

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 22 日現在

機関番号：82404

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02921

研究課題名(和文) 感覚神経-骨細胞ネットワークから解き明かす骨のメカニカルストレス応答機構

研究課題名(英文) Evaluation of adaptation and response to mechanical stress in bone through sensory nervous system and osteocyte network.

研究代表者

越智 広樹 (Ochi, Hiroki)

国立障害者リハビリテーションセンター(研究所)・研究所 運動機能系障害研究部・研究員

研究者番号：30582283

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、骨のメカニカルストレス応答機構を感覚神経-骨細胞ネットワークに着目し解明することを目的とし研究を行った。本研究の結果から、骨組織内の感覚神経の減少は、有意な骨量減少を引き起こした。加えて、感覚神経障害マウスでは尾懸垂後の再荷重における骨量増加が抑制されることを見出した。尾懸垂によって発現が変動する遺伝子を骨細胞特異的に欠損させたマウスでは、顕著な骨量増加が認められた一方で、尾懸垂による骨量減少は認められなかった。以上のことから、感覚神経、骨細胞が骨のメカニカルストレス応答に重要な役割を担っていることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

感覚神経-骨細胞ネットワークに着目し、骨のメカニカルストレス応答機構を解明しようとする試みは極めて独創的である。さらに、本研究の結果からメカニカルストレスに応答する新たな骨代謝調節機構を明らかにすることで、骨形成をターゲットとし、骨リモデリングのバランスを積極的に調節する新規骨形成促進薬開発の分子基盤構築に有用な情報を提供することができると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to elucidate the mechanical stress response mechanism of bone by focusing on the sensory nervous system and osteocyte network. In this study, the loss of sensory nerves in bone tissue caused a significant decrease in bone mass. Furthermore, sensory nerve ablation in bone tissue induced the suppression of bone mass increase during reloading after hindlimb unloading. We identify the mechanical stress response gene, and we generated the osteocyte-specific deficient mice. The osteocyte-specific deficient mice showed a high bone mass, but no bone loss due to tail suspension was observed. These results suggest that sensory nerves and osteocytes may play important roles in the mechanical stress response of bone.

研究分野：骨代謝

キーワード：骨細胞 感覚神経

1. 研究開始当初の背景

超高齢化社会を迎えた我が国において、骨粗鬆症患者は増加の一途を辿っている。また、続発する骨折は、寝たきりの原因となり、死亡率を高めることが大きな問題となっている。長期の臥床生活は骨への荷重減少を招き、さらなる骨形成の低下が生じることが考えられていることから、骨がメカニカルストレスに応答する機構の解明ならびに骨形成を促進する効果的な治療方法の開発は喫緊の課題である。

骨細胞は、骨組織内に存在する細胞の約 90% を占め、最も存在比率が高い細胞腫である。骨細胞を除去したマウスでは、後肢免荷に伴う骨量の減少が生じないことから、骨細胞はメカニカルストレスを感知するセンサーとして機能する可能性が示唆されている (Tatsumi S et al., *Cell Metab* 2007)。

一方申請者らは、骨組織内への感覚神経の正常な侵入が骨量維持に重要であることを世界に先駆けて報告した (*Nature* 2013)。加えて、骨細胞特異的遺伝子欠損マウスでは、後肢免荷で骨量の低下が認められないことを見出した。このことは、骨の感覚神経がメカニカルストレス受容に重要な役割を担っている可能性があると考えられると同時に、生体内において、感覚神経と骨細胞がネットワークを形成し、互いに協調して骨代謝を調節している可能性を示唆している。1892 年、Wolff J が、骨恒常性におけるメカニカルストレスの重要性を示してから、約 130 年が経過した現在においても、骨がメカニカルストレスをどのように受容し、骨代謝を調節しているか、その全容は明らかになっておらず、そのメカニズムの解明が囑望される。

2. 研究の目的

本研究では、骨細胞と感覚神経のネットワークに着目し、骨のメカニカルストレス受容機構を明らかにするとともに、メカニカルストレスに応答する骨代謝調節機構を解明することを目的し研究を行った。

3. 研究の方法

1) 骨組織透明化技術の開発と神経ネットワークの 3 次元的解析

骨組織透明化技術を独自に開発した。加えて、神経、血管ならびに細胞を蛍光タンパク質でラベルしたトランスジェニックマウスを用いて、神経、細胞のネットワークを解析した。

2) 骨代謝異常モデルマウスにおける骨組織内神経の解析

1) で開発した独自の骨組織透明化技術を用いて、骨代謝異常モデルマウスの骨組織内神経の変化を組織学的に解析した。

3) 神経障害モデルの確立と骨表現型解析

骨代謝における (感覚) 神経の役割を明らかにするために、独自に抹消神経障害モデルを確立した。本マウスを用いて、骨代謝に及ぼす影響ならびにメカニカルストレスの変化による骨代謝変化における神経の役割を解析した。

