

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：17201

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K18468

研究課題名(和文) Piezo1で解き明かす骨内血管新生と骨形成の機能的関

研究課題名(英文) Piezo1 are involved in coordination of angiogenesis and osteogenesis

研究代表者

西山 めぐみ(Nishiyama, Megumi)

佐賀大学・医学部・助教

研究者番号：00802844

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：骨量恒常性の維持に関する骨局所の血流については未だ明らかでない。近年、軟骨内骨化の最前線である骨軟骨移行部および骨内膜部に位置し、CD31およびEndomucinを強発現するH型血管が報告された。この血管は高い血管新生能と骨形成誘導能を持つ。本研究では、H型血管内皮細胞にはメカノセンサー分子が発現しており、血行力学負荷を感知することで細胞は活性化し、血管新生と骨形成に寄与すると考えた。メカノセンサー分子同定と関与するメカニズム解明のため、胎仔期マウスや骨減少病態モデルマウスの骨軟骨、骨内血管でメカノセンサー分子の発現解析を行った結果、複数のイオンチャネルの発現が見られ、その関与が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

適度な運動が骨量を維持することは一般によく知られている。昨今の臨床分野では運動と同様の効果を示す運動模倣薬の登場が待たれている。本研究の成果は骨形成作用を期待し力学刺激を模倣する治療として、メカノセンサーイオンチャネル作動薬を用いた薬理的刺激が新たな治療選択肢となる可能性を示唆する。

研究成果の概要(英文)：The role of local blood flow in bone mass homeostasis is still unclear. Recently, type H vessels that strongly express CD31 and Endomucin were reported to be located at the osteochondral junction and endosteum, which are the front lines of endochondral ossification. These vessels have high angiogenic and osteogenic induction abilities. In this study, we hypothesized that endothelial cells of type H vessels express mechanosensor molecules and are activated by sensing hemodynamic load, contributing to angiogenesis and osteogenesis. To identify the mechanosensor molecules and elucidate the mechanisms involved, we performed morphological expression analysis of mechanosensor molecules in osteochondral and endosteal vessels of fetal mice and osteoporotic model mice, and found expression of several ion channels, suggesting their involvement.

研究分野：細胞生物学

キーワード：メカノバイオロジー イオンチャネル 骨代謝 血管新生 血管内皮細胞 骨芽細胞 破骨細胞 骨粗鬆症

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

社会の超高齢化に伴い骨粗鬆症患者数は上昇の一途をたどり、骨折による **QOL** 低下や医療経済上の損失が問題となっている。骨粗鬆症患者の易骨折性は骨減少に起因し、その抑制は社会の大きな課題である。骨量恒常性の維持には力学負荷や血流、神経刺激などが関与しているとされるが骨局所の血流については未だ明らかでない。

近年、骨代謝に血管が重要な役割を果たしていることが明らかになり注目を集めている。2014年に **Ralf H. Adams** らにより、軟骨内骨化の最前線である骨軟骨移行部および骨内膜部に位置し、**CD31** および **Endomucin** の強い発現を示す血管内皮細胞のサブタイプが報告され、**H** 型血管と名付けられた。**H** 型血管内皮細胞は盛んな血管新生能と骨形成誘導能を有し、骨芽細胞と近接した位置関係にある。さらに、同血管は加齢に伴って減少することから骨粗鬆症発症に関与する可能性が示唆された。

血管は流体によるせん断応力、静水圧、壁伸展に伴う張力といった種々の力学負荷を受ける器官である。血管内皮細胞は力学負荷を感知する能力を有することが知られているが、感知機構の詳細や責任分子(メカノセンサー)の全容は未だ明らかでない。研究代表者は、先述の **H** 型血管内皮細胞は血行力学負荷を感知して活性化し、血管新生と骨形成誘導をもたらすのではないかと考えた。この着想に基づき、本研究では、**H** 型血管内皮細胞が力学負荷を感知することの証明、細胞力覚の責任分子の同定、細胞動態の変化をもたらすメカニズムの解明を試みた。

