

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 16 日現在

機関番号：37114

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462907

研究課題名(和文)破骨細胞Ca²⁺活性化K⁺チャネルの骨吸収シグナル制御分子としての機能解明研究課題名(英文)Elucidation of the functional roles of Ca²⁺-activated potassium channels in osteoclastic bone resorption

研究代表者

岡本 富士雄 (OKAMOTO, FUJIO)

福岡歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：60153938

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：破骨細胞に発現するCa²⁺活性化K⁺チャネル(Kca)の骨吸収における役割を検討した。成熟破骨細胞は複数のKCaを発現し、中でもKCa3.1の発現が高かった。Kca3.1のチャネル機能を抑制するとアクチンリングが消失し、骨吸収活性が抑制された。また、成熟破骨細胞にはTRPM7を含む複数の非選択的陽イオンチャネルが発現し、これらのチャネル機能を阻害しても骨吸収活性が抑制された。以上の結果より、成熟破骨細胞に発現するKca3.1は非選択的陽イオンチャネルを介したCa²⁺流入のレギュレーターとして細胞内Ca²⁺濃度を調節し、骨吸収に必須のアクチンリングの形成維持に関与することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We investigated the functional role of Ca²⁺-activated K⁺ channels (Kca) in osteoclastic bone resorption. Mature osteoclasts derived from mouse bone marrow cells abundantly expressed Kca 3.1. Pharmacological inhibition of Kca 3.1 led to rapid disappearance of ring-like actin conformation (actin-ring) and reduced bone resorption activity. Other Kca blockers had no effect on both the actin-ring conformation and the bone resorption activity. Mature osteoclasts also expressed non-selective cation channels including TRPM7. Inhibition of these cation channels also reduced the bone resorption activity. These results suggest that Kca 3.1 expressed in mature osteoclasts serves as a regulator of Ca²⁺ influx through the non-selective cation channels, which contribute to the formation of actin-ring, an essential process for the bone resorption.

研究分野：口腔生理学

キーワード：骨代謝 破骨細胞 カルシウム活性化カリウムチャネル TRPチャネル 骨吸収

1. 研究開始当初の背景

高齢化が進む中、健康寿命の延伸を図ることは、生活の質の向上とともに医療や介護費用の削減につながる重要課題である。健全な骨格を形成し維持することは、ロコモティブシンドローム（運動器症候群）を予防し、健康寿命延伸の根幹となる。そのためにも、骨粗鬆症や関節リウマチなどの骨破壊性疾患の原因解明及び新たな治療法の開発は社会的急務である。骨破壊性疾患の多くは、破骨細胞による骨吸収が亢進した病態である。従って、その原因解明と治療法の開発には、破骨細胞の骨吸収調節機構を統括的に理解することが重要である。

私たちは、以前より破骨細胞に発現する様々なイオン輸送体の機能を明らかにしてきた。その一連の研究で、破骨細胞には細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇によって活性化される Ca^{2+} 活性化 K^+ チャンネルが存在することが分かっていたが、未だその機能は十分に理解されていない。破骨細胞の Ca^{2+} 活性化 K^+ チャンネルの機能を解明することは、新規の骨吸収調節機序及び薬剤の開発基盤となる標的分子の特定につながる有益な情報を提供できる可能性が高い。そこで、本研究では破骨細胞の Ca^{2+} 活性化 K^+ チャンネルの機能解析を行うこととした。

2. 研究の目的

破骨細胞の分化誘導から骨吸収機能調節において、細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) 上昇は、細胞内情報伝達系活性化のトリガーとして重要な事象である。多くの非興奮性細胞には、刺激応答の初期に発生する $[Ca^{2+}]_i$ 上昇をポジティブフィードバック(正帰還)的に増幅する機構が普遍的に存在し、その中心的役割を担う分子機序として Ca^{2+} 活性化 K^+ チャンネル (Kca チャンネル) と非選択的陽イオンチャンネル (TRP チャンネル) の機能連関が注目されている。破骨細胞にも Kca チャンネルと TRP チャンネルが発現しているため、両者の機能連関及び骨吸収機能との関係を明らかにする意義は大きいと考えられる。

