

焦点接着斑を介した力学刺激に対する
骨芽細胞と骨細胞の感知・応答特性

仲尾 信彦

目次

第1章 緒論.....	1
1.1 骨芽細胞と骨細胞の力学刺激感知・応答	1
1.2 細胞構成要素を標的とした <i>in vitro</i> 力学刺激実験.....	2
1.2.1 力学刺激感知・応答機構解明のための <i>in vitro</i> 力学刺激実験	2
1.2.2 骨芽細胞と骨細胞を用いた力学刺激実験で使用されるツール	2
1.2.3 骨芽細胞と骨細胞の感知・応答要素の振る舞い	8
1.3 骨における焦点接着斑を介した力学刺激感知・応答	16
1.4 本論文の目的と構成.....	17
参考文献	19
第2章 骨芽細胞の焦点接着斑を介した力学刺激感知特性の変化.....	33
2.1 緒言	33
2.1.1 骨芽細胞の焦点接着斑	33
2.1.2 焦点接着斑の形成過程.....	33
2.1.3 焦点接着斑の形成過程における剛性増加.....	34
2.1.4 研究目的.....	35
2.2 手法	35
2.2.1 骨芽細胞様細胞の培養.....	35
2.2.2 細胞内におけるタリン1の発現阻害.....	35
2.2.3 AFMプローブ先端表面の化学修飾.....	36
2.2.4 プローブ先端表面のインテグリンの免疫蛍光染色と顕微鏡観察.....	37
2.2.5 AFM引張試験	37
2.2.6 カー伸び曲線解析	40
2.3 実験結果.....	41
2.3.1 フィブロネクチン-インテグリン結合の形成.....	41
2.3.2 インテグリン-タリン-アクチンフィラメント複合体の形成	43
2.3.3 焦点接着斑の剛性の増加	45
2.4 考察	47

2.4.1 焦点接着斑の剛性増加	47
2.4.2 焦点接着斑の形成過程における剛性増加機構.....	47
2.4.3 細胞内への力学刺激伝達の向上による骨形成の促進.....	48
2.4.4 AFM を用いた力学刺激実験の展望.....	48
2.5 結言	49
参考文献	50
第 3 章 骨細胞の焦点接着斑への力学刺激に対するアポトーシス応答特性	54
3.1 緒言	54
3.1.1 骨細胞の焦点接着斑.....	54
3.1.2 骨細胞への力学的過負荷とアポトーシス	54
3.1.3 アポトーシスと一酸化窒素 (NO) との関連.....	55
3.1.4 研究目的.....	56
3.2 手法	56
3.2.1 フィブロネクチン修飾ディッシュの作製.....	56
3.2.2 骨細胞の単離と初代培養	56
3.2.3 細胞内 F-アクチンの蛍光染色	57
3.2.4 骨細胞のアポトーシス検出.....	57
3.2.5 骨細胞の細胞質内 NO の蛍光染色	58
3.2.6 骨細胞の NO 産生の阻害.....	58
3.2.7 骨細胞への NO 導入.....	58
3.2.8 磁気ピンセットと磁気ビーズ	59
3.2.9 骨細胞への力学刺激負荷	62
3.2.10 力と距離の関係のキャリブレーション.....	62
3.2.11 骨細胞の顕微鏡観察と画像処理	63
3.3 実験結果	64
3.3.1 骨細胞の単離.....	64
3.3.2 大きな力学刺激による骨細胞の収縮	66
3.3.3 大きな力による骨細胞の NO 産生	66
3.3.4 骨細胞の NO 産生を介したアポトーシス	69
3.4 考察	72
3.4.1 力学的過負荷下の骨細胞アポトーシスによる骨吸収促進	72
3.4.2 骨細胞の NO を介したアポトーシス機構	72

3.4.3 力学刺激実験の展望.....	74
3.5 結言	74
参考文献	75
第 4 章 結論.....	83
4.1 本研究で得られた成果	83
4.2 本研究の意義.....	84
4.3 展望	85
関連学術論文・学術講演.....	86
謝辞	88

第1章 緒論

1.1 骨芽細胞と骨細胞の力学刺激感知・応答

我々の骨は、重力と荷重等で表される力学環境の変化に絶えずさらされており、時々刻々と複雑に変化するこの力学環境のもとで骨の代謝活動が調節され、その結果、骨の構造は環境に適応する(Christen, et al., 2014; Lambers, et al., 2015). そのため、骨構造の適応には、周囲の力学環境から与えられる力学刺激を骨の代謝活動に反映させる機構が存在すると考えられる.

骨構造の適応過程において、繰り返し生じる骨吸収・形成は、骨リモデリングと呼ばれ、力学刺激に対する種々の細胞活動により調節される. 皮質骨のオステオン内表面と海綿骨の骨梁外表面において、力学刺激にさらされた骨芽細胞は、コラーゲン等の細胞外基質 (ECM) の産生量を増加させ (Kaspar, et al., 2000; Matsugaki, et al., 2013), これにより、骨形成が促進される. また、骨基質の内部においては、力学刺激にさらされた骨細胞が、近隣の骨表面の破骨・骨芽細胞の前駆細胞にシグナルを伝達することにより、破骨細胞分化 (Kulkarni, et al., 2012; Hao, et al., 2017) と骨芽細胞分化 (Taylor, et al., 2007; Bakker, et al., 2014; Hao, et al., 2017) を制御し、これらにより、骨吸収・骨形成が促進または抑制される.

骨芽細胞の ECM 産生や骨細胞のシグナル伝達に示されるように、細胞は力学刺激を感知 (力学刺激感知) し、その刺激に対し機能的に応答 (力学刺激応答) する (Vogel, et al., 2006). 本研究では、これらの感知と応答の違いを明確にするため、両者を次のように定義する. 力学刺激感知は、力学刺激の入力に対して出力される細胞挙動とする. 一方、力学刺激応答は、力学刺激から変換された生化学的シグナル等の入力に対して出力される細胞挙動とする. 骨芽細胞と骨細胞の力学刺激感知・応答機構の解明は、力学環境に対する骨構造の適応機構への理解に不可欠である.

1.2 細胞構成要素を標的とした *in vitro* 力学刺激実験

1.2.1 力学刺激感知・応答機構解明のための *in vitro* 力学刺激実験

細胞の詳細な力学刺激感知・応答機構を解明するためには、分子・分子複合体・細胞小器官等の細胞構成要素の動的な振る舞いを調べることが重要となる。力学刺激を受けた細胞において、細胞構成要素の振る舞いは、自らの構造・形態の変化、特定の細胞内領域への移動、他の要素との相互作用等として現れる。例えば、流れ刺激下において、骨細胞では Src 分子 (Hum, et al., 2014) が細胞質から細胞核内へ移行し、骨芽細胞では焦点接着斑が形成される (Serrano, et al., 2018)。また、骨芽細胞と骨細胞において、一次線毛が細胞表面でたわみを示す (Malone, et al., 2007)。

以上のような力学刺激に対する細胞構成要素の振る舞いが、数多くの *in vitro* 力学刺激実験により明らかにされてきた。これらの実験は、細胞構成要素への力学刺激の負荷、および、刺激を受けた細胞構成要素の動的な振る舞いの測定・観察から構成される。これまで、様々なツールを駆使したこれら二つの操作（負荷、測定・観察）により、骨芽細胞と骨細胞の分子・分子複合体・細胞小器官の振る舞いが明らかにされてきた。さらに、これまでの力学刺激実験により得られた多くの知見は、骨芽細胞と骨細胞の力学刺激感知・応答機構への理解に大きく寄与してきた。

1.2.2 骨芽細胞と骨細胞を用いた力学刺激実験で使用されるツール

力学刺激負荷のためのツールは、図 1.1 に示すように、細胞全域の要素を標的とするツール（図 1.1 左上）と、細胞局所の要素を標的とするツール（図 1.1 左下）に大別される。前者のツールとしては、様々な種類の要素に対して刺激を与えるために、流体流れと基板伸展・回転を付与するものが用いられてきた。一方、後者のツールとしては、インテグリン、または、焦点接着斑に対して直接的な刺激を加えるために、磁気ピンセットと Stokesian fluid stimulus probe (SFSP) 等が用いられた。

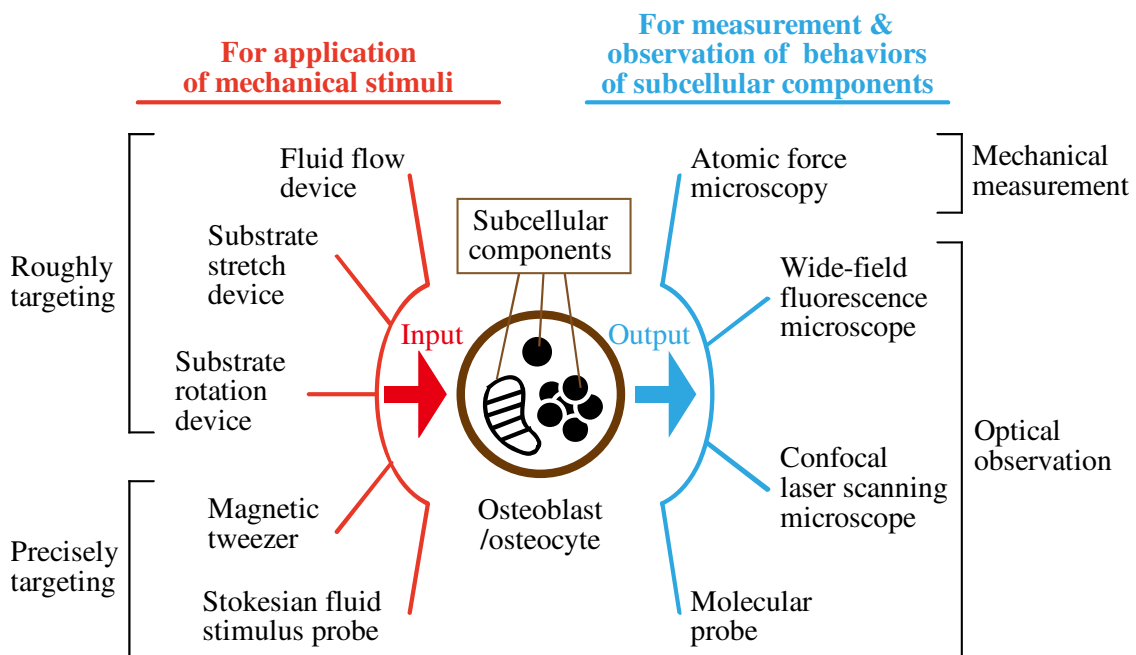


Fig. 1.1 Tools used in subcellular experiments for osteoblasts and osteocytes.

観察・測定のためのツールは、力学（図 1.1 右上）と光学（図 1.1 右下）の原理に基づいて開発された。力学的な原理に基づいた原子間力顕微鏡（AFM）は、例えば、細胞表面糖鎖から細胞骨格への力学刺激伝達機能の測定のために用いられた。一方、光学的な原理に基づいた蛍光顕微鏡は、様々な要素の動的な振る舞いの可視化のために分子プローブと組み合わせられ用いられた。

本 1.2.2 項では、まず、力学刺激実験で使用される力学刺激ツールと力学測定・光学観察ツールについて詳述する。また、骨芽細胞と骨細胞の力学刺激感知・応答機構の解明に対してこれらのツールがどのように役立てられてきたかについて述べる。

(1) 力学刺激ツール

骨表面および骨小腔・骨細管内において、骨芽細胞・骨細胞は流体流れによるせん断刺激を受けると考えられている (Wittkowske, et al., 2016). 細胞に対して流れせん断刺激を *in vitro* で付与するため、流体流れ駆動用部位 (ポンプまたはインジェクター)、流路部位、細胞培養用部位 (チャンバーまたはウェル) を備えた刺激付与装置が使用されてきた. 例えば、細胞培養用部位の内部の流れ制御により、骨芽細胞と骨細胞に対して、定常的 (Rangaswami, et al., 2010; Kou, et al., 2011; Batra, et al., 2012, 2014; Baik, et al., 2013; Roy, et al., 2014; Gardinier, et al., 2014; Bin, et al., 2016; Brown, et al., 2016; Morrell, et al., 2018; Yoneda, et al., 2019; Ding, et al., 2019; Sato, et al., 2020; Monteiro, et al., 2021), 周期的 (Baik, et al., 2010, 2013; Kamel, et al., 2010; Young, et al., 2010; Espinha, et al., 2014; Hum, et al., 2014; Roy, et al., 2014; Lee, et al., 2015; Seref-Ferlengez, et al., 2016; Zhang, et al., 2018), あるいは、不規則的な (Lyons, et al., 2016, 2017) せん断刺激が与えられた. これらの様々な流れせん断刺激下の骨芽細胞と骨細胞において、チャンネル分子、シグナル分子、細胞骨格、一次線毛、小胞等の振る舞いがそれぞれ観察されてきた.

また、流路を備えない流れせん断刺激の付与ツールとして、振盪機とピペットが用いられた. 振盪培養により発生する回転流体により、骨細胞様細胞においては転写因子 Zic1 (zinc finger protein of the cerebellum 1) を介して Wnt/TCF1 シグナルが活性化され (Kalogeropoulos, et al., 2010), 骨芽細胞様細胞においては一次線毛の短縮が観察された (Delaine-Smith, et al., 2014). また、ピペットを用いた骨細胞様細胞への液滴投下により、0.1-14 Pa の流れせん断刺激下でコネクシンヘミチャンネルの開口が観察された (Burra, et al., 2010).

流れせん断刺激に加え、骨表面の骨芽細胞と骨基質中の骨細胞に対して、骨基質の変形と重力変化が加わると考えられる.

骨基質の変形を模擬するため、細胞培養基板の伸展装置が用いられてきた. この装置は、一般に、伸展駆動部位 (ポンプ、モーター、または、重り) と細胞培養用基板から構成される. 駆動部位の制御により、骨芽細胞と骨細胞に対

して、定常的 (Hoshi, et al., 2014; Dalagiorgou, et al., 2017), または、周期的な (Peng, et al., 2012; Matsugaki, et al., 2013; Wang, et al., 2014; Gao, et al., 2016; Li, et al., 2018; Serrano, et al., 2018; Sasaki, et al., 2020; Wang, et al., 2021) 基板変形が付与された。これらの基板変形により、骨芽細胞と骨細胞において、焦点接着斑、分子チャンネル、コラーゲン分子、シグナル分子等の振る舞いが観察されてきた。

一方、宇宙飛行時等に生じる重力変化を模擬するため、細胞培養基板の回転装置が用いられてきた。クリノスタット (Wei, et al., 2013; Sun, et al., 2015), 遠心機 (Zhou, et al., 2015; Woodcock, et al., 2019), 回転機 (Shi, et al., 2017, 2020; Xu, et al., 2017; Ding, et al., 2020) 等を使用した結果、細胞骨格 (アクチンフィラメント, 微小管) や一次線毛の微小・過重力下の振る舞いが見出だされた。

以上に詳述したように、流体流れ, 基板伸展, 基板回転を付与するツールを用いることにより、分子から細胞小器官まで、様々な細胞構成要素の振る舞いが明らかとなってきた。しかし、これらのツールは細胞全域を刺激範囲とするため、ツール使用時、種々の感知要素が同時に刺激される。そこで、個別の感知要素を介した力学刺激感知・応答機構を区別して理解するため、細胞局所の要素を標的とする刺激ツールの活用が望まれた。

細胞局所の要素を標的とするツールとして、磁気ピンセット (Alenghat, et al., 2000; Batra, et al., 2012) や、SFSP と呼ばれる流体流れ付与装置が開発された (Wu, et al., 2011; Thi, et al., 2013)。これらのツールのうち、本論文 (第3章) でも使用した磁気ピンセットは、磁気ビーズを介し、ビーズが接着した感知要素に力学刺激を与える。例えば、この力学刺激を骨細胞様細胞表面のインテグリンに与えると、コネキシンヘミチャンネルの開口が観察された。一方、SFSP は、微小なマイクロピペット先端 (先端直径 $0.8\ \mu\text{m}$) から流れ刺激を生み出し、細胞表面の分子・分子複合体に微小な力 (10 pN 未満) を与える。例えば、この流れ刺激を骨細胞の細胞突起の焦点接着斑に与えると、焦点接着斑近傍で局所的なカルシウム応答が生じた (Thi, et al., 2013)。このとき、焦点接着斑に与えられる力学刺激の大きさが、準静的なストークス流れの仮定のもとで推定された。この例に示されるように、細胞局所の要素を標的とするツールの使用には、細胞局所の環境に即した力学刺激の定量的な推定が重要である。

(2) 力学測定・光学観察ツール

細胞表面の分子・分子複合体の振る舞いを測定するために、AFM が活用されてきた。AFM は、微小なプローブを自由端に取り付けたカンチレバー、レーザー光、フォトダイオードを構成要素とする。プローブが試料から力を受けると、カンチレバーにたわみが生じ、その結果、カンチレバー背面におけるレーザー光の反射角度が変化する。この原理により、フォトダイオードにおいて、レーザー受光量の変化として微小な力が検出される (Franz, et al., 2008)。

本論文 (第 2 章) でも用いた AFM 力学測定は、一般に以下の手順により行われる。まず、プローブ表面に標的分子の抗体またはリガンドを化学修飾し、次に、プローブを細胞表面のインテグリン等の標的分子と結合させる。その後、プローブを細胞表面から引き離すことにより、力-伸び曲線を得る。例えば、骨芽細胞様細胞表面の糖鎖を標的とした測定においては、分子間結合の破断直前の力-伸び曲線を解析することにより、糖鎖から細胞骨格への力学刺激伝達の経路の存在が示唆された (Marcotti, et al., 2018)。

細胞表面に限らず、細胞内の様々な場所における構成要素の振る舞いを光学的に観察するために、広視野蛍光顕微鏡と共焦点レーザー走査型蛍光顕微鏡が広く用いられてきた。これらの蛍光顕微鏡を用いた力学刺激実験においては、主に、細胞の光学切片内における細胞構成要素の二次元的な振る舞いが観察されてきた。そのため、細胞構成要素の三次元的な振る舞い、および、光学切片に垂直な方向への振る舞いは十分には理解されていない。これらの問題に対する対処は、以下に述べるようなアプローチにより進められてきた。

まず、骨細胞様細胞の細胞骨格の三次元的な力学挙動を観察するために、2 方向の観察面を備えた顕微鏡が開発された (Baik, et al., 2010, 2013)。この顕微鏡を用いることにより、流れ刺激下の細胞において、底面と側面の二方向からアクチンフィラメントと微小管の引張、圧縮、せん断ひずみが可視化された。

また、骨細胞様細胞の一次線毛内部の長軸方向に沿った分子輸送を観察するため、共焦点レーザー走査顕微鏡 (St. Croix, et al., 2005) が活用された。この顕微鏡では、ピンホールを観察面の光学共役位置に設定することにより、観察面

で発生する蛍光のみが検出される。この方法により、一次線毛の長軸方向に垂直な観察面においては、観察面を上下に移動するシグナル分子が検出された。微小重力環境下において、この分子の移動方向に生じる変化は、細胞の力学刺激感度の低下に寄与すると考えられている (Ding, et al., 2020)。

広視野蛍光顕微鏡と共焦点レーザー走査型蛍光顕微鏡は、標的の細胞構成要素を標識する分子プローブと組み合わせて活用されてきた。分子プローブとして、近接分子間のエネルギー遷移現象 (Pietraszewska-Bogiel, et al., 2011) を応用した FRET (fluorescence resonance energy transfer) プローブが、以下に示すように流れ刺激下の骨細胞様細胞において用いられた。まず、Src 分子を標的として FRET プローブを用いることにより、骨の同化作用の抑制効果をもつ Src の活性化が検出された (Hum, et al., 2014)。また、小胞体表面の Ca^{2+} を標的として FRET プローブを用いることにより、細胞質内部のカルシウム振動と同期した小胞体における Ca^{2+} 放出が明らかにされた (Brown, et al., 2016)。さらに、一次線毛の Ca^{2+} を標的とした FRET プローブを用いることにより、一次線毛における Ca^{2+} の高濃度領域の形成が示された (Lee, et al., 2015)。

その他、細胞膜分子の粘性変化を検出するために分子ローターが用いられた。分子ローター周囲の細胞膜分子の粘性が変化すると、ローター構成要素の回転運動が変化し、その速度に依存した蛍光 (Bahaidarah, 2014) が発生する。このプローブを骨芽細胞様細胞の細胞膜へ適用することにより、高重力下における細胞膜分子の粘性変化が検出された (Woodcock, et al., 2019)。細胞膜の粘性は膜上の分子拡散に重要であるため、分子チャネル等の細胞構成要素の膜上移動に関する理解がさらに深められることが期待される。

以上のように、蛍光顕微鏡と分子プローブを組み合わせることにより、数多くの細胞構成要素の力学刺激に対する特徴的な振る舞いが可視化されてきた。

1.2.3 骨芽細胞と骨細胞の感知・応答要素の振る舞い

骨芽細胞と骨細胞を用いた力学刺激実験における感知・応答要素として、分子スケールでは分子チャンネルとシグナル分子が、分子複合体スケールでは焦点接着斑と細胞骨格が、また、細胞小器官スケールでは一次線毛と小胞がそれぞれ着目されてきた (図 1.2)。

力学刺激を与えた細胞において、これらの細胞構成要素は、概括すると以下のように振る舞う。まず、分子スケールでは、感知要素である分子チャンネル (Pei, et al., 2021) が、自らの開口に伴い小さなシグナル分子を通過させる。これらのシグナル分子の下流においては、例えば、細胞核に局在化した応答要素であるシグナル分子が遺伝子発現を制御する。次に、分子複合体のスケールでは、焦点接着斑 (Marie, et al., 2014) とそれに接続した細胞骨格 (Gould, et al., 2021) が、感知・応答要素として振る舞う。ここでは、焦点接着斑の他の感知・応答分子との相互作用や、細胞骨格の形態変化に加え、両複合体の構造変化等が誘導される。さらに、細胞小器官のスケールでは、例えば、一次線毛 (Hoey, et al., 2012) が、流れに対してたわむことにより線毛局在分子を活性化させ、また、長軸方向の長さを変化させる。一次線毛が感知・応答要素として振る舞う一方、応答要素である小胞は、自らの構造を変化させ、また、細胞質から細胞外領域へのシグナル分子輸送を担う。

上に示した3つのスケールにおける細胞構成要素の振る舞いに対応し、骨芽細胞と骨細胞には様々な力学刺激感知・応答機構が存在する。そこで、この第1.2.3項では、この機構に対する理解を深めるために、個々の細胞構成要素の振る舞いを詳述し、これらの振る舞いの背後に存在する機構について議論する。

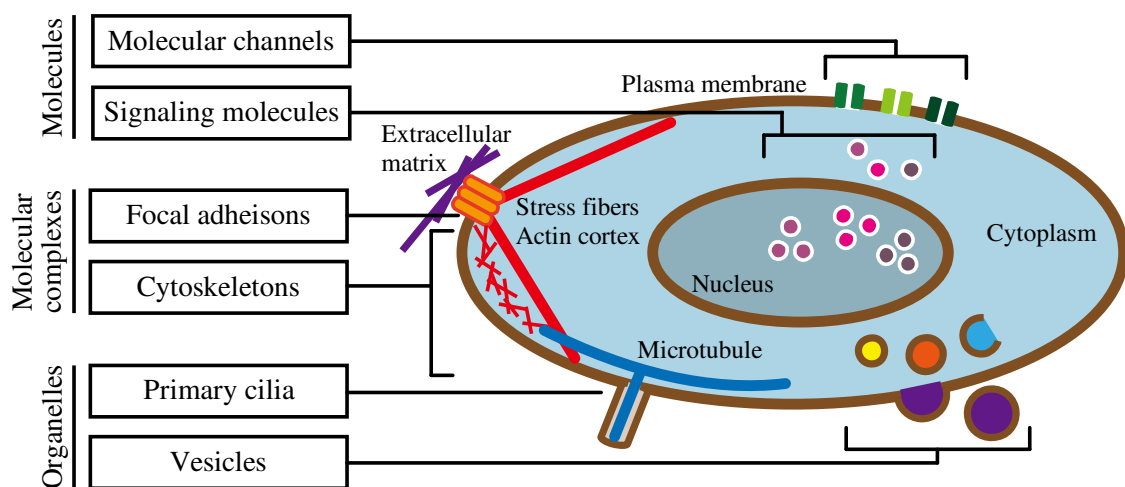


Fig. 1.2 Subcellular components at scales from molecules to organelles in osteoblasts and osteocytes.

