

令和 5 年 6 月 27 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03802

研究課題名(和文) 軟骨内骨化における細胞内Ca²⁺制御機構の解明と骨関連疾患への応用研究課題名(英文) Study on intracellular Ca²⁺ regulation in endochondral ossification and its application to bone-related diseases

研究代表者

市村 敦彦 (Ichimura, Atsuhiko)

京都大学・薬学研究科・助教

研究者番号：10609209

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：軟骨内骨化における細胞内Ca²⁺制御機構を独自のCa²⁺イメージング実験系を駆使して解析した結果、以下に示す細胞内Ca²⁺シグナルに関する主要な成果が得られた。1) Tric-b欠損によって軟骨細胞内Ca²⁺シグナル異常が引き起こされ、コラーゲンの細胞外分泌が障害され、小胞体ストレス誘導から非典型的な細胞死へ至ることを明らかとした。2) C型ナトリウム利尿ペプチド(CNP)が軟骨細胞内Ca²⁺シグナルを活性化することを見出し、TRPM7やBKチャネルを始めとしたCNPの骨伸長促進作用と関連する新規シグナル経路を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞内Ca²⁺シグナルは多様な機能を制御する。長骨伸長を担う軟骨細胞内Ca²⁺の動態やその制御分子機構はそのほとんどが不明であり、分子機序の解を目指す本研究の学術的意義は高い。また、本研究により明らかになったCa²⁺シグナルを構築する分子機序は、TRIC-B変異などに起因する骨系統疾患治療の新たな創薬標的分子の提案や、CNPアナログペプチドの薬効増強方法や、CNPの新規シグナル経路を踏まえた補助薬剤の開発などによる医薬領域への波及効果を有する。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the intracellular Ca²⁺ regulation mechanisms in endochondral ossification using our original Ca²⁺ imaging system and obtained the following major results on intracellular Ca²⁺ signaling: 1) Tric-b deficiency induces abnormal intracellular Ca²⁺ signaling in chondrocytes, resulting in impaired collagen secretion and endoplasmic reticulum stress induction, leading to atypical cell death. 2) We found that C-type natriuretic peptide (CNP) activates intracellular Ca²⁺ signaling in chondrocytes and identified novel signaling pathways, including TRPM7 and BK channel, that are associated with the bone elongation-promoting effects of CNP.

研究分野：分子薬理学

キーワード：軟骨内骨化 細胞内Ca²⁺ 小胞体ストレス 小胞体 Ca²⁺ストア 細胞死

1. 研究開始当初の背景

骨形成は軟骨内骨化と膜内骨化に大別され、軟骨細胞は前者を担うユニークな細胞である。発生期においては、凝集した間葉系幹細胞が軟骨細胞へと分化し、成長板軟骨細胞が長軸方向への伸長を促進している。また、関節においては関節軟骨が物理的摩擦を軽減する重要な役割を担っている。そのため、軟骨細胞の増殖や分化成熟不全は長骨の伸長障害を引き起こし、関節軟骨の損耗は著しい運動障害の原因となる。このように、軟骨細胞の正常な機能維持・促進が様々な骨関連疾患治療にとって重要である。軟骨細胞分化成熟過程において、Sox ファミリー遺伝子のような必須の転写因子や、インディアンヘッジホッグをはじめとした内分泌因子が複数同定されている一方で、セカンドメッセンジャーとして重要な生理機能を担う細胞内 Ca^{2+} 動態や制御機構は驚くほど理解されていない。そこでわれわれは骨芽細胞や軟骨細胞における未知の細胞内 Ca^{2+} を制御分子機構に注目した研究を展開してきた。小胞体カチオンチャンネル TRIC-B が骨芽細胞における細胞内 Ca^{2+} 放出を補助し細胞外への I 型コラーゲン分泌を促しており、その機能的欠失や遺伝子変異によりマウスやヒトで骨形成不全症を引き起こすことを見出した。TRIC-B は小胞体に貯蔵された Ca^{2+} が放出される際に小胞体内腔に発生する負電荷を中和し持続的な Ca^{2+} 放出を補助するカウンターイオンチャンネルと考えられる特徴的な分子であり、研究代表者の所属研究室で分子同定から機能解析まで世界に先駆けて行っている。最近、骨形成不全症のみならず軟骨内骨化障害を伴う胎児骨格異形成症の原因として TRIC-B 変異が報告された。われわれの予備的検討から、TRIC-B 欠損マウスの軟骨組織では膨潤した異常な形態の死細胞が観察されており、軟骨細胞においても TRIC-B や小胞体 Ca^{2+} 制御機構が重要な生理機能を担っていることを強く示唆している。われわれは TRIC-B 以外にも、 Ca^{2+} ハンドリングに関与する小胞体膜タンパク質 Calumin を単離した。Calumin は Ca^{2+} 結合ドメインを有し、欠損によって Ca^{2+} ハンドリングが障害されることを見出したが、詳細な機能は未解明である。しかしながら、ヒト Calumin 変異体キャリアも骨格形成異常を伴う重篤な発達遅延を示すことが報告されていることから、その機能が軟骨内骨化に深く寄与するものと推定している。

