

## 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24年3月31日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791785

研究課題名（和文） 骨メカノセンサーネットワークによる機械刺激受容シグナル伝達機構の解明

研究課題名（英文） Identification of mechanosensitive channels responded to hypo-osmotic stress in the osteoblast

研究代表者

吉田 卓史 (TAKASHI YOSHIDA)

東北大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号：30455795

研究成果の概要（和文）：ヒトの体を内側から支えている骨には3種類の細胞が存在する。その一つである骨芽細胞は機械刺激を受けると細胞外からチャネルタンパク質を介した  $\text{Ca}^{2+}$  の流入により細胞内のカルシウム濃度が上昇することが知られている。骨芽細胞には複数の機械刺激受容チャネルが発現しているが、どのような刺激に対してどのチャネルが応答するかはわかっていない。研究の結果、低浸透圧刺激に対しては TRPV2, TRPV4 はあまり関与しないことが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：Mechanical stress plays a vital role in maintaining bone architecture. The process by which osteoblasts convert mechanical signal into biochemical responses leading to bone remodeling is not fully understood. In spite of the significant role of mechanosensitive channels in osteoblast, the molecular identity of mechanosensitive channels remains unknown. When we applied the hypo-osmotic stress in the presence of extracellular  $\text{Ca}^{2+}$ , some cells were responded. But specific TRPV2 or TRPV4 siRNA could not inhibit  $\text{Ca}^{2+}$  response by hypo-osmotic stress. These results indicate that TRPV2 or TRPV4 channels are not candidate for the hypo-osmotic stress responding channel in osteoblast.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：骨芽細胞、カルシウム、機械刺激、チャネル

## 1. 研究開始当初の背景

脊椎動物の体を支える骨は常に一部が吸収され、同時にほぼ等量の骨が形成されており、その量は成人で一日に約 500 mg、年間で 10% の成分が入れ替わりながら一定量が保たれている。この骨量の維持にはビタミン

D やエストロゲンのような小分子だけではなく機械刺激が重要であることが知られており、寝たきりの患者さんや宇宙飛行士のように骨に一定の機械刺激が加わらなければ骨量維持のバランスが崩れ、骨の吸収過多になり骨粗鬆症を発生しやすくなる。骨粗鬆症は

患者数が日本で 1000 万人を数え、65 歳以上の女性の 2 人に 1 人がこの疾患にかかる恐れがあるといわれる、高度高齢化社会を迎える日本において大きな問題となる病気である。逆に骨に加わる圧力をうまく利用しているのが歯科矯正治療であり、骨に局所的に力学的負荷をかけると負荷を緩和するために圧迫側では破骨細胞による歯槽骨の吸収が、牽引側では骨芽細胞による歯槽骨の形成が見られる(骨リモデリング)。このように骨には機械刺激を感知し、骨に加わる機械刺激を一定にするメカニズムがある。近年の精力的研究により分子・細胞レベルでの機械刺激応答機序が徐々に明らかとなっている。機械刺激が加わると細胞内では機械刺激受容陽イオンチャンネルを介した細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度上昇が起こり、骨芽細胞の分化・増殖が起こることが知られている。しかしながらこれら骨細胞、骨芽細胞にそれぞれ発現していると思われる機械刺激受容陽イオンチャンネルの分子の実体や他のシグナル伝達経路との機能協働、細胞間のシグナル伝達様式はいまだ不明な点が多い。

## 2. 研究の目的

骨芽細胞は機械刺激を受けると細胞内のカルシウム濃度が上昇することが知られており、このカルシウムは細胞外からチャンネルタンパク質を介して流入していることがわかっている。このチャンネルタンパク質は transient receptor potential (TRP)チャンネルの一つである TRPV4 が担っていることが報告されているが、我々の研究の結果、マウスの骨芽細胞株の一つである MC3T3-E1 細胞にはこのほかにも多くの機械的刺激により活性化される TRP チャンネルタンパク質が発現していることが明らかとなった。そこでこれらの TRP チャンネルが機械的刺激に対してどのように使い分けされているかを目的として、いくつかの刺激方法(せん断応力刺激、浸透圧刺激)を用い、個々の刺激に対してどのような TRP チャンネルが応答するかを fura-2 を用いた細胞内カルシウム濃度測定を行い明らかにしようとした。

## 3. 研究の方法

### (1) 細胞培養

MC3T3-E1 細胞は 10%FBS, penicillin (30 units/mL) streptomycin (30  $\mu\text{g}$ )入りの MEM $\alpha$ 培地(WAKO)の中で培養した。培養条件は 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%CO $_2$ で行った。

### (2) siRNA 作成および細胞への導入

TRPV2 (NM\_011706)、TRPV4 (NM\_022017)の mRNA 配列に対して効果的な siRNA サイトを Invitrogen と Ambion が公開しているツールを使用して探した。これを元に silencer siRNA construction kit

