

平成 22 年 5 月 14 日現在

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20791349  
 研究課題名 (和文) 骨リモデリングを支配する機械刺激受容陽イオンチャネル活性化機構の  
 解明  
 研究課題名 (英文) The activation mechanisms of mechanosensitive cation channels in bone  
 remodeling.  
 研究代表者  
 吉田 卓史 (YOSHIDA TAKASHI)  
 東北大学・大学院歯学研究科・助教  
 研究者番号：30455795

研究成果の概要 (和文)：生きている骨には吸収と再生を繰り返し、常に一定の骨量を維持するための機構が存在する。これには外部からの様々な力が重要であることが知られているが、いまだに詳細なメカニズムは明らかになっていない。我々は細胞内に陽イオンを流し入れるチャネルタンパク質に着目し、どのようなチャネルが力を感じているかを調べた。その結果、骨の細胞に多くの、力を感じることができるチャネルタンパク質が発現していることを見出した。

研究成果の概要 (英文)：Mechanical stress plays a vital role in maintaining bone architecture. The process by which osteoblasts convert mechanical signal into biochemical responses leading to bone remodeling is not fully understood. In spite of the significant role of channels in osteoblast, the molecular identity of mechanosensitive channels remains unknown. To identify the mechanosensitive channels, we examined the expression level of channels in the clonal mouse osteoblast cell line MC3T3-E1. RT-PCR analysis revealed some mechanosensitive channel genes are expressed in MC3T3-E1 cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：骨芽細胞、チャネル、RT-PCR 法、機械的刺激、カルシウム

## 1. 研究開始当初の背景

歯科矯正治療のように骨に力学的負荷をかけると圧迫側では破骨細胞による骨の吸収が、伸展側では骨芽細胞による骨の新生が見

られることはよく知られている(骨リモデリング)。骨組織は骨細胞が骨のミネラル成分に取り込まれ、骨芽細胞が骨表面に単層状に附着した構成をとっている。ミネラル成分中の

骨細胞はまるで神経細胞のように突起 (process) を伸ばし、骨細胞同士、骨細胞と骨芽細胞を Connexin 43 (Cx43) を主体とする Gap junction の形成により 3 次元的に結びついた網目状構造をとっている。これまでの研究で骨細胞と骨芽細胞には別種の機械刺激受容陽イオンチャンネルが発現しており、骨細胞、骨芽細胞はそれぞれ弱い機械刺激と強い機械刺激に応答する。これらのことから骨芽細胞と骨細胞が相互に協調したネットワークを構成し、様々な機械的刺激を効率よく受容、シグナルを伝達する「機械刺激受容ネットワーク」といえるものを構築していると思われる。しかしながらこれら骨細胞、骨芽細胞にそれぞれ発現していると思われる機械刺激受容陽イオンチャンネルの分子の実体はいまだに明らかとなっていない。機械刺激受容陽イオンチャンネルとして機能する蛋白質の研究は精力的に進められ現在までにいくつかのセンサー分子が同定されている。中でも最近 *transient receptor potential (TRP)* スーパーファミリーと呼ばれる非選択的陽イオン透過型チャンネル群が特に注目を集めている。これら TRP チャンネル群は温度、pH 変化、酸化や機械刺激等様々な細胞外情報を感知し、細胞内に情報を伝える「感覚センサー」として機能しており、その活性化機構や生理的役割が精力的に研究されている。

## 2. 研究の目的

これまでに心筋細胞や血管平滑筋細胞等において機械的刺激受容のメカニズムが精力的に研究されてきているが本研究では骨芽細胞における機械的刺激受容機構の解明を目的とした。骨量は骨芽細胞による骨添加と破骨細胞による骨吸収により平衡状態を保っているが歯の矯正治療のように骨に圧力が加わるとこの平衡が崩れる。骨芽細胞は伸展刺激が加わると細胞内の  $Ca^{2+}$  濃度が上昇し骨を添加する方向に働くが未だにどのような機構で機械的刺激を受容しているかは明らかとなっていない。細胞が力を感じるメカニズムとしてはアクチンフィラメントをはじめとする細胞骨格の変形や、接着細胞が持つ細胞外マトリックスとの接着斑が力を細胞内に伝えることが知られている。しかしながら力を加えられた細胞内の  $Ca^{2+}$  濃度が上昇することから細胞外からの  $Ca^{2+}$  流入もしくは細胞内の  $Ca^{2+}$  ストアからの  $Ca^{2+}$  の流