(a) 分子チャネル

骨芽細胞のカルシウムチャネルとして、複数種類の transient receptor potential (TRP) チャネルが、力学刺激に対して開口する。骨芽細胞様細胞の MC3T3-E1 に流体流れ刺激を与えると、TRPV4 が開口し、その結果、骨芽細胞増殖が促進される (Yoneda, et al., 2019)。また、低張環境下の骨芽細胞においては、TRPM3 と TRPV4 が開口し、その結果、破骨・骨芽細胞の分化・増殖が nuclear factor-kappa B ligand (RANKL) と nuclear factor of activated T cells (NFAT) の発現を介して引き起こされる (Son, et al., 2018)。さらに、流れ刺激下の骨芽細胞様細胞 MG63 においては、脂質ラフト近傍の TRPV7 が開口し、その結果、細胞局所的なカルシウム振動が発生する (Roy, et al., 2014)。

TRP チャネルの他、イオンチャネル構成分子ポリシスチン 1 と L 型カルシウムチャネル Cav1.2 の振る舞いもまた、骨芽細胞において観察された。基板伸

展下の骨芽細胞様細胞においては、ポリシスチン 1 から分離した C 末端が JAK2 と相互作用し、その下流において、Runx2 を介して骨芽細胞分化が促進される (Dalagiorgou, et al., 2017). 一方、微小重力環境下の MC3T3-E1 細胞においては、L 型カルシウムチャネルである Cav1.2 の細胞膜における発現量が減少する (Sun, et al., 2015) ことにより、Ca²⁺シグナルが調節されると考えられる。

一方、骨細胞の分子チャネルとして、ATP やプロスタグランジン E 等の小分子を通過させるコネキシン/パネキシンヘミチャネルが知られる。コネキシンヘミチャネルの開口は、骨細胞様細胞の MLO-Y4 細胞の細胞体において、細胞体および細胞突起への流れせん断刺激により生じる (Burra, et al., 2010). 一方、パネキシンヘミチャネルの開口は直接的に示されていないが、流れ刺激下の MLO-Y4 細胞において、P2X7R と結合したパネキシンの、ATP の細胞外放出への寄与が明らかとなった (Seref-Ferlengez, et al., 2016).

ヘミチャネル構成分子であるコネキシン 43 は、通常の重力環境下では MLO-Y4 細胞のゴルジ体から細胞表面へ移動するが、微小重力環境下ではこの移動が抑制される (Xu, et al., 2017). また、ゲル培養中の MLO-Y4 細胞のコネキシン 43 は、ゲル中の金属板の周期運動により、細胞体から細胞突起へと移動する (Takemura, et al., 2019). これらのコネキシン 43 の細胞内における移動は、ATP/プロスタグランジン E の細胞外放出と細胞間伝達の調節に寄与すると考えられる。

ヘミチャネルに加え、カルシウムチャネルの振る舞いが、力学刺激下の骨細胞において調べられてきた。流れ刺激下と細胞膜伸長下の MLO-Y4 細胞においては、T 型電位依存性チャネルが開口し、その下流において、小胞体と連動したカルシウム応答 (Brown, et al., 2016) と、ATP 放出 (Thompson, et al., 2011) が、細胞の初期応答としてそれぞれ引き起こされた。より後期の細胞応答を観察した研究では、流れ刺激下の骨細胞様細胞 OCY454 において、TRPV4 が開口し、その下流で骨形成の制御因子スクレロステチンの発現量が減少した (Lyons, et al., 2017). 同様に、スクレロステチンの発現量減少は、基板伸展刺激下の骨細胞様細胞 IDG-SW3 においても、ピエゾ 1 の開口により生じることが示された (Sasaki, et al., 2020).

以上に挙げた実験研究から、力学刺激下の骨芽細胞と骨細胞において、様々な種類の分子チャネルの開口が明らかにされ、分子チャネルにより活性化されるシグナリング経路が調べられてきた。分子チャネルの開口は、チャネルの移動や、他の分子との相互作用等により調節されると考えられる。

(b) シグナル分子

骨芽細胞と骨細胞に力学刺激を加えると、骨形成制御因子の NF- κ B (Kamel, et al., 2010) と β -カテニン (Young, et al., 2010) がそれぞれ細胞質から細胞核内へと移行する。これらの分子をはじめとして、細胞核内に集積するシグナル分子が以下のように報告されてきた。

骨芽細胞のシグナル分子として、基板伸展刺激下の骨芽細胞においては、骨芽細胞増殖因子の MGF (mechano-growth factor) と呼ばれるシグナル分子が細胞核内へと移行し、さらに、MGF 受容体の核内移行が示唆された (Peng, et al., 2012)。また、基板伸展刺激下の MG63 細胞と流れ刺激下の MC3T3-E1 細胞においては、骨形成関連遺伝子の発現制御因子コフィリンが細胞核内へと移行する (Gardinier, et al., 2014; Gao, et al., 2016)。さらに、流れ刺激下の MC3T3-E1 においては、骨芽細胞増殖に重要な転写因子 NFATc1 が細胞核内へと移行し、その下流において、ERK5 もまた細胞核内へと移行する (Ding, et al., 2019)。ERK5 の核内移行を報告した他の研究によると、流れ刺激下の MC3T3-E1 細胞においては、ERK5 により活性化された転写因子 FoxO3a (forkhead box O 3a) の核内移行が抑制され、その結果、核内においてアポトーシス抑制因子 FasL と Bim の発現減少が引き起こされる (Bin, et al., 2016)。

一方、骨細胞のシグナル分子が、流れ刺激下の細胞核内において観察されてきた。流れ刺激下の MLO-Y4 細胞においては、焦点接着斑の構成分子である FAK (focal adhesion kinase) を介したシグナリングの下流において、ヒストン脱アセチル化酵素 HDAC 4 と HDAC 5 が核内移行し、その後、細胞核内において、HDAC はスクレロチンの発現を制御する (Sato, et al., 2020)。また、OCY454 細胞に流れ刺激を加えると、TGF β シグナリングの下流において、骨吸収・骨

形成の制御因子 Smad2/3 が細胞核内へと移行する (Monteiro, et al., 2021). さらに、流れ刺激下の MLO-Y4 細胞においては、細胞核に集積する転写因子 Zic1 が、一次線毛関連分子 Gli1, Gli3 と Wnt シグナリングとを仲介する (Kalogeropoulos, et al., 2010).

以上に示したように、力学刺激下の骨芽細胞と骨細胞の細胞核において、骨吸収・骨形成シグナルを制御する様々なシグナル分子が移動・局在する。

(c) 焦点接着斑

骨芽細胞において、焦点接着斑の力学刺激に対する振る舞いが、焦点接着斑の構成要素であるインテグリン β_3 に着目して調べられてきた。例えば、流れ刺激下の MC3T3-E1 において、焦点接着斑中のインテグリン β_3 は、シグナル分子 PKG II, Src, SHP-2 と相互作用し、その結果、細胞の増殖と生存が促進される (Rangaswami, et al., 2010).

一方、骨細胞において、焦点接着斑の力学刺激に対する振る舞いが、インテグリン α_5 , β_3 に着目して調べられてきた。例えば、MLO-Y4 細胞において、インテグリン α_5 は、足場分子 14-3-3 θ を介しコネキシン 43 との複合体を形成する (Batra, et al., 2014). MLO-Y4 細胞に流れ刺激を加えると、この複合体の形成、および、ゴルジ体から細胞表面への移動が促進され (Batra, et al., 2014), さらに、インテグリン α_5 が刺激されることにより、コネキシンヘミチャネルの開口が促進される (Batra, et al., 2012). インテグリン α_5 はまた、MLO-Y4 の細胞突起において、糖鎖との複合体を形成し、その結果、流れ刺激下で細胞体のコネキシンヘミチャネルが開口する (Burra, et al., 2010). 一方、インテグリン β_3 は、骨細胞の細胞突起において、P2X7R, Cav3.2 (Cabahug-Zuckerman, et al., 2018) 等のイオンチャネルと複合体を形成することにより、 Ca^{2+} を細胞質内へと流入させる (Thi, et al., 2013).

以上に述べたことから、力学刺激下の骨芽細胞と骨細胞の焦点接着斑は、インテグリンと力学刺激感知要素（糖鎖、分子チャネル等）との複合体形成、および、インテグリンと力学刺激応答要素（シグナル分子等）との相互作用によ

り機能を発揮すると考えられる。

(d) 細胞骨格

骨芽細胞において、重力変化による細胞骨格の構造変化が調べられてきた。例えば、微小重力環境下の初代培養骨芽細胞において、アクチン皮質とストレスファイバーの厚みの減少、および、微小管の曲率と長さの減少が生じ、その結果、骨形成が抑制されると考えられている (Nabavi, et al., 2011)。また、微小重力環境下の培養骨芽細胞において、微小管の分岐と最大長さが減少し、その結果、骨芽細胞の分化と石灰化が抑制される (Shi, et al., 2020)。さらに、微小重力環境下の骨芽細胞様細胞と骨芽細胞において、紡錘体の多極化により、骨芽細胞増殖が阻害されると考えられている (Wei, et al., 2013)。以上のように、骨芽細胞の細胞骨格の構造における異常は、骨形成の抑制と密接に関わる。

一方、骨細胞において、力学刺激による細胞骨格の変形が調べられてきた。例えば、周期的な圧縮荷重を与えた骨内において、骨細胞のアクチンフィラメントが、細胞質内のカルシウム振動と同期して収縮する (Morrell, et al., 2018)。同様のアクチン収縮が、流れ刺激下の MLO-Y4 細胞においても観察され、これが輸送小胞の細胞外放出を引き起こすと考えられている (Morrell, et al., 2018)。また、流れ刺激下の MLO-Y4 細胞において、アクチンフィラメントが細胞局所ごとに不均一に変形し、これにより、細胞骨格を介した細胞の力学刺激感度が細胞局所的に変化すると考えられる (Baik, et al., 2010)。アクチンフィラメントに加え、微小管の変形もまた骨細胞において観察されたが、微小管変形の頻度と振幅は、アクチンフィラメントの変形に比べより低い。そのため、微小管と比べて、アクチンフィラメントが、骨細胞の力学刺激感知においてより重要な役割をもつと示唆される (Baik, et al., 2013)。ただし、アクチンフィラメントの変形は微小管の阻害下で減少する (Baik, et al., 2010) ため、アクチンフィラメントと微小管の変形は密接に関わると考えられる。

細胞骨格の他に、骨格系分子として、短いアクチンフィラメントを架橋するスペクトリンの力学刺激応答への寄与が、骨細胞において調べられてきた。ス

ペクトリンは、MLO-Y4 細胞の細胞膜直下に細孔性のネットワークを形成し、このネットワークは、カルシウムチャンネル、一酸化窒素合成酵素 (NOS)、コネクシン 43 と相互作用すると示唆されている (Wu, et al., 2017). そのため、アクチンフィラメントが変形すると、スペクトリンによりこれらの分子が活性化され、その結果、様々なシグナルが発生すると考えられる。

以上に述べたように、力学刺激下の骨芽細胞と骨細胞において、アクチンフィラメントと微小管の構造・形態変化が詳細に調べられてきた。今後、骨格系分子の振る舞いに着目した研究は、細胞骨格の力学挙動に起因する力学刺激応答の理解を前進させると考えられる。

(e) 一次線毛

骨芽細胞の一次線毛は、力学刺激下のプロスタグランジン E₂ 放出、ALP 産生、および、石灰化を誘導する (Delaine-Smith, et al., 2014; Shi, et al., 2017). これらの応答において、一次線毛のたわみ (Malone, et al., 2007) の重要性が指摘されている。一次線毛のたわみの大きさは線毛の長さに依存するため、前述の骨芽細胞の力学刺激応答は、線毛の長さに依存して調節されると考えられる。一次線毛の長さは、力学刺激下で変化することが知られており、例えば、流れ刺激下の MLO-A5 細胞 (Delaine-Smith, et al., 2014) と微小重力下の単離骨芽細胞 (Shi, et al., 2017, 2020) において、一次線毛の短縮がそれぞれ報告された。これらの力学刺激条件のうち、微小重力環境下においては、一次線毛の短縮に対し、線毛基部に結合する微小管の減少 (Shi, et al., 2020) が影響する可能性がある。

骨細胞の一次線毛においても、一次線毛基部と微小管との結合が着目されてきた。ここでは、流れ刺激下の MLO-Y4 細胞において、一次線毛基部と微小管との結合が促進され、また、この結合が線毛の力学挙動に対して重要であると考えられている (Espinha, et al., 2014).

骨細胞の一次線毛に関してはまた、線毛の短縮と、線毛内部の分子輸送との関係が明らかにされた。MLO-Y4 細胞の線毛内輸送 IFT (intraflagellar transport)

分子は、微小重力環境下において、通常の重力環境下に比べ、より高い頻度で線毛の基部から先端の方向へと輸送される (Ding, et al., 2020). この輸送方向の特徴は、線毛局在分子の輸送量に影響すると考えられる.

線毛局在分子として、以下のものが骨芽細胞と骨細胞において報告されてきた. MC3T3-E1 細胞と MLO-Y4 細胞の線毛局在分子である Parathyroid hormone 1 receptor (PTH1R) は、細胞生存と骨形成の促進因子であり (Martín-Guerrero, et al., 2020), 力学刺激に応答して骨細胞の生存に寄与する (Maycas, et al., 2015). また、MLO-Y4 細胞の線毛局在分子である Adenylyl cyclase (AC) 6 は、流れ刺激に応答して Cox-2 の発現を増加させる (Kwon, et al., 2010). さらに、同様の局在分子として、イオンチャネルのポリシスチン-2, TRPV4, ピエゾ 1 が報告されている. これらのチャネルのうち、TRPV4 は、 Ca^{2+} の線毛内部への流入を引き起こし、この Ca^{2+} の流入により、Cox-2 を介したプロスタグランジン E_2 の形成が促進される (Lee, et al., 2015). これらの線毛局在分子は、線毛の流体流れに対するたわみ (Malone, et al., 2007) の結果、活性化されると考えられる.

以上のことから、骨芽細胞と骨細胞の一次線毛を介した力学刺激感知・応答機構は、以下のように考えられる. まず、流れ刺激に起因する一次線毛のたわみにより、種々の線毛局在分子が活性化される. その後、刺激応答を担う分子へと生化学的なシグナルが伝達される. その結果、微小管構造の変化に伴う一次線毛の長さ変化により、線毛の刺激感度が調節される.

(f) 小胞

力学刺激下の骨芽細胞における小胞の振る舞いとして、エキソサイトーシスによる細胞膜の修復がある. 骨芽細胞に力学刺激が加わると、細胞膜に損傷が生じるが、この損傷は、 Ca^{2+} /PLC/PKC シグナリングの下流において、エキソサイトーシス小胞と細胞膜との融合により修復される (Mikolajewicz, et al., 2018).

力学刺激下の骨細胞における小胞の振る舞いとして、シグナル分子の放出、および、小胞自体の放出がある. 前者の振る舞いとして、ATP 内包小胞による急激な ATP 放出が、流れ刺激下の MLO-Y4 細胞において引き起こされる

(Kringelbach, et al., 2015). 一方、後者の振る舞いとして、LAMP1 (lysosomal-associated membrane protein) 発現小胞の細胞外放出が、流れ刺激下の MLO-Y4 細胞において引き起こされ、その結果、小胞内包分子である RANKL (破骨細胞分化の促進因子)、OPG (破骨細胞分化の抑制因子)、スクレロステインの放出量が増加する (Morrell, et al., 2018). LAMP1 発現小胞の存在は骨中の骨細胞においても確かめられている (Solberg, et al., 2015) ことから、骨において、この小胞の細胞外放出の結果、破骨細胞と骨芽細胞の活動が調節されると考えられる。これらの LAMP1 発現小胞の他に、骨細胞の他の小胞として、オートファゴソームが流れ刺激下の MLO-Y4 細胞において形成され、これにより、細胞の ATP 放出を介し細胞死が抑制される (Zhang, et al., 2018).

以上に述べたように、力学刺激下の骨芽細胞と骨細胞において、小胞は、その形成、内包分子・小胞自体の放出、細胞膜との融合等の様々な振る舞いを示す。これらの振る舞いは、細胞の生存、細胞内・細胞間シグナル伝達、細胞膜の損傷修復等の重要な力学刺激応答を担う。

1.3 骨における焦点接着斑を介した力学刺激感知・応答

骨特有の細胞周囲環境として、骨基質の存在が挙げられる。骨基質は、コラーゲン繊維 (Turner, et al., 2007) と石灰質 (Kollmannsberger, et al., 2017) からなるナノ・マイクロスケールの微小構造を有する。骨に力学刺激が加わると、この微小構造に特徴づけられた環境のもとで、骨芽細胞と骨細胞は骨基質の変形等にさらされる。このとき、骨基質と細胞を繋ぐ焦点接着斑 (Kamioka, et al., 2006; Cabahug-Zuckerman, et al., 2018) を介して細胞に力学刺激が加えられる。

骨芽細胞において、焦点接着斑が形成されることは、骨形成のために重要である (Zimmerman, et al., 2000; Ponik, et al., 2004). 焦点接着斑は、力学刺激を感知して形成される (Riveline, et al., 2001) ことから、力学刺激下の骨芽細胞における焦点接着斑の形成は、骨形成のトリガーとなる重要な過程であると考えられる。そのため、骨形成は、力学環境下において、骨芽細胞の焦点接着斑の形

成過程における力学刺激感知特性の変化に大きく依存すると考えられる。

一方、骨細胞において、損傷した骨基質から過度な力学刺激が加えられると、アポトーシス応答が誘導されることが知られている (Verborgt et al., 2000)。骨細胞がアポトーシスすると、破骨細胞分化が促進される (Kogianni et al., 2008) ことから、骨基質から骨細胞への焦点接着斑を介した力学的過負荷により、アポトーシス応答が生じた結果、骨吸収が促進されると考えられる。そのため、骨吸収は、力学環境下において、骨細胞の焦点接着斑への力学刺激の大きさに対するアポトーシス応答特性に大きく依存すると考えられる。

以上のことから、骨構造の力学環境に対する適応機構を理解するためには、骨芽細胞の焦点接着斑の形成過程における力学刺激感知の特性変化、および、骨細胞の焦点接着斑への力学刺激の大きさに対するアポトーシス応答の特性を調べるのが重要である。

1.4 本論文の目的と構成

本論文は、骨芽細胞の焦点接着斑の形成過程における力学刺激感知の特性変化、および、骨細胞の焦点接着斑への力学刺激の大きさに対するアポトーシス応答の特性を *in vitro* 力学刺激実験により明らかにすることを目的とする。

本論文の構成を説明する。第2章では、骨芽細胞の焦点接着斑の形成過程における力学刺激感知の特性変化を明らかにする。特に、力学刺激感知特性と密接に関わる焦点接着斑の見かけの剛性の増加を調べる。ここでは、まず、AFMを用い、骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 表面において、AFM プローブと、焦点接着斑の構成分子であるインテグリンとを接触させ、異なる接触時間条件下で焦点接着斑を形成させた後、その引張試験を行う。次に、取得した力-伸び曲線から、各接触時間条件下で形成された焦点接着斑の引張力に対する剛性を評価する。第3章では、骨細胞の焦点接着斑への力学刺激の大きさに対するアポトーシス応答の特性を明らかにする。ここでは、まず、磁気ピンセットを用い、単離骨細胞表面において、大きさの異なる2つの力学刺激を焦点接着斑に付与し、アポトーシスの初期応答である細胞収縮を観察する。さらに、アポトーシ

ス誘導因子として知られる一酸化窒素 (NO) のこの細胞収縮への寄与を調べる。第 4 章では、本研究で得られた成果を示し、それらの骨および細胞・分子のバイオメカニクス分野における意義を述べる。さらに、本研究の展望として、力学刺激実験において、*in vivo* 力学環境を精確に模擬するうえで明らかにすべきことを述べ、また、細胞内の分子複合体を対象とした今後の研究の、生命システムに対する理解に与える寄与、および、工学応用に与える寄与を述べる。

参考文献

Alenghat, F. J., Fabry, B., Tsai, K. Y., Goldmann, W. H., Ingber, D. E., Analysis of cell mechanics in single vinculin-deficient cells using a magnetic tweezer, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol.277, No.1, (2000), pp.93–99, DOI: 10.1006/bbrc.2000.3636.

Bahaidarah, E., Harriman, A., Stachelek, P., Rihn, S., Heyer, E., Ziessel, R., Fluorescent molecular rotors based on the BODIPY motif: effect of remote substituents, *Photochemical & Photobiological Sciences*, Vol.13, No.10, (2014), pp.1397–1401, DOI: 10.1039/c4pp00204k.

Baik, A. D., Lu, X. L., Qiu, J., Huo, B., Hillman, E. M. C., Dong, C., Guo, X. E., Quasi-3D cytoskeletal dynamics of osteocytes under fluid flow, *Biophysical Journal*, Vol.99, No.9, (2010), pp.2812–2820, DOI: 10.1016/j.bpj.2010.08.064.

Baik, A. D., Qiu, J., Hillman, E. M. C., Dong, C., Guo, X. E., Simultaneous tracking of 3D actin and microtubule strains in individual MLO-Y4 osteocytes under oscillatory flow, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol.431, No.4, (2013), pp.718–723, DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.01.052.

Bakker, A. D., Kulkarni, R. N., Klein-Nulend, J., Lems, W. F., IL-6 alters osteocyte signaling toward osteoblasts but not osteoclasts, *Journal of Dental Research*, Vol.93, No.4, (2014), pp.394–399, DOI: 10.1177/0022034514522485.

Batra, N., Burra, S., Siller-Jackson, A. J., Gu, S., Xia, X., Weber, G. F., DeSimone, D., Bonewald, L. F., Lafer, E. M., Sprague, E., Schwartz, M. A., Jiang, J. X., Mechanical stress-activated integrin $\alpha 5 \beta 1$ induces opening of connexin 43 hemichannels, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol.109, No.9, (2012), pp.3359–3364, DOI: 10.1073/pnas.1115967109.

Batra, N., Riquelme, M. A., Burra, S., Jiang, J. X., 14-3-3 θ facilitates plasma membrane delivery

and function of mechanosensitive connexin 43 hemichannels, *Journal of Cell Science*, Vol.127, No.1, (2014), pp.137–146, DOI: 10.1242/jcs.133553.

Bin, G., Bo, Z., Jing, W., Jin, J., Xiaoyi, T., Cong, C., Liping, A., Jinglin, M., Cuifang, W., Yonggang, C., Yayi, X., Fluid shear stress suppresses TNF- α -induced apoptosis in MC3T3-E1 cells: Involvement of ERK5-AKT-FoxO3a-Bim/FasL signaling pathways, *Experimental Cell Research*, Vol.343, No.2, (2016), pp.208–217, DOI: 10.1016/j.yexcr.2016.03.014.

Brown, G. N., Leong, P. L., Guo, X. E., T-Type voltage-sensitive calcium channels mediate mechanically-induced intracellular calcium oscillations in osteocytes by regulating endoplasmic reticulum calcium dynamics, *Bone*, Vol.88, (2016), pp.56–63, DOI: 10.1016/j.bone.2016.04.018.

Burra, S., Nicoletta, D. P., Francis, W. L., Freitas, C. J., Mueschke, N. J., Poole, K., Jiang, J. X., Dendritic processes of osteocytes are mechanotransducers that induce the opening of hemichannels, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol.107, No.31, (2010), pp.13648–13653, DOI: 10.1073/pnas.1009382107.

