, Kondo T, Kitamura K, Endo M, Yamamoto T, Sekiguchi T, Urata M, Mikuni-Takagaki Y, Hattori, A. Low-intensity pulsed ultrasound induces apoptosis in osteoclasts: Fish scales are a suitable model for the analysis of bone metabolism by ultrasound, Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol, 査読有, 195, 2016, 26-31.  
DOI:10.1016/j.cbpa.2016.01.022. Epub 2016  
Harrison A, Lin S, Pounder N, Mikuni-Takagaki Y, Mode & mechanism of low intensity pulsed ultrasound (LIPUS) in fracture repair, Ultrasonics, 査読有, 70, 2016, 45-52  
DOI: 10.1016/j.ultras.2016.03.16.

〔学会発表〕(計 7件)

渡部弘隆,河田亮,船山祐太,田島愛弓,石井信之,高垣裕子,神経堤由来の下顎骨における力学刺激依存性の骨代謝.第30回日本骨代謝学会学術集会,2013,東京

高垣裕子,メカニカルストレスに対して部位特異的な骨の応答,第33回日本骨形態計測学会シンポジウム1メカニカルストレスと骨,2013,浜松

Hidaka K., Saita M., Kawamata R., Funayama Y., Watabe H., Sato T., Kawata A., Tanaka T., Maehata Y., Miyamoto C, Taniguchi M., Tajima A., Hirata K., Deguchi S., Hamada N., Tani-Ishii N., Mikuni-Takagaki Y., LIPUS Prevents BRONJ-like Pathology in an Ovariectomized Rat Model, International Bone & Mineral Society Herbert Fleisch Workshop, 2014, Brugge, Belgium,

高垣裕子,骨再生における超音波によるシグナル伝達,日本超音波医学会第87回学術集会シンポジウム分子基盤に立った超音波の治療応用,2014,横浜

高垣裕子,骨・軟骨細胞における低出力超音波パルスによる骨折治癒のシグナル伝達,第42回日本生体電気・物理刺激研究会シンポジウム1メカニカルストレスの生体受容機構,2015,東京

Hidaka K, Miyamoto C, Kawamata R, Wada-Takahashi S, Takahashi S-S, Maehata Y, Saita M, Sato T, Taniguchi M, Kawata M, Ozaki Y, Funayama Y, Watabe H, Tani-Ishii N, Hamada N, Deguchi S, Mikuni-Takagaki Y, Low-intensity Pulsed Ultrasound Prevents Malhealing of Infected Rat Extraction Socket. 93rd General Session & Exhibition of the IADR/44th Annual Meeting of the AADR/39th Annual Meeting of the CADR, 2015, Boston, USA

高垣裕子,顎骨における力学的刺激伝達と低出力超音波パルスによる骨折治癒のメカニズムOral mechano-transduction and mechanisms of fracture healing induced by Low Intensity Pulsed Ultrasound 第4回

Digital Orthodontics研究会シンポジウム, 2015, 福岡

〔図書〕(計 4件)

高垣裕子, 金芳堂, 低出力超音波刺激に対する細胞応答, pp.123-128 in 日本生体電気・物理刺激研究会編生体電気・物理刺激による骨・軟部組織修復法, 2013, 304

高垣裕子, 田中隆博, ウィネット IX 骨組織評価の方法の最前線 4 ナノインデンテーション法 pp.175-183, in 新しい骨形態計測, 2013, 232

高垣裕子, 化学同人, 15章口腔におけるメカノバイオロジー, pp.193-202, in メカノバイオロジー 細胞が力を感じ応答する仕組み, 2015, 332

高垣裕子, 東京臨床出版, 2-1 骨折治癒のメカニズム, 4-1 低出力超音波刺激による骨折・創傷治癒促進のメカニズム・Q & A in 加速矯正 基礎と臨床, 2016, 122

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

高垣 裕子 (TAKAGAKI, Yuko)

神奈川歯科大学・大学院歯学研究科・特任教授  
研究者番号: 60050689

(2)研究分担者

田中 隆博 (TANAKA, Takahiro)

神奈川歯科大学・歯学部・研究員  
研究者番号: 90550830

(3)連携研究者

森下 信 (MORISHITA, Shin)

横浜国立大学・研究院環境情報研究科・教授  
研究者番号: 80166404

(3)研究協力者

アンドリュー ハリソン (HARRISON, Andrew)