

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 29 年 3 月 31 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22590291

研究課題名（和文）軟骨内骨化過程におけるメカノセンサー TRPV4 チャンネルの役割に関する研究

研究課題名（英文）The role of mechano-sensing channel TRPV4 in the process of endochondral bone formation

研究代表者

水野 敦子 (ATSUKO MIZUNO)

自治医科大学・医学部・助教

研究者番号：30364532

研究成果の概要（和文）：

TRPV4 は機械刺激で活性化する Ca^{2+} 透過性陽イオンチャンネルであり、軟骨細胞にも発現している。新たに TRPV4 との相互作用が推定される分子として見いだした Mtap7d1 も軟骨細胞に発現している。我々は軟骨におけるこれら分子の機能解明のため、遺伝子欠損マウス、TRPV4KO と Mtap7d1KO の骨格と成長板軟骨を調べた。TRPV4KO は尾椎の短縮と成長板軟骨部に部分的な発達異常を示した。Mtap7d1KO 新生仔には軟骨発達異常があり、軟骨細胞の分化と整列に障害が見られた。以上の結果から、両者は軟骨細胞の形成と分化に関わる重要な分子であることが示唆される。

研究成果の概要（英文）：

TRPV4 (transient receptor potential vanilloid 4) is a Ca^{2+} -permeable cation channel activated by mechanical stimuli, and the gene is expressing in chondrocytes. Mtap7d1, a novel molecule isolated as possibly association with TRPV4, is also expressing in chondrocytes. To elucidate their function, we examined the skeletal structure and the growth plate chondrocytes in the gene deficient mice, TRPV4-KO and Mtap7d1-KO. TRPV4-KO showed the short tails due to shortened caudal vertebrae and partial defects in spatial arrangement of chondrocytes in the growth plate. Mtap7d1-KO newborns showed moderate achondroplasia and disorderd chondrocyte column in the growth plate. These results indicate that TRPV4 and Mtap7d1 play essential roles in development and orientation of chondrocytes in the growth plate during bone formation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合 計
2 2 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2 3 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2 4 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総 計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：分子病態学、軟骨

1. 研究開始当初の背景

(1) 骨は、機械的外力刺激（メカニカルストレス）の影響下で成長し維持されている器官である。大腿骨など長管骨は、軟骨内骨化過程（骨端の軟骨細胞群の分化と細胞死の跡を埋めるように石灰化骨が形成される）を経て伸長するが、軟骨細胞がメカニカルストレスを感知する受容機構の全容は未解明である。

(2) TRP(transient receptor potential)チャネルファミリーは、動物共通の非選択性陽イオンチャネル群である。TRPチャネルは細胞膜上に存在し、熱・光・圧・化学物質等の多様な刺激で開口し、Ca²⁺等陽イオンの一過性流入により下流の様々なカスケードが進行する。TRPは、多様な刺激に対する受容機構に必須の構成分子である。

(3) TRPV4 (transient receptor potential vanilloid 4)は、TRPV1（カプサイシン受容体、熱受容）と相関性が高く、神経、上皮等に局在し、圧、低浸透圧、特定範囲の温熱等の物理的刺激で活性化する。研究代表者らは、TRPV4 欠損マウス (TRPV4-KO) を作製し解析した結果、遺伝子欠損個体では、温度や浸透圧感受の異常の他、圧刺激応答も低下していることを報告した。これにより、TRPV4はメカノセンサーの構成分子である可能性が見いだされた。

(4) TRPV4は、骨組織の骨芽細胞、破骨細胞、軟骨細胞にも分布する。研究代表者らは、非荷重下での骨吸収亢進モデルである尾部懸垂試験では、TRPV4 欠損マウスは野生型に比べ海綿骨の減少が少ないことを報告した。骨組織におけるメカニカルストレス応答でのTRPV4の重要性が示唆される。しかし、軟骨での役割については検索されていない。

(5) 研究代表者らは、酵母 two-hybrid 法でのスクリーニングにより、マウス脳 cDNA ライブラリーから TRPV4 と相互作用を持つ可能性のある新規分子 (Map7R) を同定した。予備検討で、この分子の軟骨での発現が確認された。研究代表者らは、この新規分子の生理機能の解明に向け遺伝子欠損マウスを作製した。なお、当初は機能未知の細胞骨格関連分子であった Map7R は、後に正式名がマウスでは Mtap7d1 と統一されたため、本報告書では Mtap7d1 および遺伝子欠損マウスを Mtap7d1-KO と表記する。

