

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解析

田中 智代

緒言

骨細胞は骨を構成する細胞の中で最も多く存在する細胞である。骨細胞は石灰化した骨基質の中で細胞突起を伸ばし、周囲の骨細胞や骨表層に存在する骨芽細胞と結合し、3次元細胞間ネットワークを構築している^{1,2)}。骨細胞は機械的刺激の受容細胞としての機能を担い、細胞間コミュニケーションを介して周囲の細胞に情報伝達を行い、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³⁻⁸⁾。*In vitro*の実験では機械的刺激は、様々なシグナル経路を介して骨系細胞の活性を調整することが示されており⁹⁻¹¹⁾、機械的刺激の中でも液体と物質との間に生じる流体せん断応力は骨細胞のイオンチャネルを介して細胞内 Ca^{2+} 濃度を上昇させることが知られている¹²⁾。細胞内 Ca^{2+} はセカンドメッセンジャーとしての働き、細胞間のシグナル伝達の調整などの機能を担っている¹³⁾。単離した骨細胞では、流体せん断応力により細胞内 Ca^{2+} 濃度が急速に上昇することが報告されており¹⁴⁻¹⁶⁾、骨組織では骨表層で感知された機械的刺激は骨芽細胞から骨細胞へギャップジャンクションを介する細胞間コミュニケーションを経て伝達されることで、細胞内 Ca^{2+} 応答が活性化されることが示唆された¹⁷⁾。ギャップジャンクション構成タンパクであるコネキシン 43は骨細胞と骨芽細胞の接合部での発現が確認されており、骨形成やリモデリングに影響を与え^{18, 19)}、骨組織の構築や骨細胞の生存にも関与している²⁰⁾。また、骨細胞は機械的刺激の負荷によりギャップジャンクションの

へミチャネルが開口し、骨細胞内部と細胞外環境との情報伝達を行っている 21, 22)。

間葉系幹細胞から分化した骨芽細胞は、骨基質に包埋されることで形態的、機能的特徴を変化させ、骨細胞に分化する。骨の表層に存在する骨芽細胞は、周囲に基質を合成し、細胞直下には完全に石灰化されていない骨基質である類骨を形成する。骨芽細胞の一部は類骨に取り込まれて幼若な骨細胞となり、類骨骨細胞とよばれるようになる 23)。骨芽細胞はさらに類骨の石灰化を誘導し、類骨骨細胞は石灰化した骨基質の中で細胞突起を維持し、成熟骨細胞となる。成熟骨細胞は細胞体と細胞突起を骨小腔、骨細管と呼ばれる間隙に囲まれており、この骨小腔-骨細管システムとよばれる微細構造が骨細胞の機械的刺激の受容と情報伝達に関与していると考えられている 24)。Ishihara らは生体骨組織での細胞内 Ca^{2+} 応答を解析するために、ニワトリ胚頭蓋骨の骨片を用いた生体ライブイメージングを行った 25)。さらに機械的刺激に対する生体骨組織の細胞応答を観察するために、骨表層の骨芽細胞層と骨深部の骨細胞層のそれぞれの細胞層の機械的刺激に対する細胞内 Ca^{2+} 応答が観察されていたが 17, 26)、それぞれの細胞層は異なる骨片を用いて観察されており、立体的に隣接する骨細胞同士の Ca^{2+} 応答を比較することはできていなかった。そのため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 Ca^{2+} 応答の変化は不明であった。本研究では、3次元タイムラプスイメージングを用いて、ニワトリ胚頭蓋冠骨組織における類骨骨細胞と成熟骨細胞における細胞内 Ca^{2+} 濃度の経時的変化を評価した。さらに、それら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 27, 28)、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。

材料と方法

1. 試料作製

16日齢ニワトリ胚頭蓋骨を試料とした。頭蓋骨は採取後、10%ウシ胎仔血清(FBS)を含む α 改変型最小必須培地(α -MEM; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)で洗浄し、骨膜を可能な限り除去した。頭蓋骨は後述の流体せん断応力負荷装置に設置するために、 3×5 mmの直方体の骨片となるように切り出した。骨片は類骨骨細胞を含む類骨領域および、成熟骨細胞を含む石灰化の領域を含んでいた。

