

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：34408

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15558

研究課題名(和文)光操作-膜電位制御による生体内骨細胞機能制御-加速する力学的刺激伝達-

研究課題名(英文)The regulation of osteocyte function and mechanosignaling via light stimulus

研究代表者

納富 拓也 (NOTOMI, Takuya)

大阪歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：70542249

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：老化にともなう骨疾患や骨粗鬆症は100万人を超えると推定される。この疾患克服のために、神経伝達物質受容体とイオンチャネルの骨代謝機構における役割を明らかにして、細胞膜電位変動と骨代謝の関係を検討してきた。本研究では、力学的刺激と細胞膜電位変動との関係を検討するために、光誘導膜電位操作分子を導入した骨細胞株を頭頂骨に移植した後、頭頂骨に生体力学負荷をおこなった。骨形成速度を計測したところ、力学的負荷単独のマウスと比べて、光照射により細胞膜電位変動+力学的負荷をおこなったマウスにて、骨形成速度が増加していた。この結果により、膜電位変動による力学的刺激反応の加速が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Age-related bone diseases such as osteoporosis are serious problem in an aged society. To prevent these bone diseases, we have done the study of relationships between the changes in membrane potential and bone remodeling. To investigate the relationships between mechanosignaling and the changes in membrane potential, the light-gated ion channels and pump were transfected into osteocyte and their cells were transplanted to calvariae bone. After involoading on bone, invivo loading with light stimulus increased bone formation compared to control. In summary, our results indicate that the changes in membrane potential affects the response of bone mechanosignaling.

研究分野：骨生物学

キーワード：骨代謝 骨細胞 光遺伝学

1. 研究開始当初の背景

老化にともなう骨疾患や骨粗鬆症は 1000 万人を超えると推定される。この運動器疾患を治療・予防して、生活の質の維持・向上が重要になってきている。この疾患に関与する、骨を作る骨芽細胞と骨を減らす破骨細胞の機能制御、それらの関与する骨リモデリング機構の解明は、骨生物学において重要な研究対象となっている。しかしながら、局所的に発症する運動器疾患においては、その局所部位における細胞機能・骨リモデリング機構の制御が重要であるが、それ自体をコントロールすることは難しい。私は、このコントロールのために、神経伝達物質受容体とイオンチャンネルの骨代謝機構における役割を明らかにして、細胞膜電位変動と骨代謝の関係を検討してきた。

2. 研究の目的

本研究では現在までの研究結果に基づき、骨細胞と力学的刺激伝達機構の関係に焦点をあてて、生体内で光操作により骨細胞機能制御をおこなうことを主題とする。さらに、イオンチャンネル・力学的刺激との相乗作用を検討して、生体内における力学的刺激伝達機構の加速を目指す。

3. 研究の方法

骨細胞株(MLOY4)に膜電位操作分子を組み入れて、その機能検討をおこなった。骨細胞機能の確認は、細胞内イオンイメージング、パッチクランプ法を用いて検討した。骨細胞への力学的刺激は、伸展負荷を用いた。細胞膜電位操作および対象分子同定のために、FLIPR 法により、分子スクリーニングをおこない、同定した分子機能と光照射による膜電位操作との関係をあわせて検討した。また、骨細胞に標的分子を導入したマウスもしくは遺伝子欠損マウスに力学的負荷をおこない、その影響を検討した。骨の質は、高精細マイクロ CT および骨形態計測法・強度試験にて、その構造・強度を測定して評価した。

4. 研究成果

膜電位操作分子(ChRWR, Arch)を導入した骨細胞において、細胞膜上分子局在と細胞膜電位変動の関係を検討した。標的分子として Piezo1 をとりあげ、その C 末端に蛍光分子 Cherry を融合した融合タンパク(Piezo1-cherry)を作製した。別の標的分子として、破骨細胞形成因子 RANKL のデコイ分子 Osteoprotegerin (OPG) にも着目して、同様に C 末端に Cherry 分子を付加した融合タンパク(OPG-cherry)を作製した。これらを骨細胞株に遺伝子導入して、光照射により細胞膜電位変動を生じさせた。Piezo1 については、光照射による膜電位操作をおこなうことで、骨細胞の樹状突起先端に、蛍光斑点が移動することを観察した。特に、光照射による脱分極刺激に対して、反応が顕著であった。