Cabahug-Zuckerman, P., Stout Jr, R. F., Majeska, R. J., Thi, M. M., Spray, D. C., Weinbaum, S., Schaffler, M. B., Potential role for a specialized β 3 integrin-based structure on osteocyte processes in bone mechanosensation, *Journal of Orthopaedic Research*, Vol.36, No.2, (2018), pp.642–652, DOI: 10.1002/jor.23792.

Christen, P., Ito, K., Ellouz, R., Boutroy, S., Sornay-Rendu, E., Chapurlat, R. D., van Rietbergen, B., Bone remodeling in humans is load-driven but not lazy, *Nature Communications*, Vol.5, (2014), 4855, DOI: 10.1038/ncomms5855.

Dalagiorgou, G., Piperi, C., Adamopoulos, C., Georgopoulou, U., Gargalionis, A. N., Spyropoulou, A., Zoi, I., Nokhbehshaim, M., Damanaki, A., Deschner, J., Basdra, E. K., Papavassiliou, A. G., Mechanosensor polycystin-1 potentiates differentiation of human

osteoblastic cells by upregulating Runx2 expression via induction of JAK2/STAT3 signaling axis, *Cellular and Molecular Life Sciences*, Vol.74, No.5, (2017), pp.921–936, DOI: 10.1007/s00018-016-2394-8.

Delaine-Smith, R. M., Sittichokechaiwut, A., Reilly, G. C., Primary cilia respond to fluid shear stress and mediate flow-induced calcium deposition in osteoblasts, *FASEB Journal*, Vol.28, No.1, (2014), pp.430–439, DOI: 10.1096/fj.13-231894.

Ding, D., Yang, X., Luan, H., Wu, X., Sun, L., Fan, Y., The microgravity induces the ciliary shortening and an increased ratio of anterograde/retrograde intraflagellar transport of osteocytes, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol.530, No.1, (2020), pp.167–172, DOI: 10.1016/j.bbrc.2020.06.119.

Ding, N., Geng, B., Li, Z., Yang, Q., Yan, L., Wan, L., Zhang, B., Wang, C., Xia, Y., Fluid shear stress promotes osteoblast proliferation through the NFATc1-ERK5 pathway, *Connective Tissue Research*, Vol.60, No.2, (2019), pp.107–116, DOI: 10.1080/03008207.2018.1459588.

Espinha, L. C., Hoey, D. A., Fernandes, P. R., Rodrigues, H. C., Jacobs, C. R., Oscillatory fluid flow influences primary cilia and microtubule mechanics, *Cytoskeleton*, Vol.71, No.7, (2014), pp.435–445, DOI: 10.1002/cm.21183.

Franz, C. M., Puech, P.-H., Atomic Force Microscopy: A Versatile tool for studying cell morphology, adhesion and mechanics, *cellular and molecular bioengineering*, Vol.1, No.4, (2008), pp.289–300, DOI: 10.1007/s12195-008-0037-3.

Gao, J., Fu, S., Zeng, Z., Li, F., Niu, Q., Jing, D., Feng, X., Cyclic stretch promotes osteogenesis-related gene expression in osteoblast-like cells through a cofilin-associated mechanism, *Molecular Medicine Reports*, Vol.14, No.1, (2016), pp.218–224, DOI: 10.3892/mmr.2016.5239.

Gardinier, J., Yang, W., Madden, G. R., Kronbergs, A., Gangadharan, V., Adams, E., Czymmek, K., Duncan, R. L., P2Y2 receptors regulate osteoblast mechanosensitivity during fluid flow, *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, Vol.306, No.11, (2014), pp.C1058–C1067, DOI: 10.1152/ajpcell.00254.2013.

Gould, N. R., Torre, O. M., Leser, J. M., Stains, J. P., The cytoskeleton and connected elements in bone cell mechanotransduction, *Bone*, Vol.149, (2021), 115971, DOI: 10.1016/j.bone.2021.115971.

Hao, Z., Ma, Y., Wu, J., Li, X., Chen, H., Shen, J., Wang, H., Osteocytes regulate osteoblast differentiation and osteoclast activity through Interleukin-6 under mechanical loading, *RSC Advances*, Vol.7, No.79, (2017), pp.50200–50209, DOI: 10.1039/c7ra09308j.

Hoey, D. A., Chen, J. C., Jacobs, C. R., The primary cilium as a novel extracellular sensor in bone, *Frontiers in Endocrinology*, Vol.3, (2012), 75, DOI: 10.3389/fendo.2012.00075.

Hoshi, K., Kawaki, H., Takahashi, I., Takeshita, N., Seiryu, M., Murshid, S. A., Masuda, T., Anada, T., Kato, R., Kitaura, H., Suzuki, O., Takano-Yamamoto, T., Compressive force-produced CCN2 induces osteocyte apoptosis through ERK1/2 pathway, *Journal of Bone and Mineral Research*, Vol.29, No.5, (2014), pp.1244–1257, DOI: 10.1002/jbmr.2115.

Hum, J. M., Day, R. N., Bidwell, J. P., Wang, Y., Pavalko, F. M., Mechanical loading in osteocytes induces formation of a Src/Pyk2/MBD2 complex that suppresses anabolic gene expression, *PLoS ONE*, Vol.9, No.5, (2014), e97942, DOI: 10.1371/journal.pone.0097942.

Kalogeropoulos, M., Varanasi, S. S., Olstad, O. K., Sanderson, P., Gautvik, V. T., Reppe, S., Francis, R. M., Gautvik, K. M., Birch, M. A., Datta, H. K., Zic1 transcription factor in bone: neural developmental protein regulates mechanotransduction in osteocytes, *FASEB Journal*,

Vol.24, No.8, (2010), pp.2893–2903, DOI: 10.1096/fj.09-148908.

Kamel, M. A., Picconi, J. L., Lara-Castillo, N., Johnson, M. L., Activation of β -catenin signaling in MLO-Y4 osteocytic cells versus 2T3 osteoblastic cells by fluid flow shear stress and PGE₂: Implications for the study of mechanosensation in bone, *Bone*, Vol.47, No.5, (2010), pp.872–881, DOI: 10.1016/j.bone.2010.08.007.

Kamioka, H., Sugawara, Y., Murshid, S. A., Ishihara, Y., Honjo, 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, *Journal of Bone and Mineral Research*, Vol.21, No.7, (2006), pp.1012-1021, DOI: 10.1359/JBMR.060408.

Kaspar, D., Seidl, W., Neidlinger-Wilke, C., Ignatius, A., Claes, L., Dynamic cell stretching increases human osteoblast proliferation and C1CP synthesis but decreases osteocalcin synthesis and alkaline phosphatase activity, *Journal of Biomechanics*, Vol.33, No.1, (2000), pp.45–51, DOI: 10.1016/s0021-9290(99)00171-2.

Kogianni, G., Mann, V., Noble, B. S., Apoptotic bodies convey activity capable of initiating osteoclastogenesis and localized bone destruction. *Journal of Bone and Mineral Research*, Vol. 23, No.6, (2008), pp.915–927, DOI: 10.1359/JBMR.080207.

Kollmannsberger, P., Kerschnitzki, M., Repp, F., Wagermaier, W., Weinkamer, R., Fratzl, P., The small world of osteocytes: connectomics of the lacunocanalicular network in bone, *New Journal of Physics*, Vol.19, (2017), 073019, DOI: 10.1088/1367-2630/aa764b.

Kou, S., Pan, L., van Noort, D., Meng, G., Wu, X., Sun, H., Xu, J., Lee, I., A multishear microfluidic device for quantitative analysis of calcium dynamics in osteoblasts, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol.408, No.2, (2011), pp.350–355, DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.04.044.

Kringelbach, T. M., Aslan, D., Novak, I., Ellegaard, M., Syberg, S., Andersen, C. K. B., Kristiansen, K. A., Vang, O., Schwarz, P., Jørgensen, N. R., Fine-tuned ATP signals are acute mediators in osteocyte mechanotransduction, *Cellular Signalling*, Vol.27, No.12, (2015), pp.2401–2409, DOI: 10.1016/j.cellsig.2015.08.016.

Kulkarni, R. N., Bakker, A. D., Everts, V., Klein-Nulend, J., Mechanical loading prevents the stimulating effect of IL-1 β on osteocyte-modulated osteoclastogenesis, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol.420, No.1, (2012), pp.11–16, DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.02.099.

Kwon, R. Y., Temiyasathit, S., Tummala, P., Quah, C. C., Jacobs, C. R., Primary cilium-dependent mechanosensing is mediated by adenylyl cyclase 6 and cyclic AMP in bone cells, *FASEB Journal*, Vol.24, No.8, (2010), pp.2859–2868, DOI: 10.1096/fj.09-148007.

Lambers, F. M., Kuhn, G., Weigt, C., Koch, K. M., Schulte, F. A., Müller, R., Bone adaptation to cyclic loading in murine caudal vertebrae is maintained with age and directly correlated to the local micromechanical environment, *Journal of Biomechanics*, Vol.48, No.6, (2015), pp.1179–1187, DOI: 10.1016/j.jbiomech.2014.11.020.

Lee, K. L., Guevarra, M. D., Nguyen, A. M., Chua, M. C., Wang, Y., Jacobs, C. R., The primary cilium functions as a mechanical and calcium signaling nexus, *Cilia*, Vol.4, (2015), 7, DOI: 10.1186/s13630-015-0016-y.

Li, F.-F., Zhang, B., Cui, J.-H., Chen, F.-L., Ding, Y., Feng, X., Alterations in β -catenin/E-cadherin complex formation during the mechanotransduction of Saos-2 osteoblastic cells, *Molecular Medicine Reports*, Vol.18, No.2, (2018), pp.1495–1503, DOI: 10.3892/mmr.2018.9146.

Lyons, J. S., Iyer, S. R., Lovering, R. M., Ward, C. W., Stains, J. P., Novel multi-functional fluid

flow device for studying cellular mechanotransduction, *Journal of Biomechanics*, Vol.49, No.16, (2016), pp.4173–4179, DOI: 10.1016/j.jbiomech.2016.11.051.

Lyons, J. S., Joca, H. C., Law, R. A., Williams, K. M., Kerr, J. P., Shi, G., Khairallah, R. J., Martin, S. S., Konstantopoulos, K., Ward, C. W., Stains, J. P., Microtubules tune mechanotransduction through NOX2 and TRPV4 to decrease sclerostin abundance in osteocytes, *Science Signaling*, Vol.10, No.506, (2017), ean5748, DOI: 10.1126/scisignal.aan5748.

Malone, A. M. D., Anderson, C. T., Tummala, P., Kwon, R. Y., Johnston, T. R., Stearns, T., Jacobs, C. R., Primary cilia mediate mechanosensing in bone cells by a calcium-independent mechanism, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol.104, No.33, (2007), pp.13325–13330, DOI: 10.1073/pnas.0700636104.

Marcotti, S., Maki, K., Reilly, G. C., Lacroix, D., Adachi, T., Hyaluronic acid selective anchoring to the cytoskeleton: An atomic force microscopy study, *PLoS ONE*, Vol.13, No.10, (2018), e0206056, DOI: 10.1371/journal.pone.0206056.

Marie, P. J., Hay, E., Saidak, Z., Integrin and cadherin signaling in bone: role and potential therapeutic targets, *Trends in Endocrinology and Metabolism*, Vol.25, No.11, (2014), DOI: 10.1016/j.tem.2014.06.009.

Martín-Guerrero, E., Tirado-Cabrera, I., Buendía, I., Alonso, V., Gortázar, A. R., Ardura, J. A., Primary cilia mediate parathyroid hormone receptor type 1 osteogenic actions in osteocytes and osteoblasts via Gli activation, *Journal of Cellular Physiology*, Vol.235, No.10, (2020), pp.7356–7369, DOI: 10.1002/jcp.29636.

Matsugaki, A., Fujiwara, N., Nakano, T., Continuous cyclic stretch induces osteoblast alignment and formation of anisotropic collagen fiber matrix, *Acta Biomaterialia*, Vol.9, No.7, (2013), pp.7227–7235, DOI: 10.1016/j.actbio.2013.03.015.

Maycas, M., Ardura, J. A., de Castro, L. F., Bravo, B., Gortázar, A. R., Esbrit, P., Role of the parathyroid hormone type 1 receptor (PTH1R) as a mechanosensor in osteocyte survival, *Journal of Bone and Mineral Research*, Vol.30, No.7, (2015), pp.1231–1244, DOI: 10.1002/jbmr.2439.

Mikolajewicz, N., Zimmermann, E. A., Willie, B. M., Komarova, S. V., Mechanically stimulated ATP release from murine bone cells is regulated by a balance of injury and repair, *eLife*, Vol.7, (2018), e37812, DOI: 10.7554/eLife.37812.001.

Monteiro, D. A., Dole, N. S., Campos, J. L., Kaya, S., Schurman, C. A., Belair, C. D., Alliston, T., Fluid shear stress generates a unique signaling response by activating multiple TGF β family type I receptors in osteocytes, *FASEB Journal*, Vol.35, No.3, (2021), e21263, DOI: 10.1096/fj.202001998R.

Morrell, A. E., Brown, G. N., Robinson, S. T., Sattler, R. L., Baik, A. D., Zhen, G., Cao, X., Bonewald, L. F., Jin, W., Kam, L. C., Guo, X. E., Mechanically induced Ca²⁺ oscillations in osteocytes release extracellular vesicles and enhance bone formation, *Bone Research*, Vol.6, (2018), 6, DOI: 10.1038/s41413-018-0007-x.

Nabavi, N., Khandani, A., Camirand, A., Harrison, R. E., Effects of microgravity on osteoclast bone resorption and osteoblast cytoskeletal organization and adhesion, *Bone*, Vol.49, No.5, (2011), pp.965–974, DOI: 10.1016/j.bone.2011.07.036.

Pei, F., Liu, J., Zhang, L., Pan, X., Huang, W., Cen, X., Huang, S., Jin, Y., Zhao, Z., The functions of mechanosensitive ion channels in tooth and bone tissues, *Cellular Signalling*, Vol.78, (2021), 109877, DOI: 10.1016/j.cellsig.2020.109877.

Peng, Q., Qiu, J., Sun, J., Yang, L., Zhang, B., Wang, Y., The nuclear localization of MGF receptor in osteoblasts under mechanical stimulation, *Molecular and Cellular Biochemistry*, Vol.369,

(2012), pp.147–156, DOI: 10.1007/s11010-012-1377-9.

Pietraszewska-Bogiel, A., Gadella, T. W. J., FRET microscopy: from principle to routine technology in cell biology, *Journal of Microscopy*, Vol.241, No.2, (2011), pp.111–118, DOI: 10.1111/j.1365-2818.2010.03437.x.

Ponik, S. M., Pavalko, F. M., Formation of focal adhesions on fibronectin promotes fluid shear stress induction of COX-2 and PGE2 release in MC3T3-E1 osteoblast, *Journal of Applied Physiology*, Vol.97, No.1, (2004), pp.135-142, DOI: 10.1152/jappphysiol.01260.2003.

Rangaswami, H., Schwappacher, R., Marathe, N., Zhuang, S., Casteel, D. E., Haas, B., Chen, Y., Pfeifer, A., Kato, H., Shattil, S., Boss, G. R., Pilz, R. B., Cyclic GMP/protein kinase G control a Src-containing mechanosome in osteoblasts, *Science Signaling*, Vol.3, No.153, (2010), ra91, DOI: 10.1126/scisignal.2001423.

Riveline D., Zamir E., Balaban N. Q., Schwarz U. S., Ishizaki T., Narumiya S., Kam Z., Geiger B., Bershadsky A. D., Focal contacts as mechanosensors: externally applied local mechanical force induces growth of focal contacts by an mDia1-dependent and ROCK-independent mechanism, *Journal of Cell Biology*, Vol.153, (2001), 1175e1185, DOI: 10.1083/jcb.153.6.1175.

Roy, B., Das, T., Mishra, D., Maiti, T. K., Chakraborty, S., Oscillatory shear stress induced calcium flickers in osteoblast cells, *Integrative Biology*, Vol.6, No.3, (2014), pp.289–299, DOI: 10.1039/c3ib40174j.

Sasaki, F., Hayashi, M., Mouri, Y., Nakamura, S., Adachi, T., Nakashima, T., Mechanotransduction via the Piezo1-Akt pathway underlies Sost suppression in osteocytes, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol.521, No.3, (2020), pp.806–813, DOI: 10.1016/j.bbrc.2019.10.174.

Sato, T., Verma, S., Andrade, C. D. C., Omeara, M., Campbell, N., Wang, J. S., Cetinbas, M., Lang, A., Ausk, B. J., Brooks, D. J., Sadreyev, R. I., Kronenberg, H. M., Lagares, D., Uda, Y., Pajevic, P. D., Bouxsein, M. L., Gross, T. S., Wein, M. N., A FAK/HDAC5 signaling axis controls osteocyte mechanotransduction, *Nature Communications*, Vol.11, (2020), 3282, DOI: 10.1038/s41467-020-17099-3.

Seref-Ferlengez, Z., Maung, S., Schaffler, M. B., Spray, D. C., Suadicani, S. O., Thi, M. M., P2X7R-Panx1 complex impairs bone mechanosignaling under high glucose levels associated with type-1 diabetes, *PLoS ONE*, Vol.11, No.5, (2016), e0155107, DOI: 10.1371/journal.pone.0155107.

Serrano, J. C., Cora-Cruz, J., Diffoot-Carlo, N., Sundaram, P. A., Adaptive responses of murine osteoblasts subjected to coupled mechanical stimuli, *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, Vol.77, (2018), pp.250–257, DOI: 10.1016/j.jmbbm.2017.09.018.

Shi, W., Xie, Y., He, J., Zhou, J., Gao, Y., Wei, W., Ding, N., Ma, H., Xian, C. J., Chen, K., Wang, J., Microgravity induces inhibition of osteoblastic differentiation and mineralization through abrogating primary cilia, *Scientific Reports*, Vol.7, (2017), 1866, DOI: 10.1038/s41598-017-02049-9.

Shi, W., Zhang, Y., Chen, K., He, J., Feng, X., Wei, W., Hua, J., Wang, J., Primary cilia act as microgravity sensors by depolymerizing microtubules to inhibit osteoblastic differentiation and mineralization, *Bone*, Vol.136, (2020), 115346, DOI: 10.1016/j.bone.2020.115346.

Solberg, L. B., Stang, E., Brorson, S.-H., Andersson, G., Reinholt, F. P., Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) colocalizes with receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) in lysosomal-associated membrane protein 1 (LAMP1)-positive vesicles in rat osteoblasts and osteocytes, *Histochemistry and Cell Biology*, Vol.143, No.2, (2015), pp.195–207, DOI: 10.1007/s00418-014-1272-4.

Son, A., Kang, N., Kang, J. Y., Kim, K. W., Yang, Y.-M., Shin, D. M., TRPM3/TRPV4 regulates Ca^{2+} -mediated RANKL/NFATc1 expression in osteoblasts, *Journal of Molecular Endocrinology*, Vol.61, No.4, (2018), pp.207–218, DOI: 10.1530/JME-18-0051.

St. Croix, C. M., Shand, S. H., Watkins, S. C., Confocal microscopy: comparisons, applications, and problems, *BioTechniques*, Vol.39, No.65, (2005), pp.S2–S5, DOI: 10.2144/000112089.

Sun, Z., Cao, X., Zhang, Z., Hu, Z., Zhang, L., Wang, H., Zhou, H., Li, D., Zhang, S., Xie, M., Simulated microgravity inhibits L-type calcium channel currents partially by the up-regulation of miR-103 in MC3T3-E1 osteoblasts, *Scientific Reports*, Vol.5, (2015), 8077, DOI: 10.1038/srep08077.

Takemura, Y., Moriyama, Y., Ayukawa, Y., Kurata, K., Rakhmatia, Y. D., Koyano, K., Mechanical loading induced osteocyte apoptosis and connexin 43 expression in three-dimensional cell culture and dental implant model, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, Vol.107, No.4, (2019), pp.815–827, DOI: 10.1002/jbm.a.36597.

Taylor, A. F., Saunders, M. M., Shingle, D. L., Cimbala, J. M., Zhou, Z., Donahue, H. J., Mechanically stimulated osteocytes regulate osteoblastic activity via gap junctions, *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, Vol.292, No.1, (2007), pp.C545–C552, DOI: 10.1152/ajpcell.00611.2005.

Thi, M. M., Suadicani, S. O., Schaffler, M. B., Weinbaum, S., Spray, D. C., Mechanosensory responses of osteocytes to physiological forces occur along processes and not cell body and require $\alpha_v\beta_3$ integrin, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol.110, No.52, (2013), pp.21012–21017, DOI: 10.1073/pnas.1321210110.

Thompson, W. R., Majid, A. S., Czymmek, K. J., Ruff, A. L., García, J., Duncan, R. L., Farach-

Carson, M. C., Association of the $\alpha 2\delta 1$ subunit with Cav3.2 enhances membrane expression and regulates mechanically induced ATP release in MLO-Y4 osteocytes, *Journal of Bone and Mineral Research*, Vol.26, No.9, (2011), pp.2125–2139, DOI: 10.1002/jbmr.437.

Thurner, P. J., Oroudjev, E., Jungmann, R., Kreutz, C., Kindt, J. H., Schitter, G., Okouneva, T. O., Lauer, M. E., Fantner, G. F., Hansma, H. G., Hansma, P. K., Imaging of bone ultrastructure using atomic force microscopy, *Modern Research and Educational Topics in Microscopy*, (2007), pp.37-48.

Verborgt, O., Gibson, G. J., Schaffler, M. B., Loss of osteocyte integrity in association with microdamage and bone remodeling after fatigue in vivo, *Journal of Bone and Mineral Research*, Vol.15, No.1, (2000), pp.60–67, DOI: 10.1359/jbmr.2000.15.1.60.

Vogel, V., Sheetz, M., Local force and geometry sensing regulate cell functions, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, Vol.7, (2006), DOI: 10.1038/nrm1890.

Wang, D., Cai, J., Zeng, Z., Gao, X., Shao, X., Ding, Y., Feng, X., Jing, D., The interactions between mTOR and NF- κ B: A novel mechanism mediating mechanical stretch-stimulated osteoblast differentiation, *Journal of Cellular Physiology*, Vol.236, No.6, (2021), pp.4592–4603, DOI: 10.1002/jcp.30184.

Wang, H., Sun, W., Ma, J., Pan, Y., Wang, L., Zhang, W., Polycystin-1 mediates mechanical strain-induced osteoblastic mechanoresponses via potentiation of intracellular calcium and Akt/ β -catenin pathway, *PLoS ONE*, Vol.9, No.3, (2014), e91730, DOI: 10.1371/journal.pone.0091730.

Wei, L., Diao, Y., Qi, J., Khokhlov, A., Feng, H., Yan, X., Li, Y., Effect of change in spindle structure on proliferation inhibition of osteosarcoma cells and osteoblast under simulated microgravity during incubation in rotating bioreactor, *PLoS ONE*, Vol.8, No.10, (2013), e76710, DOI: 10.1371/journal.pone.0076710.

Wittkowske, C., Reilly, G. C., Lacroix, D., Perrault, C. M., *In vitro* bone cell models: Impact of fluid shear stress on bone formation, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, Vol.4, (2016), 87, DOI: 10.3389/fbioe.2016.00087.

Woodcock, E. M., Girvan, P., Eckert, J., Lopez-Duarte, I., Kubánková, M., van Loon, J. J. W. A., Brooks, N. J., Kuimova, M. K., Measuring intracellular viscosity in conditions of hypergravity, *Biophysical Journal*, Vol.116, No.10, (2019), pp.1984–1993, DOI: 10.1016/j.bpj.2019.03.038.

Wu, D., Ganatos, P., Spray, D. C., Weinbaum, S., On the electrophysiological response of bone cells using a Stokesian fluid stimulus probe for delivery of quantifiable localized piconewton level forces, *Journal of Biomechanics*, Vol.44, No.9, (2011), pp.1702–1708, DOI: 10.1016/j.jbiomech.2011.03.034.

Wu, X.-T., Sun, L.-W., Yang, X., Ding, D., Han, D., Fan, Y.-B., The potential role of spectrin network in the mechanotransduction of MLO-Y4 osteocytes, *Scientific Reports*, Vol.7, (2017), 40940, DOI: 10.1038/srep40940.

