

京都大学	博士（工学）	氏名	仲尾 信彦
論文題目	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		
<p>（論文内容の要旨）</p> <p>本論文は、骨構造の力学環境に対する適応機構の理解を目指し、骨芽細胞と骨細胞の焦点接着斑を標的とした <i>in vitro</i> 力学刺激実験により、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、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た結果をまとめたものであり、全 4 章からなる。</p> <p>第 1 章は緒論であり、まず、骨構造の力学環境に対する適応機構の理解には、骨吸収・骨形成に重要な、骨芽細胞と骨細胞の力学刺激感知・応答機構の解明が不可欠であることを述べている。次に、これらの感知・応答機構の解明を目指してこれまで行われてきた <i>in vitro</i> 力学刺激実験について概説し、そこで用いられる実験ツールの詳細および機構解明への寄与について述べている。また、分子・分子複合体・細胞小器官の振る舞いを詳述し、これらの振る舞いを繋ぐ機構について議論している。さらに、力学刺激感知を担う分子複合体である焦点接着斑に着目し、これを介した骨における力学刺激感知・応答の重要性を論じ、その後、本論文の目的を述べている。</p> <p>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ている。ここでは、焦点接着斑の形成過程に着目し、焦点接着斑の見かけの剛性が、細胞の力学刺激感知特性と密接に関わることから、その剛性の増加を調べている。</p> <p>まず、骨芽細胞様細胞（MC3T3-E1）において、焦点接着斑の構成要素である細胞表面分子のインテグリンに対して、フィブロネクチンを化学修飾した原子間力顕微鏡（AFM）プローブ（FN プローブ）を接触させ、フィブロネクチンとインテグリンとの結合を促した。その後、焦点接着斑を形成させるため、この接触状態を維持する時間（接触時間）を設けた。このとき、焦点接着斑の形成過程における剛性の経時変化を調べるため、接触時間を 0 秒から 30 秒までの範囲で変化させた。各接触時間の後、細胞表面から AFM プローブを引き上げることで、形成された焦点接着斑に対する引張試験を行った。</p> <p>AFM 引張試験により取得したカー伸び曲線において、まず、焦点接着斑の形成の有無を調べるため、最大力を解析した。次に、FN プローブを用いて接触時間 0 秒の条件下で計測された力の最大値から、焦点接着斑形成時の最大力の閾値を設定した。引張試験においては、この閾値以上の力を示すカー伸び曲線をポジティブ曲線と定義した。ポジティブ曲線の取得率を各接触時間条件下において調べると、この取得率は、FN プローブを用いた場合、接触時間に応じて有意に増加し、一方、BSA 修飾プローブを用いた場合、および、タリンをロックダウンした場合、FN プローブを用いた場合に比べ減少した。これらの結果から、FN プローブによる焦点接着斑の形成誘導が示された。さらに、接触時間に対する焦点接着斑の剛性変化を明らかにするため、各接触時間条件下において、カー伸び曲線の初期曲線を線形近似して得られた傾きを剛性として評価した。その結果、FN プローブを用いた場合、剛性が接触時間に応じ増加した。一方、タリンをロックダウンした場合、FN プローブを用いた場合に比べ、剛性が減少した。これらの結果から、焦点接着斑の剛性が、接触時間に応じて増加することが示された。</p>			