4) メカニカルストレス応答遺伝子の機能解析

メカニカルストレスに応答して変動する遺伝子に関して、骨細胞特異的欠損マウスを作成し、骨の表現型を、放射線学的、組織学的ならびに分子生物学的に解析した。

4. 研究成果

1. 骨組織透明化技術の開発と神経ネットワークの 3 次元的解析

骨組織内の神経-血管ネットワークを性格に理解するためには、従来の組織切片を作成し、解析する方法では、組織中の 3 次元的ネットワークを理解するのは困難である。そこで近年、軟部組織を中心に、組織透明化技術を用いた 3 次元的解析手法が広く用いられるようになってきたが、骨組織においては一般的に用いられるには至っていない。骨組織における透明化技術を困難としている要因として、1) 組織自体が硬く、透明化試薬が浸透しにくいこと、2) 硬組織、軟組織が混在しており、部位による液体浸透性や屈折率が異なること等が挙げられる。そこで本検討ではまず、骨組織の透明化技術の開発と検討を行った。我々が開発改良した

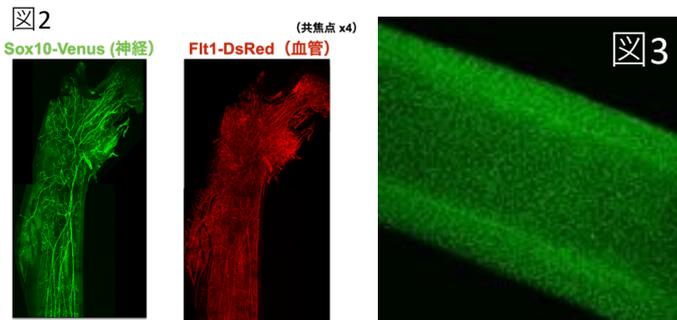
図1 透明化前



透明化後



方法によって、骨組織の効果的な透明化が可能であった(図1)。加えて、神経、血管を蛍光タンパク質で標識したトランスジェニックマウスを用いて、骨組織内の解析を行ったところ、骨組織内の神経、血管が明瞭に観察可能であった(図2)。さらに、骨細胞をGFPで標識したマウスを用いて、骨組織中の骨細胞を観察したところ、同様に明瞭な解析が可能であった(図3)。

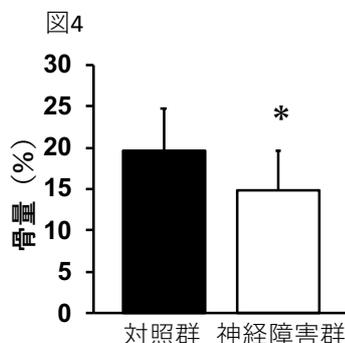


2. 骨代謝異常における骨組織内神経の変化

骨代謝異常状態における骨組織内神経の変化を、骨透明化技術を用いて検討した。まず、メカニカルストレスの変化における変化を検討するために、尾懸垂モデルを2週間実施した後、骨組織内の神経を解析した。その結果、後肢免荷により、骨量の顕著な減少に加え、骨組織内の神経の減少が確認された。さらに、加齢における骨量減少においても骨組織内神経の顕著な減少が認められた。以上のことから、骨代謝疾患における骨量減少の原因として感覚神経系の減少が関与している可能性が示唆された。

3. 神経障害モデルの確立と骨代謝に及ぼす影響の解析

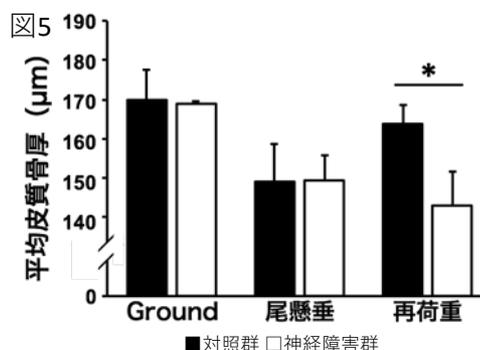
我々が開発した透明化技術による骨組織の解析から、マウス後肢骨組織に侵入する神経の解剖学的位置を同定した。次いで、骨組織に侵入する神経を外科的に切除する方法を検討し、神経障害モデルを確立した。神経障害モデル



の骨表現型を解析したところ、有意な海綿骨骨量の減少を認めた(図4)。

次に、神経がメカニカルストレスの応答に対して関与しているかを検討するために、神経障害モデルに対し、後肢免荷とその後再荷重を実施した。その結果、神経障害モデルでは、対照群で認められる再荷重後の骨量回復が顕著に抑制された(図5)。

