

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 29 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659717

研究課題名（和文） 骨細胞におけるメカニカルストレス応答因子の探索による骨萎縮治療の基盤研究

研究課題名（英文） A study of bone atrophy treatment by detection of factors in osteocytes involved in mechanical stress.

研究代表者

秋山 治彦 (AKIYAMA HARUHIKO)

京都大学・医学研究科・准教授

研究者番号：60402830

研究成果の概要（和文）：

不動化マウスモデルの骨細胞を用いた網羅的遺伝子解析の結果、坐骨神経切除による後肢不動モデルの骨細胞において BK (Big Potassium) チャンネル遺伝子の発現が変動していることを見出した。RT-PCR の結果から、骨細胞には KCNMB1, 2, 4 のサブユニットが発現していることが明らかとなった。Colla1-mRFP1; CaK-GFP Tg ダブルヘミマウスを作成し、現在、BK チャンネルオープナー化合物およびブロッカー化合物を注射投与し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて in vivo における骨芽細胞および破骨細胞の細胞動態のライブイメージングを実施している。

研究成果の概要（英文）：

Genome-wide screening using osteocytes in disused bone showed upregulation of BK channel genes. RT-PCR revealed that osteocytes express KCNMB1, 2 and 4 subunit genes. CaK-GFP transgenic mice were generated, and then Colla1-mRFP1; CaK-GFP double hemi-transgenic mice were produced. We are trying live imaging of osteoblasts and osteoclasts in these mice using confocal microscope when BK channel opener or blocker reagents are administered.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：整形外科

科研費の分科・細目：外科系臨床医学、整形外科学

キーワード：骨細胞、メカノセンサー、イオンチャンネル

1. 研究開始当初の背景

高齢者の骨粗鬆症、寝たきり等による不動や活動低下および骨折治療等によるギプス固定による廃用性骨萎縮、さらには宇宙ステーションでの無重力生活での骨萎縮は、我々人類の現在、および未来的生活における克服すべき病態である。例えば、我が国における骨粗鬆症患者は約 1200 万人と推定されており、骨粗鬆症を起因とする脊椎椎体骨

折の有病率は 80 歳以上で 43%、大腿骨頸部骨折は年間 10 万人以上に達し、また、日常活動量の低下をみる要支援/要介護の総数は 450 万人に達している。よって我が国において高齢者の骨量を積極的に増加させることは疾患治療のみならず医療経済的観点においても最重要の課題である。生後の骨組織は骨芽細胞による骨形成と破骨細胞による骨吸収によりリモデリングされ、適切な

骨量を維持するためには性ホルモンなどの内因性物質のみならず外力による適度なメカニカルストレスが必要である。骨組織におけるメカノセンシング機構は骨細胞に存在すると考えられているものの未だ明らかではなく、さらに骨細胞から骨膜および骨髄腔内の骨芽細胞や破骨細胞にメカニカルストレスを伝搬する機構もほとんど解明されていない。ノックアウトマウスを用いた *in vivo* 実験や培養細胞を用いた *in vitro* での解析から一酸化窒素やプロスタグランジンなどが関与していることが示唆されているが、骨組織特異的なメカニズムは全く知られていない。現在、骨量増加を期待した薬剤としては、骨粗鬆症治療薬としていくつかのものが実用化されており、これからも数種類が市販予定である。しかし、それらのほとんどは骨の吸収を抑制する薬剤であり、骨形成を刺激し骨量を積極的に増加させる薬剤の必要性が高まっている。よって骨形成を担う骨芽細胞の制御の分子メカニズムはその発生的な意義のみならず、生後の骨リモデリングや骨萎縮に関係する疾患制圧のために必須である。本研究者は、骨関節疾患の臨床医として骨粗鬆症治療に携わっている。さらに分子生物学的および生化学的に、また遺伝子改変マウスを用いて骨軟骨疾患の分子機序を解明してきた (Genes Dev. 2002, PNAS 2003, PNAS 2004, Genes Dev. 2004, PNAS 2005)。生後の骨内での骨リモデリングネットワークを分子生物学的に解析するためには、従来の組織学的解析や *in vitro* での実験系では明らかに出来ない点が多い。よって、本研究では、遺伝子改変マウス技術を用いて骨細胞、骨芽細胞、さらには破骨細胞を蛍光標識し生体イメージングシステムを駆使して、メカニカルストレス-骨形成-骨吸収のネットワーク機構を生きた細胞を用いて解析することとした。生体の骨細胞におけるメカニカルストレス応答遺伝子を網羅的遺伝子解析法で明らかとし、これらメカニカル応答因子が生体の骨において骨内の骨形成に関与するか、骨吸収に関与するのかを生体ライブ光イメージングで明らかとする。

