

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23995

研究課題名（和文）FRETイメージングによるCNPの骨伸長作用とERK活性制御機構の時空間的解析

研究課題名（英文）Spatio-temporal analyses of bone growth effect and ERK regulation of C-type natriuretic peptide using FRET imaging

研究代表者

廣田 圭昭（Hirota, Keisho）

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：20852263

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、生体内のERK活性をFRETの原理に基づき定量化できるERK-FRETバイオセンサー発現マウスを用いて成長板軟骨の生組織イメージングの系を確立し、C型ナトリウム利尿ペプチドによる軟骨細胞でのERK活性の変化の検出に成功した。その結果、肥大化軟骨細胞層近傍の軟骨膜下のERK活性がCNPにより抑制されることが明らかとなった。今後は、これらのERK活性の動態と組織伸長との関連の定量的な解析を予定している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CNPの骨伸長促進作用に関して、その分子機序の多くは未だ不明のままである。これまでの検討からERK活性の制御が重要であると推測されているが、免疫染色などの組織学的検討では明らかにされていなかった。今回、ERK-FRETバイオセンサー発現マウスを用いて、これまで検出することのできなかったCNPによるERK活性の抑制を生きた成長板軟骨の中で検出することができた。今後は、さらにERK活性制御と成長板軟骨伸長との関連を明らかにすることにより、ERK活性の局所制御に基づく新たな低身長症の治療法の開発への基盤形成につながることを期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we established a live-imaging system of growth plate cartilage using transgenic mice which express FRET biosensor for ERK, then successfully detected change of ERK activity induced by CNP addition. As a result, it revealed that ERK activity below the perichondrium of hypertrophic zone was suppressed by CNP addition. Hereafter, we are planning a quantitative analysis of the relationship between CNP-induced ERK dynamics and growth plate elongation.

研究分野：代謝および内分泌学関連

キーワード：生体イメージング C型ナトリウム利尿ペプチド 骨代謝

1. 研究開始当初の背景

長管骨の伸長は内軟骨性骨化により達成される (Kozhemyakina E. et al., *Development*, 2015)。CNP は強力な骨伸長促進因子であり、その受容体である Guanylyl cyclase-B (GC-B) の活性化を介した cGMP 産生により生理作用を発揮する (Yasoda A. et al., *J Biol Chem*, 1998)。一方、線維芽細胞増殖因子 3 型受容体 (FGFR3) 活性化変異は低身長症である軟骨無形成症の原因となることが知られている (Yasoda A. et al., *Nat Med*, 2003)。FGFR3 は線維芽細胞増殖因子 (FGF) の受容体であり、ERK MAP キナーゼ (以下、ERK と略す) を介して作用を発揮する。CNP/GC-B 系は FGF/FGFR3 による ERK 活性化に対して拮抗的に作用するとされる (Ozasa A. et al., *Bone*, 2005)。しかし、生体内での ERK 活性の検出は難しく、このモデルは十分に検証されているとはいえない (図 1)。

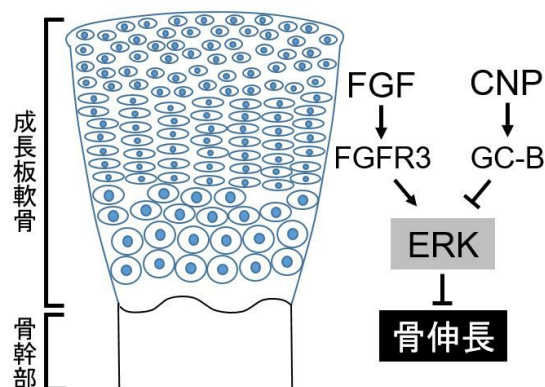


図1 CNP/GC-B系、FGF/FGFR3系による ERKを介した内軟骨性骨化調節の従来モデル

2. 研究の目的

- (1) CNP/GC-B 系による成長板軟骨伸長に伴う ERK 活性の時空間的制御を解明する。
- (2) ERK 活性の局所制御に基づく新たな作用機序の低身長症の治療法の概念を確立する。

3. 研究の方法

本研究では、目的達成のために ERK-FRET バイオセンサー発現マウスと成長板軟骨の生組織イメージングの系を用いて以下の実験を行った。

- (1) 生理的条件下の成長板軟骨での軟骨細胞の分化状態と ERK 活性の関連を解析した。
- (2) CNP 添加条件下での成長板軟骨での ERK 活性の時空間的解析を行った。

また、CNP による成長板軟骨伸長作用を組織全体で個々の細胞レベルで解析するため、組織透明化を用いた観察法を確立した。

さらに、成長板軟骨の各分化段階での CNP による ERK 活性の制御機構の機序を検討するため、軟骨前駆細胞株 ATDC5 細胞に ERK-FRET バイオセンサーを導入し、観察を行った。

4. 研究成果

- (1) ERK-FRET バイオセンサー発現マウス胎仔の成長板軟骨の生組織イメージングの系の確立

生きた成長板軟骨組織内での ERK 活性と、その変化を検出するため、ERK-FRET バイオセンサー発現マウス胎仔の長管骨を器官培養条件下で二光子顕微鏡を用いて観察し、生組織イメージングの系の確立に取り組んだ。マウスの胎生日数および長管骨の検体採取部位を検討した結果、胎生 17.5 日の橈骨近位成長板で ERK 活性の変化と軟骨細胞の分化を最も良好に観察できることが明らかとなった (図 2)。