2. Ca^{2+} 蛍光指示薬の導入

作製した骨片の細胞内 Ca^{2+} 濃度の測定には Ca^{2+} 蛍光指示薬 Fluo-8 No Wash Calcium Assay Kit (AAT Bioquest, Inc. Sunnyvale, CA, USA)をプロトコルに従って使用した。20 mM HEPES 含有 Hanks' buffer (HHBS)と界面活性剤 Pluronic F-127 を含む $10 \mu\text{M}$ Fluo-8, AM に骨片を浸漬させた。37 °C、5% CO_2 気相下で20分間培養し、 α -MEMで2回洗浄した。厚みのある骨組織での細胞分布や時間依存性の褪色など、蛍光輝度変化への影響を低減させるためにレシオメトリ法²⁹⁾に従って $10 \mu\text{M}$ Fura Red, AM (Invitrogen)を導入し、骨片に含まれる骨細胞の細胞内 Ca^{2+} 濃度の定量的評価を行った。

3. 多光子励起レーザ走査型顕微鏡による観察

骨組織中の骨細胞は、多光子励起レーザ走査型顕微鏡(FLUOVIEW FV1200

MPE, Olympus, Tokyo, Japan)で観察した。1辺を 212 μm とする正方形の領域を 512 \times 512 ピクセルで取得し、2.5 μm 間隔で 9 平面のスライス画像の撮影を行い、212 \times 212 \times 20 μm の直方体の領域の経時的な画像データを取得した。レーザーの走査速度は 1 平面のスライス画像の撮影で 1.23 秒であり、9 平面のスライス画像の記録時間は計 11.1 秒であった。以前の我々の報告では、 Ca^{2+} 応答を示した骨細胞の細胞内 Ca^{2+} 濃度の 1 回の増減は約 30 秒程度かかることから^{17, 25)}、11.1 秒毎の観察は骨細胞の Ca^{2+} 応答の有無を記録するのに妥当な記録時間であると判断した。9 平面のスライス画像を繰り返し記録し、記録開始から 323.2 秒後に流体せん断応力を負荷した。すべての画像の記録時間は 657.6 秒であった。

4. 機械的刺激の負荷

骨片の表面に機械的刺激として流体せん断応力を負荷するために、カバーガラス(25 \times 50 mm, 厚さ 0.12~0.17 mm, Matsunami glass Ind., Ltd, Osaka, Japan)に、10 \times 25 mm の大きさに切ったシリコンシート(厚さ 100 μm)を中央に 5 mm の幅を残して長軸方向沿って両端に貼り、高さ 100 μm 、幅 5 mm の液体経路を作製した。液体経路上に骨片を設置し、20 \times 26 mm の大きさに切ったスライドガラスの長辺がカバーガラスの長軸と垂直になるように載せて骨片を固定した。その後、スライドガラスの両端に α -MEM を貯留し、片側の同培地をシリンジポンプを用いて 1 分間に 0.1 mL の速度で吸引し、カバーガラスとスライドガラスの間の液体経路に液体の移動を発生させ、骨片の表面に流体せん断応力を負荷した(図 1 A)。

5. 株化骨細胞の培養

培養細胞として、マウス大腿骨由来骨細胞様細胞株 MLO-Y4 細胞を使用した²⁷⁾。MLO-Y4 細胞は 10 % FBS, 1 % ペニシリン-ストレプトマイシンを含む α -MEM を使用し、37 °C、5 % CO₂ 気相下で 100 mm 細胞培養用皿を用いて密に培養される直前の状態になるまで培養を行い、継代したものを実験に用いた。3次元培養は、ブタ腱由来 I 型コラーゲン (Nitta gelatin, Osaka, Japan) と 2 倍濃度の α -MEM の等量混合物の中に MLO-Y4 細胞を懸濁し、12 穴培養皿に各 1.5×10^6 cells/mL gel の濃度となるよう調整し、1 mL ずつ播種した。20 分間 37 °C、5 % CO₂ 気相下でコラーゲンゲル培地を硬化させた後、液体培地として 10 % FBS、1 % ペニシリン-ストレプトマイシンを含む α -MEM を 1 mL ずつ分注し、37 °C、5 % CO₂ 気相下で培養した。硬化したゲルの上の同液体培地は 2~3 日毎に交換した。