本研究では、破骨細胞の骨吸収調節における Kca チャンネルの役割を明確にする目的で、Kca チャンネルと TRP チャンネルによる正帰還 $[Ca^{2+}]_i$ 濃度調節機構の存在を検証し、その機能的役割と分子機序を調べた。

3. 研究の方法

マウス成熟破骨細胞に発現する Ca^{2+} 活性化 K^+ チャンネル (Kca チャンネル) と TRP チャンネルの分子種を明らかにし、Kca チャンネルと TRP チャンネルとの機能連関が正帰還 $[Ca^{2+}]_i$ 制御機構を発動するという仮説を $[Ca^{2+}]_i$ 動態と Patch clamp 法によるイオン輸送動態を解析して立証する。また、Kca チャンネルの機能阻害による正帰還 $[Ca^{2+}]_i$ 制御への影響及び破骨細胞の骨吸収活性に及ぼす影響を検討する。さらに、正帰還 $[Ca^{2+}]_i$ 制御機構を動

員する骨吸収調節因子を検索する。

本研究に用いた主な実験法

(1) 破骨細胞の誘導

マウスの骨髄細胞を M-CSF (20 ng/ml) 存在下で培養して骨髄マクロファージを誘導し、RANKL (80 ng/ml) 刺激により破骨細胞を誘導した。また、マウス骨髄細胞と骨芽細胞をコラーゲンゲルに播種し、 PGE_2 と活性型ビタミン D_3 存在下で共培養して破骨細胞を誘導した。多核 (3 核以上) で酒石酸耐性酸性フォスファターゼ (TRAP) 活性を有し、リン酸カルシウムをコートしたプレート上に吸収窩を形成する細胞を成熟破骨細胞として実験に用いた。

(2) 破骨細胞に発現する Ca^{2+} 活性化 K^+ チャンネル (Kca チャンネル) の同定

Kca チャンネルおよび非選択的陽イオンチャンネル (TRP チャンネル) の発現を Western blot 法により検出し、分子種を検討した。

(3) 電気生理学的手法を用いた Kca チャンネルと TRP チャンネルのチャンネル機能の解析

破骨細胞へ Whole-cell patch-clamp 法を適用し、Kca チャンネル及び TRP チャンネルを介して流れるイオン電流を分離して誘導し、各々のイオンチャンネル活性を評価した。 K^+ 電流の誘導には、生理的環境に近い正常電極内液 (in mM): 100 K aspartate, 40 KCl, 1 MgCl₂, 2 ATP-2Na, 0.1 EGTA, 10 HEPES, Tris (pH7.4) 及び正常細胞外液: 140 NaCl, 6 KCl, 2.5 CaCl₂, 0.5 MgCl₂, 10 glucose, 10 HEPES, Tris (pH7.4) を用いた。TRP チャンネルを介する陽イオン電流の誘導には、 K^+ チャンネルおよび Cl^- チャンネルを抑制するため、電極内液 (in mM): 140 Cs methanesulfonate, 8 NaCl, 3 MgCl₂, 10 EGTA, 10 HEPES, Tris (pH7.4) 及び細胞外液: 140 NaCl, 6 CsCl, 2.5 CaCl₂, 0.5 MgCl₂, 10 glucose, 10 HEPES, Tris (pH7.4) を用いた。一部の実験では Mg^{2+} を除去した電極内液及び細胞外液を用いた。

(4) 破骨細胞に発現する Kca チャンネル及び TRP チャンネルの機能抑制

Kca チャンネル及び TRP チャンネルの機能抑制には選択的チャンネル阻害剤を用いた。阻害剤投与によるチャンネル電流、骨吸収活性に及ぼす効果を検討した。また、破骨細胞分化に及ぼす影響についても検討した。さらに、Kca チャンネルの欠損による機能変化を検討するために、shRNA による発現抑制を試みた。

(5) 骨吸収活性の評価

破骨細胞の骨吸収活性は酒石酸耐性酸性フォスファターゼ (TRAP) 活性及びアクチンリングの有無を指標にして評価した。アクチンリングは蛍光標識ファロイジン (ローダミンファロイジン) でアクチン染色を行い可視化した。また、破骨細胞をリン酸カルシウムコートしたプレート上で培養し、破骨細胞が分泌する酸によって形成された吸収窩 (リン酸カルシウムが溶けた痕) の面積を計測して骨吸収活性を評価した。

