

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：17201
研究種目：挑戦的研究（萌芽）
研究期間：2020～2023
課題番号：20K21683
研究課題名（和文）メカノセンサーチャネルを標的とした新たな骨形成促進

研究課題名（英文）Mechanosensitive ion channels and bone formation

研究代表者
城戸 瑞穂（Kido, Mizuho）

佐賀大学・医学部・教授

研究者番号：60253457
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：社会の高齢化に伴い骨粗鬆症患者数は増加の一途を辿り、骨折は認知症の発症や生命予後にも関わることから、その解決は喫緊の課題である。近年の骨粗鬆症治療薬の発展が効果が上がっているが、未だ副反応などの課題もある。そこで、骨形成を促す新たな標的として骨形成の適刺激である力のセンサーであるメカノセンサーイオンチャネルを位置付け、骨形成および骨吸収への関わりをマウスモデルを用いて明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義
寝たきりや無重力のような力の負荷の減少は骨は弱くし、力が加わると骨が増えることはよく知られている。近年、力刺激の大きさに応じて膜電流量を変化させるイオンチャネル、Piezoチャネルが骨の力の受容センサーとして研究が進んできたが、未だその機能は不明な点が多い。私たちは特異的抗体の作製に成功し、超解像顕微鏡観察により、Piezo1、Piezo 2が骨芽細胞に強く発現し、細胞内の特有の構造的特徴を示すことを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：As in the ageing society the growing number of patients with osteoporosis is a serious problem in Japan, because bone fractures are associated with the onset of dementia and life prognosis. Recent developments in the treatment of osteoporosis have improved their effectiveness, but there are still issues such as adverse reactions. We set here a mechanosensitive ion channels, as a new target for promoting bone formation, which are sensors of force, because force is the optimal stimulus for bone formation. Using a mouse model, we found out the mechanosensitive ion channels were involved in bone formation and resorption.

研究分野：組織細胞生物学

キーワード：メカノセンサー 骨代謝

1. 研究開始当初の背景

社会の高齢化に伴い骨粗鬆症患者数は増加の一途を辿り、我が国では1300万人に上るとされている。例えば、年間15万人以上とされる大腿骨近位部骨折は、骨折を契機に寝たきりや認知症の発症に繋がる、あるいは誤嚥性肺炎などを引き起こすこともあり、2万人余りは死に至る。よって、健康寿命の延伸のためには、骨の質と量を維持することが求められているが、未だその解決の途上にある。骨粗鬆症治療の方法は発展し、成果が上がっている。例えば、骨粗鬆症治療薬であるビスホスホネート系薬剤やエストロゲン製剤が、骨折予防に効果を上げている。しかし、副反応である顎骨壊死や深部静脈血栓症などの課題も残されている。多くの骨粗鬆症治療薬は、骨吸収を担う破骨細胞機能抑制を標的としているがゆえに、骨維持のための破骨細胞機能までも過剰に抑制しているとも考えられることができることから、骨形成を活性化する新たなアプローチが望まれている。

古くから、力学的な負荷が骨量を増やすことはWolff's Lawとして知られている。そして、寝たきりや無重力のような負荷の減少により骨は弱くなる。骨の力覚センサーはいくつか報告されているが、長く明らかではなかった。2010年にPatapotianのグループから、細胞膜への圧入あるいは吸引刺激の大きさに応じて膜電流量を変化させる陽イオンチャネルPiezo1, Piezo2が発見された。私たちは、このユニークなメカノセンサーイオンチャネルに着目し、骨における力覚センサーと想定し、研究を進めていたところ、Piezo1がマウスの骨芽細胞の分化に影響を与えることや骨芽細胞特異的なPiezo1遺伝子欠失マウスや骨形態異常が起こることが相次いで報告された。しかし、Piezo1, Piezo2の信頼できる抗体がなかったことから、その機能局在は不明なままであった。そこで、私たちはPiezo1, Piezo2の特異的な抗体の作製を行い、骨形態形成にこれらのメカノセンサーイオンチャネルがどのように機能しているのかを明らかにしようと考えた。