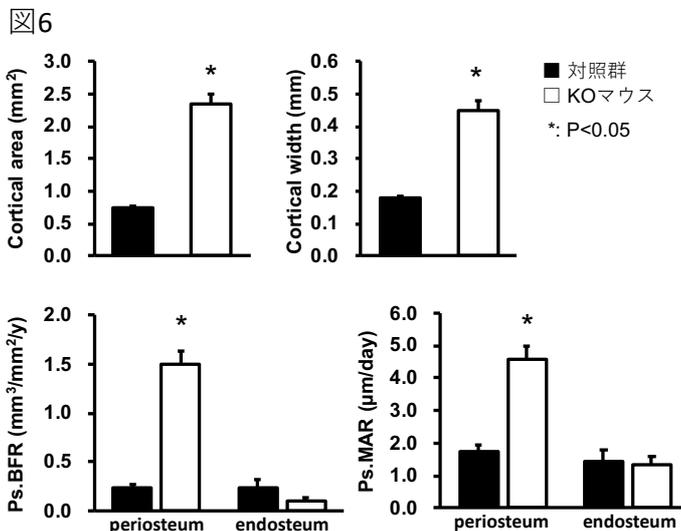
以上のことから、骨におけるメカニカルストレスの受容には感覚神経が重要な役割を担っている可能性が示唆された。



4. 骨細胞におけるメカニカルストレス応答遺伝子の同定と機能解析

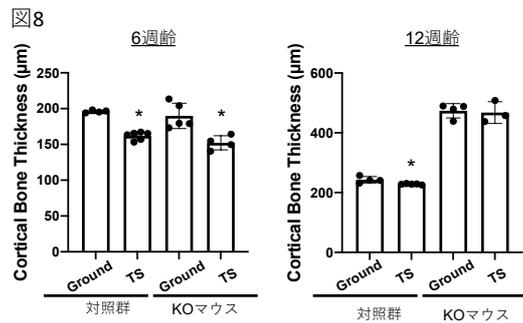
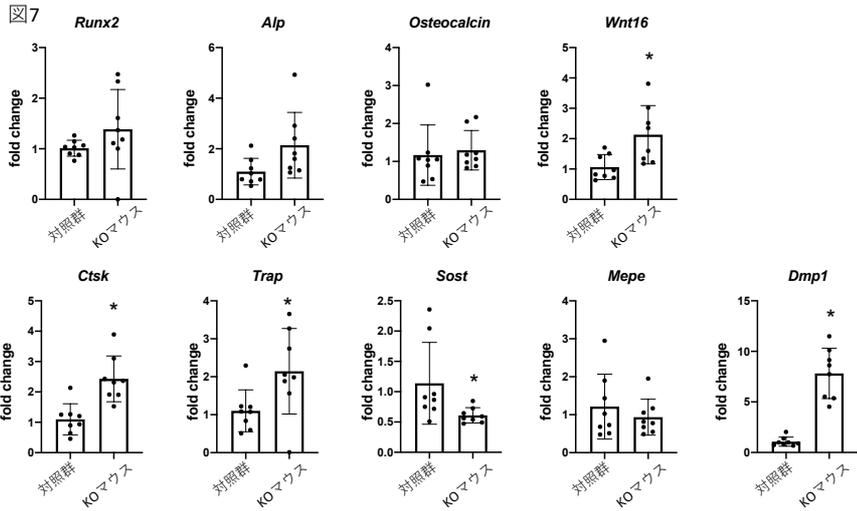
本研究では、後肢免荷で発現が変動する遺伝子に着目し、骨細胞特異的遺伝子欠損マウスを作成した。本マウスの骨表現型を解析したところ、マウスの加齢に伴い著大な皮質骨量の増加を示した。骨形態計測により詳細な解析を実施したところ、本マウスでは骨形成の著大な増加が認められた(図6)。

本マウスの骨組織からRNAを抽出し骨形成、骨吸収に関するマーカー遺伝子の発現を解析したところ、Sostの発現が有意に低下することを見出した(図7)。



興味深いことに、本遺伝子欠損マウスに対して、尾懸垂を実施すると、骨表現型が認められる前の週齢では野生型マウスと同様に骨量の減少が認められた一方で、骨量増加の表現型が発現する以降の週齢では、野生型マウスで認められた骨量減少は認められなかった(図8)。このことから、本遺伝子欠損マウスで認められた表現型は、メカニカルストレスの増加に応じて発現している可能性が示唆された。