さらに、軟骨細胞における生理的な細胞内 Ca^{2+} 動態が未解明であったことに注目し、マウス胎児大腿骨スライス培養試料を用いた軟骨細胞内 Ca^{2+} イメージング実験系を樹立した(図 1)。この独自の実験系を用いることで、軟骨細胞内 Ca^{2+} 濃度が自発的に変化しているという新たな現象を発見し、主な制御分子として 2 価カチオンチャンネル TRPM7 を同定した。Trpm7 軟骨特異的欠損マウスは著しい骨伸長障害を呈したことから、TRPM7 を介した軟骨細胞内 Ca^{2+} 自発変動が正常な軟骨分化成熟と骨伸長に必須であることを明らかとした (*Science Signaling*, 2019)。さらに、Trpm7 軟骨特異的欠損マウスの骨伸長障害の表現形質が C 型ナトリウムペプチド(CNP) 並びにその受容体 NPR2 欠損マウスと酷似していたことに着想し、CNP の作用機序に Trpm7 の関与を想定するに至った。CNP はそのアナログペプチド(Vosoritide)を用いてヒト軟骨無形成症による低身長患者を対象として第 II 相臨床試験が実施され良好な成績が報告され、第 III 相試験が実施された結果、2021 年に欧米で、2022 年には本邦で軟骨無形成症治療薬として承認された。CNP の作用機序として、NPR2 が膜型グアニル酸シクラーゼであることから cGMP 産生が起こることと PKGII, MAPK の関与が示されていたが、その詳細は長らく不明であった。研究代表者らの予備検討から CNP と TRPM7 を介する Ca^{2+} の関与が示唆された。

2. 研究の目的

軟骨細胞内 Ca^{2+} 動態やその制御分子に関する知見は非常に限られており、全容は不明である。そこで本研究では、軟骨細胞内 Ca^{2+} 制御分子機構と軟骨内骨化及び関節軟骨における生理機能の解明を目的とした。

われわれの樹立した Ca^{2+} イメージング系はこれまでの実験系の制約を突破し、生理的条件下に極めて近い状態の軟骨細胞内 Ca^{2+} 動態を観察できる点、薬理的・遺伝的手法で介入して変化を解析可能な点で非常に独自性の高い画期的な手法である。本研究では、独自的手法を用いて当研究グループが単離した分子を解析することで、全く新たな軟骨細胞機能の制御機構が明らかになり、特色ある研究成果が得られると考えた。TRIC-B や Calumin が遺伝的骨関連疾患の原因となっていることから、その病態生理機能の解明はこれらの遺伝子が関与する骨関連疾患の診断や治療に対して有益な情報を提供することを目指した。

