

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2014～2016

課題番号：26713052

研究課題名(和文)メカニカルストレスによって制御される運動器による免疫系の動的恒常性と破綻

研究課題名(英文)Homeostatic interaction between locomotor and immune system induced with mechanical stress

研究代表者

林 幹人(Hayashi, Mikihiro)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号：50581914

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,200,000円

研究成果の概要(和文)：組織や細胞はメカニカルストレスを感知・情報伝達し、機能的な応答反応によって環境に適応できるように自らを調節・再構築しており、微小重力環境においては、生体恒常性が維持できなくなることが知られている。本研究ではメカニカルストレス負荷・免荷状態における運動器が産生する因子による免疫系細胞の制御に焦点をあて、トランスクリプトーム解析等を用いたスクリーニングから、運動器がメカニカルストレスを感受して免疫制御に関わる可能性のあるいくつかの分子を発見し、コンディショナル欠損マウスの作製を行うことで、メカニカルストレス-運動器-免疫系の分子基盤の解明を目指した。

研究成果の概要(英文)：Tissues and cells are coordinated and remodeled to adapt to various environmental situations by sensing and transducing the signals induced by mechanical stress. It is well known that the human body homeostasis cannot maintain in the condition of microgravity. In this study, from the transcriptomic screening and functional analysis, we identified the immunoregulatory factors expressed in locomotor system induced by mechanical loading/unloading and analyzed conditional knockout mice in which these factors are deleted in skeletal muscle and/or osteocytes.

研究分野：骨代謝学

キーワード：メカニカルストレス 骨細胞 運動器

1. 研究開始当初の背景

超高齢化社会を迎えつつある我が国では、2050年には高齢化率が約40%に達することが見込まれている。運動器障害は寝たきりの主な原因のひとつであり、運動機能の低下は自立した生活を障害し生命予後を決定的ため大きな社会問題となっている。一方、宇宙などの微小重力環境においては、骨量が年間で約20%近く減少することが知られており、骨に蓄えられたミネラルが急激に生体外に失われていくことによるミネラル代謝異常が引き起こされると同時に、運動器の主要構造である筋肉も機能低下・筋萎縮に至ってしまう。また、運動器だけに限らず、免疫機能などの低下も非常に早い段階から現れることが知られている。すなわち、重力による刺激、メカニカルストレスが様々な生体恒常性の維持に重要な影響を及ぼしていることが示唆される。骨においてメカニカルストレスを主に感知しているのは、骨細胞という骨の中に存在する細胞であり、骨細胞が重力や運動刺激を感知して骨そのものの健康に重要な役割を果たすことが知られている。一方、骨を含む運動器がメカニカルストレスを感受してどのように免疫制御に関わっているかという機構やその過程に関わる因子に関しては未だ非常に不明な点が多く残されていた。

2. 研究の目的

本研究ではメカニカルストレスによる骨を含めた運動器の応答とそれらによる免疫機能制御に関して焦点をあてた。メカニカルストレス負荷・不動化・筋萎縮モデル等での骨構成細胞を含む運動器のトランスクリプトーム・プロテオーム解析や遺伝子改変マウス作製等により、運動器による免疫制御機構の解明を目指した。すなわち、バイオメカニクスと分子生物学・免疫学を融合することで、生体・細胞レベルでのメカニカルストレスに

よる免疫系の調節機構を理解し、その基本原理を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究ではメカニカルストレス負荷・免荷状態における運動器が産生する因子による免疫系細胞の制御に焦点をあて、トランスクリプトーム解析等を用いたスクリーニングから、骨を含む運動器がメカニカルストレスを感受して免疫制御に関わる分子の絞込みを行った。細胞・生体レベルでのメカニカルストレスによる免疫制御の全貌解明を目指すため、以下の3点の研究計画を実施した。

(1) 生体レベルでの力学的負荷・免荷による微小重力・メカニカルストレス負荷モデルを作製した。Ckm-Creを用い、ある遺伝子の筋肉特異的な欠損マウスを作製することで筋芽細胞の生存率の著しい低下を引き起こさせ、加齢とともに筋肉量が急激に減少するモデルを作製した。このマウスでは筋萎縮に伴うメカニカルストレスの低下が起こり、骨を含む多臓器に影響が見られた。また、尾部を飼育ケージ上部に固定し後肢のみ脱荷重した尾部懸垂マウスモデルも使用し、解析を行った。一方、自発的なレジスタンストレーニングを評価するメカニカルストレス負荷システムとして、マウス専用のクライミング運動負荷システムを構築し、経時的なメカニカルストレス応答性分子の解析を行った。

(2) 骨や筋肉の細胞においてメカニカルストレスによって発現変動する遺伝子を同定するため、(1)で作製した各種モデルマウスから得られる各組織・細胞における発現遺伝子のトランスクリプトーム解析を行い、免疫系細胞の分化能・機能に対する影響を解析した。

(3) 運動器のメカニカルストレス受容による免疫制御・破綻メカニズムを生体レベルで明らかにするために、コンディショナル遺伝子欠損マウスを作製し、Bglap-Creマウスや

Dmp1-Cre マウスなどを用い、ターゲット遺伝子の特異的に欠損させたマウスを作製し解析を行った。

4. 研究成果

(1) 生体レベルでの力学的負荷・免荷による微小重力・メカニカルストレス負荷モデルの作製とそれらにおける免疫系の影響

加齢に伴う筋肉減少を誘導することでメカニカルストレス免荷モデルを構築し、メカニカルストレスの軽減に伴う顕著な骨量低下を確認した。また、クライミング運動負荷モデルにおける適切なトレーニング期間の条件検討を行い、筋肉量の増加とそれに伴う骨量増加を確認した。さらに、尾部懸垂マウスモデルとトレッドミル負荷モデルも同時に構築し、これらのマウスモデルにおける運動器と免疫系での変化を確認した。

(2) 網羅的な解析による運動器・免疫系連環因子の同定

上述の複数のマウスモデルから腓腹筋とヒラメ筋、骨芽細胞画分、骨細胞を多く含む骨画分を採取した。さらに、それらの RNA を精製し、トランスクリプトーム解析を行うことで骨や筋肉の細胞においてメカニカルストレスによって発現変動する遺伝子の絞り込みを試みた。また、in vitro で伸展刺激を加えた骨細胞株の RNA-seq 解析を行い、骨細胞特異的なメカニカルストレス応答性遺伝子の絞り込みを行った。これらの結果から、特に細胞骨格関連タンパク質の発現がいずれの組織・細胞においてもメカニカルストレス負荷によって顕著に誘導されることが確認された。さらに、複数の液性因子をコードする遺伝子発現がメカニカルストレス負荷によって変動することも明らかになった。これらの因子のうち特に免疫系細胞の分化に影響する因子を絞り込んだ。

(3) コンディショナル遺伝子改変マウスの作出による生体レベルでの機能解析

上記(2)で絞り込みを行った遺伝子のうち、コンディショナル欠損マウスが存在しないものに関して、作製を行った。現在、これらのマウスと骨構成細胞特異的 Cre 発現マウスを交配し、in vivo における免疫系細胞に対する生理的な機能解析を行っている。さらに、これらのマウスにメカニカルストレス負荷・免荷を行い、免疫系細胞に対する影響を検討中である。

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 3 件)

林幹人、中島友紀、セマフォリンシグナルによる骨リモデリング制御、THE BONE、査読無、30、2016、151-156

Haruhiko Nakamura, Tomoki Nakashima, Mikihito Hayashi, Naohiro Izawa, Tetsuro Yasui, Hiroyuki Aburatani, Sakae Tanaka, Hiroshi Takayanagi, Global epigenomic analysis indicates protocadherin-7 activates osteoclastogenesis by promoting cell-cell fusion.、Biochemical and Biophysical Research Communications、査読有、455、2014、305-311

林幹人、中島友紀、造血系細胞から分化する破骨細胞の分化制御、CLINICAL CALCIUM、査読無、24、2014、487-500

[学会発表](計 10 件)

井上綾乃、林幹人、中島友紀、骨芽細胞系細胞における Sema3A の発現制御機構、第 33 回日本骨代謝学会学術集会、2015 年 7 月 25 日、京王プラザホテル(東京都・新宿区)

林幹人、中島友紀、高柳広、骨細胞が産生する Sema3A による骨代謝制御、第 1 回日本骨免疫学会、2015 年 7 月 1 日、ホテルブリ

ーズベイマリーナ（沖縄県・宮古島市）

林幹人、中島友紀、高柳広、Sema3A による骨代謝制御、第 87 回日本生化学会大会、2014 年 10 月 16 日、国立京都国際会館（京都府・京都市）

Mikihito Hayashi, Tomoki Nakashima, Hiroshi Takayanagi、Regulation of bone metabolism by Semaphorin 3A derived from osteoblast lineage cells., ASBMR 2014 Annual Meeting、2014 年 9 月 13 日、ヒューストン（アメリカ合衆国）

中村春彦、中島友紀、林幹人、高柳広、田中栄、破骨細胞分化にともないヒストン修飾が活性型に変化する遺伝子群の解析、第 1 回骨免疫会議、2014 年 7 月 4 日、万国津梁館（沖縄県・名護市）

林幹人、中島友紀、高柳広、Sema3A による骨代謝制御、第 35 回日本炎症・再生医学会、2014 年 7 月 2 日、万国津梁館（沖縄県・名護市）

中村春彦、中島友紀、林幹人、高柳広、田中栄、破骨細胞分化において RANKL により活性化される遺伝子群の解析、第 35 回日本炎症・再生医学会、2014 年 7 月 2 日、万国津梁館（沖縄県・名護市）

岡本一男、林幹人、中島友紀、高柳広、EF-hand タンパク質を介した破骨細胞分化と赤血球生成制御、第 35 回日本炎症・再生医学会、2014 年 7 月 1 日、万国津梁館（沖縄県・名護市）

Mikihito Hayashi, Tomoki Nakashima, Hiroshi Takayanagi、Regulation of bone metabolism by Semaphorin 3A.、5th International Conference on Osteoimmunology、2014 年 6 月 16 日、コス島（ギリシャ）

Kazuo Okamoto, Mikihito Hayashi, Tomoki Nakashima, Hiroshi Takayanagi、Regulation of erythropoiesis by an EF-hand protein identified as a regulator

of osteoclastogenesis.、5th International Conference on Osteoimmunology、2014 年 6 月 16 日、コス島（ギリシャ）

〔図書〕(計 1 件)

Mikihito Hayashi, Tomoki Nakashima, Hiroshi Takayanagi、Springer Japan、Semaphorins: A Diversity of Emerging Physiological and Pathological Activities Semaphorins in Bone Homeostasis、2015、159-173

〔産業財産権〕

○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 0 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

6. 研究組織

(1)研究代表者

林 幹人 (HAYASHI, Mikihito)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究

科・助教

研究者番号：50581914

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()