

## 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25年3月31日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2012

課題番号：22659335

研究課題名（和文）多光子励起顕微鏡による *in vivo* 観察法を用いた硬組織細胞間のネットワーク解析

研究課題名（英文）NETWORK ANALYSIS AMONG HARD TISSUE CELLS USING MULTI-PHOTON MICROSCOPE

研究代表者

若森 実 (WAKAMORI MINORU)

東北大学・大学院歯学研究科・教授

研究者番号：50222401

研究成果の概要（和文）：骨芽細胞や骨細胞は機械的刺激を感知し、それらのネットワークで情報を共有していると考えられる。Ca<sup>2+</sup>濃度指示タンパク質を骨細胞に発現させ骨芽細胞や骨細胞間のネットワーク機能を細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度の上昇を指標にして解析することを目指した。骨芽細胞様細胞で伸展刺激により、細胞外から Ca<sup>2+</sup>が流入することを確認した。また、Ca<sup>2+</sup>濃度指示タンパク質は fura-2 と同様に細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度上昇に応答した。

研究成果の概要（英文）：Osteoblasts and bone cells detect mechanical stimuli, and it is thought that their networks share information. The final goal of this project is to establish the method to analyze the network function among the cells by measuring intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration as an index. Ca<sup>2+</sup> influx was observed in the osteoblast-like cells after extension. Moreover, Ca<sup>2+</sup> fluorescent proteins worked like Ca<sup>2+</sup> indicator fura-2.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,000,000	0	1,000,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	570,000	3,470,000

研究分野：分子薬理学

科研費の分科・細目：歯学・機能系歯科

キーワード：カルシウム、機械刺激、細胞内

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 骨芽細胞と骨細胞は骨組織において神経細胞様にネットワークを形成し、骨への機械刺激やホルモン刺激に応答していると思われる。骨芽細胞や骨細胞の二次元培養と三次元培養が試みられているが、ネットワークの生理機能解明には至っていない。

(2) Green Fluorescent Protein(GFP)を用いて種々のバイオセンサーが開発されG-CaMPもその一つである。中井らが開発したG-CaMPはGFP1分子とカルモジュリンとミオシン軽鎖キナーゼのM13断片からなる一波長励起一波長測光タイプの蛍光カルシウムプローブであ

る。GFPと同様のスペクトル特性を持っているので標準的な蛍光顕微鏡やレーザー顕微鏡で容易に観察することができる。G-CaMPはタンパク質であるためG-CaMPをコードする遺伝子をプロモーターの制御下に発現させることで、細胞特異的なプローブとして細胞に導入できる。

## 2. 研究の目的

本研究では GFP 及び遺伝子ベースの  $Ca^{2+}$  濃度指示タンパク質 (GCaMP) を硬組織細胞に発現させ、GCaMP が硬組織系の細胞で蛍光カルシウムプローブとして用いることができるか、また、機械刺激などに対する  $Ca^{2+}$  応答を記録できるかを明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) 培養

マウス骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 細胞は 5%  $CO_2$ 、37°C の条件で 10% FBS、ペニシリン (30 unit/ml)、ストレプトマイシン (30  $\mu$ g/ml) 含有 MEM  $\alpha$  を用いて培養した。 $Ca^{2+}$  イオノフォアを投与する実験ではカバーガラスを poly-l-lysine でコート後、MC3T3-E1 細胞を  $1 \times 10^5$  個/well でカバーガラス上に播種し 5%  $CO_2$ 、37°C の条件下で 10% FBS 含有  $\alpha$  MEM 培地中にて培養した。また、機械的伸展力を負荷する実験を行う際には 0.05 mg/ml fibronectin で 5 時間表面処理を行った伸縮可能なシリコンチャンバーに MC3T3-E1 細胞を  $1 \times 10^5$  個/well で播種、5%  $CO_2$ 、37°C の条件下で 10% FBS 含有  $\alpha$  MEM 培地中にて培養した。