6. 定量 RT-PCR 法

類骨骨細胞と成熟骨細胞を想定した培養期間の違いが MLO-Y4 細胞の遺伝子発現に与える影響について調べるために、培養開始から 7 日後と 15 日後の MLO-Y4 細胞の mRNA の発現量を定量 RT-PCR 法を用いて評価した。全 RNA の抽出には RNeasy Mini Kit (Quiagen, Hilden, Germany) をプロトコルに従って使用した。逆転写反応は全 RNA 500 ng を avian myeloblastosis virus reverse transcriptase (Takara Bio, shiga, Japan) を用いて行った。定量 RT-PCR は StepOnePlus (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を用いて行った。酵素反応には SYBR Green Realtime PCR Master Mix (Toyobo, Osaka, Japan) を使用した。各 mRNA 量は glyceraldehyde 3-phosphate

dehydrogenase(*gapdh*) mRNA 量を用いて標準化した。使用プライマーの各塩基配列を表 1 に示す。

結果

1. 多光子励起レーザ走査型顕微鏡による機械的刺激に対する Ca^{2+} 応答の 3 次元タイムラプスイメージング

レシオメトリー法に従って、Fluo-8, AM と Fura Red, AM を用いて骨組織中の細胞を蛍光染色し、多光子励起レーザ走査型顕微鏡で骨細胞の細胞内 Ca^{2+} 応答の観察を行った(図 2A~D)。3 次元画像解析ソフト Volocity (Perkin Elmer, Kanagawa, Japan)を用いて記録した画像を 3 次元構築した(図 2E)。このデータを用いて、骨細胞の細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化を測定するために、各細胞の Fluo-8, AM の蛍光輝度値の経時的変化を解析した。骨表層から約 12.5 μm の領域では石灰化の進んでいない骨基質である類骨に存在する類骨骨細胞が観察された(図 2A, B)。類骨骨細胞では流体せん断応力を負荷する前後で骨細胞の輝度に大きな変化は見られなかった(図 2A, B 白矢印)。骨表層から約 20 μm 深部では石灰化の進んだ骨梁の骨基質に埋まっている成熟骨細胞が観察された(図 2C, D)。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輝度が上昇している骨細胞が観察された(図 2C, D 白矢頭)。類骨骨細胞と成熟骨細胞のそれぞれの細胞を無作為に選び、蛍光輝度値の平均を求め、相対蛍光強度の経時的変化を示した(図 2F)。定常状態では両者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(図 2G)。

2. 3 次元培養した MLO-Y4 細胞の特徴

類骨骨細胞と成熟骨細胞の細胞内 Ca^{2+} 応答の違いに影響を与える因子を検討するために、培養期間の異なる株化細胞株 MLO-Y4 細胞を用いて、その特徴の違いを検証した。まずは 3 次元培養が MLO-Y4 細胞に与える影響を確認するために、MLO-Y4 細胞の形態とニワトリ胚頭蓋骨骨組織中の骨細胞と形態を比較した。ニワトリ胚頭蓋冠骨組織中の骨細胞の形態的特徴を観察するために、細胞骨格と核を蛍光染色した。微分干渉像(図 3A, C)で石灰化度の高い骨梁を識別し、類骨と骨梁の境界を点線で示した。類骨で見られる類骨骨細胞と比較して、骨梁に埋まっている成熟骨細胞は紡錘形であり、骨梁の長軸方向に沿って平行に排列している。さらに成熟骨細胞の細胞突起は類骨骨細胞と比較して長く、周囲の骨細胞と連結している様子が観察された(図 3B, D)。

骨基質中の環境を模擬するために、MLO-Y4 細胞をコラーゲンゲル培地の中で 3 次元培養したところ、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(図 3E)。培養開始 7 日目では、MLO-Y4 細胞は突起状のものを伸ばし、周囲の細胞と連結し始めた(図 3F)。培養開始 15 日目ではさらに突起状のものを立体的に伸展させた(図 3G)。細胞突起の伸展が短く、周囲の細胞との連結が乏しいという点で培養開始 3~7 日目の MLO-Y4 細胞の形態は骨組織中の類骨骨細胞と類似した形態的特徴を持つようになり(図 3B, E, F)、細胞突起を伸展させて周囲の細胞との連結が多くみられるという点で長期培養した MLO-Y4 細胞は骨組織中の成熟骨細胞と類似した形態的特徴を持つようになった(図 3D, G)。

