

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 2 日現在

機関番号：34408

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670638

研究課題名(和文)光操作 - 膜電位制御 - による骨細胞機能・骨代謝機構コントロール

研究課題名(英文)Light-induced regulation of the function of osteocyte and bone remodelling

研究代表者

納富 拓也 (NOTOMI, Takuya)

大阪歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：70542249

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：老化にともなう骨疾患や骨粗鬆症は100万人を超えると推定される。この運動器疾患を治療・予防するために、いままでの研究成果を基にして骨組織における細胞膜電位とイオンチャネルの役割を検討してきた。本研究では、骨細胞における細胞機能操作を可能とするために、光作動性膜電位操作分子を用いて骨細胞の細胞機能制御を検討した。具体的には、光作動性イオンチャネル・ポンプを導入することで、骨細胞での膜電位制御を電気生理学的に検討するとともに、培養条件下での光照射により、骨細胞機能の一部の制御を可能とした。その結果、光照射による骨細胞の膜電位制御と機能操作が可能となった。

研究成果の概要(英文)：Age-related bone diseases such as osteoporosis are serious problem in an aged society and their treatment is necessary for maintaining QOL. To prevent bone diseases, we have done the study of role of membrane potential and ion channels on bone cells. To challenge the regulation of osteocyte function in vitro culture, we overexpressed light-sensitive ion channel and pump. The light-sensitive ion channels and pump were transfected into osteocyte and then we investigated the role of membrane potential on those cells. In electrophysiological experiments, the membrane potential was controlled by light stimulus. The light stimulus regulated some portion of osteocyte function. In summary, our results indicate that membrane potential regulate some of osteocyte functions. Our system could regulate the membrane potential and function in osteocyte.

研究分野：骨生物学

キーワード：骨代謝

1. 研究開始当初の背景

老化にともなう骨疾患や骨粗鬆症は 1000 万人を超えると推定される。この運動器疾患を治療・予防して、Quality of Life (QOL)の維持・向上が重要になってきている。骨を作る骨芽細胞と骨を減らす破骨細胞の機能制御、それらの関与する骨リモデリング機構の解明をおこない、運動器疾患の治療・新規薬剤の開発に寄与することは、骨生物学において重要な研究対象となっている。しかしながら、リウマチ・関節疾患に代表されるように、局所的に発症する運動器疾患においては、その局所的部位における細胞機能・骨リモデリング機構の制御が重要であるが、それ自体をコントロールすることは難しい。

2. 研究の目的

私は、この状況を克服するため、人工的な膜電位操作分子を骨芽細胞・破骨細胞に組み入れてその膜電位を制御することで、細胞機能を操作することに成功した。本研究では上記の結果に基づき、骨細胞に焦点をあてて、光操作により機能制御をおこなうことを主題とする。

3. 研究の方法

培養骨細胞に膜電位操作分子を組み入れて、その機能検討をおこなっていく。力学的刺激が骨細胞に加わった時に膜電位変動が生じることから、力学的刺激応答機能との関係を検討する。膜電位操作分子を導入した細胞を光照射した場合と、力学的刺激を付加した場合と比較して、光操作により力学的刺激に対する機能応答と同様な反応を再現するように試みる。また、膜電位操作分子を組み入れた細胞をマウスに移植することで骨構築を試みる。創出した骨の質は、高精細マイクロ CT および骨形態計測法・強度試験にて、その構造・強度を測定して評価する。

4. 研究成果

膜電位操作回路を培養骨細胞に導入して光照射により膜電位を制御することに成功した。具体的には、光により活性化するイオンチャネル(ChRWR: Channelrhodopsin-Wide Receiver) およびポンプ (Arch: Archaeorhodopsin-3)を遺伝子導入することで、任意の時期・場所での膜電位操作を可能とした。その後、培養環境下で、光照射をおこなったところ、骨細胞の細胞機能の一部(樹状突起の進展、ALP 発現量の調節)が膜電位操作により変動することを確認した。また、力学的刺激負荷時との比較で、リン酸化タンパク質の同程度の変化が確認された。さらに、生体内での検討をおこなうため、頭頂骨上に、マトリゲルとともに膜電位操作分子を導入した骨細胞を移植して、定着させることに成功した。骨形態観察で骨量・形態の変化が確認できたが、経時的に光照射をおこない、骨量・骨形態の正確なコントロールをおこな

うことを試みている。

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9件)