CNP については、作用機序の理解がこれまで不十分であったが、研究開始当初の予備的検討から、CNP 処置で軟骨細胞内 Ca^{2+} 自発変動が増強され、TRPM7 阻害薬で阻害された。これらから、われわれが明らかとした TRPM7 を介する細胞内 Ca^{2+} 制御機構が今まで不明であった CNP の作用機序を解明する鍵となる知見であったことが予想された。より詳細な薬理作用機序の全容解明から骨伸長の制御へと応用できれば、非常に特色ある基礎的知見が得られるのみならず、臨床応用に直結する研究成果が得られる可能性が高いと考えた。

3. 研究の方法

胎齢 17.5 日マウス大腿骨スライス試料を用いた高時空間分解蛍光イメージングによる細胞内 Ca^{2+} 動態解析、分子生物学手法による変異マウスの作出、薬理的阻害実験及び活性化実験、免疫組織学的解析、病理組織染色と電子顕微鏡解析による変異マウスの細胞組織学的解析、さらには PCR 法を用いた遺伝子発現解析、マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析、免疫学的手法を用いたタンパク質発現解析、器官培養軟骨を用いた骨伸長の解析および組織学的解析や細胞生理学手法を総動員した変異マウスの解析実験を遂行した。

4. 研究成果

1. TRIC-B チャンネルの軟骨細胞における生理機能の解明

胎齢 18.5 日 *Tric-b* 欠損マウスの大腿骨を病理学染色および電子顕微鏡により解析したところ、特に骨端側に位置する円形軟骨細胞と柱状軟骨細胞において細胞が膨大していることがわかった。また、およそ 1% 弱ほどの割合で *Tric-b* 欠損軟骨細胞では細胞質が空胞化するとともに核が濃縮した異常な死細胞が観察された。野生型軟骨細胞では全く観察されない状態であることから、更に詳細にこれらの細胞を観察した。免疫組織学解析から、異常な死細胞を含む *Tric-b* 欠損軟骨細胞ではおよそ 0.5% 程度の割合で 2 型コラーゲンが細胞内に蓄積していることが明らかとなった。そこで、小胞体ストレスについて検討した。その結果、*Tric-b* 欠損軟骨細胞では、古典的小胞体ストレス経路のうちでも特に PERK 経路が強く活性化されていることがわかった。細胞死を誘導する細胞内シグナル経路解析を行ったところ、小胞体 Ca^{2+} シグナル異常により誘導される CASP-12 の活性化が観察され、*Tric-b* 欠損大腿骨軟骨組織切片中にごく僅かではあるが CASP-3 の活性化が観られた。TRIC-B は小胞体 Ca^{2+} 放出を補助するイオンチャンネルであることから、 Ca^{2+} イメージングを行って更に詳細に解析した。その結果、*Tric-b* 欠損軟骨細胞では小胞体 Ca^{2+} ストア放出が有意に減弱しており、特定の薬理的刺激条件下において小胞体 Ca^{2+} オーバーロードが観察された。また、静止状態の Ca^{2+} レベルが有意に高くなっており、その原因の一部は PERK 経路の活性化に起因することが示唆された。これらの結果から、*Tric-b* 欠損は胎生期軟骨細胞において Ca^{2+} ハンドリング異常を引き起こし、2 型コラーゲンの分泌を障害することで小胞体ストレスを誘導し、PERK 経路の活性化から CASP-12 および CASP-3 の活性化によってアポトーシスが誘導され、細胞死に至ることが明らかとなった (bioRxiv 2023.02.28.530410)。

