

機関番号：12602

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21890071

研究課題名(和文) 神経伝達物質受容体・イオンチャネルを介した力学的負荷伝達機構の解明

研究課題名(英文) mechanical signaling via ion channels and neuronal transmitter-receptors

研究代表者

納富 拓也(NOUTOMI TAKUYA)

東京医科歯科大学・歯と骨のGCOE拠点・GCOE拠点形成特任教員

研究者番号：70542249

研究成果の概要(和文):

イオンチャネルの一つであり、ペースメーカーチャネルと呼ばれる HCN(Hyperpolarization activated cyclic nucleotide modulated channel)に着目して研究をすすめてきた。そのサブタイプの一つである、破骨細胞の酸放出部位である波状縁に局在している HCN1 の機能を HCN1 遺伝子欠損マウスにて検討した。また、骨芽細胞における HCN3 の役割の解析をすすめた。

1、骨形態計測法にて、HCN1 欠損マウスを野生型マウスの海綿骨骨量、骨構造、骨形成・骨吸収を評価した。HCN1 欠損マウスでは、野生型のマウスに比べて、海綿骨骨量が減少し、骨構造がもろくなっていた。また、骨形成指標と骨吸収指標が増加しており、高代謝回転型の骨量減少が生じていた。

2、パッチクランプ法を用いて、HCN により発生する電流(Ih)を成熟破骨細胞にて記録・解析した。HCN1 欠損マウス由来の破骨細胞においても、Ih が同定された。

3、骨芽細胞においては、HCN3 の骨芽細胞機能への関与が認められた。HCN3 を過剰発現させたところ、骨芽細胞の増殖が促され、骨芽細胞分化の指標である ALP の増大が認められた。

4、破骨細胞の HCN4 遺伝子をノックダウンすると、破骨細胞の Ih が大幅に減少した。このことから、破骨細胞における Ih は、HCN1 と HCN4 由来のものと考えられる

以上の結果から、HCN1 は、骨代謝回転を調節するとともに、破骨細胞の膜電位調節での役割が示唆された。さらに、HCN3 と骨芽細胞機能の関係から、HCN3 の骨形成における関与が考えられる

研究成果の概要(英文):

Our study focused on one of ion channels, pacemaker channel (HCN) in bone. HCN1 is localized around ruffled border area where osteoclast secretes acid. To elucidate the role of HCNs, HCN1 deficient mice were hired. The role of HCN3 in osteoblasts was investigated.

1: In HCN1-deficient mice, trabecular bone mass and the structural parameter of Trabecular Number were significantly lower, whereas Trabecular Separation was significantly higher, in HCN1-KO than in wild type (WT). Histomorphometric indices of bone formation (MAR and BFR/BS) and resorption (Oc.S/BS and Oc.N/BS) were increased.

2: Patch clamp recordings showed that HCN1-deficiency decreased the activation rate of the hyperpolarization-activated current although the amplitude was same as WT, probably because other HCN subtypes remained intact.

3: Overexpression of HCN3 by transfecting the gene enhanced proliferation of WT-osteoblasts as measured by total cell number.

4: Osteoclastic Ih was significantly reduced by knockdown of HCN4, suggesting that osteoclastic Ih could be generated from HCN1 and HCN4.

The high bone turnover in HCN1-KO was likely to be based on cellular dysfunctions. HCN1 could modulate acid secretion and differentiation in osteoclasts. In addition, lack of HCN1 upregulated expression of HCN3 in osteoblasts. HCN3 may contribute to

osteoblastic bone formation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,050,000	315,000	1,365,000
2010年度	950,000	285,000	1,235,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,000,000	600,000	2,600,000