次いで、メカニカルストレス応答遺伝子のターゲット遺伝子を同定するために、本遺伝子欠損マウスの骨細胞を単離し、網羅的遺伝子発現解析を実施した。同定した遺伝子群の発現を野生型、遺伝子欠損マウスの骨組織で解析し、ターゲットとなる遺伝子を数種類見出した。さらに、見出した遺伝子群の一部を、骨細胞培養系にトランスフェクションし、増殖、分化ならびに遺伝子発現に及ぼす影響を検討した。



以上の内容を現在まとめ、論文投稿の準備中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hashimoto Kyoko, Ochi Hiroki, Sunamura Satoko, Kosaka Nobuyoshi, Mabuchi Yo, Fukuda Toru, Yao Kenta, Kanda Hiroaki, Ae Keisuke, Okawa Atsushi, Akazawa Chihiro, Ochiya Takahiro, Futakuchi Mitsuru, Takeda Shu, Sato Shingo	4. 巻 115
2. 論文標題 Cancer-secreted hsa-miR-940 induces an osteoblastic phenotype in the bone metastatic microenvironment via targeting ARHGAP1 and FAM134A	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 2204 ~ 2209
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1717363115	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Jin Guangwen, Aobulikasimu Alkebaier, Piao Jinying, Aibibula Zulipiya, Koga Daisuke, Sato Shingo, Ochi Hiroki, Tsuji Kunikazu, Nakabayashi Tetsuo, Miyata Toshio, Okawa Atsushi, Asou Yoshinori	4. 巻 8
2. 論文標題 A small molecule PAI 1 inhibitor prevents bone loss by stimulating bone formation in a murine estrogen deficiency induced osteoporosis model	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 FEBS Open Bio	6. 最初と最後の頁 523 ~ 532
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/2211-5463.12390	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Takahashi Akira, Mulati Mieradili, Saito Masanori, Numata Hoashi, Kobayashi Yutaka, Ochi Hiroki, Sato Shingo, Kaldis Philipp, Okawa Atsushi, Inose Hiroyuki	4. 巻 293
2. 論文標題 Loss of cyclin-dependent kinase 1 impairs bone formation, but does not affect the bone-anabolic effects of parathyroid hormone	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 19387 ~ 19399
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA118.004834	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hashimoto Kyoko, Sato Shingo, Ochi Hiroki, Takeda Shu, Futakuchi Mitsuru	4. 巻 9
2. 論文標題 Calvarial Bone Implantation and in vivo Imaging of Tumor Cells in Mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BIO-PROTOCOL	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21769/BioProtoc.3151	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Supakul Sopak, Yao Kenta, Ochi Hiroki, Shimada Tomohito, Hashimoto Kyoko, Sunamura Satoko, Mabuchi Yo, Tanaka Miwa, Akazawa Chihiro, Nakamura Takuro, Okawa Atsushi, Takeda Shu, Sato Shingo	4. 巻 20
2. 論文標題 Pericytes as a Source of Osteogenic Cells in Bone Fracture Healing	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1079 ~ 1079
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20051079	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ozaki Kakeru, Yamada Takanori, Horie Tetsuhiro, Ishizaki Atsushi, Hiraiwa Manami, Iezaki Takashi, Park Gyujin, Fukasawa Kazuya, Kamada Hikari, Tokumura Kazuya, Motono Mei, Kaneda Katsuyuki, Ogawa Kazuma, Ochi Hiroki, Sato Shingo, Kobayashi Yasuhiro, Shi Yun-Bo, Taylor Peter M., Hinoi Eiichi	4. 巻 12
2. 論文標題 The L-type amino acid transporter LAT1 inhibits osteoclastogenesis and maintains bone homeostasis through the mTORC1 pathway	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Science Signaling	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/scisignal.aaw3921	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mulati Mieradili, Kobayashi Yutaka, Takahashi Akira, Numata Hoashi, Saito Masanori, Hiraoka Yuichi, Ochi Hiroki, Sato Shingo, Ezura Yoichi, Yuasa Masato, Hirai Takashi, Yoshii Toshitaka, Okawa Atsushi, Inose Hiroyuki	4. 巻 130
2. 論文標題 The long noncoding RNA Crnde regulates osteoblast proliferation through the Wnt/ -catenin signaling pathway in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bone	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bone.2019.115076	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kobayashi Yutaka, Tanaka Tomoyuki, Mulati Mieradilli, Ochi Hiroki, Sato Shingo, Kaldis Philipp, Yoshii Toshitaka, Okawa Atsushi, Inose Hiroyuki	4. 巻 8
2. 論文標題 Cyclin-Dependent Kinase 1 Is Essential for Muscle Regeneration and Overload Muscle Fiber Hypertrophy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2020.564581	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	佐藤 信吾 (Sato Shingo) (40462220)	東京医科歯科大学・医学部附属病院・講師 (12602)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------