2. 研究の目的

本研究の主目的は、高齢者の活動低下や寝たきりなどの不動による骨萎縮を抑制または治療するための基盤研究である。高齢者や寝たきりの患者に十分な骨量増加を得るほどの歩行や負荷運動を実施することは極めて困難である。よって不十分な骨への外力ストレスを薬剤などで補う必要がある。このよ

うな治療を成功させるためには、外力が骨の骨細胞にあたえる分子生物学的現象、骨細胞から骨芽細胞および破骨細胞に外力の情報伝播するシステムの解明が必須である。骨皮質の骨細胞が外力からのメカニカルストレスを感知し、それを化学的シグナルに変換して、骨膜および骨髄腔に存在する幹細胞および骨芽細胞、破骨細胞の分化および細胞機能を制御し、骨形成および骨吸収を誘導していると示唆されている。骨細胞におけるメカノセンサーは細胞骨格分子や細胞膜チャネル分子などが候補に挙げられているが、いまだ詳細は不明である。受容されたメカニカルストレスは化学的シグナルに変換されるが、主な研究は培養細胞に負荷をかけた実験系で実施されているのが現状である。一部、遺伝子改変マウスなどを用いた *in vivo* の研究も行われているものの、個別の因子に関してのメカニカルストレス伝達機能解析であり、ネットワーク機構全体像を *in vivo* で解析した試みはない。それは、生後の骨組織が硬組織であり骨細胞の単離が困難であり分子生物学的および生化学的解析に制限があること。また、組織学的解析は可能であるが骨細胞、骨芽細胞および破骨細胞を生きた状態で解析することが困難であり、生体内での実際の各細胞の挙動を明らかに出来なかったことなどが原因としてあげられる。本研究においては、遺伝子改変技術を用いて、骨細胞、骨芽細胞および破骨細胞を **red fluorescent protein** および **green fluorescent protein** 遺伝子を用いて二重ラベルした遺伝子改変マウスを作成し、このマウスを坐骨神経結紮による下肢不動モデルを作製し、骨細胞を **FACS sorting** により単離し、**GeneChip** による網羅的遺伝子解析を実施し、メカニカルストレス応答遺伝子をカタログ化する。次に、これらメカニカル応答因子の組み換えタンパク質を上述マウスの頭蓋冠に注射し、二光子励起顕微鏡により、それぞれの因子が骨芽細胞に作用するか、破骨細胞に作用するかを生体ライブ光イメージングで明らかとする。この技術によって、特に、骨組織特異的な情報伝搬システムの発見は、副作用のない薬物治療に大きなブレイクスルーとなる。また、現在の骨粗鬆症薬は骨吸収を抑制し海綿骨量を維持、増加させる作用があるが、骨皮質を増強させる作用はほとんど期待できない。本研究で外力ストレスによる骨形成誘導機構が明らかとなれば骨皮質の増大および骨強度の回復を期待でき、骨脆弱性に起因した骨折の発症頻度の減少が期待でき、医療経済的効果も非常に大きい。さらに、現在、宇宙

ステーションが建設され、人類の宇宙への進出が始まろうとしているが、無重力環境での骨萎縮は克服しなければならない問題である。本研究の成果により無重力環境下の生活における骨萎縮の予防にも新しい治療方法が期待できる。

3. 研究の方法

骨組織に加わるメカニカルストレスは骨皮質に存在する骨細胞に関与され、化学的シグナルに変換されて骨膜細胞、骨髄腔内のニッチに存在する幹細胞および骨芽細胞、破骨細胞に伝達され、骨形成および骨吸収を誘導する考えられている。不活化により、この骨細胞からの骨リモデリングシグナルが負に傾くことにより廃用性骨萎縮の病態が生ずる。本研究者は、近年骨軟骨細胞を蛍光標識した遺伝子改変マウスを用いて骨軟骨の分子生物学的解析を遂行しており、近年、骨特異的 I 型コラーゲンプロモーターを用いて骨細胞および骨芽細胞に Red fluorescent protein 遺伝子を発現するトランスジェニックマウスを作製した (Coll1a1-mRFP1 Tg)。この遺伝子改変マウスと FACS sorting を用いて骨細胞を単離することができる。10 週齢の雄トランスジェニックマウスの左坐骨神経を切除し後肢不活化モデルを作製する。対象は sham 手術とする。術後 1 週で左大腿骨を摘出し生理食塩水で骨髄腔を十分に洗浄し、C ワイヤで骨髄組織を除去、骨皮質のみとする。骨皮質のみ的大腿骨は乳鉢で十分に粉碎し、トリプシンおよびコラーゲナーゼで骨基質を十分に消化除去し、骨細胞を単離する。骨細胞は赤色蛍光で標識されており、単離された細胞を FACS にて骨細胞のみとする。不活化モデルの骨細胞および sham 手術の骨細胞それぞれより mRNA を抽出し、Affymetrix 社マウス GeneChip を用いて網羅的遺伝子解析を行い、それぞれの骨細胞における遺伝子発現プロファイルを作製する。それぞれの遺伝子発現プロファイルを比較検討し、不活化モデル骨細胞において 2 倍以上の遺伝子発現低下を認める分泌タンパク質のリストを作製する。