2. 研究の目的

上記のように、軟骨におけるメカニカルストレス受容機構にも TRPV4 チャネルの関与が想定される。そこで、TRPV4-KO の軟骨組織を詳細に解析することにより、軟骨内骨化過程における TRPV4 の役割の解明を目指す。また、TRPV4 と相互作用を持つ可能性のある分子として見出した細胞骨格関連分子 Mtap7d1 について、TRPV4 と Map7R との

細胞内での分子動態を追跡し、両分子間の相互作用の有無を検索する。

さらに、Mtap7d1-KO マウスを自家繁殖し、野生型と Mtap7d1-KO の軟骨組織および軟骨細胞を組織学的・生理学的に比較することにより、軟骨形成における Mtap7d1 の役割を明らかにする。なお、新規遺伝子改変動物 Mtap7d1-KO は、遺伝子資源の保存と将来的な公開配布の目的で公的バンクへ寄託する (TRPV4-KO は 2006 年 RIKEN に寄託)。

3. 研究の方法

(1) マウスの繁殖・育種管理：

TRPV4-KO と野生型および Mtap7d1-KO の各系統を自治医科大学内で育種繁殖し実験材料を確保する。Mtap7d1-KO の遺伝子欠損ホモ個体は周産期致死のため、ヘテロ間交配で得る出生前胎仔を解析に使用する。

(2) TRPV4-KO の骨格と軟骨組織解析：

TRPV4-KO マウスの骨形成の状態と軟骨組織の形態を野生型と比較して詳細に解析する。また、軟骨組織を採取し、軟骨内骨化過程における軟骨細胞形態の組織学的解析を行う。

(3) TRPV4 と Mtap7d1 の相互作用の解析：

Mtap7d1 の C 末端認識ポリクローナル抗体を作製する。TRPV4 の C 末端と N 末端抗体および Mtap7d1 の N 末端抗体を用いて共免疫沈降等を行う。さらに、蛍光標識 TRPV4 と Mtap7d1 を発現するベクターを作製し、培養細胞内で両者を一過性に遺伝子発現させ、TRPV4 と Map7R との分子動態を可視化して顕微鏡下で追跡し、相互作用を調べる。

(4) Mtap7d1 の遺伝子解析：

遺伝子の塩基配列情報を基に Web 公開データベース等の検索を行い、Mtap7d1 の構造と機能を推定する。

(5) Mtap7d1-KO の表現型解析：

マウスの骨形成の状態と軟骨組織の形態を詳細に解析する。遺伝子欠損ホモ型が周産期致死となる原因を探るため胎仔を帝王切開により生存した状態で採取する。同腹の全個体を比較解析すると同時に遺伝子型判定を行い、同腹のホモ型と野生型を比較し、Mtap7d1 遺伝子欠損の影響を解析する。

計画変更と遅延：

東日本大震災(平成 23 年 3 月)と研究代表者の病氣療養により、実験研究の大幅な遅延と計画変更が生じた。震災時には飼育棚の破損、停電、公共交通機関の停止等により、実験材料のマウス飼育および試料に多大な損害と実験への支障が生じた。本研究に必須の材料であるマウス自家繁殖群の全動物を淘汰し、後日 RIKEN に寄託中の系統の導入を目指した。しかし、研究代表者の病状悪化により居室実験室も学内移動となり、動物群の再興と実験再開は残念ながら出来なかった。

4. 研究成果

(1) マウス系統の維持と寄託

22年度はTRPV4-KOとMtap7d1-KOおよび野生型の各系統を自治医科大学内で維持繁殖管理した。Mtap7d1-KOの遺伝子欠損ホモ個体は周産期致死のためヘテロで系統維持した。Mtap7d1-KOの2系統から凍結受精卵を採取しRIKENに寄託した。維持管理が困難となり23年度に全マウスを淘汰した。

(2) TRPV4-KO 骨格・軟骨組織の解析：

TRPV4-KOと野生型マウスの骨格の軟X線像では、少なくともKOの尾椎において有意な短縮が観察された。組織解析では、TRPV4-KO大腿骨骨端部成長板の一部に軟骨細胞の整列の乱れが観察された。軟骨細胞の初代培養系で伸展刺激や圧負荷し反応を比較する実験を計画したが中止となった。