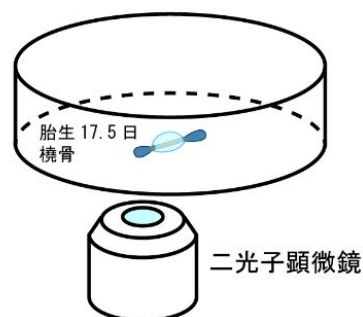


図2 生組織イメージング模式図

- (2) 生理的条件下および CNP 添加条件下における成長板軟骨で

の ERK 活性制御機構の解析

生理的条件下での成長板軟骨における ERK 活性の分布と CNP によるその制御を明らかにするため、ERK-FRET バイオセンサー発現マウス胎仔の成長板軟骨を器官培養条件下で二光子顕微鏡を使ってタイムラプス撮影を行った。その結果、生理的条件下では肥大化軟骨細胞層近傍の軟骨膜下で ERK が活性化されていることが明らかとなった。さらに、CNP 添加条件における成長板軟骨での ERK 活性の時空間的制御と軟骨細胞の分化、組織伸長との関連を明らかにするために本実験系を用いて CNP の添加実験を行った。その結果、肥大化軟骨細胞層近傍の軟骨膜下の ERK 活性が CNP により抑制されることが明らかとなった(図 3)。

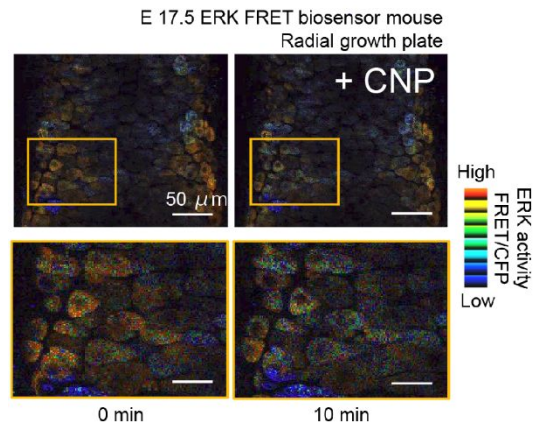


図 3 FRET/CFP ratio 画像

(3) 透明化技術を用いたマウス胎仔成長板軟骨の観察法の確立

CNP による肥大化軟骨層における ERK 活性の抑制と成長板軟骨伸長との関連を明らかにするため、CUBIC(Tainaka K. et al., *Cell Rep.* 2018)を用いてマウス胎仔成長板軟骨を透明化し観察する方法の確立に取り組んだ。器官培養後の ERK-FRET バイオセンサー発現マウス胎仔の橈骨成長板軟骨を 4%パラホルムアルデヒド・りん酸緩衝液で固定し、CUBIC プロトコルに従い透明化を行い二光子顕微鏡で観察を行った。その結果、マウス胎仔橈骨の近位成長板軟骨を組織全体で個々の

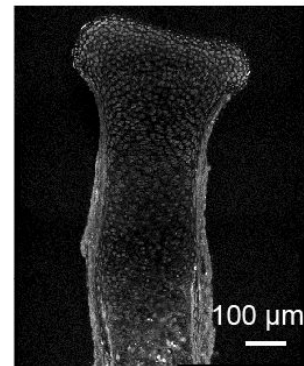


図 4 成長板軟骨 (透明化後)

細胞レベルで形態を描出することに成功した(図 4)。今後は、これらの画像データを用いて形態情報を定量化することを予定している。

(4) 軟骨前駆細胞株 ATDC5 への ERK-FRET バイオセンサーの導入

成長板軟骨の各分化段階での CNP による ERK 活性の制御機構の機序を検討するため、軟骨前駆細胞株 ATDC5 細胞に核局在型の ERK-FRET バイオセンサーをレンチウイルスを用いて遺伝子導入した。TPA を添加し ERK 活性の変化を観察したところ、TPA 添加直後

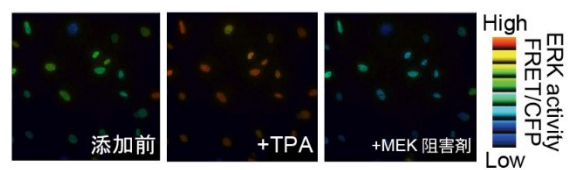


図 5 ERK-FRET バイオセンサー発現 ATDC5 細胞

より ERK の活性化を認めた。さらに、それに続く MEK 阻害剤 PD0325901 の添加によって ERK 活性の抑制を認めた。今後は、ATDC5 細胞に対し分化誘導を行い、CNP に対する ERK の反応性について検討を継続する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 廣田 圭昭
2. 発表標題 Establishment of live imaging system for the analysis of bone growth effect of C-type natriuretic peptide using FRET biosensor mice
3. 学会等名 Resonance bio international symposium
4. 発表年 2019年

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------