2. 研究の目的

1. Piezo1 および Piezo2 が骨組織においてどのような機能局在を示すのかを明らかにする。
2. 骨芽細胞において、Piezo1 および Piezo2 の機能を知るために、骨形成中の骨芽細胞および分化に伴いどのように発現を変化させるのかを明らかにする。
3. Piezo1 および Piezo2 が骨基質形成との関連を明らかにする。
4. 骨減少病態と Piezo1 および Piezo2 との関連を明らかにする。

3. 研究の方法

すべての動物実験は佐賀大学動物委員会における審査を受け、承認を得て、動物福祉に配慮して実施した。

1. Piezo1 および Piezo2 の特異的抗体の作製

ウサギおよびモルモットをアジュバントと共にペプチドを抗原として投与し、血清を採取した。精製したIgGの免疫組織化学を行い、すでに発現が報告されている神経組織等で認識できる抗体を選別した。さらに、Piezo1やPiezo2のタグ融合蛋白を発現する遺伝子改変マウスより組織を採取し、発現局在を比較した。

さらに、Human Embryonic Kidney (HEK) 293細胞に mouse および human の Piezo1

あるいは Piezo2 を遺伝子導入して培養した。その後、細胞膜および細胞質のタンパクを採取し、SDS-PAGE ゲルを用いて電気泳動を行った。作製した抗体を用いた免疫ブロッティングを実施した。

2. 免疫組織化学

深麻酔下の野生型マウスを灌流固定し、長管骨を採取した。通法に従い凍結切片を作製し、蛍光免疫染色を実施した。観察は、一般的な顕微鏡観察、レーザー顕微鏡等を用いた。さらに、超解像顕微鏡を用い、XY 方向の解像度は 140nm, Z 方向の解像度は 200nm を実現していることを確認し、観察を実施した。

3. 細胞培養

新生仔マウス頭蓋冠より間葉系細胞を単離し、骨芽細胞の初代培養を行った。アスコルビン酸、グリセロリン酸を添加し、硬組織形成を促した。分化過程の骨芽細胞を固定し、免疫細胞化学を行った。

4. 骨減少モデルマウスの作製

骨減少病態モデルとして、卵白アルブミン誘導の喘息モデルを作出した。アジュバントとして用いるアルミニウムゲルのみを投与する群と、溶媒であるリン酸緩衝生理食塩水のみを投与するマウスを対照群とした。喘息モデルが作出されていることを確認するため、気管支および肺組織を採取し、通法の切片を作製したのちにヘマトキシリンエオジン染色および PAS 染色を施し、顕微鏡にて観察を行った。長管骨は固定後 Micro CT 撮像を行い、骨の三次元形態定量解析を実施した。さらに、対側の長管骨は通法に従い、組織切片を作製し、alkali phosphatase 染色、tartrate resistance acid phosphatases 染色を行った。さらに、骨形成に関連するマーカーの特異的抗体を用いた免疫染色を施し、顕微鏡観察を行った。

4. 研究成果

1. Piezo1 および Piezo2 の特異的抗体の characterization

作製した抗体の評価のため、それぞれの cDNA を遺伝子導入した HEK293 細胞より採取したタンパクおよび陰性対象として遺伝子導入を行っていない細胞からのタンパクを比較した。すると、Piezo1 に対する抗体は Piezo1 導入細胞のタンパクのみを認識し、Piezo2 は認識しなかった。また Piezo2 に対する抗体は Piezo2 導入細胞のタンパクのみを認識し、Piezo1 は認識しなかった。また、マウス個体レベルにおける免疫組織化学により、特異性を確認した。タグを融合した遺伝子改変マウスの組織と同等の免疫反応陽性局在を示したことから、作製した抗体は特異的であると考えられた。