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³⁰⁾。*Sost* の発現量は 3 次元培養開始 15 日目に最も上昇し(図 3H)、*Dmp1* の発現量は 3 次

元培養開始 7 日目に最も高く、15 日目には著しく減少していた(図 3D)。これらの結果から、3 次元培養を行った MLO-Y4 細胞は培養開始から 7 日間は骨芽細胞や類骨骨細胞様の未成熟な骨細胞の特徴を持ち、培養開始 10~15 日目には成熟骨細胞様の特徴を持つようになることが確認された。

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 細胞において、機械的刺激や神経伝達物質など細胞の外部からの刺激に対して一過性の上昇を見せる *c-fos(c-Fos)*, ギャップジャンクションの構成タンパクであるコネキシン 43(*Cx43*), 基質の生合成に関与する I 型コラーゲン(*Colla1*), 骨の非コラーゲン性タンパクの 25 %を占めるカルシウム結合タンパクであるオステオカルシン(*Ocn*), 骨細胞で産生される液性因子で生体内のリンやビタミン D 代謝に関与する線維芽細胞増殖因子 23(*Fgf23*)の遺伝子に与える影響を定量 RT-PCR 法を用いて評価した(図 4)。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。

考察

これまでの共焦点レーザー顕微鏡を用いた生骨組織のタイムラプスイメージング法では、機械的刺激に対する異なる骨系細胞の Ca^{2+} 応答のデータを取得していたが^{17, 25, 31}、各細胞は異なる骨片で観察されており、機械的刺激に対して同時に生じる骨系細胞間の Ca^{2+} 応答の比較は、同一骨片を用いて行われていなかった。これは、蛍光顕微鏡による蛍光ライブイメージングでは波長の短いレーザーの励起による細胞の光毒性や蛍光色素の褪色などの問題が生じているため³²、長時間の観察で繰り返しレーザーを照射することが出来なかったからである。多光子励起レーザー走査型顕微鏡は共焦点レーザー顕微鏡と比較して励起波長を約 2 倍とするレーザーを使用するため、露光時間を長くしても細胞のダメージが少なく、本研究で行った深部骨組織における 3 次元タイムラプスイメージングに適していると考えた。骨表層から約 20 μm の石灰化骨組織の観察を行っても細胞内の蛍光色素の著しい褪色は見られず、流体せん断応力の負荷により、同時に生じる類骨と石灰化領域の骨細胞の細胞内 Ca^{2+} 応答を記録することが出来た。多光子励起レーザー走査型顕微鏡による 3 次元タイムラプスイメージングとその解析は組織レベルでの細胞間コミュニケーションを介するシグナル伝達の研究に新しい知見をもたらすと考えられる。

本研究では、流体せん断応力に対して類骨骨細胞と比較して成熟骨細胞では著しく細胞内 Ca^{2+} 応答が上昇することを示した(図 2F, G)。この結果は、成熟骨細胞は、類骨骨細胞と比較して、機械的刺激に対する感受性が高いということを示した。過去の報告では単離された細胞や *ex vivo* の研究で、流体により引き起こされた細胞内 Ca^{2+} 応答が骨小腔-骨細管システムを介して流体せん断応力を骨組織に伝達するとされてきた¹⁷。骨細胞は分化の過程で骨基質の石灰化に伴

い、細胞突起を伸展させながら、骨細胞の周囲に骨小腔、骨細管の微細空間を形成する。骨基質の石灰化が進行していない類骨では、この骨小腔-骨細管システムはまだ構築されておらず、石灰化領域では骨小腔-骨細管システムが構築されていることから、骨小腔-骨細管システムを介する骨細胞の機械的刺激の受容は、細胞の成熟度、周囲の骨基質の石灰化度などの影響を受けていることが考えられる。

