論 文 内 容 要 旨

学籍番号　B2DD5029　氏 名 前田 敏博

骨細胞は骨系細胞の活動を調節するメカノセンサーとして機能すると考えられている。これまでに、骨細胞のメカニカルストレス応答において細胞骨格や相互作用分子が重要に関わることが報告されてきたが、これらの応答におけるアクチン細胞骨格の関与は未だ不明な点が多い。一方、近年、骨細胞が破骨細胞分化因子 receptor activator of NF-kB ligand (RANKL) を強く発現することが明らかとなり、骨細胞由来の RANKL の骨リモデリングへの関与が注目されてきている。しかしながら、これまで骨細胞のメカニカルストレス応答過程において、RANKL の細胞内動態をリアルタイムで観察した報告はなく、その詳細も未だ不明であった。以上より、本研究では、プライマリー骨細胞にメカニカルストレスを負荷し、アクチン細胞骨格および RANKL の細胞内動態をライブセルイメージングにてリアルタイムで解析し、骨細胞のメカニカルストレス応答過程におけるアクチン細胞骨格および RANKL の細胞内動態について検討した。

プライマリー骨細胞は、DMP1-Topaz マウス頭蓋骨より単離された。メカニカルストレス応答は、蛍光カルシウム指示薬を用いたカルシウムイメージングにより評価された。アクチンおよび RANKL の細胞内動態については、これらの蛍光標識融合タンパク質を発現するプラスミドを細胞に遺伝子導入することで、蛍光標識を指標にしてリアルタイムで解析された。メカニカルストレスはシェアストレス負荷装置であるキャッチバーガーを用いて、20 分間継続して負荷された。

単離された DMP1 陽性骨細胞は、alkaline phosphatase (ALP) を発現せず、一方で、gp38、SOST、RANKL、および osteoprotegerin (OPG) をいずれも発現することが観察された。単離された骨細胞は、3 dyn/cm2 または 12 dyn/cm2 のシェアストレスに対して同程度のカルシウム応答能を示し、カルシウム応答率は 3 dyn/cm2 群：19.5 %、12 dyn/cm2 群：23.5 % であった。アクチンの細胞内動態解析から、カルシウム応答を示した骨細胞において、カルシウム応答後しばらくして (19.07±6.01 min)、アクチンの再構成と細胞全体の収縮変化が誘導されることが観察され、一方、カルシウム応答を示さなかった骨細胞ではこのような変化は観察されなかった。さらに、RANKL の細胞内動態解析から、カルシウム応答を示した骨細胞では、カルシウム応答後の細胞の収縮変化に平行して、RANKL の細胞核周囲への集積が観察された。

以上の結果より、メカニカルストレスを感知した骨細胞では、カルシウム応答の約 20 分後において、アクチン線維の再構成に伴う細胞の収縮変化、および RANKL の細胞体への集積が誘導されることが示唆された。