OPG については、用いた光照射条件では、明確な局在移動が観察されなかったが、長期(1-5 分)の光照射による局在様式の変化は認められた。しかしながら、長時間蛍光励起による発熱を含んだアーチファクトの可能性もあるため、再検討中である。また、細胞外イオン濃度の特定の変化にて局在様式変化が認められた。

次に、ex vivo 系において、培養骨組織中の骨細胞に膜電位操作分子を遺伝子導入した後、細胞内イオン動態の変動を蛍光イメージング観察した。遺伝子導入には、レンチウイルスを使用した実験系および Invivo transfection の実験系を適用した。光照射により、骨細胞の細胞内カルシウムイオン濃度は組織中においても細胞膜電位変動により大きく変動することが明らかとなった。これと同時に細胞内マグネシウムイオン濃度も蛍光観察をおこなったが、顕著な変動は認められなかった。また、伸展負荷をおこない、細胞膜電位変動を蛍光イメージングにより観察した。その結果、力学負荷により、骨細胞の細胞膜電位は、特定条件下にて周期的に変動することが明らかとなった。

生体内骨細胞機能制御を検討するために、培養骨細胞に膜電位操作分子を導入した細胞を作製して、マウスの頭頂骨上にマトリゲルとともに操作分子を導入した骨細胞を移植した。光照射を 1-2 週間断続的におこない、切片を作製して、骨量を形態計測法により定量した。その結果、欠損部の骨構築が観察された。さらに、頭頂骨の限定領域に Invivo transfection により、膜電位操作分子を導入して、光照射を断続的におこなった。この光誘導細胞膜電位変動により骨量の増減は認められなかったが、骨細胞形状および骨細胞間ネットワークを形作る樹状突起接続の変化が認められた。特に、骨細胞間での樹状突起数が大きく増加していた。これらに加えて、脛骨骨幹部を用いて、ex vivo 系にて、同様の実験をおこない、骨幹部の切片作成後に顕微鏡観察・定量的解析をおこなったところ、骨細胞の形状変化とネットワークの拡大(細胞間結合部の増加)が認められた。以上の結果から、細胞膜電位変動と骨細胞ネットワークの機能的関係性が示唆された。

生体内における力学的刺激と細胞膜電位変動との関係を検討するために、光誘導膜電位操作分子を導入した骨細胞株を頭頂骨に移植して、頭頂骨に生体力学負荷をおこなった。切片作成後に骨形態計測法により、骨形成速度を計測したところ、力学的負荷単独のマウスと比べて、光照射により細胞膜電位変動+力学的負荷をおこなったマウスにて、骨形成速度が増加していた。この結果により、膜電位変動による力学的刺激反応の加速が示唆された。

5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 5 件)