そこで我々は、骨細胞の成熟が細胞の生理的作用に与える影響を調べるために、類骨骨細胞と成熟骨細胞の遺伝子の発現を比較することを検討した。しかしながら、それぞれの骨基質に埋まった骨細胞を識別して RNA を回収することは困難であり、本研究では成熟度の異なる骨細胞の遺伝子を解析するために、生体骨組織の骨基質の環境を模倣したコラーゲンゲル内で MLO-Y4 細胞を 3 次元培養し、培養期間の違いが骨細胞の遺伝子発現に与える影響を評価することとした。

3 次元培養モデルでは、MLO-Y4 細胞は周囲の細胞とコミュニケーションを行うことが報告されており³³⁾、Sugawara らは骨組織への荷重の違いは、骨細胞の形態と骨細胞の 3 次元ネットワークの形成に影響を与えることを示した³⁴⁾。本研究でも、アクチンフィラメントの染色により骨組織中の細胞の形態を観察したところ、類骨で見られる類骨骨細胞と比較して、骨梁では成熟骨細胞が細胞突起を伸展し、周囲の骨細胞とネットワークを形成していることが確認された(図 3B, D)。培養開始 7 日目の MLO-Y4 細胞では、類骨骨細胞と類似した形態的特徴がみられた。さらに、培養開始 15 日目の MLO-Y4 細胞は細胞突起を伸展させ、石灰化した骨基質に埋まった成熟骨細胞と類似した形態的特徴を持つように変化した。*Dmp1* は骨表層の幼若な骨細胞で発現し³⁵⁾、細胞外マトリク

スにおける *Dmp1* の発現は骨芽細胞マーカーの発現抑制や骨細胞の分化に重要であると報告されている³⁶⁾。*Sost* の発現は石灰化の進行した骨組織で観察される。本研究では、MLO-Y4 細胞は培養開始 7 日から 10 日において成熟骨細胞のマーカーである *Sost* の増加を示し、*Dmp1* は減少しており、これまでに報告されている骨細胞の遺伝子発現の特徴と一致していた(図 3D, E)。これらの結果から、3次元培養した MLO-Y4 細胞は形態だけではなく、機能的にも幼若骨細胞から成熟骨細胞と類似した特徴を持つようになることを確認した。

Wang らはニワトリ胚頭蓋冠骨組織において、ギャップジャンクションを介する細胞間コミュニケーションの機能を定量化し、骨細胞の細胞間コミュニケーションの効率性は骨細胞の成熟と関連があることを示した³⁷⁾。これは幼若骨細胞と成熟骨細胞の遺伝子の発現に違いがあることを示唆しており、本研究では骨細胞の成熟度による生理的機能の違いを調べるために、3次元培養システムを用いて培養した骨細胞の骨細胞関連遺伝子発現の変化を調べたところ、*c-Fos*, *Cx43*, *Colla1*, *Ocn* の発現は 7 日間培養したものと比較して 15 日間培養した MLO-Y4 細胞で有意に上昇していたが、*Fgf23* のみ変化は見られなかった(図 4)。これらの結果から、培養開始 15 日で見られた *Cx43* の遺伝子発現の増加は、骨梁中の成熟骨細胞で見られた細胞内 Ca^{2+} 応答の増加と一致しており、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の構築を強化し、細胞間コミュニケーションを促進することで Ca^{2+} 応答を上昇させていることが推測される。さらに培養開始 15 日目に *Colla1* と *Ocn* の発現が上昇するという結果から、成熟骨細胞は幼若骨細胞と比較して、骨形成やリモデリングを潜在的に促進しているという可能性を示した。骨細胞の成熟過程において、*Fgf23* は I 型コラーゲンやオステオカルシンよりも後期で役割を果たすことが報告されて

いる³¹⁾。これらのことから、骨細胞は幼若骨細胞から成熟骨細胞に分化する過程において、成熟骨細胞に分化した状態の方が機械的刺激による細胞内 Ca^{2+} 応答は劇的に促進されることを示唆しており、骨組織の深部にある成熟骨細胞は細胞間ネットワークを介して骨のモデリングやリモデリングを積極的に制御していると考えられる。

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、コネクシン 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。