(3) TRPV4とMtap7d1との相互作用の解析：

Mtap7d1のC末端を認識するポリクローナル抗体を作製した。作成済みのTRPV4抗体およびMtap7d1抗体を用いた共免疫沈降では、両者の結合は確認できなかった。また、蛍光標識TRPV4およびMtap7d1発現ベクターをCHO細胞へ導入し顕微鏡下で観察したが、TRPV4とMtap7d1とが相互作用を示す明瞭な像は観察されなかった。細胞の内部環境や他分子の関与で結合が影響を受ける可能性も考えられ、両者が高発現している軟骨細胞や神経細胞での発現実験が必要であろう。

(4) Mtap7d1の遺伝子解析：

Web公開データベースから再検索した結果、Mtap7d1遺伝子から推定されるアミノ酸配列はMAP7 (microtubule-associated protein 7, Mtap7, E-Map-115)と全体で約40%相同であり、特にN末端側のtubulin結合部位と、C末端側の種間で保存性の高い特徴的な領域(結合分子不明)で高い相同性があることから、機能的な類似性が示唆された。また、共免疫沈降法でも、Mtap7d1と微小管タンパク質tubulinとの結合は堅固であると確認できた。これら結果から、Mtap7d1はtubulin結合タンパク質MAPファミリーと考えられた。

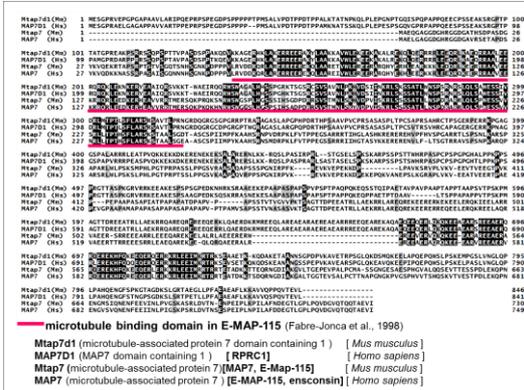


図1. Mtap7d1とMAP7のアミノ酸配列の比較

(5) Mtap7d1-KOの表現型解析：

遺伝子欠損ホモ型が周産期致死となる原因を探るため、胎生18.5日齢の胎子を帝王切開で摘出し、同腹個体を遺伝子型判定と同時に病理学的に比較した。個体間で脳や心肺等の内臓所見および心電図には特に異常は認められなかった。しかし野生型ではvon Frey hairによる刺激に応答し心拍数も増加し容易に蘇生するのに対し、ホモ型では強い刺激にも四肢の微動のみで自発呼吸は誘発されず全例死亡した(図2.)。Mtap7d1は脳で高発現しており、中枢や神経系で機能し生命維持に関わる必須分子であることが推察された。

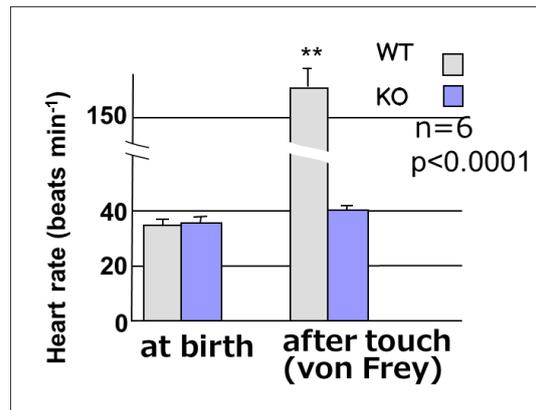


図2. 帝王切開胎仔への刺激による心拍数の変化

(6) Mtap7d1-KO 骨格・軟骨組織の解析：

骨格染色し野生型と比較した結果、ホモ型の脊柱はS字状とならず、胸郭がベル型で若干小さく、胸骨の奇形と鎖骨の配置にも異常が観察され、軟骨低形成と判定された(図3.)。