Xu, H., Liu, R., Ning, D., Zhang, J., Yang, R., Riquelme, M. A., Li, J., Jiang, J. X., Shang, P., Biological responses of osteocytic connexin 43 hemichannels to simulated microgravity, *Journal of Orthopaedic Research*, Vol.35, No.6, (2017), pp.1195–1202, DOI: 10.1002/jor.23224.

Yoneda, M., Suzuki, H., Hatano, N., Nakano, S., Muraki, Y., Miyazawa, K., Goto, S., Muraki, K., PIEZO1 and TRPV4, which are distinct mechano-sensors in the osteoblastic MC3T3-E1 cells, modify cell-proliferation, *International Journal of Molecular Sciences*, Vol.20, No.19, (2019), 4960, DOI: 10.3390/ijms20194960.

Young, S. R. L., Gerard-O’Riley, R., Harrington, M., Pavalko, F. M., Activation of NF- κ B by fluid shear stress, but not TNF- α , requires focal adhesion kinase in osteoblasts, *Bone*, Vol.47,

No.1, (2010), pp.74–82, DOI: 10.1016/j.bone.2010.03.014.

Zhang, B., Hou, R., Zou, Z., Luo, T., Zhang, Y., Wang, L., Wang, B., Mechanically induced autophagy is associated with ATP metabolism and cellular viability in osteocytes in vitro, *Redox Biology*, Vol.14, (2018), pp.492–498, DOI: 10.1016/j.redox.2017.10.021.

Zhou, S., Zu, Y., Zhuang, F., Yang, C., Hypergravity-induced enrichment of $\beta 1$ integrin on the cell membranes of osteoblast-like cells via caveolae-dependent endocytosis, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol.463, No.4, (2015), pp.928–933, DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.06.037.

Zimmerman, D., Jin, F., Leboy, P., Hardy, S., Damsky, C., Impaired bone formation in transgenic mice resulting from altered integrin function in osteoblasts, *Developmental Biology*, Vol.220, No.1, (2000), pp.2-15, DOI: 10.1006/dbio.2000.9633.

第 2 章 骨芽細胞の焦点接着斑を介した力学刺激 感知特性の変化

2.1 緒言

2.1.1 骨芽細胞の焦点接着斑

骨形成を担う骨芽細胞は、ECM を合成・分泌し、骨基質を石灰化させる。これらの細胞活動を行う上で、骨表面と細胞との接着を担う焦点接着斑は重要な役割を果たす。例えば、骨芽細胞において焦点接着斑形成の起点となるインテグリン β_1 の細胞外ドメインが異常をきたすと、骨量の減少、皮質骨多孔率の増加、扁平骨の厚みの低下が引き起こされる (Zimmerman, et al., 2000)。また、骨芽細胞の焦点接着斑形成を阻害すると、力学刺激下の骨形成促進因子プロスタグランジン E_2 の放出が抑制される (Ponik, et al., 2004)。これらの知見から、骨形成には、骨芽細胞の焦点接着斑の存在が重要であると考えられ、骨形成は、焦点接着斑の形成によりプロスタグランジン E_2 等のシグナル分子を介して制御される可能性が示唆される。

2.1.2 焦点接着斑の形成過程

焦点接着斑は、細胞表面に力学刺激を与えるとインテグリンを起点として形成される (Riveline, et al., 2001)。焦点接着斑の形成時、インテグリン、タリン、ビンキュリン、アクチン等の分子が接着領域に局在化する (Choi, et al., 2008; Tan, et al., 2010; Galbraith, et al., 2002)。これらの局在分子により、複合体の形成が段階的に行われる。まず、細胞表面において、ECM との結合によりインテグリンが活性化 (Giancotti, et al., 1999) し、その結果、Outside-in シグナリングが開始される (Kim, et al., 2003)。次に、インテグリンの細胞質側にタリンとアクチンが局在化し、その後、インテグリン-タリン-アクチン複合体が形成され

る (Jiang, et al., 2003). さらに、力学刺激下で分子構造が変化したタリン (Maki, et al., 2017; Lee, et al., 2007; Ciobanasu, et al., 2014; Hirata, et al., 2014) が、ビンキュリンと結合する。このとき、ビンキュリンはアクチンと結合するため、インテグリンとアクチンフィラメントの接続が強化される (Humphries, et al., 2007; Hirata, et al., 2014) こととなる。以上の一連の分子の振る舞いにより、焦点接着斑の基本的な構造が形成される。

以上のように、焦点接着斑の形成過程は、インテグリンとアクチンフィラメントの接続強化の過程であると考えられる。この接続強化は、焦点接着斑のその後の形成（成熟）に必要であると示唆されている (Choi, et al., 2008) ことから、インテグリンとアクチンフィラメントの接続強化は、焦点接着斑形成の重要な過程であると考えられる。

2.1.3 焦点接着斑の形成過程における剛性増加

焦点接着斑の形成過程においては、前項で説明したように、種々の接着分子同士の結合に関する理解が深められてきた。これらの分子間結合により、焦点接着斑の力学特性が高められると考えられる。焦点接着斑の力学特性の一つとして、見かけの剛性は、焦点接着斑の ECM 側から細胞骨格側への力学刺激の伝達特性に大きく影響する。ゆえに、焦点接着斑の形成過程における剛性増加は、ECM から細胞骨格への力学刺激伝達特性を向上させると考えられる。この力学刺激伝達特性の向上により、細胞骨格と接続したイオンチャネルの開口 (Hayakawa, et al., 2008)、また、細胞骨格の変形に起因するシグナル分子の活性化 (Han, et al., 2004) が促進されることが考えられる。これらのイオンチャネル、シグナル分子は細胞の力学刺激感知要素であることから、焦点接着斑の形成過程における見かけの剛性の増加は、細胞の力学刺激感知特性の変化と密接に関わると考えられる。

2.1.4 研究目的

第2章では、骨芽細胞の焦点接着斑の形成過程において、細胞の力学刺激感知特性の変化を明らかにすることを目的とする。この力学刺激感知特性には、焦点接着斑の見かけの剛性が密接に関わると考えられることから、焦点接着斑の形成過程において、その剛性の増加を調べる。そこで、まず、骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 表面において、フィブロネクチンを化学修飾した AFM プローブとインテグリンを接触させ、その接触状態を維持する時間を設けることにより、焦点接着斑の形成を誘導し、その後、焦点接着斑に対する引張試験を行う。次に、引張試験において取得された力-伸び曲線から、焦点接着斑の見かけの剛性を解析する。

2.2 手法

2.2.1 骨芽細胞様細胞の培養

骨芽細胞として、マウス頭蓋冠由来の骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 (RIKEN CELL BANK) を用いた。この細胞の表面には、インテグリン β_1 が発現する (Pavalko, et al., 1998)。細胞培養には、ウシ胎児血清 (Fetal bovine serum (FBS), Gibco) と抗生物質 (Antibiotic-antimycotic, ナカライテスク) を α -MEM (Gibco) に添加した培養液を用いた。細胞培養のため、インキュベータ内に静置した培養ディッシュ上に細胞を播種した。その後、細胞接着のため 2 h 以上静置した。

2.2.2 細胞内におけるタリン 1 の発現阻害

細胞内のタリンの発現を阻害 (ノックダウン) するため、DNA の 1 種であるプラスミドを用いて RNA 干渉を誘導した。ここでは、細胞内に導入されたプラスミドにより shRNA (short hairpin RNA) が発現誘導された後、それが siRNA (short interference RNA) へと変化し、標的タンパク質のメッセンジャー RNA

に対して配列特異的に結合して分解する (De Paula, et al., 2007). これにより, 標的タンパク質の発現が抑制される. まず, タリン1を標的にした RNA 干渉用プラスミド (pSilencer-Talin-1, 慶應義塾大学解剖学教室提供) を以下の手順で細胞内に導入した. $\phi = 100$ mm 培養ディッシュ (Thermo Fisher Scientific) に 3.0×10^6 個の細胞を播種し, 細胞接着後, ディッシュ内の培養液をトランスフェクション溶液と交換した. この溶液の作製には, トランスフェクション試薬 FuGENE HD (プロメガ) を用いた. FuGENE HD を 10% FBS Opti-MEM 培地 (Gibco) 中に添加し, ボルテックスミキサー (トミー工業株式会社) でよく攪拌した. さらに, この溶液に干渉プラスミドを加え, タッピングにより穏やかに混和した. このとき, FuGENE HD とプラスミドの比率は, トランスフェクション効率が最大となる先行の条件 (Yamano, et al., 2010) に倣った. その後, この溶液を室温で 15 min 静置した. ディッシュ内の培養液のトランスフェクション溶液への交換後, ディッシュを 37°C , CO_2 濃度 5% 環境下のインキュベータ内に 2 h 静置した. インキュベーション後, ディッシュ内の溶液を通常の培養液に交換し, ディッシュを同環境下で 46 h 静置した.

タリンノックダウン細胞を判別するため, 前述のトランスフェクション溶液の作製時, 干渉プラスミドに加え, 蛍光分子 GFP (Green fluorescent protein) を標的として高度に発現させるプラスミド (pCAGGS-EGFP, 慶應義塾大学解剖学研究室提供) を混和した. 力学刺激実験に際して, 蛍光顕微鏡 (IX73, オリパス) 観察下で GFP 蛍光を示す細胞をノックダウン細胞として用いた.

2.2.3 AFM プロブ先端表面の化学修飾

AFM プロブとして, OMCL-TR400PSA (バネ定数: 0.02 N/m, 先端直径: 約 30 nm, オリパス) を使用した. プロブ先端表面に ECM の一種であるフィブロネクチン (FN) を化学修飾するため, まず, 先端表面から真空プラズマ処理装置 (PC-400, ストレックス) により有機物を除去した. 洗浄後, プロブ先端を以下に述べる複数の溶液中に順次静置した. まず, シランカップリング反応のため, 2% 3-aminopropyl-triethoxysilane (APTES; Sigma-Aldrich) 溶液中に 15 min 静置した. 洗浄後, リンカータンパク質との結合のため, 1 mM

maleimide-polyethyleneglycol-N-hydroxysuccinimide (Maleimide-PEG-NHS ; Nanocos) 溶液中に 30 min 静置した. さらに, 洗浄後, 100 nM フィブロネクチン (EMD Millipore) 溶液中に 60 min 静置した. 最後に, 未反応のマレイミド残基をブロッキングするため, 2-mercaptoethanol (和光) に 60 min 静置した. 以上の手順により, FN プローブを作製した. 一方, FN プローブの焦点接着斑形成への寄与を検証するため, BSA プローブを作製した. その作製のため, Maleimide-PEG-NHS の修飾後, プローブ先端を 4% bovine serum albumin (BSA; 和光) 溶液中に静置した.

2.2.4 プローブ先端表面のインテグリンの免疫蛍光染色と顕微鏡観察

細胞表面と接触した FN プローブの先端表面において, フィブロネクチンと結合したインテグリンを可視化するため, 免疫蛍光染色を行った. まず, プローブ先端の表面タンパク質を 5% paraformaldehyde により化学固定した. その後, 3% BSA を用いてタンパク質をブロッキングし, 一次抗体として Anti-Integrin beta 1 antibody (ab95623, Abcam), 二次抗体として蛍光色素 Alexa Fluor 488-conjugated donkey anti-rat IgG antibody (ab150153, Abcam) をそれぞれ用い, インテグリンを蛍光標識した. インテグリンの蛍光観察は全反射照明蛍光顕微鏡 TIRFM (オリンパス) を用いて行われた. 観察結果の解析には, 画像処理ソフトウェア ImageJ (NIH) を用いた.

2.2.5 AFM 引張試験

AFM (NanoWizard 3, JPK) を用いた引張試験のため, 出力電圧の値とカンチレバーに加わる力の値との関係をキャリブレーションした. まず, AFM 内部のピエゾ素子に対する動作制御により, カンチレバーを $1 \mu\text{m/s}$ の速さで培養ディッシュ底面に押しつけた. この操作により, 出力電圧の変化とカンチレバーのたわみとの関係を表す曲線を取得した. 次に, この曲線に対する直線近似により, 電圧変化に対するたわみの比率を算出した. 最後に, この比率にカンチレバーのバネ定数 (0.02 N/m) を乗じ, 電圧変化に対するプローブに加わる力

の比率を算出した。以上の操作を AFM プローブごとに実行した。

2 h 以上培養した細胞に対して、AFM 引張試験 (図 2.1) を以下の手順で行った。まず、細胞中央部表面の $10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$ の領域において、5 個 \times 5 個の格子点を 25 点設定した。次に、これらの点の真上から、AFM プローブを $1\ \mu\text{m/s}$ の速度で押込んだ。プローブに加わる力の大きさは、押込深さに応じて増加した (図 2.1 A)。力の値が $100\ \text{pN}$ に達した後、焦点接着斑の形成のために接触時間 $T[\text{s}]$ ($0\ \text{s}$, $5\ \text{s}$, $10\ \text{s}$, $15\ \text{s}$, $20\ \text{s}$, $25\ \text{s}$, $30\ \text{s}$) を設定した (図 2.1 B)。この期間中、 piezo 素子に対するフィードバック制御により、押込力の値を $100\ \text{pN}$ に維持した。その後、プローブを細胞表面から $1\ \mu\text{m/s}$ の速度で引き離れた (図 2.1 A)。以上の手順により、プローブに加わる力 $F[\text{pN}]$ と piezo 素子の位置する高さとの関係を表す曲線 (力-高さ曲線) を取得した (図 2.1 C)。曲線取得のため、各接触時間を設けた実験ごとに、8 個から 10 個までの細胞を用いた。

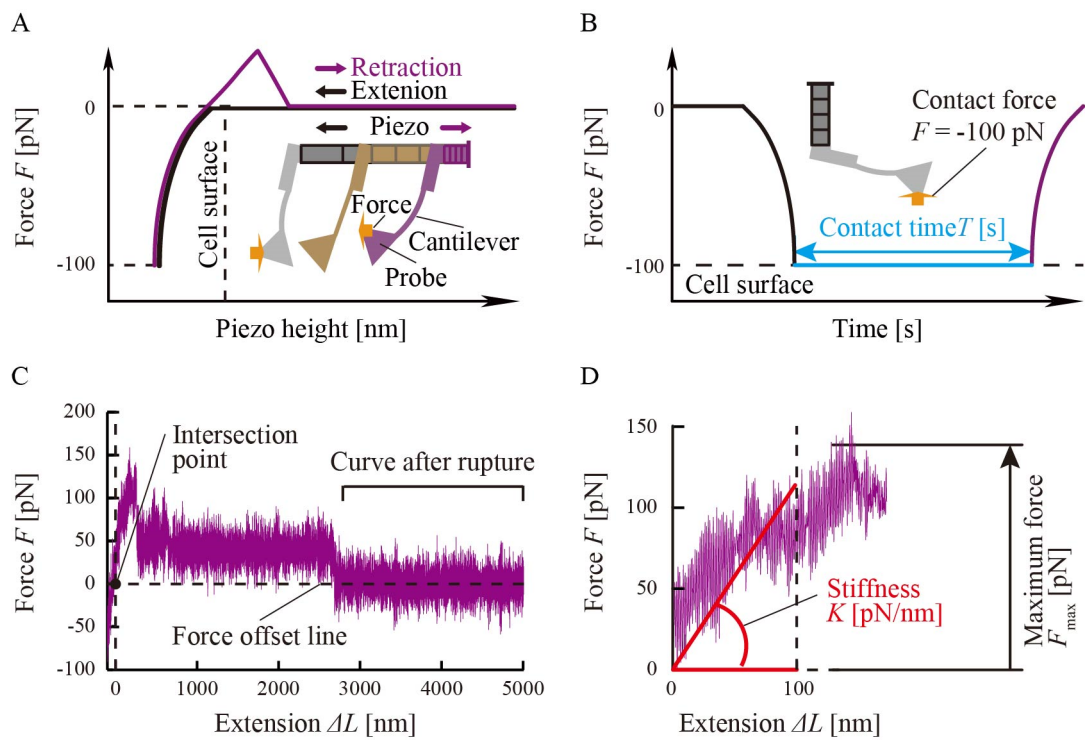


Fig. 2.1 AFM stiffness measurement. (A) Schematic of AFM tensile-testing. The AFM probe approached the cell surface by extending a piezo actuator. After the probe-cell contact, the probe was pulled away by retracting the actuator. (B) The contact state was retained using constant force ($F = -100$ pN) for contact time T [s]. (C) Typical force curve. The intersection point represents the origin of the curve. The origin of force F was determined as force after rupture. The origin of extension ΔL was defined as the tip height when force reached 0 pN. (D) Maximum force F_{\max} [pN] was measured within 500 nm of ΔL . Stiffness K [pN/nm] was calculated by linear approximation of the curve ($0 \text{ nm} \leq \Delta L \leq 100 \text{ nm}$).

2.2.6 カー伸び曲線解析

カー高さ曲線から焦点接着斑の剛性を測定するため、解析ソフト JPKSPM Data Processing (JPK) によりカー伸び曲線 (F - ΔL 曲線) を出力した。まず、カンチレバーのたわみを計算するため、プローブに加わる力の値をカンチレバーのバネ定数で除した。次に、プローブ先端の高さを計算するため、ピエゾ素子の高さの値からカンチレバーのたわみを減じた。その後、熱ドリフトにより生じる曲線全体の傾きを補正するため、曲線全体の傾きから、破断後の曲線の傾きの値を減じた。また、曲線において力 F [pN] の原点を定めるため、縦軸の値から、破断後の曲線の力の平均値を減じた。さらに、焦点接着斑の伸び ΔL [nm] の原点を定めるため、横軸の値から、初期曲線上で $F=0$ pN となる高さの値を減じた。一連の処理により、カー伸び曲線 (F - ΔL 曲線) を出力した。

F - ΔL 曲線の最大力 F_{\max} [pN] の値から焦点接着斑形成を判定するため、最大力の閾値を設定した。そのため、 $T=0$ s 条件下で取得された曲線の最大力を解析した。最大力の平均値 μ [pN] と標準偏差 α [pN] の値を用い、 $\mu + 2\alpha$ を閾値として設定した。焦点接着斑の形成時、その最大力 F_{\max} の解析のため、焦点接着斑の高さ方向の大きさ (100 nm 程度 (Liu, et al., 2015)) を考慮し、 F_{\max} の定義域を $0 \text{ nm} \leq \Delta L \leq 500 \text{ nm}$ に設定した。また、見かけの剛性 K [pN/nm] の解析のため、焦点接着斑の伸びの定義域を $0 \text{ nm} \leq \Delta L \leq 100 \text{ nm}$ に設定した (図 2.1 D)。以上の解析には、数値計算ソフトウェア Scilab (INRIA) を用いた。

2.3 実験結果

2.3.1 フィブロネクチン-インテグリン結合の形成

FN プローブと細胞表面との接触によりフィブロネクチン-インテグリン結合が形成されたかどうかを検証するため、FN プローブ表面を TIRFM 観察した。細胞表面に接触していない FN プローブの表面の観察結果を図 2.2 A に表す。また、細胞表面に接触したプローブに対する観察結果を図 2.2 B に表す。図 2.2 A, B の顕微鏡画像の蛍光は、インテグリンを表す。また、赤色と青色の破線の交点は、カンチレバー先端(黄色実線の内側)のプローブの先端位置を表す。顕微鏡画像からプローブ先端表面の蛍光強度を解析すると、細胞表面に接触したプローブの強度は、接触していないプローブの強度に比べ高いことが示された(図 2.2 A, B 下側のグラフ)。この蛍光強度の違いから、細胞表面と FN プローブとの接触により、プローブ表面にインテグリンが結合したことが示され、フィブロネクチン-インテグリン結合の形成が示唆された。

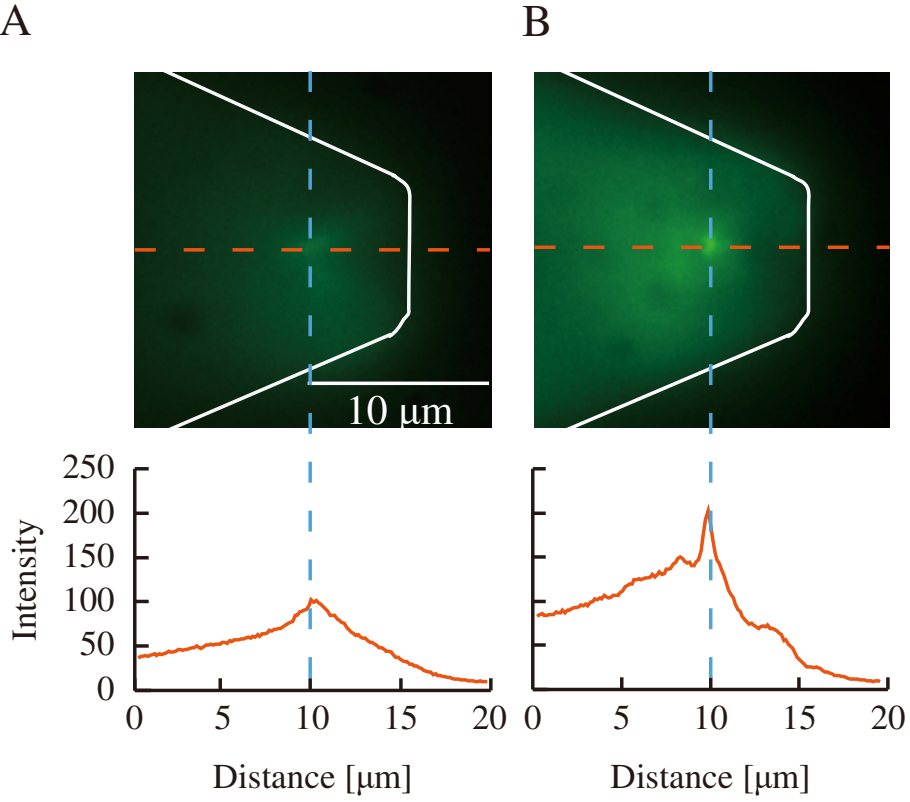


Fig. 2.2 Integrin β_1 -fibronectin binding. Fluorescence images of (A) non- and (B) post-contact (contact time $T = 30$ s) FN probe. The fluorescence intensity in the both images was profiled along with the red lines. The white lines indicate the outline of cantilevers. The blue and red dashed lines indicate the position of the probe.

2.3.2 インテグリン-タリン-アクチンフィラメント複合体の形成

FN プローブと細胞表面との接触によるインテグリン-タリン-アクチンフィラメント複合体形成を検証するため、 $F-AL$ 曲線の最大力 F_{\max} を解析した (図 2.3 A). まず, 複合体形成の有無を判定するため, 複合体形成の困難な接触時間 $T=0s$ の条件下で取得された曲線において, その最大力を解析し, 最大力の閾値 $\mu + 2\alpha$ を決定した. 以下, この閾値以上の最大力を示す曲線をポジティブ曲線と呼び表すこととする.

各接触時間条件下のポジティブ曲線取得率の解析により, 接触時間に伴う焦点接着斑形成の有無を検証した. 線形回帰分析の結果, 接触時間に対するポジティブ曲線取得率の変化率は, 有意な正の値として示された ($p=0.0033$, 図 2.3 B 黒色棒グラフ). また, ポジティブ曲線の取得率は, 細胞内のタリンをノックダウンした場合, していない場合に比べ減少した (図 2.3 B 黒・灰色棒グラフ). これらの結果から, タリンを構成要素とする分子構造体の形成が示された. さらに, この構造体の形成にフィブロネクチン-インテグリン結合が必要であることを確かめるため, FN プローブと BSA プローブを用いた測定の結果を比較した. この比較によると, FN プローブを用いた場合に比べ, BSA プローブを用いた場合にポジティブ曲線の取得率が減少した (図 2.3 B 黒・白色棒グラフ). この結果は, タリンを含む分子構造体の形成にフィブロネクチン-インテグリン結合が必要であることを示している. 以上の解析結果から, FN プローブと細胞表面との接触によるインテグリン-タリン-アクチンフィラメント複合体の形成が示唆された.