謝辞

稿を終えるにあたり、懇篤なる御指導、御校閲を賜りました岡山大学大学院医歯薬学総合研究科歯科矯正学分野、上岡寛教授、京都大学ウイルス・再生医科学研究所、バイオメカニクス分野、安達泰治教授に心より感謝の意を表します。また、本研究の遂行に際し、御指導御協力していただきました岡山大学大学院医歯薬学総合研究科口腔生化学分野、西田崇准教授、歯学部先端領域研究センター、矯正歯科学分野、星島光博助教に深く感謝致します。最後に本研究を行うにあたり、御援助と御協力をいただきました岡山大学大学院医歯薬学総合研究科歯科矯正学分野の諸先生方に御礼申し上げます。

図の説明

図 1. 流体せん断応力負荷装置の模式図

図 2. 流体せん断応力が骨組織の細胞内 Ca^{2+} 応答に与える影響

(A, B) 骨表層から約 $12.5 \mu\text{m}$ の領域: 定常時(A)と負荷後(B)

(C, D) 骨表層から約 $20 \mu\text{m}$ の領域: 定常時(C)と負荷後(D)

(E) 骨組織の 3 次元構築画像

0° , 60° , 80° 回転したものを示す。(緑): Fluo-8 AM、(赤): Fura red AM

X: $212 \mu\text{m}$ 、Y: $212 \mu\text{m}$ 、Z: $20 \mu\text{m}$

(F) 類骨骨細胞(点線)と成熟骨細胞(実線)の細胞内 Ca^{2+} 濃度の平均値の経時的変化(平均値 \pm 標準偏差、 $n=10$)

(G) (F)で示した定常時と負荷後の時点での類骨骨細胞と成熟骨細胞の細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇率の比較(平均値 \pm 標準偏差、 $n=10$)(t-test $*P < 0.01$)

図 3. 3 次元培養の期間の違いが MLO-Y4 細胞に与える影響

(A-D) 微分干渉像と蛍光染色像による骨組織観察像

アクチンフィラメント(緑): Alexa 488 phalloidin、核(青): DAPI

類骨領域における微分干渉像(A)と蛍光染色像(B)

石灰化領域における微分干渉像(C)と蛍光染色像(D)

(E) 3 日間, (F) 7 日間, (G) 15 日間 3 次元培養した MLO-Y4 細胞の顕微鏡観察像

(H, I)骨細胞マーカー遺伝子の発現(H)*Sost*、(I)*Dmp1*

(t-test, * $P < 0.01$, ** $P < 0.001$)

図 4. 3 次元培養の期間が MLO-Y4 細胞の骨細胞関連遺伝子に与える影響

(t-test, ** $P < 0.001$)

表題脚注

本論文の一部は、以下の学会において発表した。

第 34 回日本骨代謝学会学術集会(2016 年 5 月、大阪)

オーストラリア・ニュージーランド骨代謝学会学術大会(2016 年 8 月、ゴールド
コースト、オーストラリア)

第 38 回米国骨代謝学会学術大会(2016 年 9 月、アトランタ、アメリカ)

日本矯正歯科学会大会(2016 年 11 月、徳島)

参考文献

1. Power, J., Loveridge, N., Rushton, N., Parker, M. and Reeve, J.: Osteocyte density in aging subjects is enhanced in bone adjacent to remodeling haversian systems. *Bone.*, **30**, 859-865, 2002.
2. Kamioka, H., Honjo, T. and Takano-Yamamoto, T.: A three-dimensional distribution of osteocyte processes revealed by the combination of confocal laser scanning microscopy and differential interference contrast microscopy. *Bone.*, **28**, 145-149, 2001.
3. Gu, G., Kurata, K., Chen, Z. and VÄÄNÄNEN, K. H.: Osteocyte: a cellular basis for mechanotransduction in bone. *Journal of Biomechanical Science and Engineering.*, **2**, 150-165, 2007.
4. Burger, E.H. and Klein-Nulend, J.: Mechanotransduction in bone-role of the lacuno-canalicular network. *FASEB J.*, **13**, 101-12, 1999.
5. Bonewald, L. F. and Johnson, M. L.: Osteocytes, mechanosensing and Wnt signaling. *Bone.*, **42**, 606-615, 2008.
6. Klein-Nulend, J., Bakker, A. D., Bacabac, R. G., Vatsa, A. and Weinbaum, S.: Mechanosensation and transduction in osteocytes. *Bone.*, **54**, 182-190, 2013.
7. Komori, T.: Functions of the osteocyte network in the regulation of bone mass. *Cell Tissue Res.*, **352**, 191-198, 2013.
8. Bonewald, L. F.: Mechanosensation and transduction in osteocytes. *Bonekey Osteovision.*, **3**, 7-15, 2006.