出が起こっていると考えられる。この細胞内  $Ca^{2+}$  濃度上昇が起こるためには上記のいずれにせよ膜タンパク質であるチャンネルタンパク質が関与している。形質膜上に存在するチャンネルタンパク質は活性化機構の観点から①電位作動型②リガンド作動型と、③その他のチャンネルに分類される。TRP チャンネルは③その他のチャンネルに分類され、これまでに様々な細胞外刺激 (温度、酸化、機械的刺激等) により活性化されることが知られており、このうち機械的刺激はチャンネルタンパク質が直接力を受容して活性化することによりイオンを透過させることが知られている。我々は TRP チャンネルが骨芽細胞や、骨細胞に発現しており、これが外的力を直接感知して細胞内の  $Ca^{2+}$  濃度上昇を引き起こしているのではないかと考えた。さらに最近の研究では TRP チャンネルを中心として様々なシグナル伝達に関与するタンパク質が凝集体を形成することにより効率よくシグナルを伝えることがわかってきているので、骨芽細胞においてもそのようなシグナル伝達複合体を形成している可能性がある。そこで本研究では機械的刺激受容能があることが報告されている TRP チャンネルタンパク質に注目して骨芽細胞における機械的刺激受容機構の解明を目指した。具体的には骨芽細胞に発現している TRP チャンネルの網羅的発現解析を行うことによりどのような TRP チャンネルが骨芽細胞に発現しているのかを調べ、その中に機械的刺激に応答する TRP チャンネルがいるのかを明らかとする。

## 3. 研究の方法

### (1) マウス骨芽細胞の単離

実験動物は、生後 1 日齢の bulb-C マウス 15 匹を使用した。頭蓋冠を切り取り、付着軟組織を除去した。頭蓋冠骨片は最終濃度 0.25% のトリプシン、10%FBS を添加したフェノールレッド不含 MEM $\alpha$  を用い 37°C で 30 分インキュベーションを行い、続いて 1 mg/mL collagenase A 溶液にて 37°C で 30 分浸漬・振盪を行い、骨芽細胞を単離した。その後、骨芽細胞が含まれる上清を遠心沈降し、上清を捨てることにより骨芽細胞を回収した。

### (2) 細胞培養

MC3T3-E1 細胞および単離骨芽細胞

MC3T3-E1 細胞および単離した骨芽細胞は

10%FBS, penicillin (30 units/mL)  
streptomycin (30 µg)入りのMEMα培地  
(WAKO)の中で培養した。培養条件は37°C、  
5%CO<sub>2</sub>で行った。

### (3) RT-PCR アッセイ

60mm dish に培養した MC3T3-E1 細胞もしくは単離骨芽細胞を用い、PBS (-)で細胞を洗浄後、ISOGEN (Nippon gene) により細胞を溶解した。回収した細胞溶解液より説明書の方法に従い total RNA を抽出した。得られた total RNA は分光光度計を用いて濃度測定を行い、total RNA の 1 µg を用いて cDNA を transcriptor fast strand cDNA synthesis kit (Roche) で合成し、TRP チャンネルタンパク質に選択的なプライマーを用いて PCR 反応を行い、1%アガロースゲル電気泳動により複製物を分離して目的の大きさの DNA フラグメントが増幅されているかを調べた。

### (4) 細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度測定

MC3T3-E1 細胞を fibronectin で表面をコーティングしたシリコンエラストマー製チャンバーに播種して一晚培養した後、細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度指示薬である Fura 2-AM (5 µM) (Dojindo) を 40 分間適用した。シリコンチャンバーは伸展装置 STB-190(ストレックス)に装着し、顕微鏡ステージに設置した。測定は画像取得ソフトウェア Metamorph (Molecular Device) で制御されたフィルター切替え装置を使用して 340 nm、380 nm の励起波長における 510 nm の蛍光画像を取得した。この 2 つの蛍光画像の蛍光強度の比 (F340/F380) をピクセル単位で求め、MC3T3-E1 細胞内の Ca<sup>2+</sup>濃度変化を経時的に解析を行った。

## 4. 研究成果

### (1) MC3T3-E1 細胞・単離骨芽細胞の TRP タンパク質発現解析

MC3T3-E1 細胞を培養後、total RNA を抽出した後、random primers を用い cDNA を合成した。TRPC, TRPV, TRPM, PKD, TRPA の各サブファミリーに属する TRP タンパク質に特異的なプライマーを用いて PCR 反応を行い反応物を 1%アガロースゲル電気泳動を行うことにより、どのような TRP チャンネルタンパク質が MC3T3-E1 細胞に発現しているかを調べた。その結果、8 種類の TRP タンパク質が発現していることが明らかとなった。TRPC のサブファミリーは今回