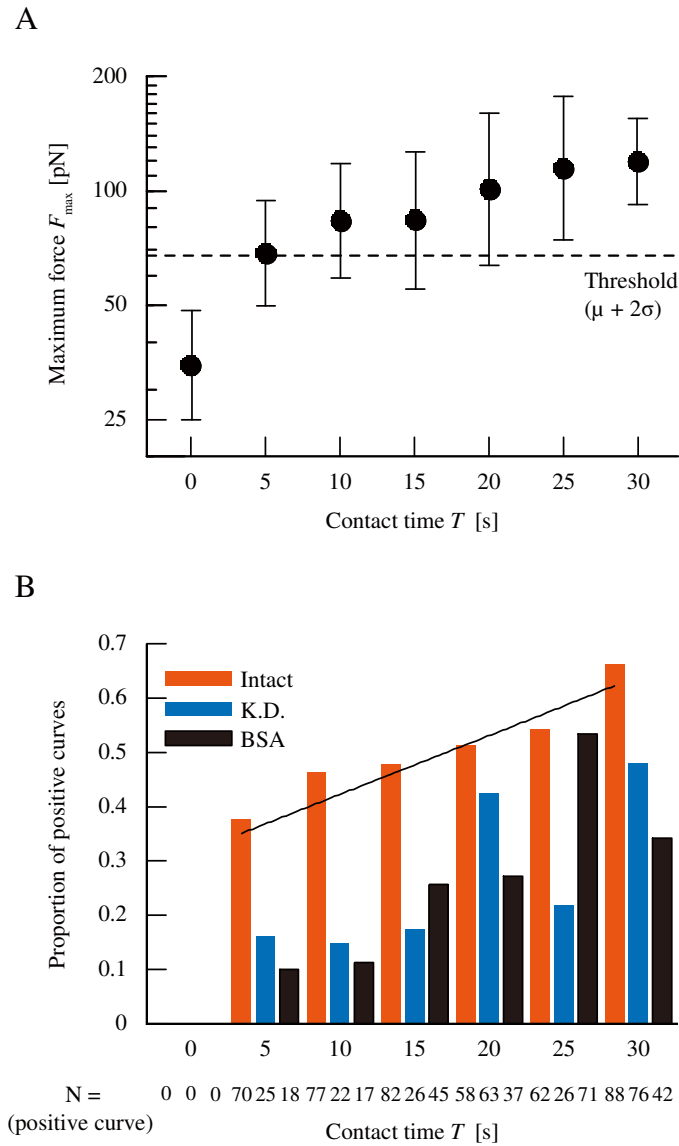


Fig. 2.3 Formation of integrin-talin-actin filament complex for contact time T . (A) Time-dependent variations in maximum force F_{\max} [pN] for intact cells. Black points indicate the mean. Error bars indicate S.D. A positive curve is defined as the force-extension curve, in which maximum force F_{\max} exceeds $m \mu + 2\sigma$ ($\mu = \text{mean}$, $\sigma = \text{S.D.}$) at 0 s contact. (B) Proportion of positive curve to total curves was shown with respect to each contact time T for intact cells, talin 1 knocked-down cells and BSA probe. Linear regression analysis indicated that the proportion for intact cells significantly increased with contact time T ($p < 0.01$).

2.3.3 焦点接着斑の剛性の増加

焦点接着斑の形成過程における見かけの剛性の変化を調べるため、各接触時間の条件下で剛性 K (図 2.1 D) を測定した。10 s から 30 s までの接触時間の条件下で測定した剛性 K は、5 s の接触時間の条件下で測定した剛性 K に比べ有意に増加した (Two-way ANOVA test followed by Tukey-Kramer test, $p < 0.001$)

(図 2.4)。一方、細胞内のタリンをロックダウンすると、通常の細胞と比べ剛性 K が有意に減少した (Two-way ANOVA test followed by Tukey-Kramer test, $p < 0.001$) ことから、剛性 K が焦点接着斑の剛性を表すと考えられる。以上の結果から、焦点接着斑の剛性 K の接触時間に応じた増加、および、その増加の時間スケール (10 秒程度) が示された。

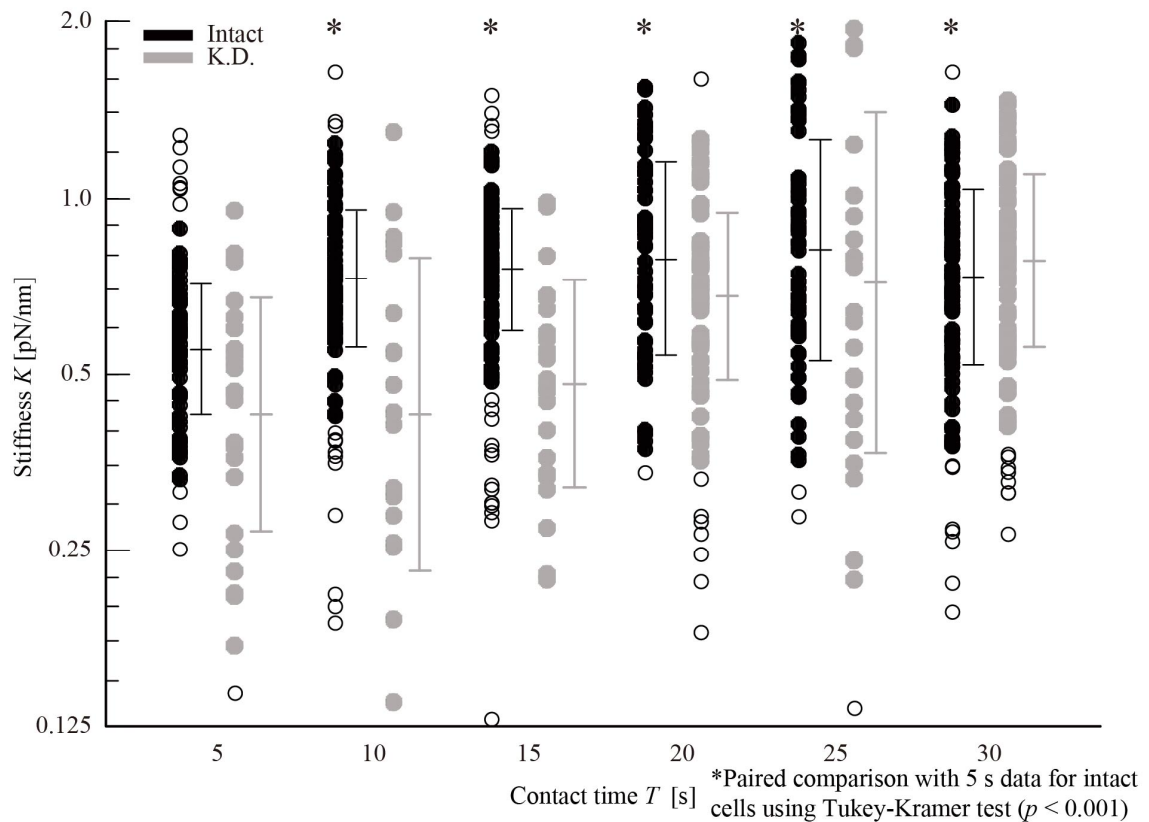


Fig. 2.4 Increase in stiffness K requiring talin. Stiffness K for intact and talin 1 knocked-down cells was plotted with respect to each contact time T . On the right side of the plots, mean and S.D. are shown. ANOVA test indicated that talin 1 knock-down had a significant effect on stiffness K ($p < 0.001$). Tukey-Kramer test indicated that stiffness K for 10-to-30 s contact was significantly larger than that for 5 s contact in AFM stiffness measurements on intact cells ($*p < 0.001$).

2.4 考察

2.4.1 焦点接着斑の剛性増加

第 2 章では、骨芽細胞様細胞を用いた AFM 引張試験の結果、焦点接着斑の形成過程において、焦点接着斑の見かけの剛性増加が示された。この剛性増加は、ECM から細胞骨格への力学刺激伝達を向上させると考えられる。さらに、この力学刺激伝達の向上の結果、機械受容チャネルの開口 (Hayakawa, et al., 2008), および、細胞骨格の変形を介した生化学的シグナル伝達 (Han, et al., 2004) が促進されると考えられる。ゆえに、焦点接着斑の剛性増加により、細胞内への力学刺激伝達が向上し、細胞の力学刺激感知要素の振る舞いがより活発になると考えられる。このことは、剛性増加の原因であると考えられるインテグリンとアクチンフィラメントの接続強化が、焦点接着斑の成熟に必要なもの (Choi, et al., 2008) 一因であると考えられる。

また、焦点接着斑の剛性増加の時間スケールが秒スケールであることが明らかとなった。この剛性増加の時間スケールは、1 秒以下の時間スケールで生じる分子の振る舞いに対する理解と、分以上のスケールで生じる細胞の振る舞いに対する理解を繋ぐための基礎的な知見だと考えられる。特に、接着分子の振る舞いから、焦点接着斑の力学機能的な振る舞いが生み出されるシステムを理解するうえで重要な知見となると考えられる。

2.4.2 焦点接着斑の形成過程における剛性増加機構

第 2.4.1 項で議論したように、焦点接着斑の剛性増加は、インテグリンとアクチンフィラメントの接続強化により引き起こされたと考えられる。先行研究から、この接続強化にはタリンの分子構造が密接に関連することが示唆されている。分子動力学シミュレーションによると、タリンのロッドドメインは、引張条件下でビンキュリンとの結合部位を露出する (Lee, et al., 2007)。また、精製タンパク質を用いた分子実験によると、タリン-アクチン複合体は、引張条件下でビンキュリンと結合する (Ciobanasu, et al., 2014)。さらに、細胞実験によ

ると、ビンキュリンは、細胞に対する基板伸展刺激下でタリンと共に局在化する (Hirata, et al., 2014). これらの研究から、タリンとビンキュリンを介したインテグリン-アクチンフィラメント接続の強化機構が示唆される (Menkel, et al., 1994; Golji, et al., 2013). 焦点接着斑の剛性増加はこの強化機構により生じたと考えられ、また、このことは、タリンノックダウンにより剛性 K の増加が抑制された結果からも支持される.

2.4.3 細胞内への力学刺激伝達の向上による骨形成の促進

骨芽細胞において、焦点接着斑から細胞骨格への力学刺激伝達の結果、細胞骨格と結合した力学刺激感知要素が活性化される機構は明らかでない. そのため、焦点接着斑の剛性増加が、細胞内への力学刺激伝達の向上を介し、骨芽細胞の力学刺激応答に及ぼす影響は明らかでない. しかしながら、骨芽細胞の焦点接着斑の形成において、骨形成促進因子プロスタグランジン (Ponik, et al., 2004) 等の発現レベルが増加する一因として、この力学刺激伝達の向上による力学刺激感知要素の活性化機構 (第 2.4.1 項) の存在が考えられる. これらの力学刺激感知要素の一つとして、第 1.2.3 項で述べたように、骨芽細胞増殖等を担うチャンネル分子の存在が挙げられる. このチャンネル分子等の振る舞いの結果として、骨形成が促進される可能性が考えられる.

2.4.4 AFM を用いた力学刺激実験の展望

今後、焦点接着斑の形成過程における剛性増加機構を調べるために、タリンをはじめとして、力学刺激下の接着分子の動的な振る舞いを知ることが重要となる. そのために、AFM を用いた細胞表面への力学刺激負荷と焦点接着斑に対する引張試験に加え、接着分子の振る舞いの可視化が有益である. AFM と蛍光顕微鏡を併用する (Maki, et al., 2018) ことにより、接着分子の局在化、タリン分子の立体構造変化、タリンとビンキュリンとの結合等の可視化が期待される. 焦点接着斑の剛性増加機構を解明するためには、さらに、細胞骨格への力学刺激伝達特性と、力学刺激感知要素の振る舞いを詳細に調べることが必要となる.

2.5 結言

第2章では、骨芽細胞の焦点接着斑の形成過程における力学刺激感知特性の変化を明らかにすることを目的とした。まず、骨芽細胞様細胞の表面において、AFMプローブをインテグリンに接触させ、その接触状態を維持することにより、焦点接着斑を形成させた。次に、AFM引張試験により、力学刺激感知特性と密接に関わる焦点接着斑の見かけの剛性を計測した。異なる接触時間の条件下でカーブ曲線を取得し、剛性を評価した結果、力学刺激負荷開始から秒スケールで焦点接着斑の剛性増加が生じることを見出した。この剛性増加は、ECMから細胞骨格への力学刺激伝達を向上させることにより、骨形成促進シグナルの発生に寄与すると考えられる。また、剛性増加の時間スケールは、分子の振る舞いに対する理解と、細胞の振る舞いに対する理解を繋ぐための基礎的な知見だと考えられる。

参考文献

Choi, C. K., Vicente-Manzanares, M., Zareno, J., Leanna, W. A., Mogilner, A., Horwitz, A. R., Actin and a-actinin orchestrate the assembly and maturation of nascent adhesions in a myosin II motor-independent manner, *Nature Cell Biology*, Vol.10, No.9, (2008), pp.1039-1050, DOI: 10.1038/ncb1763.

Ciobanaru, C., Faivre, B., Le Clairche C., Actomyosin-dependent formation of the mechanosensitive talin-vinculin complex reinforces actin anchoring, *Nature Communications*, Vol.5, (2014), 3095, DOI: 10.1038/ncomms4095.

De Paula D., Bentley M. V., Mahato R. I., Hydrophobization and bioconjugation for enhanced siRNA delivery and targeting, *RNA*, Vol.13, No.4, (2007), pp.431-456, DOI: 10.1261/rna.459807.

Galbraith, C. G., Yamada, K. M., Sheetz, M. P., The relationship between force and focal complex development, *Journal of Cell Biology*, Vol.159, No.4, (2002), pp.695-705, DOI: 10.1083/jcb.200204153.

Giancotti, F. G., Ruoslahti, E., Integrin signaling, *Science*, Vol.285, No.5430, (1999), pp.1028-1033, DOI: 10.1126/science.285.5430.1028.

Golji, J., Mofrad, M. R. K., The interaction of vinculin with actin, *PLoS Computational Biology*, Vol.9, No.4, (2013), e1002995, DOI: 10.1371/journal.pcbi.1002995.

Han, B., Bai, X., Lodyga, M., Xu, J., Yang, B. B., Keshavjee, S., Post, M., Liu, M., Conversion of mechanical force into biochemical signaling, *Journal of Cell Biology*, Vol.279, No.52, (2004) pp.54793-54801, DOI: 10.1074/jbc.M406880200.

Hayakawa, K., Tatsumi, H. Sokabe, M., Actin stress fibers transmit and focus force to activate

mechanosensitive channels, *Journal of Cell Science*, Vol.121, No.4, (2008), pp.496-503, DOI: 10.1242/jcs.022053.

Hirata, H., Tatsumi, H., Lim, C. T., Sokabe, M., Force-dependent vinculin binding to talin in live cells: a crucial step in anchoring the actin cytoskeleton to focal adhesions, *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, Vol.306, No.6, (2014), pp.C607-C620, DOI: 10.1152/ajpcell.00122.2013.

Humphries, J. D., Wang, P., Streuli, C., Geiger, B., Humphries, M. J., Ballestrem, C., Vinculin controls focal adhesion formation by direct interactions with talin and actin, *Journal of Cell Biology*, Vol.179, No.5, (2007), pp.1043-1057, DOI: 10.1083/jcb.200703036.

Jiang, G. Y., Giannone, G., Critchley, D. R., Fukumoto, E., Sheetz, M. P., Two-piconewton slip bond between fibronectin and the cytoskeleton depends on talin, *Nature*, Vol.424, (2003), pp.334-337, DOI: 10.1038/nature01794.1.

Kim, M., Christopher, C.V., Springer, T.A., Bidirectional transmembrane signaling by cytoplasmic domain separation in integrins, *Science*, Vol.301, No.5640, (2003), pp.1720-1725, DOI: 10.1126/science.1084174.

Lee, S. E., Kamm, R. D., Mofrad, M. R. K., Force-induced activation of Talin and its possible role in focal adhesion mechanotransduction, *Journal of Biomechanics*, Vol.40, No.9, (2007), pp.2096-2106, DOI: 10.1016/j.jbiomech.2007.04.006.

Liu J., Wang Y., Goh W.I., Goh H., Baird M.A., Ruehland S., Teo S., Bate N., Critchley D.R., Davidson M.W., Talin determines the nanoscale architecture of focal adhesions, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112 (2015), <https://doi.org/10.1073/pnas.1512025112>. E4864eE4873.

Maki, K., Nakao, N., Adachi, T., Nano-mechanical characterization of tensionsensitive helix

bundles in talin rod, *Biochemical and Biophysical Research Communication*, Vol.484, No.2, (2017), pp.372-377, DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.01.127.

Maki, K., Han, S., Hirano, Y., Yonemura, S., Hakoshima, T., Adachi, T., Real-time TIRF observation of vinculin recruitment to stretched α -catenin by AFM, *Scientific Reports*, Vol.8, (2018), 1575, DOI: 10.1038/s41598-018-20115-8.

Menkel, A. R., Kroemker, M., Bubeck, P., Ronsiek, M., Nikolai, G. B., Jockusch, M., Characterization of an F-actin-binding domain in the cytoskeletal protein vinculin, *Journal of Cell Biology*, Vol.126, No.5, (1994), pp.1231-1240. DOI: 10.1083/jcb.126.5.1231.

Pavalko, F. M., Chen, N. X., Turner, C. H., Burr, D. B., Atkinson, S., Hsieh, Y., Qiu, J., Duncan, R. L., Fluid shear-induced mechanical signaling in MC3T3-E1 osteoblasts requires cytoskeleton-integrin interactions, *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, Vol.275, No.6, (1998), pp.C1591-C1601, DOI: 10.1152/ajpcell.1998.275.6.C1591.

Ponik, S. M., Pavalko, F. M., Formation of focal adhesions on fibronectin promotes fluid shear stress induction of COX-2 and PGE2 release in MC3T3-E1 osteoblast, *Journal of Applied Physiology*, Vol.97, No.1, (2004), pp.135-142, DOI: 10.1152/jappphysiol.01260.2003.

Riveline D., Zamir E., Balaban N. Q., Schwarz U. S., Ishizaki T., Narumiya S., Kam Z., Geiger B., Bershadsky A. D., Focal contacts as mechanosensors: externally applied local mechanical force induces growth of focal contacts by an mDia1-dependent and ROCK-independent mechanism, *Journal of Cell Biology*, Vol.153, (2001), 1175e1185, DOI: 10.1083/jcb.153.6.1175.

Tan, L., Meyer, T., Pfau, B., Hofmann, T., Tan, T. W., Jones, D., Rapid vinculin exchange dynamics at focal adhesions in primary osteoblasts following shear flow stimulation, *Journal of Musculoskeletal Neuronal Interactions*, Vol.10, No.1, (2010), pp.92-99.

Yamano, S., Dai, J., Moursi, A. M., Comparison of transfection efficiency of nonviral gene transfer reagents, *Molecular Biotechnology*. Vol.46, No.3, (2010), pp.287-300, DOI: 10.1007/s12033-010-9302-5.

Zimmerman, D., Jin, F., Leboy, P., Hardy, S., Damsky, C., Impaired bone formation in transgenic mice resulting from altered integrin function in osteoblasts, *Developmental Biology*, Vol.220, No.1, (2000), pp.2-15, DOI: 10.1006/dbio.2000.9633.

第 3 章 骨細胞の焦点接着斑への力学刺激 に対するアポトーシス応答特性

3.1 緒言

3.1.1 骨細胞の焦点接着斑

骨細胞は、骨基質中の空隙である骨小腔・骨細管の内部に存在する。骨小腔・骨細管の内壁と骨細胞は、点在する焦点接着斑を介して局所的に接着していると考えられている (You, et al., 2004)。損傷骨等においては、この細胞周囲環境のもとで骨基質が大きく変形すると、焦点接着斑に過度な力学刺激が加わると考えられる。これまで、骨細胞の焦点接着斑への力学刺激負荷による骨吸収・骨形成への影響は、直接的に明らかでないが、その一方で、骨細胞の焦点接着斑の発現を阻害した骨においては、骨形成・骨吸収の異常が示唆されている。例えば、骨細胞のインテグリン β_1 や α_5 の発現を阻害すると、骨量の低下、皮質骨の厚みの減少等が引き起こされる (Qin, et al., 2022; Zhao, et al., 2022)。そのため、力学環境変化に対し骨構造が適切に変化するためには、骨細胞の焦点接着斑の存在が不可欠であると考えられる。

3.1.2 骨細胞への力学的過負荷とアポトーシス

骨は、絶えず力学刺激を受け、損傷を蓄積する (Vashishth, et al., 2000)。骨の損傷は骨折の原因となる (Yeni, et al., 2002) ため、損傷箇所を修復することは、骨の健全性を維持するうえで重要である。この骨損傷の修復過程においては、破骨細胞による骨吸収がまず引き起こされ (Cardoso, et al., 2009)、その後、骨芽細胞による骨形成が行われる。

骨吸収は、骨基質中に埋没している骨細胞により制御されることが考えられている。損傷骨内部の骨細胞は、骨基質に生じる微小亀裂（マイクロクラック）の

周囲において、ひずみの増大 (Barak, et al., 2009) と細胞突起の断裂 (Dooley, et al., 2012) から示唆されるように、過度な力学的な負荷にさらされると考えられる。この力学的過負荷を受けた領域においては、骨細胞のアポトーシスが生じ、これが骨吸収を促進すると示唆されている (Kogianni, et al., 2008; Verborgt, et al., 2000)。実際、力学的過負荷を与えた骨の表面を顕微鏡により観察すると、微小亀裂箇所と骨吸収箇所において、アポトーシスした骨細胞が多数検出された (Verborgt, et al., 2000)。また、アポトーシスした骨細胞から放出されるアポトーシス小体の存在下において、破骨細胞分化と骨表面における骨吸収の促進が示された (Kogianni, et al., 2008)。これらの知見から、骨損傷の修復期間中、力学的過負荷による骨細胞アポトーシスが、破骨細胞による骨吸収の促進において重要な役割を果たすと考えられる。

3.1.3 アポトーシスと一酸化窒素(NO)との関連

これまでの *in vitro* 実験により、骨細胞の力学刺激に対する応答には、細胞質内の一酸化窒素 (NO) (Bacabac, et al., 2008; Klein-Nulend, et al., 1995; Vatsa, et al., 2006)、 Ca^{2+} (Adachi, et al., 2009a, 2009b; Thi, et al., 2013) 等のシグナル分子の介在が示されている。これらの分子のうち、NO は、NOS (Nitric oxide synthase) の存在下で合成され (Knowles, et al., 1994)、マクロファージ (Albina, et al., 1993)、神経細胞 (Simmons, et al., 1992)、軟骨細胞 (Blanco, et al., 1995) 等のアポトーシスを誘導する。NO の働きは、高濃度下ではアポトーシス促進的である一方、低濃度下ではアポトーシス抑制的である (Kanaoka, et al., 2000; Mancini, et al., 2000; Shen, et al., 1998; Yoshioka, et al., 2003) ことが報告されている。力学刺激下の骨細胞において、細胞質内の NO 濃度が上昇する (Bacabac, et al., 2008; Klein-Nulend, et al., 1995; Vatsa, et al., 2006) ため、NO は骨細胞のアポトーシスを誘導する候補として考えられる。これまで、軟骨細胞において NO によるアポトーシス促進 (Lee, et al., 2003) が報告されたことから、力学刺激下の骨細胞アポトーシスにおける NO の関与が強く予想される。

3.1.4 研究目的

第3章では、骨細胞の焦点接着斑への力学刺激の大きさに対するアポトーシス応答の特性を明らかにすることを目的とする。磁気ピンセットを用い、単離骨細胞の焦点接着斑に対して大きさの異なる2つの力学刺激を加え、力学刺激の大きさと、アポトーシスの初期応答である細胞収縮 (Kim, et al., 2004; Porcelli, et al., 2004; Tian, et al., 2016) との関係性を調べる。さらに、力学的過負荷による骨細胞の収縮へのNOの寄与を調べる。