2. Calumin の軟骨細胞における生理機能の解明

軟骨特異的に *Calumin(Ccdc47)* を欠損したマウスを作出するため、*Ccdc47* flox マウスと *Col2a1-Cre-Tg* マウスを交配した。当該マウスは *Ccdc47* 全身欠損マウスで観察される胎生致死が回避され、正常に生まれ成長することがわかった。軟骨細胞における遺伝子発現解析から軟骨細胞特異的に *Ccdc47* が欠損していることを確認した。一方で、巨視的な体長や骨格形成に *Ccdc47* 欠損の影響は観察されず、軟骨細胞内 Ca^{2+} イメージングにおいても *Ccdc47* 欠損による野生型との差異は認められなかった。また、ゼブラフィッシュにおいて *ccdc47* を欠損させた系統を国立循環器病研究センターとの共同研究で作出した。しかし、*ccdc47* 欠損ゼブラフィッシュにおいても、大きな体長の変化や骨格系への影響は観察されなかった。これらの観察結果から、*Ccdc47* の担う生理機能は軟骨細胞においては相対的重要性が低いと判断し、肝臓など他の臓器へと解析対象を移行することとした。

3. CNP/NPR2 の骨伸長薬理作用機序の解明とその応用

CNP の室温 1 時間の処置によって軟骨細胞内 Ca^{2+} シグナルが賦活されることが明らかとなった。さらに、細胞内 Ca^{2+} イメージングおよび薬理的阻害実験や活性化実験を行うことによって、CNP の受容体である NPR2 のみならず、cGMP および cGMP 依存性タンパク質リン酸化酵素 PKG が CNP の軟骨細胞内 Ca^{2+} シグナル活性化に寄与していることを明らかとした。さらに、大コンダクタンス Ca^{2+} 依存性 K^+ (BK) チャンネルや TRPM7 チャンネルといったイオンチャンネルが CNP の軟骨細胞内 Ca^{2+} シグナル活性化を引き起こしていることを示した。また、CNP 措置によって CaMKII が活性化することを示した。一連の細胞内シグナル経路解析結果から、CNP-NPR2-cGMP-PKG-BK ch.-TRPM7 ch.-CaMKII という CNP が軟骨細胞において活性化する新たなシグナル経路を明らかにした。生理機能との関与を調べるため、器官培養軟骨を用いた CNP の評価を行った。CNP は既報の通り野生型マウス由来の器官培養軟骨の伸長を促進したが、*Npr2* 欠損マウス由来の器官培養軟骨ではその生理機能が失われた。これらの結果は、CNP の骨を伸ばす活性が軟骨細胞内 Ca^{2+} シグナル経路に依存して発揮されていることを示唆している。本研究で明らかとなったシグナル経路に関連する分子の活性調節剤は新たな骨系統疾患治療薬として期待できる。以上の結果を国際学術誌に公表した (*eLife*, 2022)。