H 型血管内皮細胞の力学刺激感知に関与する分子の候補を想定するにあたり、本研究では力学刺激感受性イオンチャネル **Piezo1**, **Piezo2** や **TRPV4** に着目した。**Piezo1** はマウス胚血管内皮細胞に発現し、せん断応力や静水圧により直接活性化される性質をもつ。血管の発生にも関与し、**Piezo1** 遺伝子欠損マウスは血管形成障害によって胎生致死となることが知られている。**Piezo2** もせん断応力や細胞膜の変形に感受性があるとされ、注目を集める分子である。**TRPV4** はマウス血管内皮細胞での発現が確認されており、圧刺激や浸透圧、温熱刺激に感受性がある。これらの分子、およびメカノセンサーと考えられる細胞内骨格や細胞接着因子の関与も想定に含め、下記の通り実験を計画した。

2. 研究の目的

本研究は、**H** 型血管内皮細胞が力学負荷を感知することの証明、細胞力覚の責任分子の同定、細胞動態の変化をもたらすメカニズムの解明を通じて、骨粗鬆症をはじめとする骨減少性疾患の治療に資する標的分子、標的シグナル経路の発見を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 軟骨内骨化期マウス胎仔の繁殖および形態学的、免疫学的解析

発生初期段階の軟骨内骨化における **H** 型血管および骨軟骨組織の観察を行うため、軟骨原基への血管侵入が観察可能な時期として、マウス胎生 **14.5** 日齢から **15.5** 日齢を選択した。胎仔は **C57BL/6N** マウスの交配により確保した。胎仔からは後肢の長管骨となる部分を採取し標本とした。

本項を含め、本研究で行われたすべての動物実験は佐賀大学動物実験委員会の承認を得て動物福祉に配慮し行った。

(2) 骨減少病態モデルマウスの作出

本研究では骨減少病態を模倣する疾患モデル動物として、炎症性疾患モデルマウスおよび尾部懸垂飼育モデルマウスを、**6** から **10** 週齢の雄性 **C57BL/6N** マウスを用いて作出した。研究代表者が当時所属した研究室では、卵白アルブミン投与による喘息モデルマウスにおいて、炎症性病態の結果骨減少が引きこされることが見出されている。尾部懸垂飼育モデルでは、飼育ケージ内でマウスを尾部懸垂状態に置くことで後肢が非荷重状態に置かれる。その状態を維持し飼育した結果、骨への力学負荷が低下して骨減少がもたらされる。

以上のモデルマウスを通常飼育の健常群マウスと同様に標本作成し、骨減少病態モデルマウスにおいてメカノセンサー分子の発現局在やその多寡について比較検討を行い、違いが見られる分子を骨減少あるいは骨形成の責任分子候補として、さらなる解析の対象とした。

(3) マウス骨軟骨組織・血管組織の形態学的解析

(1,2)において安楽死したマウスより骨組織(大腿骨、脛骨、頭蓋冠など)を採取し、凍結切片作成装置により厚さ **5-10μm** の切片を作製した。形態評価はヘマトキシリン エオジン染

色による定性的評価および骨形態計測による定量的評価を行った。

(4) マウス骨軟骨組織・血管組織におけるメカノセンサー分子の発現解析

定性的評価として、(3)と同様に得た標本に対し免疫組織化学染色法を用い、分子発現の局在様式とその多寡を評価した。免疫組織化学染色の一次抗体には市販の抗体に加え、特異的抗体を独自に作製し、特異的結合を評価の上使用した。観察には高精細のレーザー顕微鏡を用い、高解像度での解析が可能な条件を確立した。

定量的評価として、骨組織より蛋白質を抽出し、メカノセンサー分子に対して免疫ブロッティングを行った。

(5) マウス個体へのメカノセンサー分子作動薬投与による骨量増加効果の検証

血管新生と骨形成誘導の責任分子を同定の後、当該分子の作動薬を用いて骨量の増生、あるいは骨減少の抑制が確認できるか検証する。(本実験は下記に述べる理由により未実施)

計画の遅延

本研究課題は当初 2019 年度から 2021 年度の 3 か年計画で実行していたが、2021 年度初頭から研究代表者の病気療養により研究は大幅に遅延した。病気より復帰次第再開の予定であったため、研究課題の中断申請は行っていない。最終的には病状悪化により一年間の遅延となり、研究計画を変更して、研究課題の 2022 年度までの延長手続きを行った。その後病状回復し 2022 年度から研究に復帰したが、同年度より所属研究室から異動したために新たな研究環境での研究計画の再構築を試みることとなった。

4. 研究成果

研究代表者は胎仔期と成体期、および健常群と骨減少病態モデルにおいて、骨軟骨組織、血管組織を観察し、骨形成、骨減少の過程においてメカノセンサーが果たす役割を明らかにすることを目指した。