2. 骨組織における Piezo1 および Piezo2 の局在の解明

マウス脛骨あるいは大腿骨から採取したタンパクは Piezo1 および Piezo2、それぞれ 230kDa 程度の陽性バンドを示した。組織切片の免疫染色では、軟骨、骨、血管、一部の骨髄細胞が陽性を示した。Piezo1 および Piezo2 は骨芽細胞に強い発現局在を示した。陽性反応は表面細胞膜に加え、細胞内にも認められた。蛍光二重染色組織の超解像イメージングにより細胞表面膜の Piezo1 および Piezo2 は共存、あるいは近接しているものもあったが、異なる部位にも認められた。細胞内では異なる細胞内小器官に特徴的であった。初代培養骨芽細胞もそれぞれの抗体で認識した。

3. 骨減少モデルにおける Piezo1 および Piezo2 発現への影響

卵白アルブミン誘導喘息モデルが作成されていることを、肺組織の HE 染色および

PAS 染色により確認を行った。μCT の三次元骨解析により卵白アルブミン誘導喘息マウスは溶媒のみあるいはアジュバントのみを投与したマウスの骨と比較して骨量が有意に少ないことがわかった。さらに、骨形成に関わる分子、Piezo1 および Piezo2 の発現を比較したところ、卵白アルブミン誘導喘息マウスの骨組織では、対照群に比べ有意に減少していた。

以上より、Piezo1 および Piezo2 は成熟した骨芽細胞に発現し、骨減少によりその発現を低下させることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 城戸瑞穂, 高イ琦, 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（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高イ琦, 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 福山哲平, 西田寛汰, 吉本怜子, 澤田孟志, 高イ琦, 城戸瑞穂
2. 発表標題 軟骨原基への血管侵入とメカノセンサーイオンチャネル
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 福山哲平, 西田寛汰, 吉本怜子, 澤田孟志, 高イ琦, 城戸瑞穂
2. 発表標題 マウス軟骨原基への血管侵入に関わるメカノセンサーチャネル 第78回日本解剖学会九州支部学術集会
3. 学会等名 第78回日本解剖学会九州支部学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 福山哲平, 吉本怜子, 澤田孟志, 高イ琦, 曹愛琳, 城戸瑞穂
2. 発表標題 骨発生に伴う侵入血管の周辺微小環境とメカノセンサー
3. 学会等名 第64回日本顕微鏡学会 九州支部集会・学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 内野加穂, 吉本怜子, 澤田孟志, 高イキ, 曹 愛琳, 本田裕子, 城戸瑞穂
2. 発表標題 成長板軟骨の軟骨内骨化におけるTRPV4の役割
3. 学会等名 第127回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 内野加穂, 吉本怜子, 高イキ, 本田裕子, 牧野 優徳, 澤田 孟志, 山下 佳雄, 城戸 瑞穂
2. 発表標題 骨軟骨組織におけるTRPV4 遺伝子欠失の影響
3. 学会等名 第62回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 内野加穂, 吉本怜子, 西山めぐみ, 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 TRPV4 遺伝子欠失が骨軟骨組織に及ぼす影響
3. 学会等名 第126回日本解剖学会・第98回日本生理学会大会合同大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高イ琦, 澤田孟志, 曹愛琳, 吉本怜子, 福田孝一, 城戸瑞穂
2. 発表標題 骨代謝調節に関わるPiezoチャネルの機能局在
3. 学会等名 第129回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 高イ琦, 澤田孟志, 曹愛琳, 吉本怜子, 大内雅博, 福山哲平, 大崎康吉, 城戸瑞穂
2. 発表標題 喘息モデルマウスにおける骨代謝調節
3. 学会等名 第128回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2023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
研究 分担者	吉本 怜子 (Reiko Yoshimoto) (70878181)	佐賀大学・医学部・助教 (17201)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	西山 めぐみ (Megumi Nishiyama) (00802844)	佐賀大学・医学部・助教 (17201)	
研究分担者	本田 裕子 (Yuko Honda) (60295053)	佐賀大学・医学部・教務職員 (17201)	

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