9. Hughes-Fulford, M.: Signal transduction and mechanical stress. *Sci STKE.*, 2004.
10. Wadhwa, S., Godwin, S. L., Peterson, D. R., Epstein, M. A., Raisz, L. G. and Pilbeam, C. C.: Fluid flow induction of cyclo-oxygenase 2 gene expression in osteoblasts is dependent on an extracellular signal-regulated kinase signaling pathway. *J Bone Miner Res.*, **17**, 266-274, 2002.
11. Wadhwa, S., Choudhary, S., Voznesensky, M., Epstein, M., Raisz, L. and Pilbeam, C.: Fluid flow induces COX-2 expression in MC3T3-E1 osteoblasts via a PKA signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun.*, **297**, 46-51, 2002.
12. You, J., Reilly, G. C., Zhen, X., Yellowley, C. E., Chen, Q., Donahue, H. J. and Hacobs, C. R.: Osteopontin gene regulation by oscillatory fluid flow via intracellular calcium mobilization and activation of mitogen-activated protein kinase in MC3T3-E1 osteoblasts. *J Bio Chem.*, **276**, 13365-13371, 2001.
13. Berridge, M. J., Bootman, M. D. and Lipp, P.: Calcium-a life and death signal. *Nature.*, **395**, 645-648, 1998.
14. Kamioka, H., Sugawara, Y., Murshid, S. A., Ishihara, Y., Honjo and T., Takano-Yamamoto, T.: Fluid shear stress induces less calcium response in a single primary osteocyte than in a single osteoblast: implication of different focal adhesion formation. *J Bone Miner Res.* **21**, 1012-1021,

2006.

15. Lu, X. L., Huo, B., Chiang, V. and Guo, X. E.: Osteocytic network is more responsive in calcium signaling than osteoblastic network under fluid flow. *J Bone Miner Res.*, **27**, 563-574, 2012.
16. Hung, C. T., Pollack, S. R., Reilly, T. M. and Brighton, C. T.: Real-time calcium response of cultured bone cells to fluid flow. *Clin Orthop Relat Res.*, 256-269, 1995.
17. Ishihara, Y., Sugawara, Y., Kamioka, H., Kawanabe, N., Hayano, S., Balam, T. A., Naruse, K. and Yamashiro, T.: Ex vivo real-time observation of Ca²⁺ signaling in living bone in response to shear stress applied on the bone surface. *Bone.*, **53**, 204-215, 2013.
18. Jones, S. J., Gray, C., Sakamaki, H., Arora, M., Boyde, A., Gourdie, R. and Green, C.: The incidence and size of gap junctions between the bone cells in rat calvaria. *Anat Embryol (Berl.)*, **187**, 343-352, 1993.
19. Ilvesaro, J., Vaananen, K. and Tuukkanen, J.: Bone-resorbing osteoclasts contain gap-junctional connexin-43. *J Bone Miner Res.*, **15**, 919-926, 2000.
20. Xu, H., Gu, S., Riquelme, M. A., Burra, S., Callaway, D., Cheng, H., Guda, T., Schmitz, J., Fajardo, R. J., Werner, S. L., Zhao, H., Shang, P., Johnson, M. L., Bonewald, L. F. and Jiang, J. X.: Connexin 43 channels are essential for normal bone structure and osteocyte viability. *J Bone Miner Res.*, **30**, 436-448, 2015.