### (2) 伸展刺激を負荷した MC3T3-E1 細胞の $[Ca^{2+}]_i$ 測定

シリコンチャンバーで MC3T3-E1 細胞を 8 時間培養した。シリコンチャンバー上の MC3T3-E1 細胞を 5  $\mu$ M fura-2 添加 10% FBS 含有  $\alpha$  MEM で浸漬し、37°C で 40 分培養した。シリコンチャンバーを伸展装置 STREX STB-150 (ストレックス) に装着し、倒立顕微鏡 (IX71、OLYMPUS) 上に設置した。上記シリコンチャンバーに機械的伸展刺激を負荷した。測定は 2 mM  $Ca^{2+}$  含有 HEPES-buffered saline (HBS) (pH 7.4 に調整した 107 mM NaCl、6 mM KCl、1.2 mM  $MgSO_4$ 、2 mM  $CaCl_2$ 、11.5 mM グルコース) と  $Ca^{2+}$  フリー-HBS (0 mM  $Ca^{2+}$ ) 中に行った。蛍光画像は MetaMorph (MetaImaging Series Version 7.6、日本モレキュラーデバイス) を用いて記録し解析した。fura-2 蛍光画像は定法により 340 nm と 380 nm の 2 波長励起とし、得られた蛍光を 510 nm で測定した。

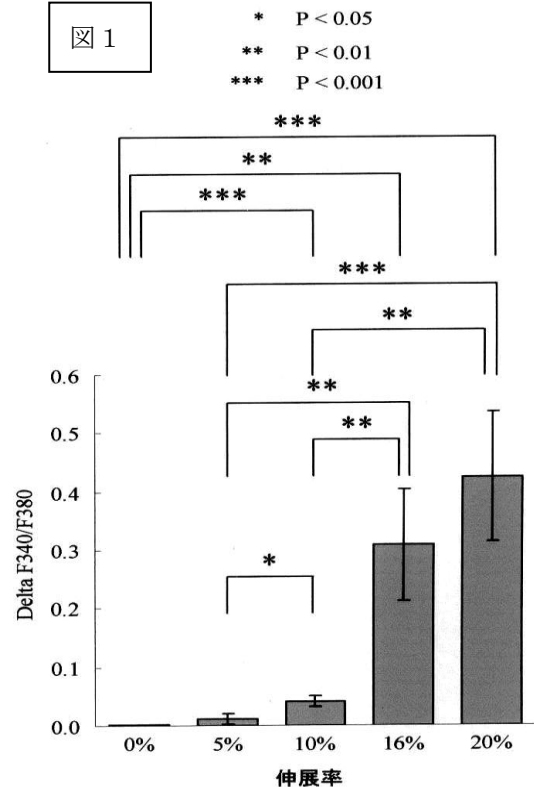
### (3) トランスフェクション

培養した MC3T3-E1 細胞にリン酸カルシウム

法、Lipofectamine 2000 (Life) と Effecten (Qiagen) を用いたリポフェクション法、MicroPorator (Digital Bio) を用いたエレクトロポレーション法により、 $Ca^{2+}$  濃度指示タンパク質を導入した。

## 4. 研究成果

図 1



(1) MC3T3-E1 細胞を播種した伸縮可能なシリコンチャンバーを一軸方向へ 5%、10%、16%、20% の伸展刺激を負荷した時の  $[Ca^{2+}]_i$  変化を  $Ca^{2+}$  蛍光指示薬 fura-2 を用いて測定した。図 1 は 5%、10%、16%、20% の伸展刺激による  $[Ca^{2+}]_i$  上昇を F340/F380 の比で表わした。それぞれ  $0.012 \pm 0.009$ 、 $0.041 \pm 0.009$ 、 $0.309 \pm 0.096$ 、 $0.425 \pm 0.111$  (各  $n = 19$ ) であった。5% の伸展刺激では伸展刺激なしに比較して有意な  $[Ca^{2+}]_i$  上昇は認められなかった ( $p > 0.05$ )。10%、16%、20% の伸展刺激では伸展刺激なしに比較して有意な  $[Ca^{2+}]_i$  上昇が認められた ( $p < 0.01$ )。また 16% の伸展刺激は 10% の伸展刺激に比較して特に有意な  $[Ca^{2+}]_i$  上昇が認められたが、20% の伸展刺激とは有意な差が認められなかった。この結果から、16% 以上の伸展刺激で機械刺激受容チャネルが十分に応答することが明らかになった。5 分間隔で 20% の伸展刺激を繰り返すと、2 回目の応答は 1 回目の  $86 \pm 3\%$  ( $n = 22$ ) となった。また、この  $[Ca^{2+}]_i$  上昇が細胞外からの流入によって起きていることを明らかにするために  $Ca^{2+}$  を除去した細胞外液 (0 mM HBS) 中で 20% の伸展刺激を加えたところ、MC3T3-E1 細胞の

