

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 12 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25293319

研究課題名(和文)骨細胞におけるメカノセンサーとしてのカルシウム活性化カリウムチャネルの機能解析

研究課題名(英文)The analysis of potassium channel as mechanosensors in osteocytes

研究代表者

秋山 治彦 (AKIYAMA, HARUHIKO)

岐阜大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：60402830

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：廃用性骨萎縮の分子生物学的機序を解明するために、マウス坐骨神経結紮モデルを作成し、大腿骨を摘出、網羅的発現遺伝子解析を行った結果、sham手術群と比較してカリウムチャネルであるKcnmb1及びKcnmb4サブユニット遺伝子の発現が有意に変動していた。real-time PCR及び免疫染色で解析したところ、Kcnmb1及びKcnmb4遺伝子は骨細胞及び骨膜細胞において発現し、廃用性骨萎縮によって発現が低下していた。Kcnmb1及びKcnmb4ダブルノックアウトマウスを作成したところ、骨量の増加を認めた。以上の結果からカリウムチャネルが廃用性骨萎縮に関与していることが強く示唆された。

研究成果の概要(英文)：To clarify molecular mechanisms under disuse bone atrophy, we generated the mice with ligation of ischia nerve, and analyzed gene expression profiles of the femurs, resulting in identification of Kcnmb1 and Kcnmb4. These genes are expressed in osteocytes and periosteal cells, and the expression of these genes were down regulated in disuse bone atrophy model mice. In double knockout mice of Kcnmb1 and Kcnmb4, the bone volume of these mice significantly increased. These data strongly suggest that Kcnmb1 and Kcnmb4 are involved in disuse bone atrophy.

研究分野：整形外科学、骨軟骨代謝学

キーワード：廃用性骨萎縮 カリウムチャネル ノックアウトマウス

1. 研究開始当初の背景

高齢者の骨粗鬆症や骨脆弱化による骨折、寝たきりなどによる不動や活動低下および骨折治療などによるギプス固定による**廃用性骨萎縮**、さらには宇宙ステーションでの無重力生活での骨萎縮は、我々人類の現在、および未来的生活において克服すべき病態である。例えば、我が国における骨粗鬆症患者は約1200万人と推定されており、骨粗鬆症を起因とする脊椎椎体骨折の有病率は80歳以上で43%、大腿骨頸部骨折は年間10万人以上に達し、また、日常活動量の低下をみる**要支援/要介護**の総数は450万人に達している。よって我が国において**高齢者の骨量を積極的に増加**させることは疾患治療のみならず医療経済的観点においても最重要の課題である。生後の骨組織は骨芽細胞による骨形成と破骨細胞による骨吸収によりモデリングされ、適切な骨量を維持するためには性ホルモンなどの内因性物質のみならず外力による適度な**メカニカルストレス**が必要である。1892年、Julius Wolffが提唱した通り、骨は応力に反応し、骨への荷重(歪み)の機械的刺激を受けて、骨は生物学的に適応し、形状や内部構造が強化される(**Wolffの応変則**)組織である。しかし100年以上たった現在においても、Wolffの応変則の分子機序は明らかになっていない。骨組織における**メカノセンシング機構**は骨細胞に存在すると考えられているものの未だ明らかではなく、さらに骨細胞から骨膜および骨髄腔内の骨芽細胞にメカニカルストレスを伝搬する機構もほとんど解明されていない。ノックアウトマウスを用いたin vivo実験や培養細胞を用いたin vitroでの解析から一酸化窒素やプロスタグランジンなどが関与していることが示唆されているが、骨組織特異的なメカニズムは全く知られていない。現在、骨量増加を期待した薬剤としては、骨粗鬆症治療薬としていくつかのものが実用化されており、これからも数種類が市販予定である。しかし、それらのほとんどは骨の吸収を抑制する薬剤であり、骨形成を刺激し骨量を積極的に増加させる薬剤の必要性が高まっている。よって骨細胞による骨形成制御の分子メカニズムはその発生学的な意義のみならず、生後の骨リモデリングや骨萎縮に関係する疾患制圧のために必須である。

2. 研究の目的

我が国の高齢化社会の到来は、様々な疾患による骨脆弱性を起因とした易骨折性とその後の運動能力の低下を引き起こし社会的に大きな問題となっている。現在まで数種類の骨粗鬆症薬が開発され、骨粗鬆症患者の骨折リスクを軽減するエビデンスが得ら

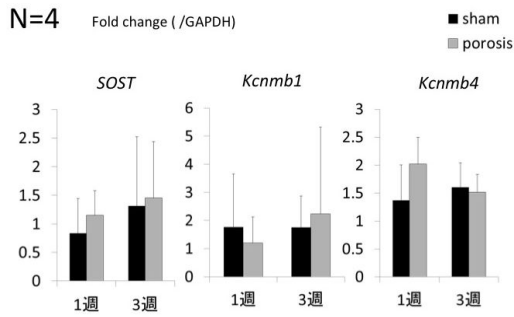
れているが、**骨の永続的回復**に効果が期待できる薬剤はない。骨皮質では外力負荷により骨形成が亢進する事は以前から知られている。しかし骨皮質の骨形成を司る**骨細胞**と骨髄腔に存在する骨芽細胞の細胞間の局所微小環境における**メカニカルストレス - 骨形成**の分子メカニズムは未だ解明されておらず、皮質骨の骨量回復治療法が確立されていない理由の一つになっている。本研究では、**遺伝子改変マウス**を用いて、メカニカルストレスが、骨皮質の**骨細胞内カルシウムイオン濃度の上昇**を惹起し、骨細胞に存在する**カルシウム活性化カリウムチャンネル**が活性化することにより、**皮質骨の維持**や**皮質骨の外力への順応**をおこなっていることを明らかにする。本研究の成果により、骨粗鬆症および廃用性骨萎縮、骨折に対する組織再生医工学的治療および新規創薬の開発につなげることが期待される。