研究分野：骨生理学

科研費の分科・細目：医歯薬学・整形外科学

キーワード：骨、破骨細胞、イオンチャネル

1. 研究開始当初の背景

老化や閉経に伴う骨粗鬆症患者数は1000万人といわれ、高齢化社会をむかえて、その患者数は増加し続けている。この治療・予防に運動のような力学的負荷は有効であると報告されている。しかしながら、力学的負荷の強い運動（レジスタンス運動）による骨代謝・骨形態変動についてのメカニズムは明確にされていない。これは、動物に運動負荷することの難しさによると考えられる。このメカニズムを検討するために、ラットが非侵襲的にレジスタンス運動をおこなうクライミング運動とヒトと同様に直立運動をおこなうスクワット運動を開発することで本研究の着手を可能とし、力学的負荷の骨に与える影響から検討を開始した。これに関して、神経伝達物質およびそれに関連するイオンチャネルが関与していることを明らかにしてきた。

2. 研究の目的

われわれは、神経伝達物質受容体の一種AMPA型サブユニット(GluR2)と小胞性グルタミン酸トランスポーター(DNPI)が骨組織中に存在し、それは異なる細胞(骨芽細胞と破骨細胞)に異局在していることを確認した。さらに、近年クローニングされた電位依存性イオンチャネルの一種でペースメーカーチャネルと呼ばれるHCNが破骨細胞の波状縁に豊富に局在しており、骨代謝機構にとって重要な役割を担っていることを明らかにした。これらのことから、細胞-細胞間の接触を介して骨の細胞間で脳神経と類似した神経伝達物質・イオンチャネルによる電位変化を伴う情報伝達がおこなわれていると考えられるが、この伝達機構はほとんど明らかになっていない。そこで、経験に基づいた工学、脳科学および骨生物学を融合した方法を用いながら、脳

内神経伝達物質・イオンチャネルを介した力学的刺激による骨代謝機構の解明を目指す。

3. 研究の方法

1: 細胞間情報伝達では、伝達物質の放出部位とその受容体の局在位置は重要な要素である。また、それに伴う電位変化により開口するイオンチャネルの膜上の配置も深く関わっている。光学顕微鏡レベルでの確認後、免疫電顕法にて細胞膜上の局在と関連分子と共存関係を確認する。

2: 細胞間情報伝達の直接的証拠を得るために、電気生理・パッチクランプ法を用いる。受容細胞から電流記録をおこない、情報伝達時におけるイオンチャネル・受容体の骨芽細胞・破骨細胞における機能を検討する。

4. 研究成果

イオンチャネルの一つであり、ペースメーカーチャネルと呼ばれるHCN(Hyperpolarization activated cyclic nucleotide modulated channel)に着目して研究をすすめてきた。初年度では、そのサブタイプの一つである、破骨細胞の酸放出部位である波状縁に局在しているHCN1の機能をHCN1遺伝子欠損マウスにて検討した。また、骨芽細胞におけるHCN3の役割の解析をすすめた。具体的には次の通りである。

1. 骨形態計測法にて、HCN1欠損マウスを野生型マウスの海綿骨骨量、骨構造、骨形成・骨吸収を評価した。HCN1欠損マウスでは、野生型のマウスに比べて、海綿骨骨量が減少し、骨構造がもろくなっていた。また、骨形成指標と骨吸収指標が増加しており、高代謝回転型の骨量減少が生じていた。

2、パッチクランプ法を用いて、HCNにより発生する電流(Ih)を成熟破骨細胞にて記録・解析した。HCN1欠損マウス由来の破骨細胞においても、Ihが同定された。

3、骨芽細胞においては、HCN3の骨芽細胞機能への関与が認められた。HCN3を過剰発現させたところ、骨芽細胞の増殖が促され、骨芽細胞分化の指標であるALPの増大が認められた。

以上の結果から、HCN1は、骨代謝回転を調節するとともに、破骨細胞の膜電位調節での役割が示唆された。さらに、HCN3と骨芽細胞機能の関係から、HCN3の骨形成における関与が考えられる。

次年度では、HCNサブタイプの一つである、破骨細胞の酸放出部位である波状縁に局在しているHCN1とHCN4の機能を検討した。具体的には次の通りである。

1、パッチクランプ法を用いて、HCNにより発生する電流(Ih)を成熟破骨細胞にて記録・解析した。HCN1欠損マウス由来の破骨細胞においても、Ihが同定された。これは、HCNの別のサブタイプ由来のものと考えられ、このサブタイプの同定を試みた。