京都大学	博士 (工学)	氏名	仲尾 信彦
<p>この増加により、細胞外基質から細胞骨格への力学刺激伝達特性が向上し、このことにより、骨形成シグナルが促進されると考えられる。また、剛性増加は 10 秒程度で生じることが明らかとなったことから、焦点接着斑の振る舞いの時間スケールが示唆された。この結果は、秒スケール以下で生じる分子の振る舞いと、分スケール以上で生じる細胞の振る舞いを繋いで理解するための基礎的な知見であると考えられる。</p> <p>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ている。ここでは、力学刺激の大きさと、アポトーシスの初期応答として知られる細胞収縮との関係を調べた。また、一酸化窒素 (NO) がアポトーシス誘導因子として知られることから、力学刺激下の細胞収縮における NO の関与を調べた。</p> <p>まず、骨細胞分化の初期マーカーである DMP1 の発現誘導により蛍光分子である EGFP の発現が駆動される DMP1-EGFP マウスから、頭蓋冠を摘出した。次に、この頭蓋冠から回収した細胞を培養ディッシュ上に播種し、EGFP の蛍光が陽性の細胞を骨細胞として実験に用いた。この骨細胞に対して、大きさの異なる 2 種類の力学刺激条件を設定し、フィブロネクチンを化学修飾した磁気ビーズを介し、磁気ピンセットにより焦点接着斑に定量的な力学刺激を与えた。その後、EGFP により可視化された骨細胞の接着面積の変化を経時観察した結果、大きな力学刺激条件下において、細胞収縮が観察された。ここで、これらの収縮の観察された細胞の細胞質において、NO の産生が確認されたことから、NO を介した細胞収縮が示唆された。そこで、L-NAME により NO 合成酵素の活動を阻害したうえで、焦点接着斑に大きな力学刺激を与えると、細胞収縮が観察されなかった。このことから、大きな力学刺激による骨細胞の収縮に NO が関与することが示唆された。さらに、NO のアポトーシスへの関与を直接的に示すため、NO 供与剤を骨細胞の細胞質内に導入すると、細胞の接着面積が減少し、また、アポトーシスマーカーとして知られる Annexin V の蛍光が陽性の細胞の数が増加した。これらの結果から、NO による骨細胞のアポトーシスの誘導が示された。以上の力学刺激実験および NO 供与実験から、骨細胞の焦点接着斑への大きな力学刺激による NO 産生を介したアポトーシス応答が示された。この応答は、損傷骨の微小亀裂周囲において、細胞に焦点接着斑を介して力学的過負荷が加わることにより引き起こされると考えられる。また、このアポトーシス応答は、破骨細胞の活動を誘導することが知られていることから、骨吸収を促進させることにより、骨修復に寄与すると考えられる。</p> <p>第 4 章は結論であり、まず、本論文で得られた結果をまとめ、本研究の目的が達成されたことを述べている。次に、骨および細胞・分子のバイオメカニクス分野における本研究の意義を考察している。ここでは、力学環境下における骨吸収・形成機構、および、焦点接着斑を介した力学刺激感知機構を理解する上での本論文の意義を述べている。また、本研究の展望として、焦点接着斑の振る舞いに対するさらなる理解のため、実際の骨芽細胞・骨細胞の <i>in vivo</i> における力学環境をより精確に模擬した力学刺激実験を行う上で、今後明らかにすべきことについて考察を加えている。さらに、細胞内の分子複合体を対象とした今後の研究が、生命システムの様々な機構の理解につながるだけでなく、工学的応用へと広がる可能性について述べている。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、骨の力学環境に対する適応機構の解明を目指し、原子間力顕微鏡 (AFM) と磁気ピンセットを用いて、骨芽細胞と骨細胞に対する *in vitro* 力学刺激実験を行うことにより、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、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特性を明らかにすることを目指して行った研究の成果をまとめたものである。得られた主な成果は次のとおりである。

1. 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が、細胞の力学刺激感知特性と密接に関わると考えられることから、その剛性の増加を調べている。ここでは、骨芽細胞様細胞 (MC3T3-E1) の表面において、フィブロネクチンを化学修飾した AFM プロブと焦点接着斑の構成分子であるインテグリンの接触により、焦点接着斑の形成を誘導し、さらに、その引張試験を行っている。取得したカーブ曲線の解析結果から、焦点接着斑の剛性が、AFM プロブとインテグリンとの接触時間に応じて、秒スケールの時間で増加することを明らかにしている。この剛性増加により、細胞外基質から細胞骨格への力学刺激伝達特性が向上し、これにより、骨形成シグナルが促進されると考えられる。また、明らかとなった剛性増加の時間スケールは、分子と細胞の両階層における振る舞いの関連を理解する上で、重要な知見であると考えられる。
2. 損傷骨において、骨細胞に焦点接着斑を介して加わる力学的過負荷により、骨細胞のアポトーシスが誘導されると考えられることから、骨細胞の焦点接着斑への力学刺激の大きさとアポトーシス応答との関係を調べている。ここでは、マウスから単離した骨細胞において、大きさの異なる 2 種類の力学刺激条件を設定し、フィブロネクチンを化学修飾した磁気ビーズを介して、磁気ピンセットにより焦点接着斑に定量的な力学刺激を与えている。力学刺激後に生じる細胞の接着面積の変化を経時観察し、大きな刺激条件下において、アポトーシスの初期応答である細胞収縮が生じることを確かめている。さらに、この細胞収縮が、細胞質内の一酸化窒素 (NO) 産生の阻害下で抑制され、また逆に、NO の導入により誘導されることを確かめている。以上のことは、骨細胞の焦点接着斑への大きな力学刺激による NO を介したアポトーシス応答を示唆しており、この応答は、損傷骨の吸収による骨修復の促進に寄与すると考えられる。

以上の成果は、骨芽細胞と骨細胞の焦点接着斑を介した力学刺激感知・応答特性に関する新たな知見を示したものであり、骨の適応機構解明の糸口となることから、骨のバイオメカニクス研究の重要な基礎をなすものである。また、明らかにされた力学刺激感知・応答特性は、生体医工学デバイスや生体機械の創製において重要な知見として活用されることが見込まれるため、本論文は、学術上、實際上寄与するところが少なくない。よって、本論文は、博士 (工学) の学位論文として価値あるものと認める。また、令和 5 年 1 月 23 日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行い、申請者が博士後期課程学位取得基準を満たしていることを確認し、合格と認めた。