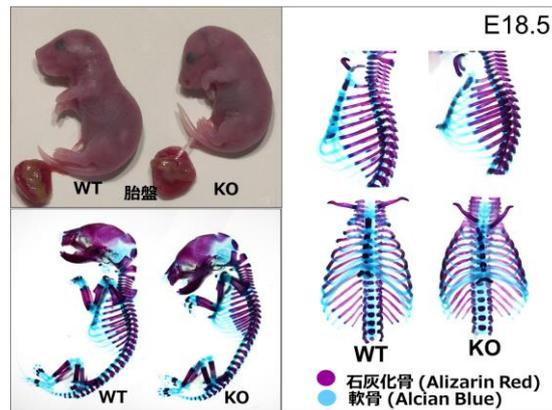


図3. Mtap7d1-KO 18.5日齢胎仔の骨格

組織学的解析により、大腿骨遠位端における成長板軟骨組織縦断面の観察結果を模式図と共に示す(図4.)。野生型では軟骨細胞が分化に伴い肥大しつつ柱状に並列した構造となるが、KOマウスでは柱状に整列せず、休止

期・増殖期の軟骨細胞の細胞外マトリクスも乏しかった。これら結果から、Mtap7d1は軟骨細胞の増殖分化に関わる重要分子であることが示唆された。

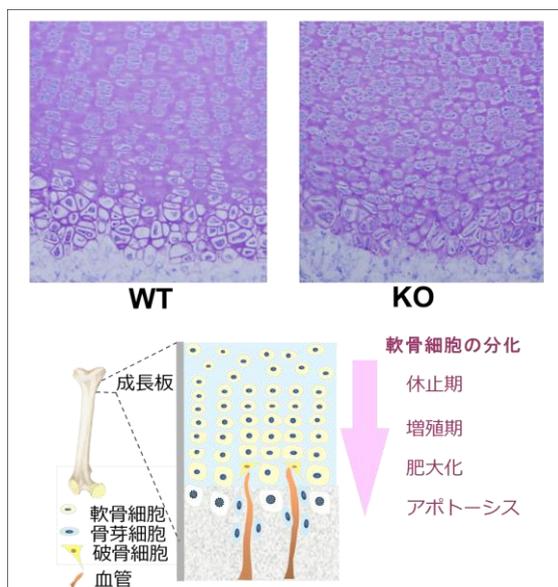


図4. Mtap7d1-KO18.5日齢胎仔の成長板軟骨

軟骨細胞の分化と整列した柱状構造の形成には細胞の極性が重要と考えられている。Mtap7d1は細胞骨格を介して極性に寄与し、軟骨細胞の細胞分裂や分化に関わる重要分子であるかも知れない。その解析には、軟骨細胞内の細胞骨格とMtap7d1を免疫染色して比較する等の手法が有効と考えられるが、今回は未実施である。

今後の展望

以上のように、TRPV4の他に、新たに注目したMtap7d1も、神経系に必須の分子であると同時に、軟骨形成にも重要な働きをしていることが示唆された。

研究代表者の長期病気療養により、本課題研究で当初計画していた実験の多くと論文投稿を断念することとなった。

しかしながら、本研究の過程で新規の遺伝子欠損マウスMtap7d1-KOを公的機関RIKENに寄託した。既に分与可能で提供依頼も届き始めた。ごく最近、Mtap7d1の結合分子が論文報告されている。

先に寄託済みのTRPV4-KOは既に世界の数十箇所の研究者に分与され基礎医学の多方面の研究に貢献している。これらを材料として、生体内でのTRPV4とMtap7d1の生理的意義の研究が進み、特に軟骨内骨化過程に関わるTRPV4とMtap7d1の果たす機能的役割が明かされ、メカノセンサー全容の解明に繋がることを願っている。

5. 主な発表論文等

〔図書〕(計 2件)

Makoto Suzuki and **Atsuko Mizuno**, Chapter 7, TRP channels and Mechanical Signals. In *Mechanosensing Biology*, (M.Noda ed.), 2011.

Makoto Suzuki and **Atsuko Mizuno**, *Mechanosensitivity in Cells and Tissues* No.6. Mechanically Gated Channels and mechanisms of their regulation. Springer, Kamkin & Kiseleva (eds.), 2012.

〔マウス系統寄託〕

マウス系統寄託先ホームページ:

<http://mus.brc.riken.jp/>

No.RBRC05455:

B6.Cg-Mtap7d1^{tm1>/2A5}

No.RBRC05526:

B6.Cg-Mtap7d1^{tm1>/7D1}

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水野 敦子 (MIZUNO Atsuko)
自治医科大学・医学部・助教
研究者番号: 3 0 3 6 4 5 3 2

(2) 研究分担者

天野 均 (AMANO Hitoshi)
昭和大学・歯学部・准教授
研究者番号: 9 0 2 1 2 5 7 1