1. **Takuya Notomi (Corresponding author)**, Miyuki Kuno, Akiko Hiyama, Kiyoshi Ohura, Masaki Noda, Timothy M. Skerry, Zinc-induced effects on osteoclastogenesis involves activation of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide modulated channels via changes in membrane potential. J Bone Miner Res, 2015, (in press)
2. Makiri Kawasaki, Yoichi Ezura, Tadayoshi Hayata, **Takuya Notomi**, Yayoi Izu, Masaki Noda, TGF-Beta Suppresses Ift88 Expression in Chondrocytic ATDC5 cells. J Cell Physiol, 2015, (in press)
3. Takayuki Yamada, Yoichi Ezura, Tadayoshi Hayata, Shuichi Moriya, Jumpei Shirakawa, **Takuya Notomi**, Smriti Aryal, Makiri Kawasaki, Yayoi Izu, Kiyoshi Harada, Masaki Noda, β 2 Adrenergic receptor activation suppresses BMP-induced alkaline phosphatase expression in osteoblast-like MC3T3E1 cells. J Cell Biochem, 2015, (in press)
4. Shuichi Moriya, Tadayoshi Hayata, **Takuya Notomi**, Smriti Aryal, Testuya Nakamoto, Yayoi Izu, Makiri Kawasaki, Takayuki Yamada, Jumpei Shirakawa, Kazuo Kaneko, Yoichi Ezura, Masaki Noda, PTH regulates β 2-adrenergic receptor expression in osteoblast-like MC3T3-E1 cells. J Cell Biochem, 116: 1: 142-8, 2015
5. **Takuya Notomi (Corresponding author)**, Ikuaki Karasaki, Yuichi Okazaki, Nobukazu Okimoto, Yushi Kato, Kiyoshi Ohura, Masaki Noda, Toshitaka Nakamura, Masashige Suzuki, Insulinogenic sucrose + amino acid mixture ingestion immediately after resistance exercise has an anabolic effect on bone compared with non-insulinogenic fructose + amino acid mixture in growing rats. Bone, 65: 1: 42-48, 2014
6. Jumpei Shirakawa, Yoichi Ezura, Shuichi Moriya, Makiri Kawasaki, Takayuki Yamada, **Takuya Notomi**, Tetsuya Nakamoto, Tadayoshi Hayata, Atsushi Miyawaki, Ken Omura, Masaki Noda, Migration linked to Fucci-indicated cell cycle is controlled by PTH and mechanical stress. J Cell Physiol, 229: 10: 1353-8, 2014
7. Chiho Watanabe, Masahiro Morita,

Yoichi Ezura, Tetsuya Nakamoto, Tadayoshi Hayata, Chisato Kikuguchi, Li Xue, Yasuhiro Kobayashi, Naoyuki Takahashi, **Takuya Notomi**, Keiji Moriyama, Tadashi Yamamoto, Masaki Noda, Stability of mRNA influences osteoporotic bone mass via Cnot3. Proc Natl Acad Sci USA, 111: 7: 2692-7, 2014

8. Takafumi Suzuki, **Takuya Notomi (Corresponding author)**, Daisuke Miyajima, Fumitaka Mizoguchi, Tadayoshi Hayata, Tetsuya Nakamoto, Ryo Hanyu, Paksinee Kamolratanakul, Atsuko Mizuno, Makoto Suzuki, Yoichi Ezura, Yuichi Izumi, Masaki Noda, Osteoblastic differentiation enhances expression of TRPV4 that is required for calcium oscillation induced by mechanical force. Bone, 54: 1: 172-8, 2013
9. Aryal Smriti, Kentaro Miyai, Yoichi Ezura, Tadayoshi Hayata, **Takuya Notomi**, Tetsuya Nakamoto, Tony Pawson, Masaki Noda, Nck1 deficiency accelerates unloading-induced bone loss. J Cell Physiol, 228: 7: 1397-1403, 2013

[学会発表](計 16 件)

