

指 導 教 授 氏 名	指 導 役 割
印	研究の総括・総合的指導
印	
印	

学 位 論 文 要 旨

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科

専攻分野 歯科矯正学	身分 大学院生	氏名 田中 智代
論 文 題 名 骨細胞の分化に伴うメカニカルストレス応答の変化と3次元培養によるその変化の遺伝子的解析		
論文内容の要旨（2000字程度）		
<p>【緒言】 骨細胞は骨組織の中で3次元細胞間ネットワークを形成している。骨細胞は機械的刺激の受容と周囲の細胞への情報伝達を行い、骨芽細胞や破骨細胞の活性を調整することで、骨のモデリングやリモデリングに関与している。機械的刺激の中でも流体せん断応力は、骨細胞の細胞内カルシウム(Ca²⁺)を上昇させることが知られている。Ishiharaらは生体骨組織での細胞内Ca²⁺応答を解析するために、共焦点レーザー顕微鏡を用いてニワトリ胚頭蓋骨の骨表層の骨芽細胞と深部の骨細胞の細胞内Ca²⁺応答の観察を行った。しかしながら、この方法では細胞間ネットワークにおけるCa²⁺応答の経時的変化を立体的にとらえることは困難であり、機械的刺激に対して異なる細胞層で同時に生じる細胞内Ca²⁺応答の変化は不明であった。本研究では、多光子励起レーザー走査型顕微鏡を用いて骨組織の3次元タイムラプスイメージングを行い、ニワトリ胚頭蓋骨組織における類骨骨細胞と成熟骨細胞の細胞内Ca²⁺応答の経時的変化を評価した。さらにそれらの違いに与える因子を検討するために、骨細胞様細胞株MLO-Y4をコラーゲンゲル培地で3次元培養し、類骨骨細胞と成熟骨細胞を想定した培養期間の違いが骨細胞の遺伝子発現に与える影響を調べた。</p> <p>【材料と方法】 3次元タイムラプスイメージングは、胎生16日齢ニワトリ胚頭蓋骨の細胞にCa²⁺蛍光指示薬Fluo-8, AMを取り込ませ、多光子励起レーザー走査型顕微鏡を用いて212×212×20 μmの立体的な領域のスライス画像を経時的に取得した。機械的刺激として流体せん断応力を用いた。骨細胞の成熟の違いにより生じる機械的刺激に対する細胞内Ca²⁺応答の違いに与える因子を調べるため、コラーゲンゲル培地で骨細胞様細胞株MLO-Y4を3次元培養し、培養開始7日目と15日目にRNAを回収し、骨細胞関連遺伝子の発現変化を定量RT-PCRにより評価した。</p> <p>【結果および考察】 1. 多光子励起レーザー走査型顕微鏡による機械的刺激に対する細胞内Ca²⁺応答の3次元タイムラプスイメージング 多光子励起レーザー走査型顕微鏡を用いて骨組織中の細胞内Ca²⁺応答を、定常時と流体せん断応力負荷時で記録し、画像を3次元構築することで、機械的刺激が細胞内Ca²⁺応答に与える影響を立体的に可視化することが出来た。Ca²⁺蛍光指示薬Fluo-8, AMを取り込んだ各細胞の輝度値の経時的変化を解析したところ、骨表層から約12.5μmの類骨に存在する類骨骨細胞では流体せん断応力を負荷する前後で蛍光輝度に大きな変化は見られなかった。骨表層から約20μmの石灰化領域にある成熟骨細胞では、定常状態と比較して流体せん断応力を負荷した後では蛍光輝度が上昇している骨細胞が観察された。定常状態では両者の細胞内Ca²⁺応答に差は見られないが、流体せん断応力を負荷すると、類骨骨細胞と比較して成熟骨細胞では細胞の蛍光強度は有意に上昇していた。</p>		

2. 3次元培養した MLO-Y4 細胞の特徴

ニワトリ胚頭蓋骨の骨細胞の細胞骨格の蛍光染色画像から、類骨骨細胞と比較して、成熟骨細胞は紡錘形であり、骨梁の長軸方向に沿って排列していた。さらに成熟骨細胞の細胞突起は幼若骨細胞と比較して長く、周囲の骨細胞と連結していた。

骨基質中の環境を模擬するために、 \square 型コラーゲンゲルを用いて MLO-Y4 細胞を 3 次元培養した。培養 3 日目では細胞は独立し、短い細胞突起様のものが観察された。培養開始 7 日目から 15 日目にかけて MLO-Y4 細胞は突起状のものを伸ばし、周囲の細胞と連結するようになった。さらに、骨細胞マーカーとして成熟骨細胞で高発現する *Sost* と幼若骨細胞で高発現する *Dmp1* の遺伝子発現を定量 RT-PCR により評価したところ、*Sost* の発現量は培養開始 7 日目と比較して 15 日目に最も上昇し、*Dmp1* の発現量は培養開始 7 日目に最も高く、15 日目には著しく減少していた。3 次元培養した MLO-Y4 細胞は培養期間が長くなるにしたがい、形態的、機能的に類骨骨細胞から成熟骨細胞の特徴と類似した特徴を持つようになることが示された。

3. 骨細胞関連遺伝子の発現

骨細胞の成熟が骨細胞の生理機能に与える影響を調べるために、3 次元培養開始 7 日目と 15 日目の MLO-Y4 細胞から mRNA を回収し、骨細胞関連遺伝子である *c-Fos*, *Cx43*, *Colla1*, *OCN*, *Fgf23* に与える影響を定量 RT-PCR 法を用いて評価した。3 次元培養 7 日目と比較して 15 日目では、*c-Fos*, *Cx43*, *Colla1*, *OCN* の mRNA の発現は優位に上昇していたが、*Fgf23* の発現では有意差は見られなかった。*Cx43* の上昇は骨細胞の成熟がギャップジャンクションを介する細胞間ネットワーク構築を促進することを示し、*Colla1*, *OCN* の上昇は成熟骨細胞が骨のモデリングやリモデリングを潜在的に促進している可能性を示唆した。

【結論】

機械的刺激に対する細胞内 Ca^{2+} 応答は、類骨骨細胞と比較して成熟骨細胞で著しく上昇することが明らかとなった。また、骨細胞はその成熟に伴って、コネキシン 43 の発現が亢進されることが示された。成熟骨細胞はギャップジャンクションを介する細胞間ネットワークの構築を増強することで、細胞内 Ca^{2+} 応答が促進され、骨化の進行した深部骨組織での骨代謝能が高められている可能性が示唆された。