3.2 手法

3.2.1 フィブロネクチン修飾ディッシュの作製

骨細胞をガラスボトムディッシュ (MatTek) に接着させるため、ディッシュ表面をフィブロネクチンで化学修飾した。フィブロネクチンはインテグリン $\alpha_v\beta_3$ と結合することが知られており (Adair, et al., 2005), このインテグリンの骨細胞における発現が報告されている (Cabahug-zuckerman, et al., 2018). ディッシュ表面にフィブロネクチン修飾のためのリンカー分子を接着させるため、ディッシュ内に 0.2% poly-D-lysine (Sigma) 溶液を添加し、37°Cで1h静置した。洗浄後、0.2%フィブロネクチン (Millipore) 溶液を添加し、37°Cで1h静置し、その後再び洗浄した。

3.2.2 骨細胞の単離と初代培養

骨細胞分化の初期マーカーである DMP1 (Toyosawa, et al., 2001) の発現誘導下で蛍光分子 EGFP の発現が駆動される遺伝子改変マウス (DMP1-EGFP マウス, CAG-CAT-EGFP/Dmp1-Cre double-transgenic C57BL/6JJmsSlc) の頭蓋冠から、先行研究の実験手法 (Nakashima et al., 2011) に倣い、骨細胞を単離した。このマウス由来の細胞は、骨細胞マーカーDMP1 の発現時のみ蛍光分子 EGFP を発

現する．そのため，EGFP 蛍光の有無により，骨細胞と他の細胞との識別が可能となる．

骨細胞の単離手順を以下に示す．まず，7-10 日齢マウスの頭蓋冠を摘出し，洗浄後，骨片に細分した．これらの骨片組織中のコラーゲン繊維を分解するため，単離専用バッファーに 0.1% コラゲナーゼ（Wako）と 0.2% Dispase II（合同酒精）を加えてコラゲナーゼ溶液を作製し，その溶液に骨片を加え 37°C で 20 min 振盪した．洗浄後，脱灰するため，5 mM EDTA 溶液中に骨片を加え 37°C で 15 min 浸透した．洗浄後，コラゲナーゼ溶液処理と EDTA 溶液処理を交互に繰り返した．2 回目と 3 回目のコラゲナーゼ溶液処理後，回収溶液を 500 rcf で 3 min 遠心した．上澄み液の除去後に α -MEM 培養液を加え，再遠心した．その後，回収した細胞を 9.9×10^4 - 4.5×10^5 cells/cm² の細胞密度でガラスボトムディッシュに播種した．細胞培養のため，CO₂ 濃度 5%，37°C の環境下で細胞を 2 h インキュベートした．

3.2.3 細胞内 F-アクチンの蛍光染色

骨細胞と他の細胞の細胞形状を比較するため，F-アクチンを蛍光染色により可視化した．ディッシュ内の細胞を 4% paraformaldehyde（Sigma）で 60 min 化学固定し，PBS 洗浄と 0.1% Triton X-100 による脱膜処理との後，細胞をアクチン特異的な蛍光色素 Alexa Fluor 546 Phalloidin（Invitrogen）の溶液中に 60 min 浸した後，再度洗浄した．

3.2.4 骨細胞のアポトーシス検出

アポトーシス細胞の初期応答である細胞収縮（Kim, et al., 2004; Porcelli, et al., 2004; Tian, et al., 2016）を検出するため，細胞の接着面積の経時変化を顕微鏡観察した．接着面積 $A(t)$ [μm^2] の定義は，力学刺激負荷開始（ $t = 0$ s）後の EGFP の蛍光領域とした．

細胞膜の変性もまた，アポトーシス細胞の初期応答として知られている．この細胞膜変性の検出には Annexin V（Tait, et al., 1989）を用いた．本実験では，

2% Alexa Fluor 488 conjugated Annexin V (Invitrogen) と 1.5 mM CaCl₂ を細胞培養液に加えた Annexin V 溶液を用いた。細胞培養ディッシュにこの溶液を添加後、ディッシュを CO₂ 濃度 5%, 37°C の環境下で 30 min インキュベートした。

3.2.5 骨細胞の細胞質内 NO の蛍光染色

骨細胞の細胞質内 NO を可視化するため、蛍光色素 DAR-4 MAM (五稜化薬) を用いた。DAR-4 MAM は、細胞質内において DAR-4 M と AM 基に加水分解される。DAR-4 M は、細胞質内に留まり、NO と結合すると蛍光を発する (Kojima, et al., 2001)。NO 染色溶液を作製するため、細胞培養液に 1.25×10⁻³% DAR-4 M AM と、細胞膜透過の促進物質 0.01% Pluronic F-127 (ATT Bioquest) および 5.00×10⁻³% Cremophor EL (Sigma) を加えた。染色溶液に細胞を浸し、CO₂ 濃度 5%, 37°C 環境下で 30 min インキュベートした。その後、DAR-4 MAM の加水分解を促進させるため、染色液を通常の培養液 (α-MEM) と交換し、さらに 30 min インキュベートした。

3.2.6 骨細胞の NO 産生の阻害

力学刺激下における NO の骨細胞アポトーシスへの影響を調べるため、先行研究 (Tan, et al., 2007) に倣い、細胞内の NOS を L-NAME (同仁化学研究所) により阻害した。阻害実験に先行し、細胞を 1 mM L-NAME の培養液中で培養した。その後、NO 染色溶液の添加時には、ディッシュ内の L-NAME 濃度を保つように L-NAME を新たに追加した。

3.2.7 骨細胞への NO 導入

NO の骨細胞アポトーシスへの影響を直接的に調べるために、先行研究 (Chen et al., 2005) に倣い、NO 供与剤 Sodium nitrosylpentacyanoferrate (III) dehydrate (SNP; ナカライテスク) を細胞に添加した。骨細胞として、8-10 日齢の C57BL/6JJmsSlc マウス (清水実験材料) の頭蓋冠から回収した細胞のう

ち、細長い細胞突起を有し、かつ、Annexin V の蛍光を発しないものを用いた。同一ディッシュ内の 10 個の細胞を選択し、50 mM SNP を加えた後、CO₂ 濃度 5%、37°C 環境下でディッシュを 2 h インキュベートした。最後に、前述のように選択した細胞の Annexin V 蛍光を顕微鏡観察した。

3.2.8 磁気ピンセットと磁気ビーズ

骨細胞に力学刺激を負荷するために、磁気ピンセット (MagTw10-1200 ; RF イノベーション ; 図 3.1 A 左) を使用した。磁気ピンセットは、PC パーロマイ製の丸棒 (Ni : 78 %) に銅線を 1 層あたり 100 回、12 層分巻きつけることにより作製された。ピンセット先端と細胞との距離を正確に測るため、丸棒の先端を研磨した (図 3.1 A 右)。この研磨により、先端形状を、元の円錐から、棒の中心軸から 45° 傾いた平面に加工した。

骨細胞表面への磁気ビーズ (Dynabeads MyOne Tosylactivated, Invitrogen, 直径 : 4.5 μm) の接着のために、ビーズの表面をフィブロネクチンで化学修飾した。フィブロネクチン溶液を作製するため、ホウ酸ナトリウム溶液に 200 μg/mL フィブロネクチン (Millipore) と 0.1% BSA を加えた。ビーズ表面のトシル基とフィブロネクチンとの共有結合のため、作製した溶液中に洗浄したビーズを加え、37°C で 24 h 振盪した。その後、未反応のトシル基を不活性化させるため、0.1% BSA を添加した 0.2 M Tris 溶液中にビーズを加え、37°C で 4 h 振盪した。

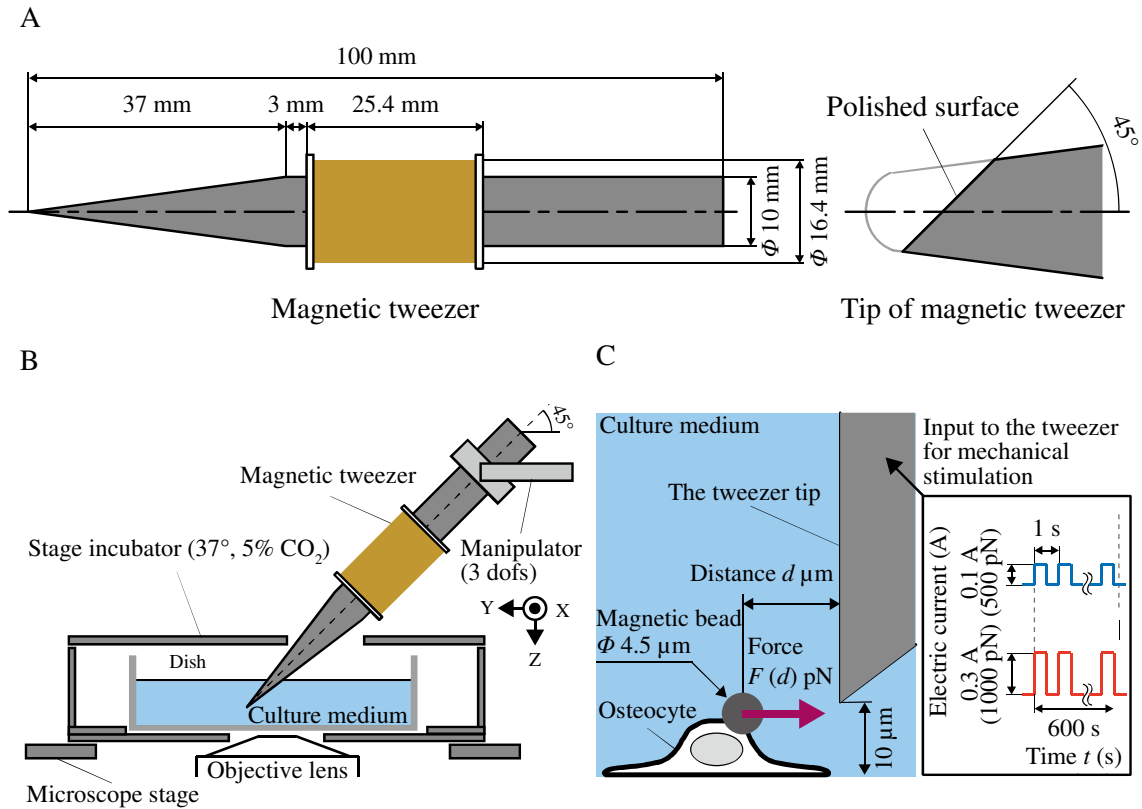


Fig. 3.1 Schematic representation of mechanical stimulation in osteocytes using a magnetic tweezer. (A) Magnetic tweezer (left), whose tip surface (right) was polished at an angle of 45° from the central axis (dashed-dotted lines). (B) Installation of the magnetic tweezer on a microscope stage with a manipulator controlling the position of the tweezer tip in culture dishes in the stage incubator. (C) Mechanical stimulation of osteocytes using the tweezer. Through the input of electric currents (right), the tweezer applied mechanical stimuli of force $F = 500$ or 1000 pN to the cells via magnetic beads at distance d [μm] between the magnetic bead and tweezer tip.

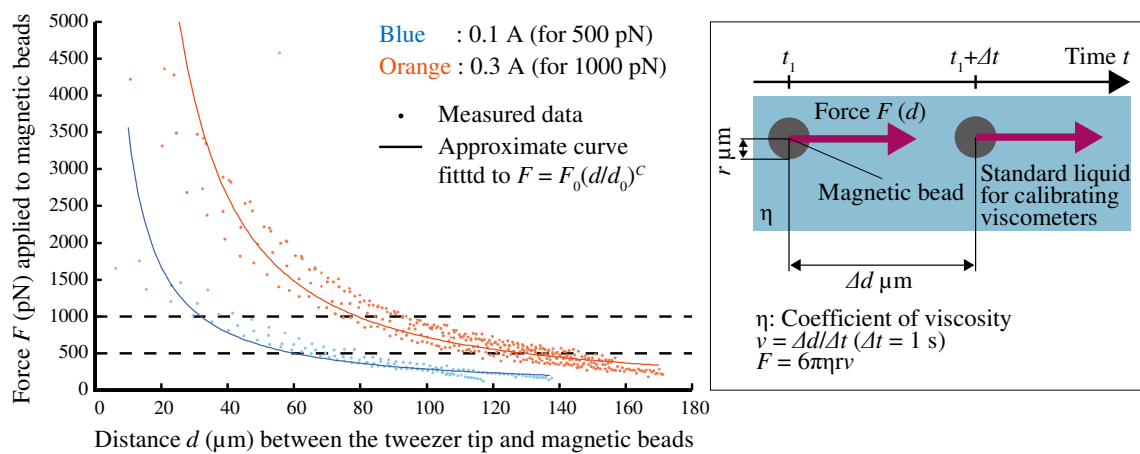


Fig. 3.2 Calibration of F - d relationship. Force F (pN) was calculated using Stokes' equation $F = 6\pi\eta r v$ (right), and the distance d was measured. The relationship was fitted to $F = F_0(d/d_0)^C$ (F_0 , d_0 , $C(I)$: constant). Blue and orange indicate electric current of 0.1 A (for 500 pN force) and 0.3 A (for 1000 pN force), respectively. Data dots and solid lines indicate measured data and approximate curves, respectively.

3.2.9 骨細胞への力学刺激負荷

骨細胞への力学刺激負荷のため、共焦点顕微鏡 (FV-3000, オリンパス) のステージに取り付けたインキュベータ (STG-IX3W and WSKMX-A17F, 東海ヒット) の内側に細胞培養ディッシュを設置した (図 3.1 B). 磁気ピンセットを 3 自由度マイクロマニピュレータ (QP-3LH, マイクロサポート) に取り付け、ピンセットの中心軸の向きがディッシュ底面に対して 45°傾くように、マニピュレータの軸を調節した。これにより、ピンセット先端の研磨面が、細胞側面に対して正対した状態で、ピンセット先端と細胞表面ビーズとの距離を正確に測ることが可能となる。

刺激に先行して、まず、マニピュレータの操作により、単一のビーズが接着した EGFP 陽性細胞の付近へ、ピンセット先端を移動させた。次に、500 pN, または、1000 pN の力として力学刺激を負荷した。このとき、ピンセット先端とディッシュ底面との間隔は、ピンセット先端とディッシュ・細胞との接触を防止するため、細胞の高さ以上の 10 μm とした (図 3.1 C). 定量的な力学刺激負荷のため、第 3.2.10 項で説明するように、磁気力 F [pN] と、ピンセット先端とビーズとの距離 d [μm] との関係性を予めキャリブレーションし、負荷力の大きさに対応する距離 d [μm] を決定した。磁気ピンセットを駆動する印加電流として、振幅 0.1 A, または、0.3 A, 振動数 1 Hz, 期間 600 s の矩形波を与えた ($0 \text{ s} \leq t \text{ (s)} \leq 600 \text{ s}$, 図 3.1 C). 3 種類の刺激条件 (1000 pN の刺激, 500 pN の刺激, L-NAME 添加下で 1000 pN の刺激) を設け、各条件下における力学刺激実験をそれぞれ試行した。

3.2.10 力と距離の関係のキャリブレーション

力と距離 (F - d) の関係のキャリブレーションのために、ステージインキュベータ内部にセットしたディッシュ内へ、粘度較正用の標準溶液 (JIS14000 Lot No.135, 日本グリース) と磁気ビーズを加えた。マイクロマニピュレータを用いてピンセット先端を溶液中に差し込んだ後、電磁気力付与装置 (MagFPrototype, RF イノベーション) により磁気力を発生させた。磁気力発

生のための印加電流は、振動数 0.01 Hz, デューティー比 99 %とした。

刺激負荷中、ビーズの運動を顕微鏡により撮影した。撮影動画からビーズの運動を ImageJ (NIH) により解析し、ビーズに加わる力 F と、ピンセット先端からビーズ中心までの距離 d との関係を評価した。各時刻のビーズ画像の二値化処理後、ビーズの移動速度 v ($\mu\text{m/s}$; $\Delta d/\Delta t$) をビーズ領域の重心変位として計測した。また、ビーズに加わる力 F [pN] を Stokes の式に従い計算した。

$$F(v) = 6\pi\eta r v \quad (3.1)$$

ここで、定数 η [kg/ μms] と r [μm] は、それぞれ、標準溶液の粘度とビーズ半径を表す。一方、ビーズに加わる力 F [pN] は、 $F(d, I) = F_0 \times (d/d_0)^{C(I)}$ と計算される。ここで、 F_0 [pN], d_0 [mm], I [A] (0.1 または 0.3 A) は、それぞれ、力の定数、距離の定数、電流の振幅である。電流 I の値が一定として最小二乗法を用いることにより、 F と d の計測値から F - d 曲線を決定した (図 3.2)。

3.2.11 骨細胞の顕微鏡観察と画像処理

力学刺激実験において、細胞形状の透過光観察に加え、細胞に現れる EGFP, DAR-4 M, Annexin V の蛍光画像を共焦点レーザー走査顕微鏡により取得した。露光時間は 200-500 ms, 撮影間隔は 1 s, 観察時間は 3660 s ($-60 \text{ s} \leq t \leq 3600 \text{ s}$) とした。取得した蛍光画像は、ImageJ により解析された。時刻 t の EGFP 蛍光領域において、DAR-4 M の蛍光輝度を定量化した。この輝度を細胞サイズに依存せず評価するため、接着面積 $A(t)$ で平均し、さらに、異なる細胞同士で比較するために初期値 (at $t = -60 \text{ s}$) で正規化した。細胞ごとに異なるそれぞれの初期蛍光強度を等しくするため、全ての細胞の蛍光画像において、時刻 $t = -60 \text{ s}$ の輝度合計値を 600 とすることにより、時刻 t の輝度合計値を正規化した。

SNP 供与実験により取得した透過光画像に対しては、ImageJ 上で細胞突起と膜ブレブを除く細胞輪郭を手作業で抽出した。細胞輪郭の内側領域を接着面積 A [μm^2] とした。恣意的な輪郭線の決定を防ぐため、SNP 添加の有無・前後の画像を処理する順番はランダムとした。その後、1 細胞あたりの平均接着面積の大きさを計算した。

3.3 実験結果

3.3.1 骨細胞の単離

DMP1-EGFP マウスの頭蓋冠から単離した細胞が骨細胞であることを確かめるため、細胞質内の EGFP 発現の有無と骨細胞特異的な細胞形状との関係を調べた。F-アクチンの蛍光観察により、EGFP 蛍光の検出された細胞（図 3.3 左上）において、細胞体からの細長い細胞突起の伸長が示された（図 3.3 左下）。この観察結果は、骨細胞特有の細胞形状として報告された特徴 (Hasegawa et al., 2018) と一致した。一方、EGFP 蛍光の検出されなかった細胞（図 3.3 右上）においては、細長い細胞突起が観察されなかった（図 3.3 右下）。以上の観察結果から、EGFP により蛍光標識された骨細胞の単離が確かめられた。

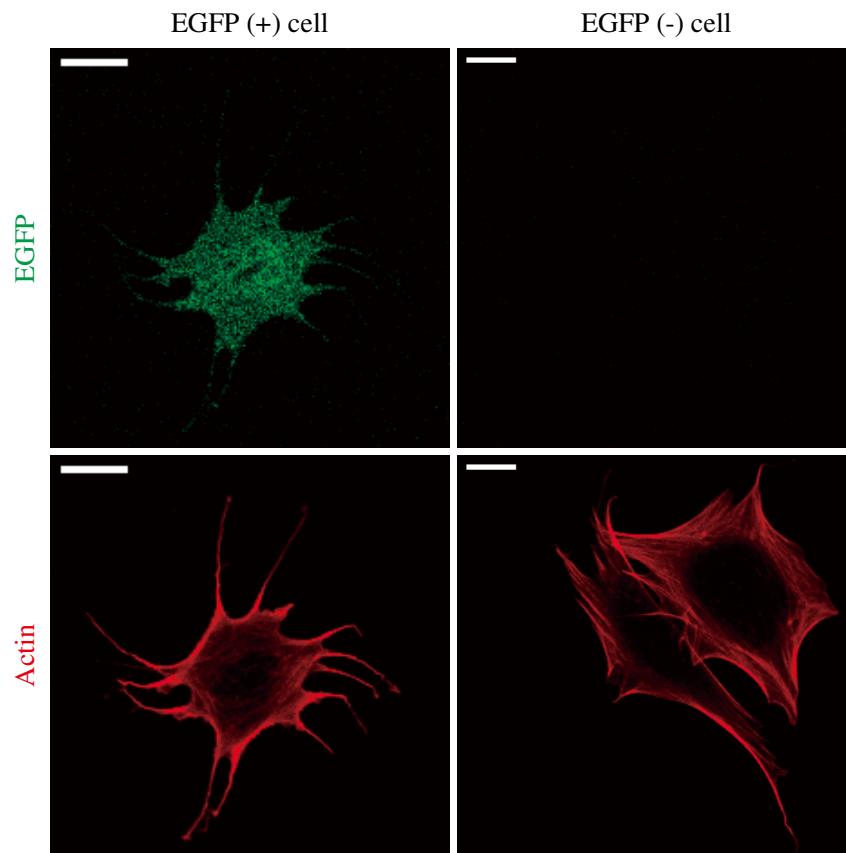


Fig. 3.3 Fluorescence images of bone cells derived from DMP1-EGFP mice calvariae. Left and right images indicate EGFP-positive (EGFP (+)) and -negative (EGFP (-)) cells, respectively. The upper and lower images show the intracellular fluorescence of EGFP and actin filaments, respectively. Scale bars 10 μ m.