2、破骨細胞における別のサブタイプの発現様式を確認したところ、HCN4の発現が認められた。

3、破骨細胞のHCN4に着目して、研究を進めた。siRNAにより、HCN4遺伝子をノックダウンすると、破骨細胞のIhが大幅に減少した。このことから、破骨細胞におけるIhはHCN1とHCN4由来のものと考えられる。

以上の結果から、HCN1とHCN4について破骨細胞の膜電位調節での役割が示唆された。今後、さらにHCNの破骨細胞機能・酸放出との関係を検討する。

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5件)

Hanyu R, Hayata T, Nagao M, Saita Y, Hemmi H, Notomi T, Nakamoto T, Schipani E, Knonenbery H, Kaneko K, Kurosawa H, Ezura Y and Noda M, Per-1 is a specific clock gene regulated by parathyroid hormone (PTH) signaling in osteoblasts and is functional for the transcriptional events induced by PTH, *Journal of Cellular Biochemistry*, 査読有, 112, 2011, 433-438

Kamolratanakul P, Hayata T, Ezura Y, Kawamata A, Hayashi C, Yamamoto Y, Hemmi H, Nagao M, Hanyu R, Notomi T, Nakamoto T, Amagasa T, Akiyoshi K and Noda M,

Nanogel-based scaffold delivery of prostaglandin E(2) receptor-specific agonist in combination with a low dose of growth factor heals critical-size bone defects in mice, *Arthritis and Rheumatism*, 査読有, 63, 2011, 1021-1033

Nagao M, Saita Y, Hanyu R, Hemmi H, Notomi T, Hayata T, Nakamoto T, Nakashima K, Kaneko K, Kurosawa H, Ishii S, Ezura Y and Noda M., Schnurri-2 deficiency counteracts against bone loss induced by ovariectomy, *Journal of Cellular Physiology*, 査読有, 226, 2011, 573-578

Noda M, Nagao M, Hanyu R, Mizoguchi F, Notomi T, Hayata T, Nakamoto T and Ezura Y., Control of bone remodeling by nervous system. [Nervous system and bone], 査読有, 20, 2010, 1801-1805

Sakai H, Moriura Y, Notomi T, Kawawaki J, Ohnishi K and Kuno M, Phospholipase C-dependent Ca²⁺-sensing pathways leading to endocytosis and inhibition of the plasma membrane vacuolar H⁺-ATPase in osteoclasts, *American Journal of Physiology*, 査読有, 299, 2010, C570-C578

[学会発表](計7件)

納富 拓也、遺伝子導入に基づく破骨細胞機能の光学的新規制御システムは陽イオンチャネル依存性膜電位変動により破骨細胞分化を促進する、日本骨代謝学会、2010

Takuya Notomi, Genetic conversion of osteoclast precursor to be responsive to light-controlled cation channel activation enhances differentiation upon modulation of their membrane potential, ASBMR 2010 Annual Meeting, 2010

Takuya Notomi, Pacemaker channel HCN1 affects osteoclast function in vitro and bone remodeling in vivo, 31st ASBMR Annual Meeting, 2009

Takuya Notomi, Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide modulated channels (HCN) in bone cells: Roles of HCN1 and HCN3 in bone remodeling, 36th International Congress of Physiological Sciences, 2009

Takuya Notomi, Pacemaker channel HCN1 affects bone remodeling, Sokendai International Symposium 2009, 2009, (招待講演)

納富 拓也、ペースメーカーチャネル(HCN1)の破骨細胞機能と骨代謝機構への関与、日本骨代謝学会、2009

納富 拓也、ペースメーカーチャネル(HCN1)の欠損は高代謝回転による骨量減少を引き起こす、骨形態計測学会、2009

[図書](計1件)

納富 拓也(宮村実晴編) 真興交易(株) 医書出版部、身体トレーニング(運動による骨形態・骨代謝の変化) 2009、430

〔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：
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)
東京医科歯科大学・歯と骨の GCOE 拠点・
GCOE 拠点形成特任教員
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：