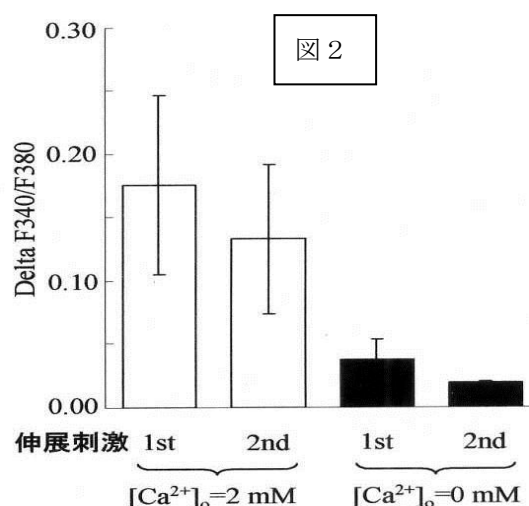


図 2  
[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 上昇は 1 回目の刺激、2 回目の刺激とも見られなかった (図 2)。このため機械刺激による MC3T3-E1 細胞の [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 上昇は細胞外からの Ca<sup>2+</sup> 流入による、又は Ca<sup>2+</sup> 流入がトリガーになって細胞内 Ca<sup>2+</sup> ストアから放出されることが示唆された。

(2) MC3T3-E1 細胞に G-CaMP をコードする遺伝子をリポフェクション法とリン酸カルシウム法、エレクトロポレーション法で導入し最適条件の検討を行った。リン酸カルシウム法による遺伝子導入の効率が他の方法に比べやや劣っていた。イオノマイシン (Ca<sup>2+</sup> イオノフォア) を投与すると、G-CaMP は Ca<sup>2+</sup> 蛍光指示薬 fura-2 同様に細胞内 Ca<sup>2+</sup> 濃度上昇に応答することを確認した。更に、G-CaMP を発現させた MC3T3-E1 を伸縮可能なシリコンチャンバーに播種し、一軸方向への伸展刺激を負荷した時の [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 変化を fura-2 を用いて測定した結果と比較したが、改良型 G-CaMP は fura-2 と同様に細胞内 Ca<sup>2+</sup> 濃度を測定できることが判明した。

近年、G-CaMP を含む蛍光カルシウムプローブなどのバイオセンサー開発が盛んになってきている。開発されたセンサーも *in vitro* のみならず *in vivo* でも使えることが報告され始めている。G-CaMP は中井らのグループにより更なる改良が加えられ、益々使いやすくなってきている。本研究期間では G-CaMP を培養頭蓋冠標本にエレクトロポレーション法で発現させるまでには至らなかったが、中井らのグループにより提供を受けた蛍光カルシウムプローブは培養細胞レベルでは発現させることに成功し、その性能も極めて優れていることが判明した。本研究期間に確実に次のステップへの手掛かりが得られた。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① Unno T, Wakamori M, Koike M, Uchiyama Y, Ishikawa K, Kubota H, Yoshida T, Sasakawa H, Peters C, Mizusawa H, Watase K. Development of Purkinje cell degeneration in a knockin mouse model reveals lysosomal involvement in the pathogenesis of SCA6. *Proc Natl Acad Sci USA* 109; 17693-17698 (2012). 査読有  
doi: 10.1073/pnas.1212786109.
- ② Uriu Y, Kiyonaka S, Miki T, Yagi M, Akiyama S, Mori E, Nakao A, Beedle AM, Campbell KP, Wakamori M, Mori Y. Rab3-interacting molecular isoforms lacking the Rab3-binding domain induce long lasting currents but block neurotransmitter vesicle anchoring in voltage-dependent P/Q-type Ca<sup>2+</sup> channels. *J Biol Chem* 285; 21750-21767 (2010). 査読有  
doi: 10.1074/jbc.M110.101311.
- ③ Mashimo T, Ohmori I, Ouchida M, Ohno Y, Tsurumi T, Miki T, Wakamori M, Ishihara S, Yoshida T, Takizawa A, Kato M, Hirabayashi M, Sasa M, Mori Y, Serikawa T. A missense mutation of the gene encoding voltage-dependent sodium channel (Nav1.1) confers susceptibility to febrile seizures in rats. *J Neurosci* 30; 5744-5753 (2010). 査読有  
doi:10.1523/JNEUROSCI.3360-09.2010.
- ④ Wakamori M. Neuronal Ca<sup>2+</sup>-sensitive non-selective cation channels and TRPC5. *J Oral Biosci* 52; 352-357 (2010). 査読有