<引用文献>

Qian N, **Ichimura A**, Takei D, Sakaguchi R, Kitani A, Nagaoka R, Tomizawa M, Miyazaki Y, Miyachi H, Numata T, Kakizawa S, Nishi M, Mori Y, Takeshima H., TRPM7 channels mediate spontaneous Ca²⁺ fluctuations in growth plate chondrocytes that promote bone development, *Sci Signal*. 2019 Apr 9;12(576):eaaw4847. doi: 10.1126/scisignal.aaw4847.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yuu Miyazaki#, Atsuhiko Ichimura#, Ryo Kitayama, Naoki Okamoto, Tomoki Yasue, Feng Liu, Takaaki Kawabe, Hiroki Nagatomo, Yohei Ueda, Ichiro Yamauchi, Takuro Hakata, Kazumasa Nakao, Sho Kakizawa, Miyuki Nishi, Yasuo Mori, Haruhiko Akiyama, Kazuwa Nakao, Hiroshi Takeshima, #, contributed equally	4. 巻 11
2. 論文標題 C-type natriuretic peptide facilitates autonomic Ca ²⁺ entry in growth plate chondrocytes for stimulating bone growth	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e71931
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7554/eLife.71931.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 市村 敦彦	4. 巻 40
2. 論文標題 FFAR (free fatty acid receptor, 遊離脂肪酸受容体) の種類	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Clinical Neuroscience	6. 最初と最後の頁 8-10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 市村 敦彦	4. 巻 40
2. 論文標題 FFAR (free fatty acid receptor, 遊離脂肪酸受容体) の生理的および薬理的作用	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Clinical Neuroscience	6. 最初と最後の頁 146-147
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 市村 敦彦	4. 巻 40
2. 論文標題 FFAR (free fatty acid receptor, 遊離脂肪酸受容体) の臨床応用	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Clinical Neuroscience	6. 最初と最後の頁 284-287
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 Feng Liu, Luxin Xu, Miyuki Nishi, Atsuhiko Ichimura, Hiroshi Takeshima	4. 巻 96
2. 論文標題 Enhanced Ca ²⁺ handling in thioglycolate-elicited peritoneal macrophages	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Calcium	6. 最初と最後の頁 102381
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ceca.2021.102381.	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 Atsuhiko Ichimura	4. 巻 44
2. 論文標題 Elucidation of the Physiological Functions of Membrane Proteins as Novel Drug Target Candidate Molecules	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biol Pharm Bull	6. 最初と最後の頁 1167-1173.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b21-00296.	査読の有無 無
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 Jinghan Ma, Hideki Kitaura, Saika Ogawa, Fumitoshi Ohori, Takahiro Noguchi, Aseel Marahleh, Yasuhiko Nara, Adya Pramusa, Ria Kinjo, Kayoko Kanou, Akiko Kishikawa, Atsuhiko Ichimura, Itaru Mizoguchi	4. 巻 13
2. 論文標題 Docosahexaenoic acid inhibits TNF- α -induced osteoclast formation and orthodontic tooth movement through GPR120	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 929690
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2022.929690.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 宮崎 侑、市村 敦彦、北山 諒、岡本 直樹、安江 智生、劉 楓、川邊 隆彰、長友 宏樹、西 美幸、柿澤 昌、竹島 浩
2. 発表標題 C型ナトリウム利尿ペプチドは成長板軟骨細胞において自発的なCa ²⁺ 流入を介して骨伸長を促進する
3. 学会等名 日本薬理学会95回年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岡本 直樹、市村 敦彦、宮崎 侑、北山 諒、安江 智己、劉 楓、川邊 隆彰、長友 宏樹、柿澤 昌、西 美幸、竹島 浩
2. 発表標題 C型ナトリウム利尿ペプチドは軟骨細胞内Ca ²⁺ シグナル経路を活性化し骨伸長を促進する
3. 学会等名 日本薬学会第142回年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 市村 敦彦
2. 発表標題 遊離脂肪酸受容体の新たな生理機能
3. 学会等名 日本薬理学会第94回年会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 長友 宏樹、市村 敦彦、川邊 隆彰、中嶋 将久、安江 智生、竹島 浩
2. 発表標題 Tric-b遺伝子欠損は成長板軟骨細胞において非典型的な細胞死を引き起こす
3. 学会等名 日本薬学会第143回年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 川邊 隆彰、市村 敦彦、安江 智生、竹島 浩
2. 発表標題 成長板軟骨細胞におけるホスホジエステラーゼ3(PDE3)の阻害は細胞内Ca ²⁺ シグナル経路を活性化し骨伸長を促進する
3. 学会等名 日本薬学会第143回年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 市村 敦彦
2. 発表標題 C型ナトリウム利尿ペプチドによる軟骨細胞内 Ca ²⁺ シグナルの活性化と骨伸長促進作用: 分子機序に基づく小児骨系統疾患に対する創薬戦略
3. 学会等名 「子どもの薬を創る会」第5回セミナー(招待講演)
4. 発表年 2022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
研究分担者	植田 洋平 (Ueda Yohei) (30848213)	京都大学・医学研究科・特定助教 (14301)	
研究分担者	近藤 武史 (Kondo Takefumi) (60565084)	京都大学・生命科学研究所・特定助教 (14301)	
研究分担者	伊藤 宣 (Iro Hiromu) (70397537)	公益財団法人大原記念倉敷中央医療機構(臨床医学研究所臨床医学研究開発部)・クリニカルサイエンスリサーチグループ・研究員 (85308)	

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