の実験では確認されなかった。しかしながら TRPV、TRPM のサブファミリーでは 2、3 種類の TRP が強く発現していることが確認された。興味深い点はこれら発現が確認された 8 種類の TRP チャンネルのうち、実に 6 種類の TRP チャンネルが機械的刺激に応答する、もしくは機械的刺激の受容に関連していることが報告されていることである。これらのことは MC3T3-E1 細胞が様々な違う種類の機械的刺激に応答することが出来ることを示唆していると考ええる。また、同様の実験をマウスより単離した骨芽細胞に対しても行ったところ MC3T3-E1 のときと同様の結果が得られたことから、native の骨芽細胞においても同様の TRP チャンネルが発現していると考えられる。

### (2) 伸展刺激に対する MC3T3-E1 細胞応答

MC3T3-E1 細胞に伸展刺激を加えて Fura 2 を用いた細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度測定を行った。シリコンエラストマー製の培養チャンバーに MC3T3-E1 細胞を培養して Fura 2-AM (5 µM) を処置して伸展装置を用いて 5, 10, 16, 20%の伸展刺激を加えた。その結果、10%の伸展刺激ではほとんど Ca<sup>2+</sup>上昇は見られなかったが、16, 20%の刺激では大きな Ca<sup>2+</sup>上昇が見られた。細胞外液から Ca<sup>2+</sup>を抜くとこの Ca<sup>2+</sup>上昇が見られなかったことから細胞外からの Ca<sup>2+</sup>流入が重要であることが明らかとなった。このことから MC3T3-E1 細胞においては機械刺激による細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度上昇には形質膜越えの Ca<sup>2+</sup>流入が重要であることが明らかとなった。

これらの成果は骨芽細胞が力を受容した場合にどのようなメカニズムで応答するかを、チャンネルという新しい感覚センサーを足がかりとして解き明かすことにつながる。今後は様々な機械刺激に対してどの TRP チャンネルが応答するのか、またその結果として細胞内にどのようにシグナルが伝達されるのかを明らかとしていく。そうすれば骨組織における機械刺激受容メカニズムにとどまらず普遍的な機械刺激受容メカニズムの理解、さらには神経細胞ネットワークとは違う新規な感覚情報伝達機構の存在を提唱できるものと考ええる。社会的には聴覚異常や心筋梗塞、骨粗鬆症などの新たな治療薬の開発につながると思われる。

## 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 1 件)

① Kiyonaka S, Kato K, Nishida M, Mio K, Numaga T, Sawaguchi Y, Yoshida T, Wakamori M, Mori E, Numata T, Ishii M,

Takemoto H, Ojida A, Watanabe K, Uemura A, Kurose H, Morii T, Kobayashi T, Sato Y, Sato C, Hamachi I, Mori Y. Selective and direct inhibition of TRPC3 channels underlies biological activities of a pyrazole compound. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 査読有、106 巻、2009、5400-5404

[学会発表] (計 8 件)

- ①吉田 卓史、森 泰生、TRPC5 チャネルの新規活性化機構と生理的意義、第 37 回薬物活性シンポジウム、2009 年 10 月 10 日、東北薬科大学 (仙台)
- ②吉田 卓史、宮島 悠旗、若森 実、MC3T3-E1 細胞における機械刺激受容に関与するTRPチャネル、第 51 回歯科基礎医学学会学術大会、2009 年 9 月 11 日、朱鷺メッセ (新潟)
- ③Takashi Yoshida, Yuki Miyajima, Minoru Wakamori. TRP CHANNELS PLAY A ROLE IN MECHANICAL RESPONSES IN STRETCHED OSTEOBLASTS. 36th International Congress of Physiological Sciences. 2009年7月30日、京都国際会議場 (京都)
- ④吉田 卓史、宮島 悠旗、若森 実、マウス骨芽細胞株MC3T3-E1におけるTRPメカノセンサーチャネルの発現解析、第82回日本薬理学会年会、2009年3月16日、(横浜)
- ⑤Takashi Yoshida, Yuki Miyajima, Minoru Wakamori. Expression patterns of mechanosensitive TRP channels in osteoblasts. The 3rd International Symposium for Interface Oral Health Science. 2009年1月16日、(仙台)
- ⑥吉田 卓史、感覚センサーとして機能するイオンチャネルの探求、新世代の生物有機化学研究会2008、2008年6月28日、(名古屋)

(1) 研究代表者

吉田 卓史 (YOSHIDA TAKASHI)  
東北大学・大学院歯学研究科・助教  
研究者番号：30455795