3.3.2 大きな力学刺激による骨細胞の収縮

力の大きさが骨細胞アポトーシスの発生に与える影響を調べるため、500 pN, または、1000 pN の力学刺激を 600 s 間、骨細胞に与えた。アポトーシスを検出するために、細胞の接着面積の変化を経時観察（刺激: $0 \leq t \leq 600$ s）すると、500 pN の刺激を与えた細胞においては、接着面積の減少が観察されなかった（図 3.4 A EGFP and DIC）。顕微鏡画像を定量解析すると、力学刺激の負荷前後における細胞面積 A [μm^2] の変化が有意に示されなかった（paired t -test; 図 3.4 B）。一方、1000 pN の刺激を与えた骨細胞においては、接着面積が減少し続け（図 3.4 E EGFP and DIC）、刺激前に比べ有意に減少した（paired t -test, $p < 0.05$, 図 3.4 F）。以上により、大きな力学刺激による骨細胞収縮の誘導が示された。

3.3.3 大きな力による骨細胞の NO 産生

力学刺激下の骨細胞の細胞質における NO の振る舞いを調べるため、細胞内に予め導入した NO 指示薬 DAR-4 M の蛍光を経時観察した。500 pN の刺激を与えた細胞においては、DAR-4 M 蛍光の輝度変化が観察されなかった（図 3.4 A, DAR-4 M）。一方、1000 pN の力学刺激を与えたほとんどの細胞においては、DAR-4 M 蛍光の輝度上昇が刺激中（ $0 \leq t \leq 600$ s）と刺激後（ $600 \leq t \leq 1000$ s）に観察された（図 3.4 E, DAR-4 M）。正規化蛍光輝度（元の蛍光輝度を細胞面積 $A(t)$ と時刻 $t = -60$ s の蛍光輝度により除した値）の解析からは、500 pN の力学刺激条件下において、緩やかな輝度上昇がいくつかの細胞で示された（図 3.4 C）が、刺激負荷前後で有意な輝度上昇は示されなかった（paired t -test, 図 3.4 D）。一方、1000 pN の力学刺激条件下において、正規化蛍光輝度が刺激の負荷中から急激な増加を示し（図 3.4 G）、刺激負荷前後で有意に増加した（paired t -test, 図 3.4 H）。以上のことから、大きな力学刺激による骨細胞の NO 産生が示された。

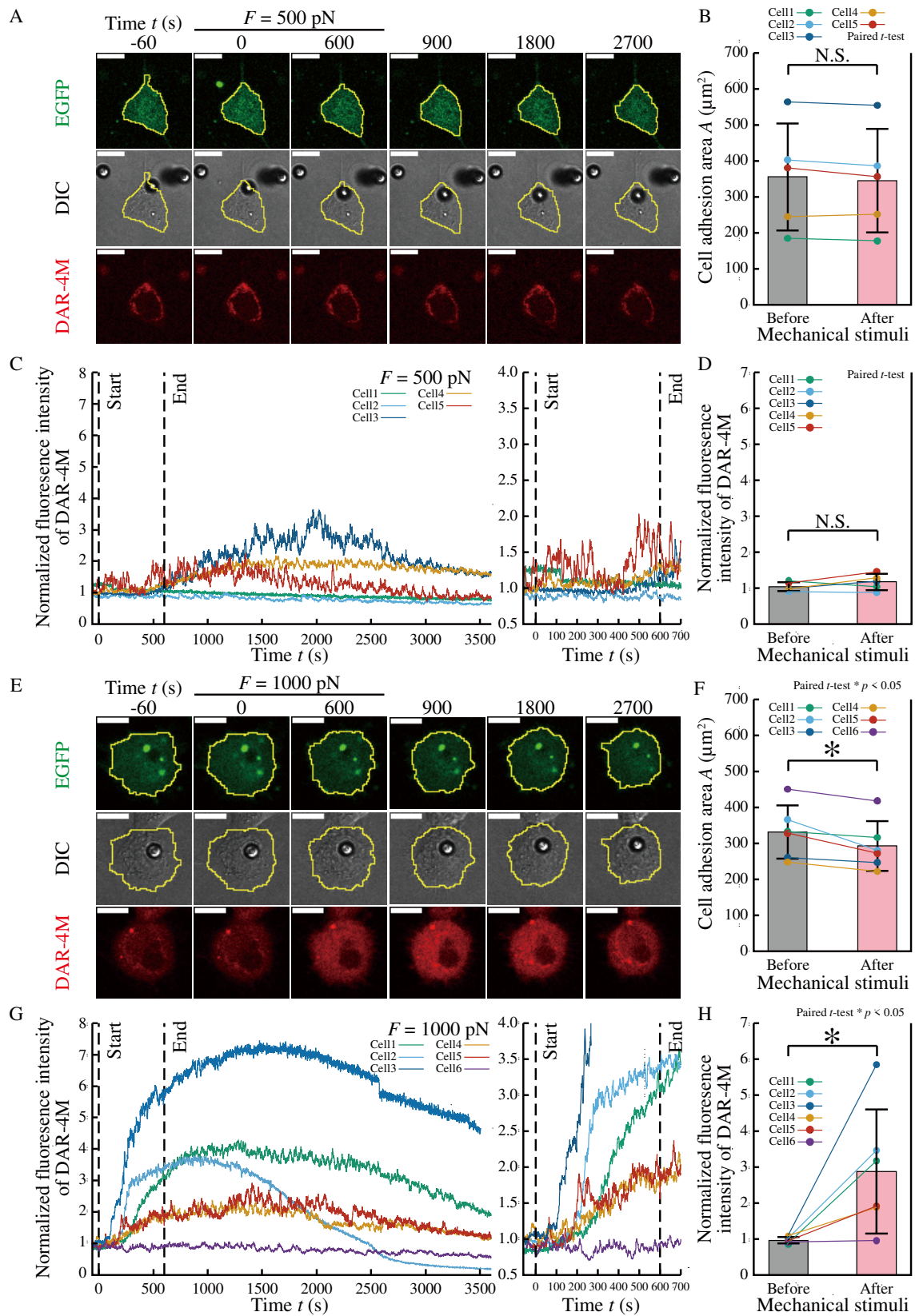


Fig. 3.4 (continued)

Fig. 3.4 Apoptosis and NO production in mechanically stimulated osteocytes. The magnetic tweezer applied mechanical stimuli of $F = 500$ pN (A-D) or 1000 pN (E-H) to osteocytes. (A)(E) Microscopic imaging of cell adhesion area and intracellular NO. Mechanical stimuli ($0 \leq \text{time } t \text{ (s)} \leq 600$ s) were applied to the cells after a no-stimulation period ($-60 \text{ s} \leq t < 0$ s). EGFP (upper) and DIC (middle) images showing time-course changes in the cell area. DAR-4 M fluorescence images (lower) indicating the behavior of intracellular NO. Yellow lines are cell outlines. Scale bars $10 \mu\text{m}$. (B)(F) Effects of force F on cell area A . Paired t -tests determined significant changes in cell adhesion area A (mm^2) evaluated as temporally averaged values before ($-60 \text{ s} \leq t < 0$ s) and after ($600 \text{ s} < t \leq 660$ s) mechanical stimulation ($*p < 0.05$). (C)(G) Time-course changes in DAR-4 M-normalized fluorescence intensity with enlarged views ($0 \leq t \leq 700$ s). Vertical left and right dashed lines indicate the start and end of mechanical stimulation, respectively. (D)(H) Effects of force F on normalized fluorescence intensity. Paired t -tests determined significant change in normalized fluorescence intensity evaluated as temporally averaged values before ($-60 \text{ s} \leq t < 0$ s) and after ($600 \text{ s} < t \leq 660$ s) mechanical stimulation ($*p < 0.05$).

3.3.4 骨細胞の NO 産生を介したアポトーシス

力学刺激下の骨細胞収縮における NO の役割を明らかにするため、L-NAME による NOS 阻害のもとで、1000 pN の力学刺激を骨細胞に与えた。L-NAME 添加細胞においては、DAR-4 M の蛍光観察と輝度解析の結果、力学刺激による NO 産生が示されなかった (図 3.5 A DAR4-M, 図 3.5 C and D)。これらの細胞に対し、接着面積の観察と定量評価を行うと、細胞収縮が示されなかった (図 3.5 A EGFP and DIC, 図 3.5 B)。以上の結果から、大きな力学刺激下において、NO 産生による骨細胞の収縮が示された。

NO による骨細胞収縮の誘導を直接検証するため、NO 供与剤 SNP を骨細胞に添加した。SNP 添加後、細胞を 2 h 培養 (SNP (+)) すると、SNP を添加せずに 2 h 培養した (SNP (-)) 場合に比べ、接着面積が有意に減少した (図 3.5 E DIC and F, Student's *t*-test, $p < 0.001$)。また、SNP (+)条件下においては、SNP (-)条件下に比べ、Annexin V 蛍光の検出された細胞の数が有意に増加した (図 3.5 E Annexin V and G, Student's *t*-test, $p < 0.05$)。これらの結果から、骨細胞の細胞質内 NO によるアポトーシス誘導が示された。

以上の NOS 阻害実験と NO 供給実験から、大きな力学刺激下の骨細胞アポトーシスは NO を介して生じることが示唆された。

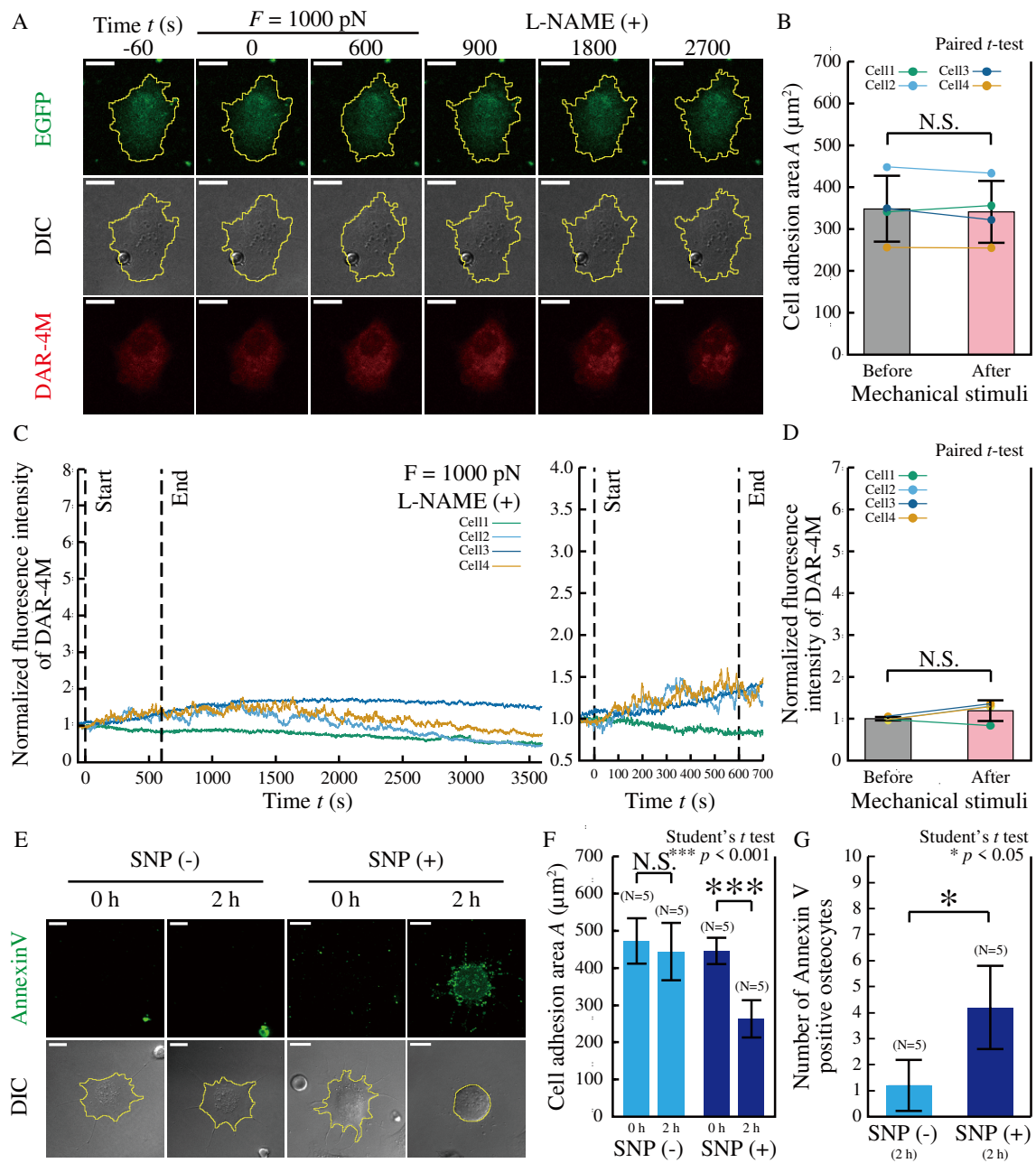


Fig. 3.5 (continued)

Fig. 3.5 Effects of NO on apoptosis in mechanically stimulated osteocytes. (A) Effects of NOS inhibition on mechanically stimulated osteocytes. As a negative control, the magnetic tweezer applied 1000 pN force to L-NAME (NOS inhibitor)-treated osteocytes. EGFP (upper) and DIC (middle) images showing the time-course changes in the adhesion cell area. DAR-4 M fluorescence images (lower) indicating the behavior of intracellular NO. (B) Effects of force F on cell adhesion area. A paired t -test determined significant changes in cell adhesion area A (mm^2) evaluated as temporally averaged values before ($-60 \text{ s} \leq t < 0 \text{ s}$) and after ($600 \text{ s} \leq t < 660 \text{ s}$) mechanical stimulation. (C) Time-course changes in DAR-4 M normalized fluorescence intensity with enlarged views ($0 \leq t \leq 700 \text{ s}$). Vertical left and right dashed lines indicate the start and end of mechanical stimulation, respectively. (D) Effects of force F on normalized fluorescence intensity. A paired t -test determined significant changes in normalized fluorescence intensity evaluated as temporally averaged values before ($-60 \text{ s} \leq t < 0 \text{ s}$) and after ($600 \text{ s} < t \leq 660 \text{ s}$) mechanical stimulation. (E-G) Effects of NO donation on osteocyte apoptosis. As a positive control, Annexin V fluorescence was examined in osteocytes with or without 2 h of exposure to a NO donor (SNP). (E) Microscopic observation showing Annexin V fluorescence and cell shrinkage in SNP-treated cells. (F, G) Student's t -tests determined significant change in (F) cell adhesion area A (mm^2) during 2 h treatment, and (G) the number of Annexin V-positive cells between SNP (-) and (+) cells ($*p < 0.05$, $**p < 0.001$). A single SNP experiment tested ten cells. For reproducibility, independent experiments were repeated five times. Yellow lines indicate cell outlines. Scale bars 10 μm .

3.4 考察

3.4.1 力学的過負荷下の骨細胞アポトーシスによる骨吸収促進

骨細胞の力学的過負荷に対するアポトーシス応答はこれまでにほとんど着目されなかったが、基板変形下における単離骨細胞の細胞増殖関連分子 ERK を介したアポトーシスが報告されている (Hoshi, et al., 2014). しかし、この研究においては、骨細胞アポトーシスへの焦点接着斑の寄与が明らかでなかった。一方、本研究においては、焦点接着斑への大きな力学刺激により、骨細胞アポトーシスが引き起こされることが初めて明らかとなった。

焦点接着斑への大きな力学刺激は、骨基質内部の細胞周囲の力学環境下においても発生すると考えられる。骨小腔・骨細管内部の骨細胞においては、点在する焦点接着斑に骨基質から力学刺激が加わると考えられる。実際、骨基質から骨細胞への焦点接着斑を介した過度な力学刺激が、骨基質のマイクロクラックと呼ばれる微小亀裂の周囲において、骨基質ひずみの増大 (Barak, et al., 2009) と骨細胞の細胞突起の断裂 (Dooley, et al., 2012) から示唆される。亀裂周囲においてはまた、アポトーシスした骨細胞と骨吸収の痕跡が多数観察されている (Verborgt, et al., 2000)。骨細胞アポトーシスと骨吸収との関係を調べた研究によると、骨細胞のアポトーシス小体を破骨細胞前駆細胞の培養ディッシュ内に添加すると、破骨細胞分化が誘導される。また、骨細胞のアポトーシス小体を頭蓋冠の表面に与えると、その表面において破骨細胞が活性化する (Kogianni, et al., 2008)。以上に述べた一連の先行研究から、力学的過負荷のもとでの骨細胞アポトーシスによる骨吸収促進機構の存在が示唆される。

3.4.2 骨細胞の NO を介したアポトーシス機構

焦点接着斑に加わる力学刺激は、NO 合成酵素 NOS (Knowles, et al., 1994) の活性化を誘導すると考えられる。NOS には、nNOS (neural NOS), eNOS (endothelial NOS), iNOS (inducible NOS) の 3 種類の同位体が存在する (Marletta, 1993)。これらのうち nNOS (Bredt, et al., 1990) と eNOS (Forstermann, et al., 1991)

は、細胞質内において Ca^{2+} の存在下で活性化する。細胞質内の Ca^{2+} 濃度は、骨細胞の焦点接着斑に力学刺激を与えると、インテグリン近傍のカルシウムチャンネル (Cabahug-zuckerman, et al., 2018) の開口の結果、上昇する (Adachi, et al., 2009a, 2009b; Thi, et al., 2013) と考えられる。さらに、細胞質内の Ca^{2+} 濃度の上昇は、流体流れ刺激下の骨細胞様細胞において、NO 濃度との上昇とともに観察されている (Bakker, et al., 2009) ことから、力学刺激下の骨細胞は、nNOS と eNOS により NO を産生すると考えられる。しかし、力学的過負荷という特殊な条件下における Ca^{2+} と NOS との関係は、未だ明らかでない。

NO 合成酵素の nNOS, eNOS とは異なり、iNOS は、 Ca^{2+} 非依存的に NO 産生を誘導する (Stuehr, et al., 1991)。iNOS による NO 産生誘導は、サイトカイン等による生化学的刺激下のマクロファージ (Chiou, et al., 2000) および筋細胞 (Balligand, et al., 1994) において観察されたが、力学的過負荷下の骨細胞においては調べられていない。また、iNOS の発現量は通常 (非刺激) 時に少ない (Balligand, et al., 1994; Chiou, et al., 2000) ため、iNOS と急激な NO 産生との関係は不明である。

以上に考察したように、力学的過負荷下の NO 産生を誘導する NOS の種類は明らかではないが、NOS 活性化による NO 濃度の上昇は細胞死と密接に関わる。乳癌細胞においては、アポトーシス誘導因子 HIF-1 α と p53 が、それぞれ特定濃度の NO の存在下で活性化・安定化する (Thomas, et al., 2004)。また、内皮細胞 (Shen, et al., 1998) とマクロファージ (Yoshioka, et al., 2003) においては、NO 濃度に応じて、アポトーシスが促進または抑制される。骨系細胞に関しても、骨芽細胞 (Mancini, et al., 2000) と破骨細胞 (Kanaoka, et al., 2000) においては、高濃度の NO 供与下におけるアポトーシスが報告された。一方、骨細胞においては、NO のアポトーシス抑制的な効果が報告された (Plotkin, et al., 2018) が、この効果は、急激な NO 産生の発生しない、500 pN 以下の小さな力学刺激下において生じると考えられる。以上のことから、力学的過負荷による骨細胞の急激な NO 産生により、NO 濃度依存的なアポトーシス経路が活性化されたと考えられる。

3.4.3 力学刺激実験の展望

本研究では、1000 pN の力学刺激を負荷したほぼすべての骨細胞において、アポトーシスマーカーである Annexin V の蛍光が刺激の負荷後 60 min 以内には観察されなかった。この結果は、アポトーシス応答において、Annexin V により検出される細胞膜の変性が、数時間の時間スケールで生じる (Demchenko, 2013) ことによると考えられる。また、本研究の力学刺激実験において観察されなかった膜ブレブは、悪性黒色腫細胞 (Andrade et al., 2010) および神経細胞 (Tanaka et al., 2015) において示されているように、アポトーシスにおいて細胞収縮後に発生すると考えられる。したがって、今後、より長時間の観察時間を設定することにより、細胞膜の変性やブレブ等を検出し、アポトーシス応答をより厳密に示すことが可能となると考えられる。

3.5 結言

第3章では、骨細胞の焦点接着斑への力学刺激の大きさに対するアポトーシス応答の特性を明らかにすることを目的とした。まず、磁気ピンセットを用い、単離骨細胞の焦点接着斑に対し、大きさの異なる2つの力学刺激を加えた。その結果、大きな力学刺激条件下において、初期的なアポトーシス応答である細胞収縮を骨細胞が示すことを見出した。さらに、この細胞収縮には、細胞質内において産生される NO が介在することを明らかにした。骨細胞の焦点接着斑への大きな力学刺激に対するアポトーシス応答は、骨の損傷個所における吸収を促進するうえで重要であると考えられる。

参考文献

Adachi, T., Aonuma, Y., Ito, S., Tanaka, M., Hojo, M., Takano-Yamamoto, T., Kamioka, H., Osteocyte calcium signaling response to bone matrix deformation, *Journal of Biomechanics*, Vol. 42, No.15, (2009a), pp.2507–2512, DOI: 10.1016/j.jbiomech.2009.07.006.

Adachi, T., Aonuma, Y., Tanaka, M., Hojo, M., Takano-Yamamoto, T., Kamioka, H., Calcium response in single osteocytes to locally applied mechanical stimulus: Differences in cell process and cell body. *Journal of Biomechanics*, Vol.42, No.12, (2009b), pp.1989–1995, DOI: 10.1016/j.jbiomech.2009.04.034.

Adair, B. D., Xiong, J., Maddock, C., Goodman, S. L., Arnaout, M. A., Yeager, M., Three-dimensional EM structure of the ectodomain of integrin $\alpha_v\beta_3$ in a complex with fibronectin, *Journal of Cell Biology*, Vol.168, No.7, (2005), pp.1109–1118, DOI: 10.1083/jcb.200410068.

Albina, J. E., Cui, S. J., Mateo, R. B., Reichner, J. S., Nitric oxide-mediated apoptosis in murine peritoneal macrophages, *Journal of Immunology*, Vol.150, No.11, (1993), pp.5080–5085. DOI: 10.1016/0169-4758(93)90226-6.

Andrade, R., Crisol, L., Prado, R., Boyano, M. D., Arluzea, J., Arechaga, J., Plasma membrane and nuclear envelope integrity during the blebbing stage of apoptosis: a time-lapse study, *Biology of the Cell*, Vol.102, No.1, (2010), pp.25–35, DOI: 10.1042/BC20090077.

Bacabac, R. G., Mizuno, D., Schmidt, C. F., Mackintosh, F. C., Van Loon, J. J. W. A., Klein-Nulend, J., Smit, T. H., Round versus flat: Bone cell morphology, elasticity, and mechanosensing, *Journal of Biomechanics*, Vol.41, No.7, (2008), pp.1590–1598, DOI: 10.1016/j.jbiomech.2008.01.031.

Bakker, A. D., da Silva, V. C., Krishnan, R., Bacabac, R. G., Blaauboer, M. E., Lin, Y. C., Marcantonio, R. A. C., Cirelli, J. A., J, K.-N., Tumor necrosis factor α and interleukin-1 β modulate

calcium and nitric oxide signaling in mechanically stimulated osteocytes, *Arthritis and Rheumatology*, Vol.60, No.11, (2009), pp.3336–3345, DOI: 10.1002/art.24920.

Balligand, J. L., Ungureanu-Longrois, D., Simmons, W. W., Pimental, D., Malinski, T. A., Kapturczak, M., Taha, Z., Lowenstein, C. J., Davidoff, A. J., Kelly, R. A., Smith, T. W., Michel, T., Cytokine-inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in cardiac myocytes. Characterization and regulation of iNOS expression and detection of iNOS activity in single cardiac myocytes *in vitro*, *Journal of Biological Chemistry*, Vol.269, No.44, (1994), pp.27580–27588.

Barak, M. M., Sharir, A., Shahar, R., Optical metrology methods for mechanical testing of whole bones, *Veterinary Journal*, Vol.180, No.1, (2009), pp.7-14, DOI: 10.1016/j.tvjl.2007.11.022.

Blanco, F. J., Ochs, R. L., Schwarz, H., Lotz, M., Chondrocyte apoptosis induced by nitric oxide, *American Journal of Pathology*, Vol.146, No.1, (1995), pp.75–85.

Bredt, D. S., Snyder, S. H., Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulinrequiring enzyme, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol.87, No.2, (1990), pp.682–685, DOI: 10.1073/pnas.87.2.682.

Cabahug-zuckerman, P., Jr, R. F. S., Majeska, R. J., Thi, M. M., Spray, D. C., Weinbaum, S., Schaffler, M. B., Potential role for a specialized β_3 integrin-based structure on osteocyte processes in bone mechanosensation, *Journal of Orthopaedic Research*, Vol.36, No.2, (2018), pp.642–652, DOI: 10.1002/jor.23792.

Cardoso, L., Herman, B. C., Verborgt, O., Laudier, D., Majeska, R. J., Schaffler, M. B., Osteocyte apoptosis controls activation of intracortical resorption in response to bone fatigue, *Journal of Bone and Mineral Research*, Vol.24, No.4, (2009), pp.597–605. DOI: 10.1359/jbmr.081210.

Chen, R. M., Chen, T. L., Chiu, W. T., Chang, C. C., Molecular mechanism of nitric oxide-induced osteoblast apoptosis, *Journal of Orthopaedic Research*, Vol.23, No.2, (2005), pp.462–468, DOI: 10.1016/j.orthres.2004.08.011.

Chiou, W.-F., Chen, C.-F., Lin, J.-J., Mechanisms of suppression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in RAW 264.7 cells by andrographolide, *British Journal of Pharmacology*, Vol.129, No.8, (2000), pp.1553–1560, DOI: 10.1038/sj.bjp.0703191.

Demchenko, A. P., Beyond annexin V: fluorescence response of cellular membranes to apoptosis, *Cytotechnology*, Vol.65, No.2, (2013), pp.157–172, DOI: 10.1007/s10616-012-9481-y.

Dooley, C., Tisbo, P., Lee, T. C., Taylor, D., Rupture of osteocyte processes across microcracks: the effect of crack length and stress, *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology*, Vol.11, (2012), pp.759-766, DOI: 10.1007/s10237-011-0349-4.

Forstermann, U., Pollock, J. S., Schmidt, H. H. H. W., Heller, M., Murad, F., Calmodulin-dependent endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase activity is present in the particulate and cytosolic fractions of bovine aortic endothelial cells, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol.88, No.5, (1991), pp.1788–1792, DOI: 10.1073/pnas.88.5.1788.