3. 研究の方法

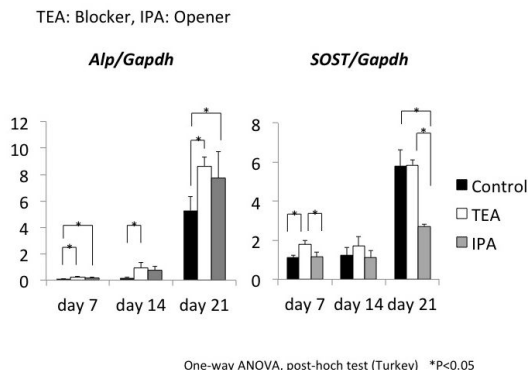
骨組織における**カルシウム活性化カリウムチャンネル**(BKチャンネル)の機能を明らかにするため、BKチャンネルのユニットモジュレーター分子Kcnm1、4**ノックアウトマウス**の脊椎骨・大腿骨を骨形態計測で解析する。また骨細胞にBKチャンネルオーブナー化合物およびBKチャンネルブロッカー化合物を添加し骨細胞のマーカー遺伝子の変化を解析する。以上の結果から、骨細胞の細胞機能を活性化する**BKチャンネルモジュレーター化合物**を同定する。C57BL/6マウスを用いて片側坐骨神経切除による廃用性骨萎縮モデルマウスを作製し、化合物の全身投与により骨量減少抑制効果を骨形態計測で評価する。

4. 研究成果

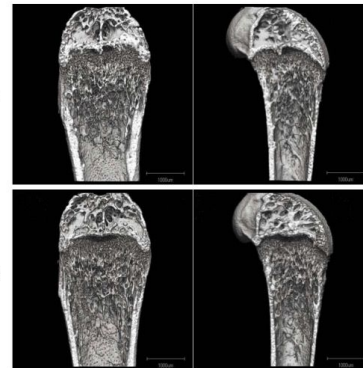
マウスの坐骨神経結紮モデルにおいて、術後1週目および3週目の骨萎縮を呈した大腿骨より骨細胞を単離し、カリウムチャンネルKcnmb1とKcnmb4の発現レベルの変化をsham手術群と比較した。Kcnmb1は、廃用性骨萎縮1週目で発現量の増加を呈し、3週目で低下した。一方、Kcnmb4は廃用性骨萎縮1週目および3週目で継続的に発現量の低下を見た。手術のポジティブコントロールとして骨細胞に特異的に発現するSOSTの発現量を計測したところ、廃用整骨萎縮1週目および3週目ともに継続的に低下していた。以上の結果より、廃用性骨萎縮をきたした大腿骨骨細胞では、その初期にkcnmb1の発現が亢進し、Kcnmb4とは異なる何らかの役割を果たしていると考えられた。



次に、マウス骨細胞にBKチャンネルブロッカーであるTEA(tetra-ethyl-ammonium)およびオープナーのIPA(isopimaric acid)を添加しアルカリフォスファターゼおよびSOSTの発現を解析した。TEAでは、これら遺伝子の発現量は有意に上昇したものの、IPAではほとんど上昇しなかった。よって、Kcnmカリウムチャンネルの機能亢進で骨細胞の機能が抑制されている事が推測された。以上の結果から、廃用性骨萎縮をきたした早期にはカリウムチャンネルであるKcnmb1ユニットの一過性の遺伝子発現をきたし、骨細胞機能の早期抑制に関与している事が示唆された。



次に、Kcnmb1及びKcnmb4の骨組織での機能を明らかにするため、それぞれのノックアウトマウスを交配した。Kcnmb1及びKcnmb4ノックアウトマウスは骨組織に明らかな異常を認めなかった。また、Kcnmb1及びKcnmb4のトリプルアレルミュートーションマウスでも骨組織に明らかな異常を認めなかった。Kcnmb1:Kcnmb4ダブルノックアウトマウスを作成したところ、そのマウスの大腿骨及び脛骨の海綿骨骨密度は増加していることが明らかになった。CT及び硬組織を用いた骨形態計測の結果から、ダブルノックアウトマウスでは骨形成能が促進していることが明らかになった。



以上のin vitro及びin vivoの結果から、骨細胞におけるカリウムチャンネルKcnmb1は、荷重を感知するメカノセンサーとして、骨芽細胞及びコルマク細胞における骨形成を制御し、免荷などによる力学的負荷の骨への低下によるKcnmb1遺伝子の遺伝子発現の変化により、廃用性骨萎縮が発症することが強く示唆された。

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0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕なし

出願状況(計0件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年月日：
 国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 取得年月日：
 国内外の別：

〔その他〕
 ホームページ等
 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

秋山 治彦 (AKIYTAMA, Haruhiko)
岐阜大学・医学系研究科・教授
研究者番号 : 60402830

(2) 研究分担者

松田 秀一 (MATSUDA, Shuichi)
京都大学・医学研究科・教授
研究者番号 : 40294938

(3) 研究分担者

宿南 知佐 (SHUKUNAMI, Chisa)
広島大学・医歯薬保健学研究院・教授
研究者番号 : 60303905