21. Burra, S., Nicoletta, D. P., Francis, W. L., Freitas, C. J., Mueschke, N. J., Poole, K. and Jiang, J. X.: Dendritic processes of osteocytes are mechanotransducers that induce the opening of hemichannels. *Proc Natl Acad Sci USA*, **107**, 13648-13653, 2010.
22. Cherian, P. P., Siller-Jackson, A. J., Gu, S., Wang, X., Bonewald, L. F., Sprague, E. and Jiang, J. X.: Mechanical strain opens connexin 43 hemichannels in osteocytes: a novel mechanism for the release of prostaglandin. *Mol Biol Cell*, **16**, 3100-3106, 2005.
23. Palumbo, C.: A three-dimensional ultrastructural study of osteoid-osteocytes in the tibia of chick embryos. *Cell Tissue Res.*, **246**, 125-31, 1986.
24. Kamioka, H., Kameo, Y., Imai, Y., Bakker, A. D., Bacabac, R. G., Yamada, N., Takaoka, A., Yamashiro, T., Adachi, T. and Klein-Nulend, J.: Microscale fluid flow analysis in a human osteocyte canaliculus using a realistic high-resolution image-based three-dimensional model. *Integr Biol*, **4**, 1198-1206, 2012.
25. Ishihara, Y., Sugawara, Y., Kamioka, H., Kawanabe, N., Kurosaka, H., Naruse, K. and Yamashiro, T.: In situ imaging of the autonomous intracellular Ca^{2+} oscillations of osteoblasts and osteocytes in bone. *Bone*, **50**, 842-852, 2012.
26. Adachi, T., Aonuma, Y., Tanaka, M., Hojo, M., Takano-Yamamoto, T. and Kamioka, H.: Calcium response in single osteocytes to locally applied

- mechanical stimulus: differences in cell process and cell body. *J Biomech.*, **42**, 1989-1995, 2009.
27. Kato, Y., Windle, J. J., Koop, B. A., Mundy, G. R. and Bonewald, L. F.: Establishment of an osteocyte-like cell line, MLO-Y4. *J Bone Miner Res.*, **12**, 2014-2023, 1997.
28. Kurata, K., Heino, T. J., Higaki, H. and Väänänen, H. K.: Bone marrow cell differentiation induced by mechanically damaged osteocytes in 3D gel-embedded culture. *J Bone Miner Res.*, **21**, 616-625, 2006.
29. Grynkiewicz, G., Poenie, M. and Tsien, R. Y.: A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem.*, **260**, 3440-3450, 1985.
30. Noble, B. S.: The osteocyte lineage. *Arch Biochem Biophys.*, **473**, 106-111, 2008.
31. Jing, D., Baik, A. D., Lu, X. L., Zhou, B., Lai, X., Wang, L., Luo, E. and Guo, X. E.: In situ intracellular calcium oscillations in osteocytes in intact mouse long bones under dynamic mechanical loading. *FASEB J.*, **28**, 1582-1592, 2014.
32. Hoebe, R. A., Van Oven, C. H., Gadella, T. W. Jr., Dhonukshe, P. B., Van Noorden, C. J. and Manders, E. M.: Controlled light-exposure microscopy reduces photobleaching and phototoxicity in fluorescence live-cell imaging. *Nat Biotechnol.*, **25**, 249-53, 2007.
33. Woo, S. M., Rosser, J., Dusevich, V., Kalajzic, I. and Bonewald, L. F.: Cell

line IDG-SW3 replicates osteoblast-to-late-osteocyte differentiation in vitro and accelerates bone formation in vivo. *J Bone Miner Res.*, **26**, 2634-2646, 2011.

34. Sugawara, Y., Kamioka, H., Ishihara, Y., Fujisawa, N., Kawanabe, N. and Yamashiro, T.: The early mouse 3D osteocyte network in the presence and absence of mechanical loading. *Bone.*, **52**, 189-196, 2013.
35. Toyosawa, S., Oya, K., Sato, S. and Ishida, K.: Osteocyte and DMP1. *Clin Calcium.*, **22**, 713-720, 2012.
36. Schiavi, S. C.: Bone talk. *Nat Genet.*, **38**, 1230-1231, 2006.
37. Wang, Z., Odagaki, N., Tanaka, T., Hashimoto, M., Nakamura, M., Hayano, S., Ishihara, Y., Kawanabe, N. and Kamioka, H.: Alternation in the gap-junctional intercellular communication capacity during the maturation of osteocytes in the embryonic chick calvaria. *Bone.*, **91**, 20-29, 2016.