Hasegawa, T., Yamamoto, T., Hongo, H., Qiu, Z., Abe, M., Kanesaki, T., Tanaka, K., Endo, T., de Freitas, P. H. L., Li, M. Q., Amizuka, N., Three-dimensional ultrastructure of osteocytes assessed by focused ion beam-scanning electron microscopy (FIB-SEM), *Histochemistry and Cell Biology*, Vol.149, No.4, (2018), pp.423–432, DOI: 10.1007/s00418-018-1645-1.

Hoshi, K., Kawaki, H., Takahashi, I., Takeshita, N., Seiryu, M., Murshid, S. A., Masuda, T., Anada, T., Kato, R., Kitaura, H., Suzuki, O., Takano-Yamamoto, T., Compressive force-produced CCN2 induces osteocyte apoptosis through ERK1/2 pathway, *Journal of Bone and Mineral Research*,

Vol.29, No.5, (2014), pp.1244–1257, DOI: 10.1002/jbmr.2115.

Kanaoka, K., Kobayashi, Y., Hashimoto, F., Nakashima, T., Shibata, M., Kobayashi, K., Kato, Y., Sakai, H., A common downstream signaling activity of osteoclast survival factors that prevent nitric oxide-promoted osteoclast apoptosis, *Endocrinology*, Vol.141, No.8, (2000), pp.2995–3005, DOI: 10.1210/endo.141.8.7603.

Kim, T., Tchah, H., Cho, E. H., Kook, M. S., Evaluation for safety of cultured corneal fibroblasts with cotreatment of alcohol and mitomycin C, *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, Vol.45, Vol.1, (2004), pp.86–92, DOI: 10.1167/iovs.03-0520.

Klein-Nulend, J., Semeins, C. M., Ajubi, N. E., Nijweide, P. J., Burger, E. H., Pulsating fluid flow increases nitric oxide (NO) synthesis by osteocytes but not periosteal fibroblasts - correlation with prostaglandin upregulation, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol.217, No.2, (1995), pp.640–648, DOI: 10.1006/bbrc.1995.2822.

Knowles, R. G., Moncada, S., Nitric oxide synthases in mammals, *Biochemical Journal*, Vol.298, Pt.2, (1994), pp.249–258, DOI: 10.1042/bj2980249.

Kogianni, G., Mann, V., Noble, B. S., Apoptotic bodies convey activity capable of initiating osteoclastogenesis and localized bone destruction. *Journal of Bone and Mineral Research*, Vol. 23, No.6, (2008), pp.915–927, DOI: 10.1359/JBMR.080207.

Kojima, H., Hirotsu, M., Nakatsubo, N., Kikuchi, K., Urano, Y., Higuchi, T., Hirata, Y., Nagano, T., Bioimaging of nitric oxide with fluorescent indicators based on the rhodamine chromophore, *Analytical Chemistry*, Vol.73, No.9, (2001), pp.1967–1973, DOI: 10.1021/ac001136i.

Lee, M. S., Trindade, M. C. D., Ikenoue, T., Goodman, S. B., Schurman, D. J., Smith, R. L., Regulation of nitric oxide and bcl-2 expression by shear stress in human osteoarthritic

chondrocytes in vitro, *Journal of Cellular Biochemistry*, Vol.90, No.1, (2003), pp.80–86, DOI: 10.1002/jcb.10611.

Mancini, L., Moradi-Bidhendi, N., Becherini, L., Martineti, V., MacIntyre, I., The biphasic effects of nitric oxide in primary rat osteoblasts are cGMP dependent, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol.274, No.2, (2000), pp.477–481, DOI: 10.1006/bbrc.2000.3164.

Marletta, M. A., Nitric Oxide Synthase Structure and Mechanism, *Journal of Biological Chemistry*, Vol.268, No.17, (1993), pp.12231–12234.

Nakashima, T., Hayashi, M., Fukunaga, T., Kurata, K., Oh-hora, M., Feng, J. Q., Bonewald, L. F., Kodama, T., Wutz, A., Wagner, E. F., Penninger, J. M., Takayanagi, H., Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression, *Nature Medicine*, Vol.17, No.10, (2011), pp.1231–1234, DOI: 10.1038/nm.2452.

Plotkin, L. I., Mathov, I., Aguirre, J. I., Parfitt, A. M., Manolagas, S. C., Bellido, T., Mechanical stimulation prevents osteocyte apoptosis: requirement of integrins, Src kinases, and ERKs. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. Vol.289, No.3, (2005), pp.C633-C643, DOI:10.1152/ajpcell.00278.2004.

Porcelli, A. M., Ghelli, A., Zanna, C., Valente, P., Ferroni, S., Rugolo, M., Apoptosis induced by staurosporine in ECV304 cells requires cell shrinkage and upregulation of Cl⁻ conductance, *Cell Death and Differentiation*, Vol.11, (2004), pp.655–662, DOI: 10.1038/sj.cdd.4401396.

Qin, L., He, T., Yang, D., Wang, Y., Li, Z., Yan, Q., Zhang, P., Chen, Z., Lin, S., Gao, H., Yao, Q., Xu, Z., Tang, B., Yi, W., Xiao, G., Osteocyte $\beta 1$ integrin loss causes low bone mass and impairs bone mechanotransduction in mice, *Journal of Orthopaedic Translation*, Vol.17, No.34, (2022), DOI: 10.1016/j.jot.2022.03.008.

Shen, Y. H., Wang, X. L., Wilcken, D. E. L., Nitric oxide induces and inhibits apoptosis through different pathways, *FEBS Letters*, Vol.433, No.1-2, (1998), pp.125–131. DOI: 10.1016/S0014-5793(98)00844-8.

Simmons, M. L., Murphy, S., Induction of nitric oxide synthase in glial cells, *Journal of Neurochemistry*, Vol.59, No.3, (1992), pp.897–905, DOI: 10.1111/j.1471-4159.1992.tb08328.x.

Stuehr, D. J., Cho, H. J., Kwon, N. S., Weise, M. F., Nathan, C. F., Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: An FAD- and FMN-containing flavoprotein, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol.88, No.17, (1991), pp.7773–7777, DOI: 10.1073/pnas.88.17.7773.

Tait, J. F., Gibson, D., Fujikawa, K., Phospholipid binding properties of human placental anticoagulant protein-I, a member of the lipocortin family, *Journal of Biological Chemistry*, Vol.264, No.14, (1989), pp.7944–7949.

Tan, S. D., de Vries, T. J., Kuijpers-jagtman, A. M., Semeins, C. M., Everts, V., Klein-Nulend, J., Osteocytes subjected to fluid flow inhibit osteoclast formation and bone resorption, *Bone*, Vol.41, No.5, (2007), pp.745–751, DOI: 10.1016/j.bone.2007.07.019.

Tanaka, A., Tanaka, R., Kasai, N., Tsukada, S., Okajima, T., Sumitomo, K., Time-lapse imaging of morphological changes in a single neuron during the early stages of apoptosis using scanning ion conductance microscopy, *Journal of Structural Biology*, Vol.191, No.1, (2015), pp.32–38, DOI: 10.1016/j.jsb.2015.06.002.

Thi, M. M., Suadicani, S. O., Schaffler, M. B., Weinbaum, S., Spray, D. C., Mechanosensory responses of osteocytes to physiological forces occur along processes and not cell body and require $\alpha\beta3$ integrin, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol.110, No.52, (2013), pp.21012–21017, DOI: 10.1073/pnas.1321210110.

Thomas, D. D., Espey, M. G., Ridnour, L. A., Hofseth, L. J., Mancardi, D., Harris, C. C., Wink, D. A., Hypoxic inducible factor 1a, extracellular signal-regulated kinase, and p53 are regulated by distinct threshold concentrations of nitric oxide, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol.101, No.24, (2004), pp.8894–8899, DOI: 10.1073/pnas.0400453101.

Tian, Q., Wu, S., Dai, Z., Yang, J., Zheng, J., Zheng, Q., Liu, Y., Iron overload induced death of osteoblasts in vitro: involvement of the mitochondrial apoptotic pathway, *PeerJ*, Vol.4, (2016), e2611, DOI: 10.7717/peerj.2611 e2611.

Toyosawa, S., Shintani, S., Fujiwara, T., Ooshima, T., Sato, A., Ijuhin, N., Komori, T., Dentin matrix protein 1 is predominantly expressed in chicken and rat osteocytes but not in osteoblasts, *Journal of Bone and Mineral Research*, Vol.16, No.11, (2001), pp.2017–2026, DOI: 10.1359/jbmr.2001.16.11.2017.

Vashishth, D., Koontz, J., Qiu, S. J., Lundin-Cannon, D., Yeni, Y. N., Schaffler, M. B., Fyhrie, D. P., In vivo diffuse damage in human vertebral trabecular bone, *Bone*, Vol.26, No.2, (2000), pp.147–152, DOI: 10.1016/S8756-3282(99)00253-7.

Vatsa, A., Mizuno, D., Smit, T. H., Schmidt, C. F., Mackintosh, F. C., Klein-Nulend, J., Bio imaging of intracellular NO production in single bone cells after mechanical stimulation, *Journal of Bone and Mineral Research*, Vol.21, No.11, (2006), pp.1722–1728, DOI: 10.1359/JBMR.060720.

Verborgt, O., Gibson, G. J., Schaffler, M. B., Loss of osteocyte integrity in association with microdamage and bone remodeling after fatigue in vivo, *Journal of Bone and Mineral Research*, Vol.15, No.1, (2000), pp.60–67, DOI: 10.1359/jbmr.2000.15.1.60.

Yeni, Y. N., Fyhrie, D. P., Fatigue damage-fracture mechanics interaction in cortical bone, *Bone*, Vol.30, No.3, (2002), pp.509–514, DOI: 10.1016/S8756-3282(01)00696-2.

Yoshioka, Y., Yamamuro, A., Maeda, S., Nitric oxide at a low concentration protects murine macrophage RAW264 cells against nitric oxide-induced death via cGMP signaling pathway, *British Journal of Pharmacology*, Vol.139, No.1, (2003), pp.28–3, DOI: 10.1038/sj.bjp.0705206.

You, L., Weinbaum, S., Cowin, S. C., Schaffler, M. B., Ultrastructure of the osteocyte process and its pericellular matrix, *Anatomical Record. Part A, Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology*, Vol.278, No.2, (2004), pp.505–513. DOI: 10.1002/ar.a.20050.

Zhao, D., Hua, R., Riquelme, M. A., Cheng, H., Guda, T., Xu, H., Gu, S., Jiang, J. X., Osteocytes regulate bone anabolic response to mechanical loading in male mice via activation of integrin $\alpha 5$, *Bone Research*, Vol.10, (2022), 49, DOI: 10.1038/s41413-022-00222-z.

第 4 章 結論

4.1 本研究で得られた成果

我々の骨は、絶えず力学環境にさらされる。この力学環境の変化のもとで、骨が代謝活動を調節し、その構造を適応させる機構の理解は、バイオメカニクス分野における長年の主要な課題の 1 つである。骨周囲の力学環境と骨の代謝活動を結びつける骨芽細胞と骨細胞は、骨表面と骨基質内部においてそれぞれ力学刺激にさらされる。このとき、骨芽細胞と骨細胞は、加えられた力学刺激を感知し、さらに刺激に対して機能的に応答する。

骨構造の適応機構の理解を目指し、骨芽細胞と骨細胞の力学刺激感知・応答の機構を解明するため、これまで数多くの *in vitro* 力学刺激実験が行われてきた。これらの実験においては、様々な力学刺激負荷ツールと測定・観察ツールを駆使することにより、分子、分子複合体、細胞小器官等の力学刺激下における動的な振る舞いが明らかにされてきた。

これらの細胞構成要素のうち、焦点接着斑は、骨に特有の力学環境下において、骨基質の変形等により生じる力学刺激の細胞への入力に介在する。そこで、本研究では、骨芽細胞と骨細胞の焦点接着斑を標的とした *in vitro* 力学刺激実験を行うことにより、焦点接着斑を介した力学刺激感知・応答特性を新たに見出した。

第 2 章では、骨芽細胞の焦点接着斑の形成過程における力学刺激感知特性を明らかにするため、感知特性と密接に関わる焦点接着斑の見かけの剛性の増加を確かめ、さらに、この剛性増加が生じる時間スケールを明らかにした。剛性測定のため、フィブロネクチンを化学修飾した AFM プロブを用い、骨芽細胞様細胞の表面において、焦点接着斑の形成誘導、および、焦点接着斑の引張試験の手法を確立した。さらに、引張試験により取得された力-伸び曲線における剛性評価を行った。得られた曲線の解析により、骨芽細胞の焦点接着斑の形成過程における引張力に対する剛性が、プロブとインテグリンとの接触時間に応じ秒スケールで増加することを示した。

第 3 章では、骨細胞の焦点接着斑への力学刺激の大きさに対するアポトーシス応答の特性を探るため、力学刺激の大きさとアポトーシス応答との関係を明らかにした。磁気ピンセットを用い、フィブロネクチンを化学修飾した磁気ビーズを介し、単離骨細胞の焦点接着斑に力学刺激を与える実験系を構築した。ここで、2 種類の大きさの力学刺激を与えることにより、大きな刺激下において、初期的なアポトーシス応答である細胞収縮が、NO を介し生じることを示した。

これらの明らかにされた感知・応答特性は、力学環境下の骨の形成・吸収制御の機構解明につながる重要な知見であると考えられる。

4.2 本研究の意義

本論文の第 2 章では、力学刺激下の焦点接着斑の形成過程における剛性増加を明らかにした。先行研究においては、焦点接着斑を構成する接着分子の振る舞いが明らかにされてきた。その一方で、これらの接着分子の振る舞いにより焦点接着斑の剛性が増加するとき、その剛性増加に要する時間スケールは明らかでなかった。そのため、本研究で得られた知見は、接着分子の振る舞いと焦点接着斑の力学刺激感知要素としての振る舞いを関連づけ、さらに、焦点接着斑の動的な力学挙動を理解する研究の礎となる。また、焦点接着斑の剛性増加の結果、細胞骨格と分子チャンネル等を介して骨形成促進シグナルがより活発になると考えられるため、本研究で得られた知見は、力学環境下における骨形成制御機構に対する理解の糸口を与える。

また、本論文の第 3 章では、焦点接着斑への大きな力学刺激に対する骨細胞のアポトーシス応答を明らかにした。これまで、複雑な微細構造を有する骨小腔・骨細管の内部において、骨細胞の焦点接着斑周囲の力学環境は明らかでなかった。そのため、焦点接着斑に定量的な力学刺激を負荷する本研究は、焦点接着斑周囲の力学環境を推定するうえで重要な知見を提供する。また、力学的過負荷は骨基質において発生すると想定されるため、本研究は、骨に特有の力学環境に起因する焦点接着斑の振る舞いを理解するための一助となる。さらに、骨細胞のアポトーシスによる骨吸収促進が示唆されていることから、本研究は、力学環境下における骨吸収制御機構の一端を解明するものである。

4.3 展望

力学刺激下の骨芽細胞と骨細胞において、焦点接着斑の振る舞いに対するさらなる理解のために、焦点接着斑の内部構造の詳細な解明に加え、力学刺激実験における *in vivo* 力学環境の精確な模擬が必要となる。この模擬のために、焦点接着斑の周囲において、骨基質の表面形状と力学特性、および、焦点接着斑と結合する分子の構造と力学特性を調べるのが重要となる。特に、骨細胞の焦点接着斑の周囲において、骨小腔・骨細管内壁の形状、インテグリンと ECM・プロテオグリカンとの結合構造、および、狭い細胞突起内部における焦点接着斑とアクチンフィラメントの接続構造等を明らかにすることが望まれる。焦点接着斑周囲のこれらの形状・構造を明らかにすることにより、ナノ・マイクロスケールの力学の知見に基づいた、焦点接着斑に加わる力学刺激の推定、また、焦点接着斑周囲の力学刺激の模擬に適した実験ツールの開発が期待される。

本研究で扱った焦点接着斑をはじめとして、細胞内の分子複合体においては、異なる種類の構成分子が協調的に相互作用することにより、高度な機能が発現する。この機能は、構成分子間の動的な結合関係により、環境に応じて柔軟に調節され、また、構成分子の種類の違いにより、多様性に富むことから、生命システムを理解するうえで、より一層重要性を増していくと考えられる。しかし、これらの特徴に由来する複雑さから、分子複合体の機能は多くの不明な点を有する。今後、これらの不明な点を明らかにすれば、分子、分子複合体、細胞小器官の順序で機能が複雑化する階層構造の存在する細胞内において、分子の単純な機能に対する理解と、細胞小器官の複雑な機能に対する理解を橋渡しすることが可能となるであろう。さらに機械工学分野においては、細胞内の分子複合体の機能のうち、特に力学的な機能を詳細に調べることで、細胞の行う優れた力学刺激感知・増幅、エネルギー変換の仕組みが同分野へ応用されると期待される。これらの応用の延長線上において、例えば、これまで合成生物学等の分野において進められてきた、人工細胞を作製する研究が、機械工学的なアプローチで推進されると考えられる。一個の微小機械である細胞において、分子複合体スケールのユニークな構成部品に着目することは、新たな生体工学分野の開拓へとつながるであろう。

関連学術論文・学術講演

○ 原著学術論文

- (1) Nakao, N., Adachi, T., Investigation of mechanosensing and mechanoresponse mechanisms in osteoblasts and osteocytes: *in vitro* experiments targeting subcellular components, Journal of Biomechanical Science and Engineering, Vol.17, No.4, (2022), 22-00267, DOI: 10.1299/jbse.22-00267. (第1章, Figures were adapted from this article.)
- (2) Nakao, N., Maki, K., Mofrad, M. R. K., Adachi, T., Talin is required to increase stiffness of focal molecular complex in its early formation process, Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol.518, No.3, (2019), pp.579-583, DOI: 10.1016/j.bbrc.2019.08.091. (第2章, Figures were adapted from this article.)
- (3) Nakao, N., Mori, I., Sunaga, J., Adachi, T., Large magnitude of force leads to NO-mediated cell shrinkage in single osteocytes implying an initial apoptotic response, Journal of Biomechanics, Vol.117, (2021), 110245, DOI: 10.1016/j.jbiomech.2021.110245. (第3章, Figures were adapted from this article.)
- (4) Maki, K., Nakao, N., Adachi, T., Nano-mechanical characterization of tension-sensitive helix bundles in talin rod, Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol.484, No.2, (2017), pp.372-377, DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.01.127. (第2章の議論で引用)

○ 学術講演(国際学会)

(口頭発表)

- (1) Nakao, N., Maki, K., Adachi, T., Time dependent change in nano-mechanical properties of nascent focal complex, 8th World Congress of Biomechanics, Dublin, Ireland, Jul. 2018.
(ポスター発表)
- (2) Nakao, N., Maki, K., Adachi, T., Analysis of mechanical behaviors of maturing focal complex by nano-tensile testing, 5th Switzerland-Japan Workshop on Biomechanics, Zermatt, Switzerland, Sep. 2017.
- (3) Nakao, N., Maki, K., Adachi, T., Nano-mechanical measurement of integrin-based focal complex using AFM, CDB Symposium 2017, Hyogo, Japan, Mar. 2017.

- (4) Nakao, N., Maki, K., Adachi, T., Actin remodeling in nascent focal adhesion explored by integrin nanofishing, IGER International Symposium on "Now in actin study: Motor protein research reaching a new stage", Aichi, Japan, Dec. 2016.

○ 学術講演(国内学会)

(口頭発表)

- (1) 仲尾信彦, 安達泰治, “接着分子複合体の形成におけるタリンの力学的役割”, 日本機械学会第 32 回バイオエンジニアリング講演会, 石川, 2019 年 12 月.
- (2) 森泉, 仲尾信彦, 須長純子, 安達泰治, “力学刺激を受けたマウス単離骨細胞における一酸化窒素産生に依存したアポトーシス”, 石川, 2019 年 12 月.
- (5) 仲尾信彦, 牧功一郎, 安達泰治, “Outside-in シグナルを介して成熟する接着分子複合体のナノ力学挙動解析”, 日本機械学会 2017 年度年次大会, 埼玉, 2017 年 9 月.
- (6) 仲尾信彦, 牧功一郎, 安達泰治, “ECM に刺激されたインテグリン-アクチン構造体の成熟過程におけるナノ力学特性評価”, 日本機械学会 第 27 回バイオフロンティア講演会, 北海道, 2016 年 10 月.

(ポスター発表)

- (3) 仲尾信彦, 安達泰治, “タリンが接着分子複合体の形成初期におけるナノ剛性に与える影響”, 文部科学省研究費補助金 新学術領域研究「脳構築における発生時計と場の連携」第 4 回領域班会議, 石川, 2019 年 7 月.
- (4) 仲尾信彦, 牧功一郎, 安達泰治, “形成初期における細胞接着分子構造体のナノ引張特性”, 日本機械学会第 30 回バイオエンジニアリング講演会, 京都, 2017 年 12 月.
- (7) 仲尾信彦, 牧功一郎, 安達泰治, “AFM を用いたインテグリン-アクチン構造体の初期形成過程における剛性評価”, 第 56 回生物物理若手の会 夏の学校, 北海道, 2016 年 9 月.

○ 解説記事

- (1) 仲尾信彦, 安達泰治, “力学的過負荷に対する骨細胞の応答”, 体育の科学, Vol.71, No.9, (2021), pp.655-660.

謝辞

本論文を著すにあたり、研究計画を立てることからその遂行に至るまで常に懇切なるご指導とご鞭撻を賜り、また、様々な研究活動を通じ研究者としてあるべき姿をご教示くださいました京都大学医生物学研究所の安達泰治教授に衷心より多大なる感謝を申し上げます。また、京都大学大学院工学研究科マイクロエンジニアリング専攻の井上康博教授、および、横川隆司教授には、本論文の質を向上させるうえで重要なお指摘を幾つも賜りました。謹んで感謝申し上げます。

京都大学医生物学研究所の Okeyo Kennedy Omondi 講師には、実験結果の解釈、および、本論文の構成に関して、有益なお助言を賜りました。厚く御礼申し上げます。同研究所の亀尾佳貴助教には、本論文の構成に加え、文章作成に関して貴重なご意見を賜りました。多大なる感謝を申し上げます。また、同研究所の牧功一郎助教には、分子実験に関する技術に加え、折に触れて研究者としての心構えをご教示していただきました。深く感謝いたします。

接着分子の振る舞いの観点から細胞の力学刺激感知機構を考察するにあたり、University of California Berkeley の Mohammad R. K. Mofrad 教授には大変貴重な御意見を賜りました。さらに、同教授は、私が同大学に留学した際には、研究面から生活面まで快く相談に乗ってくださいました。改めて感謝いたします。

慶應義塾大学医学部の仲嶋一範教授、ならびに、林周宏講師には、タリンノックダウン用のプラスミドを快くご提供していただいたことに加え、ノックダウン手法を丁寧にご教示していただきました。深謝いたします。

上記の先生方の他に、バイオメカニクス研究室のスタッフ・学生の方々にも大きくお世話になりました。研究員の金英寛氏には、医学的な見地から建設的なご意見を数多く頂戴しました。また、研究員の Jeonghyun Kim 氏には、細胞実験に関する技術的なご助言を頂きました。研究員の須長純子氏には、生物実験に必要な機器・試薬の使用法をご教示いただきました。さらに、事務補佐員の平良美智代氏、ならびに、森山友紀恵氏には、複雑な事務手続きが円滑に進むよう温かいご支援を頂きました。博士後期課程の同輩である安藤悠太氏と竹田宏典氏には、支えあう同志として、また、率直な議論の相手として、格別にお世話になりました。私とともに磁気ピンセットを用いた実験に取り組んでくださった京都大学大学院工学研究科修士課程学生の森泉君

には，実験者の目線から度々有益なご指摘を頂戴しました．以上の方々に対し，この場をお借りして御礼申し上げます．

末筆になりますが，博士後期課程在学中を通して，物心両面にわたり，父なる人，ならびに，母なる人のお世話になりました．お二人の恩愛に感謝いたします．

令和5年1月 仲尾信彦