1. **納富拓也**、大浦清、野田政樹、レジスタンス運動直後のインスリン高刺激性糖摂取は、インスリン低刺激性糖摂取に比べて骨量・骨強度を増大させる、第 56 回 歯科基礎医学会、福岡国際会議場、福岡県、福岡市、2014 年 9 月 26 日
2. 天野均、**納富拓也**、大浦清、スフィンゴシン 1 リン酸は in vitro の破骨細胞形成系において分化促進する、第 56 回 歯科基礎医学会、福岡国際会議場、福岡県、福岡市、2014 年 9 月 26 日
3. **Takuya Notomi**, Ikuaki Karasaki, Yuichi Okazaki, Nobukazu Okimoto, Yushi Kato, Kiyoshi Ohura, Masaki Noda, Toshitaka Nakamura, Masashige Suzuki, Insulinogenic sucrose+amino acids mixture ingestion immediately after resistance exercise has an anabolic effect on bone compared with non-insulinogenic fructose+amino acids mixture in growing rats, ASBMR 2014 Houston, Texas, USA, 13th September 2014
4. Yoichi Ezura, Tadayoshi Hayata, **Takuya Notomi**, Ichiro Sekiya, Masaki Noda, Preferentially expressed genes in synovium derived stromal cells include atypical genes not expressed highly in mouse synovium but in embryonic cartilages, ASBMR 2014 Houston, Texas, USA, 13th September 2014
5. **納富拓也**、唐崎郁晃、岡崎雄一、沖本信和、加藤雄士、大浦清、野田政樹、中村利孝、鈴木正成、レジスタンス運動直後のインスリン高刺激性糖(砂糖)+アミノ酸溶液摂取は、インスリン低刺激性糖(果糖)+アミノ酸溶液摂取に比べて骨量・骨強度を増大させる、第 32 回 日本骨代謝学会、大阪国際会議場、大阪府、大阪市、2014 年 7 月 25 日
6. 川崎真希理、早田匡芳、中元哲也、**納富拓也**、江面陽一、野田政樹、培養軟骨細胞 ATDC5 において、TGF-beta1 は一次繊毛構成遺伝子 Ifi88 の発現を抑制し、一次繊毛を短縮させる、第 32 回 日本骨代謝学会、大阪国際会議場、大阪府、大阪市、2014 年 7 月 25 日
7. **納富拓也**、江面陽一、野田政樹、破骨細胞分化段階における細胞内 Ca²⁺動態とイオンチャネルの役割、次世代の会シンポジウム 2、第 87 回 日本薬理学会年会、東北大学、宮城県、仙台市、2014 年 3 月 19 日
8. 江面陽一、近藤久貴、長尾雅史、Smriti Aryal、鈴木允文、早田匡芳、**納富拓也**、野田政樹、メカニカルストレスに応じた骨代謝制御に関わる分子機構の解明、第 36 回 分子生物学会、神戸国際会議場、兵庫県、神戸市、2013 年 12 月 5 日
9. **納富拓也**、Light-induced membrane potential regulates bone cell function; development of the light-responsive bone cells, CBI 学会 2013 年大会、タワーホール舟堀、東京都、江戸川区、2013 年 11 月 30 日
10. Takayuki Yamada, Tadayoshi Hayata, **Takuya Notomi**, Yoichi Ezura, Kiyoshi Harada, Masaki Noda, β_2 Adrenergic Receptor agonist suppresses BMP-induced osteoblastic differentiation in MC3T3E-1 cells while epinephrine modulates it differently, ASBMR 2013, Baltimore, Maryland, USA, 7th October 2013
11. **Takuya Notomi**, Miyuki Kuno, Yoichi Ezura, Masaki Noda, Depolarizing Membrane Potential by PTH and VD₃ Regulates RANKL-intracellular Transportation; A Novel Mechanism of PTH- and VD₃-induced Osteoclastogenesis, ASBMR 2013, Baltimore, Maryland, USA, 6th October 2013
12. Yoichi Ezura, Tadayoshi Hayata, **Takuya Notomi**, Ichiro Sekiya, Masaki Noda, Genes significantly highly expressed in synovium derived stromal cells than in bone marrow derived cells are conserved both in mouse and human, and may contribute to higher potential for chondrogenic differentiation, ASBMR

- 2013, Baltimore, Maryland, USA, 6th October 2013
13. Makiri Kawasaki, Tetsuya Nakamoto, **Takuya Notomi**, Tadayoshi Hayata, Yoichi Ezura, Masaki Noda, TGF-β1 inhibits maturation of chondrogenic cell line ATDC5 by impeding canonical hedgehog signaling through direct down-regulation of ciliary component gene Ift88, ASBMR 2013, Baltimore, Maryland, USA, 6th October 2013
 14. Jumpei Shirakawa, Yoichi Ezura, Makiri Kawasaki, Takayuki Yamada, Shuichi Moriya, **Takuya Notomi**, Tadayoshi Hayata, Ken Omura, Masaki Noda, PTH Additively Enhances The Mechanical Stress-induced Proliferation of Calvarial Osteoblasts, ASBMR 2013, Baltimore, Maryland, USA, 5th October 2013
 15. Shuichi Moriya, Tadayoshi Hayata, Jumpei Shirakawa, Makiri Kawasaki, **Takuya Notomi**, Yoichi Ezura, Kazuo Kaneko, Masaki Noda, Tob1, a BMP repressor, is activated by parathyroid hormone in osteoblasts in vitro and in vivo and reciprocally regulates PTH signaling, ASBMR 2013, Baltimore, Maryland, USA, 5th October 2013
 16. 江面陽一、早田匡芳、中元哲也、**納富拓也**、関谷一郎、宗田大、野田政樹、滑膜・半月板および靭帯由来間葉系幹細胞における選択的発現遺伝子の同定、第31回 日本骨代謝学会、神戸国際会議場、兵庫県、神戸市、2013年5月10日

〔図書〕(計1件)

1. **納富拓也**(宮村実晴編) ニュー運動生理学(運動と骨格:骨形態) 真興交易(株)医書出版部、262-270頁、2014

〔産業財産権〕

出願状況(計 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：
 出願年月日：
 取得年月日：
 国内外の別：

〔その他〕
 ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

納富拓也 (NOTOMI, Takuya)
 大阪歯科大学・歯学部
 講師
 研究者番号：70542249

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：