(Ambion)を用いて siRNA を合成した。MC3T3-E1 細胞への導入はエレクトロポレーション法(MP-100, Digital Bio)を用い最終濃度 30 nM になるようにして導入を行い、1 日後に ISOGEN を用いて total RNA を回収した。得られた total RNA は分光光度計を用いて濃度測定を行い、total RNA の 1  $\mu\text{g}$  を用いて cDNA を iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad)で合成し、TRP チャンネルタンパク質に選択的なプライマーを用いて real-time PCR(CFX96, Bio-Rad)を用いて定量化( $\Delta\Delta\text{Ct}$ 法)した。コントロールとしてハウスキーピングタンパク質の遺伝子である Pgk1 を用いた。

### (3) 細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度測定

MC3T3-E1 細胞を poly-L-lysine で表面をコーティングしたガラスカバースリップに播種して一晩培養した後、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度指示薬である Fura 2-AM (5  $\mu\text{M}$ ) (Dojindo) を 40 分間適用した。その後、倒立顕微鏡 (IX-71, Olympus)ステージ上の測定チャンパーにカバースリップを設置した。測定は画像取得ソフトウェア Metamorph (Molecular Device)で制御されたフィルター切替装置を使用して 340 nm、380 nm の励起波長における 510 nm の蛍光画像を取得した。この 2 つの蛍光画像の蛍光強度の比(F340/F380)をピクセル単位で求め、HSC-2, HSC-3細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度変化を解析した。

せん断応力刺激には LFR-25 を用いた。

## 4. 研究成果

### (1) 骨芽細胞株 MC3T3-E1 における浸透圧刺激応答

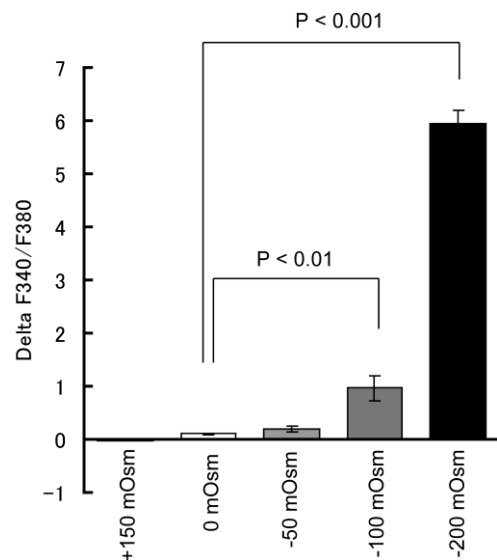


図 1. MC3T3-E1 細胞の浸透圧刺激応答

通常より 100, 200 mOsm 低い低浸透圧刺激で細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$ 上昇が見られられた。

機械刺激には進展刺激、せん断応力刺激などの他に浸透圧刺激も数えられる。浸透圧刺激は通常より低い浸透圧を細胞に付加することにより、相対的に細胞内の浸透圧が細胞外に対して高い状態になり、浸透圧を平衡化する結果として細胞内に水が入り込み、細胞が膨れる。その膨らみにより細胞膜が進展されることが機械刺激として認識され機械刺激応答性のチャネルが活性化するものである。そこでMC3T3-E1細胞がどの程度の低浸透圧刺激により活性化するかを見極めるために、通常より50 mOsm, 100 mOsm, 200 mOsm低い細胞外液もしくは150 mOsm高い細胞外液を作成して刺激とした。細胞内のCa<sup>2+</sup>濃度上昇はFura-2を用いたイメージング法を用い、蛍光強度の比(F340/F380)の上昇分として見積もった。まず、通常より高い浸透圧刺激(+150 mOsm)を適用したが、細胞内のCa<sup>2+</sup>上昇は見られなかった。一方、通常より低い浸透圧刺激(-50, -100, -200 mOsm)を加えたところ-50 mOsmの刺激では反応は見られなかったが、-100, -200 mOsmの刺激ではともに細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度上昇が見られた(図1)。このCa<sup>2+</sup>上昇はTRPV4の浸透圧刺激に対する反応を阻害すると考えられる17-ODYA(10 μM)の適用では抑制できなかった。

#### (2) TRPV2, TRPV4 に対する siRNA 作成

MC3T3-E1細胞株における低浸透圧刺激に対するCa<sup>2+</sup>上昇がどのチャネルにより生じているかを明らかとするためにsiRNAの作成を行った。MC3T3-E1には複数種のTRPチャネルが発現していることをわれわれはすでに明らかとしているが、その中でもっとも可能性の高いチャネルとしてTRPV2, TRPV4と考えて、siRNAによりノックダウンを行い浸透圧刺激に対する効果をCa<sup>2+</sup>イメージング法を用いて調べることとした。

siRNAの作成はInvitrogenとAmbionのサイトを参考にして設計し、Ambionのsilencer siRNA construction kitを用いて合成した。siRNAの抑制効率はreal-time PCR装置を用いてハウスキーピングタンパク質であるPgk1のmRNAをコントロールとして見積もった。その結果、TRPV2に対するsiRNA (siTRPV2)は抑制効率15.6%、TRPV4に対するsiRNA (siTRPV4)は23.1%まで抑制することが出来た。またこのsiRNAをMC3T3-E1細胞に導入するときは一様な導入を行うためにエレクトロポレーションを用いることにより高い遺伝子発現抑制率を得られることができた。