4. 研究成果

(1) 破骨細胞に発現する Kca チャンネルの分子種検索

マウス骨髄細胞を M-CSF により骨髄マクロファージを誘導し、さらに RANKL にて破骨細胞へと分化させた。この分化過程における K⁺ チャンネルの発現を調べた。Kca チャンネルは大きく 3 種類、large-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel (BK 型)、intermediate-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel (IK 型)、small-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel (SK 型) に分類される。これまでの報告によると、破骨細胞には BK 型 (Sausbier et al., PLoS One. 2011) と IK 型 (Kca3.1 (KCNN4) (Kang et al., Cell Rep. 2014) が発現していることが示されている。また、電位依存性 K⁺ チャンネル (Kv1.3) (Komarova et al., Curr Pharm Des. 2001) の発現も報告されている。そこで、骨髄細胞、骨髄マクロファージ、成熟破骨細胞におけるこれらのチャンネルの発現を調べた (図 1)。その結果、Kca3.1 (KCNN4) は骨髄細胞にはほとんど認められなかったが、骨髄マクロファージおよび破骨細胞に発現していることが分かった。特に破骨細胞に高発現していた。また、破骨細胞への分化とともに Kv1.3 の発現が高まった。なお、他の Kv 型や BK 型はほとんど検出できなかった。

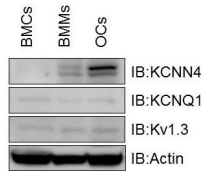


図 1

(2) 破骨細胞に発現する Kca チャンネルの電気生理学的性質

BK 型、IK 型、SK 型 Kca チャンネルはそれぞれ異なった組織分布、薬理学特性を示し、様々な細胞機能に関与しているが、いずれも [Ca²⁺]_i 上昇を感受して活性化されるという共通の性質を有している。そこで、破骨細胞から [Ca²⁺]_i 上昇に伴って活性化する K⁺ 電流を記録した (図 2)。

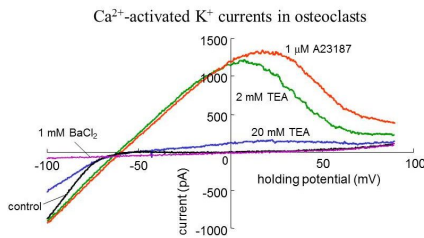


図 2

まず、正常電極内液及び細胞外液で whole-cell 電流を誘導すると、過分極により活性化される内向き整流性 K⁺ 電流 (I_{Kin}) が記録された (control)。続いて、細胞外液にカルシウムイオノフォアである A23187 を添

加して [Ca²⁺]_i を上昇させると、外向き電流が活性化された。この電流は膜電位を陽極側に保持すると不活性化され、その反転電位 (reversal potential = -72 mV) は理論上の K⁺ の平衡電位 ($E_K = -80$ mV) に近似した。また、[Ca²⁺]_i 上昇により活性化された電流は、その大部分が Kca チャンネル阻害剤である tetraethylammonium chloride (TEA) によって抑制された。しかしながら、カルシウムイオノフォア A23187 を添加しなくとも -70 mV 付近に反転電位もつ電流が自発的かつ間欠的に活性化されることが分かった (図 3A b)。その外向き電流成分は膜電位を陽性 (0 ~ +90 mV) に保持しても不活性化されず、この性質は A23187 で誘発された電流と異なった。A23187 は [Ca²⁺]_i を数 μM にまで上昇させるため、分子種の異なる複数の Kca チャンネルが活性化された可能性が考えられる。

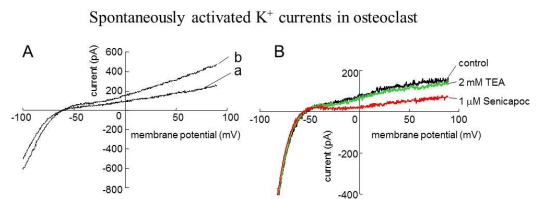


図 3

そこで正常イオン環境下 (正常電極内液及び正常細胞外液) で誘導される電流 $I_{control}$ に I_{Kca} が含まれる可能性を検討した (図 3B)。 $I_{control}$ は TEA により部分的に抑制されたが、Kca3.1 の選択的阻害剤である ICA-17043 (Senicapoc) を追加投与すると、外向き K⁺ 電流がさらに抑制され、 $I_{control}$ には I_{Kca} が含まれていることが明らかになった (図 3B)。