[学会発表] (計 9 件)

- ① 吉田卓史、菊池尚、高橋かおり、若森実、ユージノールの TRPV1 チャンネルに対する抑制作用、第 86 回 日本薬理学会年会、2013 年 3 月 21 日、福岡
- ② Wakamori M, TRP channels and oral sensation, Sydney-Tohoku Symposium on Dentistry 2013, January 18 2013, Sydney, Australia
- ③ 鈴木崇弘、坪井明人、吉田卓史、若森実、フェノール類による CRAC チャンネルの遮断、第 54 回 歯科基礎医学会、2012 年 9 月 16 日、郡山
- ④ 吉田卓史、高橋かおり、若森実、ユージノールによる TRPV1 チャンネル活性の抑制作用、第 54 回 歯科基礎医学会、2012 年 9 月 16 日、郡山
- ⑤ 吉田卓史、菊池尚、高橋かおり、若森実、

鎮静薬ユージオールのTRPV1チャネルに対する効果、日本薬理学会、2012年3月16日、京都

- ⑥ 若森実、電位依存性カルシウムチャネルの生物物理学的解析、新薬理学セミナー2011、2011年9月30日、仙台
- ⑦ Wakamori M、Kondoh D、Yoshida T、Kikuchi H、Komatsu M、Facilitation of TRPM5 channel activities by fatty acids、Harvard-Tohoku-Forsyth Symposium、January 6 2011、Boston、USA
- ⑧ Yoshida T、Wakamori M、TRP channels play a role in the mouse osteoblast cell line MC3T3-E1 under shear stress、Annual Meeting of The Japanese Pharmacological Society、March 23, 2011、Yokohama
- ⑨ 近藤大祐、吉田卓史、菊池尚、小松正志、若森実、TRPM5チャネル活性の脂肪酸による修飾、日本薬理学会北部会、2010年9月10日、札幌

[図書] (計5件)

- ① 若森実、三木崇史、中尾章人、高田宣則、森泰生、「電位依存性チャネル」脳神経科学イラストレイテッド、羊土社、2013、185-192
- ② 若森実、歯学英和辞典、監修 渡邊誠、研究社、2012、1-921 (分担執筆、生理学・薬理学担当)
- ③ 若森実、現代歯科薬理学 第5版、医歯薬出版、2012、14-19
- ④ Wakamori M、Yoshida T、Kikuchi T、Kondoh D、Komatsu M、Melastatin Transient Receptor Potential Channel Type 5、Interface Oral Health Science 2011、2011、341-345、Springer社
- ⑤ 若森実、近藤大祐、荒木健太郎、痛覚(侵害受容)とは何か? ユージオールはなぜ効くのか? 日本歯科評論 70、2010、135-142

[その他]

ホームページ等

[http://www.bsc.tohoku.ac.jp/contents/c2\\_32/c2\\_32\\_wakamori\\_m.html](http://www.bsc.tohoku.ac.jp/contents/c2_32/c2_32_wakamori_m.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

若森 実 (WAKAMORI MINORU)  
東北大学・大学院歯学研究科・教授  
研究者番号：50222401

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

中井 淳一 (NAKAI JYUNICHI)  
埼玉大学・脳科学癒合研究センター・教授  
研究者番号：80237198