#### (3) 浸透圧刺激に対する siRNA による遺伝子発現抑制の効果

(2)で作成したsiRNAをMC3T3-E1細胞に導入後1日目にCa<sup>2+</sup>イメージング法を用いて低浸透圧刺激に対するMC3T3-E1細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度上昇が抑制されるかどうかを調べ

た。低浸透圧刺激は-100 mOsmを用いた。その結果、図2に示すようにMC3T3-E1内のCa<sup>2+</sup>上昇は有意な減弱は見られなかった。

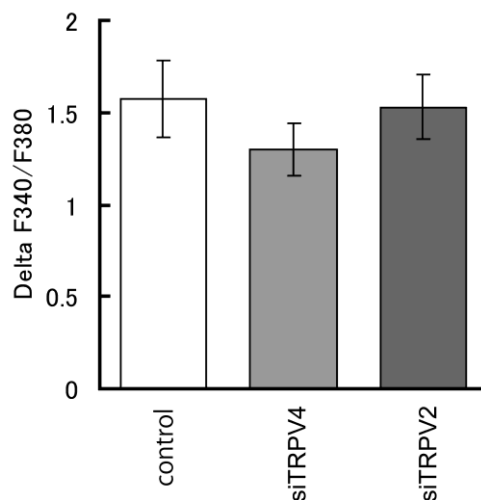


図2. 低浸透圧刺激応答に対するsiRNAの効果

siRNAを導入したMC3T3-E1細胞に対して低浸透圧刺激をした場合の細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度上昇の変化量。

この結果は浸透圧刺激に対するMC3T3-E1のCa<sup>2+</sup>濃度上昇にはTRPV2, TRPV4が大きくは関与していないことを示している。

#### (4) せん断応力刺激に対する siRNA の効果

低浸透圧刺激とは違う機械刺激としてせん断応力刺激によるMC3T3-E1細胞のCa<sup>2+</sup>濃度上昇を測定してTRPV2, TRPV4に対するsiRNAの効果測定した。せん断応力刺激には閉鎖空間内にMC3T3-E1細胞を播種することによりせん断応力刺激を加えた。この結果、30 ml/minの環流によりMC3T3-E1細胞内のCa<sup>2+</sup>上昇は観測でき、siTRPV2でそのCa<sup>2+</sup>上昇は抑制できると考えられる結果は得られた。しかしながらsiTRPV4では有意な差は見られなかった。

これらの結果からMC3T3-E1細胞の低浸透圧刺激により細胞内のCa<sup>2+</sup>濃度が上昇することにはTRPV2, TRPV4の2つのチャネルは大きな関与をしていないことが明らかとなった。一方、せん断応力刺激に対してはTRPV2の関与が考えられる結果が得られた。これらのことは同じ機械刺激といえどもその刺激の種類により応答するチャネルや細胞内のCa<sup>2+</sup>シグナリングが異なっていることを示唆していると思われる。今後は他のTRPチャネルも含めて総合的に機械刺激に対するMC3T3-E1細胞、ひいては骨芽細胞の応答機序を明らかとしていく予定である。

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 1 件)

1. 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. and Serikawa, T. A missense mutation of the gene encoding voltage-dependent sodium channel (Nav1.1) confers susceptibility to febrile seizures in rats. *J. Neurosci.* 査読有、30 巻、2010、5744-5753

[学会発表] (計 7 件)

1. 吉田 卓史、菊地 尚、高橋 かおり、若森 実、鎮静薬ユージオールの TRPV1 チャンネルに対する効果、第 85 回日本薬理学会年会、2012 年 3 月 16 日、京都
2. 吉田 卓史、骨組織における圧力受容機構の解明、新世代の生物有機化学研究会 2011、2011 年 7 月 9 日、京都
3. 吉田 卓史、若森 実、マウス骨芽細胞 MC3T3-E1 において剪断応力を受容する TRP チャンネル、第 84 回日本薬理学会年会、2011 年 3 月 23 日、横浜 (紙上開催)
4. Takashi Yoshida, Minoru Wakamori, Mechanosensitive channels in the clonal mouse osteoblast cell line MC3T3-E1, The 4<sup>th</sup> international symposium for interface oral health science, 8, March, 2011, Sendai
5. 近藤 大祐、吉田 卓史、菊地 尚、小松 正志、若森 実、TRPM5 チャンネル活性の脂肪酸による修飾、第 61 回日本薬理学会北部会、2010 年 9 月 10 日、札幌
6. Takashi Yoshida, Mechanosensitive TRP channels in the clonal mouse osteoblast cell line MC3T3-E1, The 5th International Workshop on Nano, Bio and Amorphous Materials, 10, August, 2010, 刈田郡蔵王町
7. 吉田 卓史、細胞外環境を感知するセンサータンパク質、新世代の生物有機化学研究会 2010、2010 年 5 月 22 日、吹田市

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 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 0 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]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 卓史 (YOSHIDA TAKASHI)

東北大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号 : 30455795

(2) 研究分担者