I_{Kca} はすべての破骨細胞で常に観察されるわけではなく、内向き電流の活性化に続いて数十秒から数分間に渡り観察される例が多かった (図 4A)。また、膜を過分極させて内向き電流を誘発させると、外向き電流が活性化され (図 4B)、Kca3.1 の選択的阻害剤 (Senicapoc) により抑制された。

Ca²⁺-activated K⁺ currents enhanced by a transient inward current

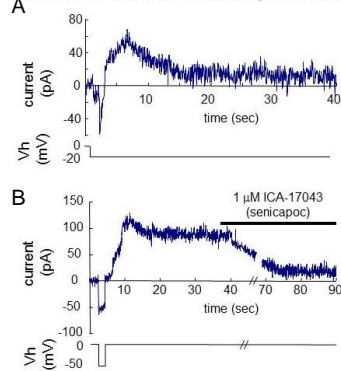


図 4

骨吸収を抑制するカルシトニンやビスフォスフォネートは成熟破骨細胞の Kca チャンネル活性に影響しなかった。一方、RANKL

を成熟破骨細胞に投与すると、 I_{KCa} が一過性に活性化したが、その活性化に対する Senicapoc や他の K^+ チャンネル阻害剤の効果は検討できなかった。RANKL 誘導性に活性化される I_{KCa} が $Kca3.1$ の活性化によるものかどうかは今後の検討課題である。

(3) 破骨細胞形成に対する K^+ チャンネル阻害剤の効果

RANKL 刺激による破骨細胞誘導系を用いて、破骨細胞形成に及ぼす種々の K^+ チャンネル阻害剤の効果を検討した (図 5)。

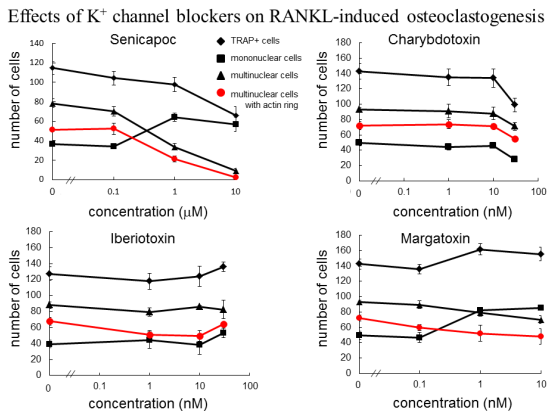


図 5

$Kca 3.1$ を含む IK 型チャンネルを阻害する Senicapoc (100 nM ~ 1 μM) は、濃度依存的に全 TRAP 陽性細胞数、多核 TRAP 陽性細胞数およびアクチンリングを有する多核細胞数を減少させた。一方、全 TRAP 陽性細胞に占める単核の TRAP 陽性細胞の数は増加した。この結果は、 $Kca 3.1$ の発現抑制により、単核/マクロファージの細胞融合が抑制されて多核の破骨細胞が形成されないという報告(Kang et al., Cell Rep. 2014)と一致した。 $Kca1.1$, 1.2 および $Kv1.3$ の阻害剤である Charybdotoxin は nM オーダーでチャンネル阻害作用を示すが、全 TRAP 陽性細胞数、アクチンリングを有する多核細胞数に影響しなかった。また、 $Kv1.3$ の阻害剤で Kca に作用しない Margatoxin も破骨細胞形成に影響がなかった。 $Kca1.1$ の阻害剤である Iberiotoxin もまた破骨細胞形成に影響しなかった。

(4) 成熟破骨細胞に対する K^+ チャンネル阻害剤の効果

アクチンリングに及ぼす効果

コラーゲンゲル上で形成された成熟破骨細胞をコラーゲナーゼ処理により剥離して回収し、プラスチックディッシュに再度播種した。細胞が接着した後、アクチンリングに対する Senicapoc、Charybdotoxin、Margatoxin の作用を検討した (図 6)。

播種した多核の TRAP 陽性破骨細胞のうち、約 75% の細胞が接着後、アクチンリングを形成したが、Senicapoc を投与により濃度依存

的にアクチンリングの形成が抑制された。しかし、Charybdotoxin、Margatoxin はアクチンリングの形成に影響しなかった。TRP チャンネル阻害剤であるルテニウムレッドおよび TRP チャンネルの活性を促進または抑制する 2-APB は、チャンネル阻害作用を示す濃度 (μM オーダー) 及び作用時間 (投与後 30 分以内) において、成熟破骨細胞のアクチンリング形成をわずかに抑制した。

Abolition of actin-ring by $Kca3.1$ inhibitor (Senicapoc)

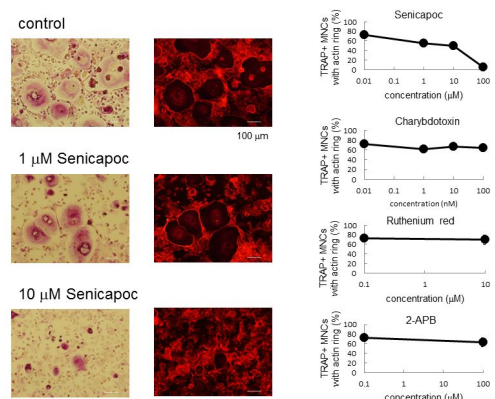


図 6

骨吸収活性に及ぼす効果

コラーゲンゲル上で形成された成熟破骨細胞を回収してリン酸カルシウムをコートしたプレートに再度播種して 24 ~ 36 時間培養した。その後、細胞を除去し吸収窩の面積を計測した (図 7)。

Senicapoc は濃度依存的に吸収窩面積を減少させ、骨吸収活性を抑制した。一方、Charybdotoxin、Margatoxin は骨吸収活性に影響しなかった。

TRP チャンネルを全般的に阻害するルテニウムレッドは骨吸収を抑制した。また、TRPV チャンネルを活性化し、TRPM7 チャンネルを抑制する 2-APB も骨吸収を抑制した。なお、shRNA による $Kca 3.1$ の発現抑制を試みたが、成熟破骨細胞では効果的に発現を抑制できなかったため、 $Kca 3.1$ 欠損による骨吸収活性への影響は検討できなかった。

Effects of blockers of K^+ and TRP channels on osteoclastic bone resorption

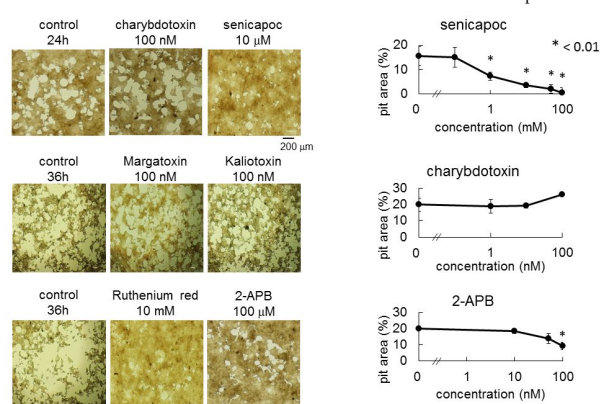


図 7

(5) 総括

破骨細胞は単核の前駆破骨細胞が融合して多核の破骨細胞が形成される。最近、この多核化に Ca^{2+} 活性化 K^+ チャンネル Kca 3.1 が必要であることが報告された(Kang et al., Cell Rep. 2014)。一方、我々は本研究において Kca 3.1 は前駆破骨細胞のみならず成熟破骨細胞にも強く発現し、イオンチャンネルとして機能することを証明した。また、成熟破骨細胞に発現する Kca 3.1 は骨吸収に関与することを明らかにした。

成熟破骨細胞に発現する Kca 3.1 は、定常的には活性化されていなかったが、細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇に連動して間欠的に活性化されると考えられた。また、細胞によっても Kca 3.1 の活性化の程度が異なることが分かった。

我々は破骨細胞には非選択的陽イオンチャンネルである TRPV2 (Kjiya et al., 2010) や TRPM7 (Okamoto et al., 2013) が発現すること。TRPM7 は歯牙や骨を構成する非興奮性細胞に発現し、細胞内 Ca^{2+} シグナルの形成に寄与していることを報告している。破骨細胞に発現する Kca 3.1 の活性化は細胞膜を過分極させ、これらの非選択的陽イオンチャンネルを介した Ca^{2+} 流入の駆動力を形成すると考えられた。本結果より Kca 3.1 と特に TRPM7 との機能連関が示唆され、細胞内ストアからの Ca^{2+} 放出が細胞外からの Ca^{2+} 流入を促進するというポジティブフィードバック (正帰還) 制御の分子実体を機能的に明らかにすることができた。

Kca 3.1 の活性化に伴う細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇は、成熟破骨細胞に形成されたアクチンリングの維持に必要であり、Kca 3.1 を選択的に阻害することによって骨吸収活性が効果的に抑制されることが明らかになった。

健康寿命の延伸を図る上で、骨粗鬆症、関節リウマチ、癌の骨転移などの骨破壊性疾患に対する有効な治療法の確立は急務である。本研究成果は、成熟破骨細胞に発現する Kca 3.1 が骨吸収制御における新たな分子として創薬ターゲットになり得る可能性を示唆する。

<引用文献>

Sausbier U et al., Osteopenia due to enhanced cathepsin K release by BK channel ablation in osteoclasts. PLoS One 2011; 6(6):e21168.

Kang H et al., Kcnn4 is a regulator of macrophage multinucleation in bone homeostasis and inflammatory disease. Cell Rep. 2014; 8(4):1210-1224.

Kajiya H, Okamoto F, Nemoto T, Kimachi K, Toh-Goto K, Nakayana S, Okabe K. RANKL-induced TRPV2 expression regulates osteoclastogenesis via calcium oscillations. Cell Calcium. 2010; 48(5):260-269.

Okamoto F et al., The properties of Mg^{2+} -inhibited TRPM7-like channel in mouse osteoclasts. The Journal of Physiological Sciences 2013; 65 Suppl. S196

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)

〔学会発表〕(計 5 件)

緒方佳代子、福島秀文、圓谷智之、岡 暁子、岡本富士雄、片桐千秋、鍛冶屋 浩、松下正之、尾崎正雄、岡部幸司、TRPM7 は歯の石灰化に関与する、第 66 回西日本生理学会、平成 27 年 10 月 9 日、久留米

緒方佳代子、福島秀文、岡本富士雄、岡 暁子、永島勝之、尾崎正雄、岡部幸司、Chanzime TRPM7 は歯の石灰化に関与する、第 33 回日本骨代謝学会、平成 27 年 7 月 23 日、東京

Tomoyuki Tsumuraya, Hideo Fukushima, Chiaki Katagiri, Fujio Okamoto, Koji Okabe, Masayuki Matsushita, Expression analysis of TRPM7 in odontoblasts. The 92th Annual Meeting of the PSJ/The120 Annual Meeting of the JAA, 平成 27 年 3 月 21 日、神戸

Tomoyuki Tsumuraya, Chiaki Katagiri, Fujio Okamoto, Koji Okabe, Masayuki Matsushita, Expression analysis of TRPM7 in the odontoblasts. 第 37 回日本分子生物学会、平成 26 年 11 月 25 日 27 日、横浜

片桐千秋、圓谷智之、岡本富士雄、岡部幸司、松下正之、象牙芽細胞における TRPM7 の発現解析、第 91 回日本生理学会、平成 26 年 3 月 17 日、鹿児島

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡本 富士雄 (OKAMOTO, Fujio)

福岡歯科大学・口腔歯学部・講師

研究者番号：60153938

(2) 研究分担者

鍛冶屋 浩 (KAJIYA, Hiroshi)

福岡歯科大学・口腔歯学部・講師

研究者番号：80177378

(3) 研究分担者

岡部 幸司 (OKABE, Koji)

福岡歯科大学・口腔歯学部・教授

研究者番号：80224046