1. Tetsuya Nakamoto, Yayoi Izu, Makiri Kawasaki, Takuya Notomi, Tadayoshi Hayata, Masaki Noda, Yoichi Ezura, Mice deficient in CIZ/NMP4 develop an attenuated form of K/BxN-serum induced arthritis. *J Cell Biochem*, 117: 4: 970-7, 2016, 査読有
2. Takuya Notomi (Corresponding author), Miyuki Kuno, Akiko Hiyama, Yoichi Ezura, Masashi Honma, Toru Ishizuka, Kiyoshi Ohura, Hiromu Yawo, Masaki Noda, Membrane depolarization regulates intracellular RANKL transport in non-excitabile osteoblasts. *Bone*, 81: 1: 306-14, 2015, 査読有
3. Takuya Notomi (Corresponding author), Miyuki Kuno, Akiko Hiyama, Kiyoshi Ohura, Masaki Noda, Timothy M. Skerry, Zinc-induced effects on osteoclastogenesis involves activation of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide modulated channels via changes in membrane potential. *J Bone Miner Res*, 30: 9: 1618-26, 2015, 査読有
4. Takayuki Yamada, Yoichi Ezura, Tadayoshi Hayata, Shuichi Moriya, Jumpei Shirakawa, Takuya Notomi, Smriti Aryal, Makiri Kawasaki, Yayoi Izu, Kiyoshi Harada, *Masaki Noda, $\beta 2$ Adrenergic receptor activation suppresses BMP-induced alkaline phosphatase expression in osteoblast-like MC3T3E1 cells. *J Cell Biochem*, 116: 6: 1144-52, 2015, 査読有
5. Shuichi Moriya, Tadayoshi Hayata, Takuya Notomi, Smriti Aryal, Tetsuya Nakamoto, Yayoi Izu, Makiri Kawasaki, Takayuki Yamada, Jumpei Shirakawa, Kazuo Kaneko, Yoichi Ezura, *Masaki Noda, PTH regulates $\beta 2$ -adrenergic receptor expression in osteoblast-like MC3T3-E1 cells. *J Cell Biochem*, 116: 1: 142-8, 2015, 査読有

[学会発表](計 6 件)

1. Takuya Notomi, Miyuki Kuno, Akiko

Hiyama, Yoichi Ezura, Kiyoshi Ohura, Masaki Noda, Changes in membrane potential regulates RANKL intracellular transport via voltage-gated calcium channels in osteoblasts, ASBMR 2016 Atlanta, Georgia, USA, 16th September, 2016

2. Takuya Notomi, Miyuki Kuno, Akiko Hiyama, Kiyoshi Ohura, Masaki Noda, Timothy M. Skerry, Zinc-induced effects on osteoclastogenesis involves activation of HCN channels via changes in membrane potential, ASBMR 2015 Seattle, Washington, USA, 11th October, 2015
3. Takuya Notomi, Miyuki Kuno, Yoichi Ezura, Kiyoshi Ohura, Masaki Noda, Membrane depolarization regulates intracellular RANKL transport in non-excitabile osteoblasts, 13th Congress of the International Society of Bone Morphometry, Tokyo, Japan, 28th April, 2015
4. Makiri Kawasaki, Tadayoshi Hayata, Tetsuya Nakamoto, Takuya Notomi, Shuichi Moriya, Takayuki Yamada, Yayoi Izu, Yoichi Ezura, Masaki Noda, TGF-beta impairs cilia morphology via suppression of Ift88 expression in chondrocytic ATDC5 cells, 13th Congress of the International Society of Bone Morphometry, Tokyo, Japan, 28th April, 2015
5. Takayuki Yamada, Yoichi Ezura, Tadayoshi Hayata, Shuichi Moriya, Jumpei Shirakawa, Takuya Notomi, Smriti Aryal, Makiri Kawasaki, Yayoi Izu, Kiyoshi Harada, Masaki Noda, BMP-induced alkaline phosphatase expression in osteoblast-like MC3T3E1 cells is suppressed by $\beta 2$ adrenergic receptor activation, 13th Congress of the International Society of Bone Morphometry, Tokyo, Japan, 28th April, 2015
6. Jumpei Shirakawa, Yoichi Ezura, Shuichi Moriya, Makiri Kawasaki, Takayuki Yamada, Takuya Notomi, Tadayoshi Hayata, Atsushi Miyawaki, Ken Omura, Masaki Noda, Morphological and dynamic analysis of migration linked to Fucci-indicated cell cycle under the influence of PTH and mechanical flow signals, 13th Congress of the International Society

of Bone Morphometry, Tokyo, Japan,
28th April, 2015

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

納富 拓也 (NOTOMI, Takuya)

大阪歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：7 0 5 4 2 2 4 9