(1) 軟骨内骨化期マウス胎仔の繁殖、および形態学的、免疫学的解析

胎生期マウスでは 14.5 日齢から 15.5 日齢にかけて、軟骨原基に血管が侵入する像が段階を追って観察できた。大腿骨軟骨および軟骨膜には **Piezo2** の発現が確認された。

(2) 骨減少病態モデルマウスの作出

炎症性疾患モデルマウスでは炎症が惹起され、大腿骨で海綿骨量が減少した。尾部懸垂飼育マウスは適切な飼育条件を確立するまでに習熟を要した。最終的には尾部懸垂飼育により後肢の骨量には減少傾向が見られた。

(3) マウス骨軟骨組織・血管組織の形態学的解析

喘息モデルマウスの骨芽細胞は健常群に比して扁平で、類骨に向けた細胞突起の数が減少していた。尾部懸垂飼育モデルの形態解析は研究の遅延により完遂できていない。

(4) マウス骨軟骨組織・血管組織におけるメカノセンサー分子の発現解析

成体マウス健常群の長管骨において、骨軟骨移行部では軟骨基質内へ侵入する血管内皮細胞に **Piezo1** が発現していた。また、成体マウス健常群の長管骨遠位端の海綿骨、皮質骨、軟骨、骨髄組織には **Piezo2** の発現が認められた。**Piezo2** は骨芽細胞、破骨細胞、骨細胞に認められ、特に骨面上の骨芽細胞、一次海綿骨の骨梁表面、および皮質骨の骨内膜表面上に存在する骨芽細胞に強く発現していた。マウス長管骨の軟骨部分では、**TRPV4** の発現を認めた。

(5) マウス個体へのメカノセンサー分子作動薬投与による骨量増加効果の検証

本実験は研究の遅延により未実施となった。

今後の展望

本研究により、骨軟骨組織や血管組織といった、微小環境において力学刺激が生じる器官では、組織を構成する細胞にはメカノセンサーイオンチャネルの発現が見られており、力学刺激感受性を持つことが示唆された。力学負荷の刺激が伝達される過程を経て、細胞動態が変化することが予想される。

研究代表者は研究計画を再構築する中で、物理刺激の中でも流体によるせん断応力がもたらす刺激とその影響について新たに着目した。また複数の細胞種が共存する生体内において、細胞間相互作用がもたらす影響の重要性は無視できない。現在、骨や腎において毛細血管や腎尿細管の細胞が微小環境の構成因子に刺激を受けることで起きる事象のメカニズムを明らかにする取り組みを行っている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田原愛理, 高イキ, 曹愛琳, 大崎康吉, 本田裕子, 西山めぐみ, 内野加穂, 西田寛汰, 城戸瑞穂
2. 発表標題 マウス大腿骨におけるメカノセンサーの炎症による発現調節
3. 学会等名 日本解剖学会 第75回九州支部学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西田寛汰, 高イキ, 曹愛琳, 本田裕子, 西山めぐみ, 田原愛理, 内野加穂, 城戸瑞穂
2. 発表標題 骨形成における血管新生と機械刺激感受性陽イオンチャネルの発現
3. 学会等名 日本解剖学会 第75回九州支部学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 内野加穂, 吉本怜子, 西山めぐみ, 本田裕子, 澤田孟志, 城戸瑞穂
2. 発表標題 軟骨内骨化におけるTRPV4遺伝子欠失の影響
3. 学会等名 日本解剖学会 第76回九州支部学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 内野加穂, 吉本怜子, 西山めぐみ, 澤田孟志, 高イキ, 曹愛琳, 本田裕子, 城戸瑞穂
2. 発表標題 The effect of Transient receptor potential-vanilloid 4 (TRPV4) deletion on endochondral ossification
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高イキ, 澤田孟志, 曹愛琳, 吉本怜子, 大内雅博, 福山哲平, 西山めぐみ, 大崎康吉, 城戸瑞穂
2. 発表標題 アレルギー性炎症マウスにおける骨減少
3. 学会等名 第40回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 城戸瑞穂, 高イキ, 澤田孟志, 吉本怜子, 西山めぐみ, 福山哲平
2. 発表標題 骨組織における力センサー Piezo チャネルの局在と骨減少
3. 学会等名 第40回日本骨代謝学会学術集会
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

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