不活化マウスモデルの骨細胞で発現が低下している分泌タンパク質で、既に組み換えタンパク質が購入できるものに関しては購入し、市販されていないものに関しては大腸菌による発現システムを用いて作製する。6xHis タグを付加した分泌タンパク質遺伝子の発現ベクターを大腸菌に発現させ、IPTG 誘導でタンパク質を発現させる。Ni アフィニティカラムで、His タグ付加組み換えタンパ

ク質を精製し、濃度を 100ug-1mg/ml に調整しておく。次に、Coll1a1-mRFP1 Tg とカテプシン K 遺伝子座に green fluorescent protein 遺伝子ノックインし破骨細胞を緑色蛍光で標識した遺伝子改変マウス (CaK-GFP KI) を交配し、ダブルヘミマウスを作成する。このマウスは骨細胞/骨芽細胞が赤色蛍光を、破骨細胞が緑色蛍光で標識されている。このダブルヘミマウスの頭蓋骨骨膜下に組み換えタンパク質を注射投与する。二光子励起顕微鏡を用いて、in vivo における骨芽細胞および破骨細胞の組み換えタンパク質投与部への細胞動態をライブイメージングし、骨芽細胞の細胞誘導および活性増強を有する分泌タンパク質を同定する。

4. 研究成果

骨軟骨細胞を蛍光標識した遺伝子改変マウスを用いて骨軟骨の分子生物学的解析を遂行するため、近年、骨特異的 I 型コラーゲンプロモーターを用いて骨細胞および骨芽細胞に、Red fluorescent protein 遺伝子を発現するトランスジェニックマウスを作製した (Coll1a1mRFP1 Tg)。この遺伝子改変マウスと、FACS sorting を用いて骨細胞を単離することができる。10 週齢の雄トランスジェニックマウスの左坐骨神経を切除し後肢不活化モデルを作製する。対象は、sham 手術とした。術後 1 週および 3 週で左大腿骨を摘出し、マイクロ CT にて廃用性骨萎縮が発症していることを確認した。次に、生理食塩水で骨髄腔を十分に洗浄し、C ワイヤで骨髄組織を除去、骨皮質のみとした。骨皮質のみ的大腿骨は乳鉢で十分に粉碎し、トリプシンおよびコラーゲナーゼで骨基質を十分に消化除去し、骨細胞を単離した。骨細胞は赤色蛍光で標識されており、単離された細胞を、FACS にて骨細胞のみとする。不活化モデルの骨細胞および、sham 手術の骨細胞それぞれより、mRNA を抽出し、GeneChip を用いて網羅的遺伝子解析を行い、それぞれの骨細胞における遺伝子発現プロファイルを作製した。GeneChip による網羅的遺伝子解析の結果、坐骨神経切除による後肢不活化モデルの骨細胞において BK (Big Potassium) チャネルの構成分子遺伝子の発現が大きく変動していることを見出した。BK チャネルはカルシウム活性化カリウムチャネルサブファミリーの一つで、脱分極とそれに伴う細胞内カルシウムイオン上昇に応答して開口し、膜電位の再分極相や後過分極あるいは静止膜電位の過分極を引き起こす。BK チャネルは 4 量体構造で、全身の組織に広く分布している KCNMA1 (α サ

βサブユニット) と組織分布が特異的で BK チャネルの機能調整をおこなう KCNMB1-4 (βサブユニット) で構成されている。BK チャネルは神経・心筋・血管平滑筋・腺組織などに高発現しており、それぞれの組織で重要な機能を担っている。しかし、骨細胞で機能は全くの未知である。骨量維持に重要な女性ホルモンであるエストロジオールが βサブユニットに作用して BK チャネルの開口作用を示すことから BK チャネルの骨細胞での重要な機能が示唆される。骨細胞の RNA を用いた RT-PCR の結果から、骨細胞には KCNMB1, 2, 4 のサブユニットが発現していることが明らかとなった。Coll1a1-mRFP1 Tg とカテプシン K 遺伝子座に green fluorescent protein 遺伝子ノックインし破骨細胞を緑色蛍光で標識した遺伝子改変マウス (CaK-GFP KI) は作製が終了し、Coll1a1-mRFP1 Tg とのダブルヘミマウスを作成した。現在、BK チャネルオープナー化合物およびブロッカー化合物をこのダブルヘミマウスの頭蓋骨骨膜下に注射投与し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて in vivo における骨芽細胞および破骨細胞の細胞動態をライブイメージングを実施している。

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)

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

秋山 治彦 (AKIYAMA HARUHIKO)
京都大学・医学研究科・准教授
研究者番号：60402830

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし