

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 10日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23791626

研究課題名（和文）神経伝達物質受容体・イオンチャネルによる電位変化を伴う力学的負荷感知機構の解明

研究課題名（英文）Investigation into the mechanism of mechano-transduction via neurotransmitter receptors and ion channels

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

研究成果の概要（和文）：高齢化社会に伴う骨疾患の増加により、その疾患の治療対策が必要となってきた。この原因を明らかにして、骨疾患治療を推進するために、われわれの研究経験を基にして骨代謝における膜電位・イオンチャネルの役割を検討してきた。本研究では、受容体・イオンチャネルを介した細胞情報伝達を検討するために、光作動性イオンチャネルを用いて細胞機能を調べた。具体的には、光作動性イオンチャネル・ポンプの遺伝子導入を用いて、骨芽細胞・破骨細胞での膜電位の役割を検討するとともに、研究進行に伴う興味深い結果を基にして、骨代謝に関与する新規分子の同定をおこなった。その結果、細胞膜電位による細胞機能調節および新規骨代謝関連イオンチャネルによる破骨細胞機能制御が明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：Bone diseases are serious problem in an aged society and their treatment is necessary for maintaining QOL. To prevent bone diseases, we have done the study of effects of ion channels and membrane potential in bone. To investigate the signaling mechanism via ion channel and receptor, we examined the function of bone cells by light-sensitive ion channel and pump. The light-gated ion channels and pump were transfected into bone cells and then the role of membrane potential on those cells were investigated. Further, based on their results, we identified bone remodeling-related novel ion channels. In summary, our results indicate that membrane potential regulate bone cell function and bone remodeling-related novel ion channels are important for osteoclastic functions.

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	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：整形外科

科研費の分科・細目：骨・軟骨代謝学

キーワード：膜電位

1. 研究開始当初の背景

高齢化社会をむかえて、骨粗鬆症に代表される老化に伴う骨疾患数は増えつつあり、この治療・予防に力学刺激の強い運動（レジスタンス運動）は有用と報告されている。私と共同研究者は脳における主要な興奮性伝達物質であるグルタミン酸の力学的刺激伝達機構における役割と多様なイオンチャネ

ルの骨代謝機構における役割を明らかにしてきた。

2. 研究の目的

これらの結果は、骨の細胞間で脳神経と類似した情報伝達の存在を示唆している。そこで、脳内神経伝達物質受容体・イオンチャネルを介した電位変化を伴う骨代謝機構の解明を目指す。

3. 研究の方法

A：光作動性イオンチャネルを用いて細胞機能を調べた。具体的には、光作動性イオンチャネル・ポンプの遺伝子導入を用いて、骨芽細胞・破骨細胞での膜電位の役割を検討した。

B：破骨細胞機能に関与する新たなイオンチャネルの探索をおこなった。その結果、ライソソームに存在するカルシウムチャネルを新たな標的分子として同定して、その破骨細胞分化におよぼす影響を検討した。

4. 研究成果

A：人工的な膜電位操作回路を骨芽細胞・破骨細胞に組み入れて膜電位を制御することに成功した。具体的には、光照射により活性化するイオンチャネル (ChWR: Channelrhodopsin-Wide Receiver) およびポンプ (Arch: Archaeorhodopsin-3) を発現させることで、任意の時期・場所での膜電位操作を可能とした。生体内での検討をおこなうため、頭頂骨部に焦点をあてて、頭頂骨を切り取った部分に、マトリゲルとともに膜電位操作を可能とした細胞を埋め込み、定着させることに成功した。細胞定着の試行錯誤のため、予想以上に時間がかかったが、現在、この細胞を埋め込んだマウスにたいして、光照射をおこない、骨量のコントロールをおこなうことを試みている。

B：膜電位操作回路の発展のため、膜電位感受性分子の破骨細胞の機能的スクリーニングをおこない、その結果、ライソソームにある膜電位感受性イオンチャネルのカルシウム透過性チャネル TPC2 を同定した。破骨細胞の分化過程において、細胞内カルシウム濃度の変動が深くかかわっているが、TPC2はこの細胞内カルシウム変動を制御しており、破骨細胞分化をコントロールしていることを報告した (発表論文2)。また、力学的負荷・膜電位変動時における骨芽細胞の細胞内カルシウム変動にイオンチャネル TRPV4 の関与を見出した (発表論文1)。現在、これら分子を膜電位操作・細胞内カルシウム変動に生かすために、細胞における発現調整をおこなっている。

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)

[雑誌論文] (計6件)

1: Takafumi Suzuki, Takuya Notomi (**Corresponding author**), Daizuke Miyajima, Fumitaka Mizoguchi, Tadayoshi Hayata, Tetsuya Nakamoto, Ryo Hanyu, Paksinee Kamolratanakul, Atsuko Mizuno, Makoto Suzuki, Yoichi Ezura, Yuichi Izumi, Masaki Noda, Osteoblastic differentiation enhances expression of TRPV4 that is required for

calcium oscillation induced by mechanical force, *Bone*, 54(1): 172-8, 2013

2: Takuya Notomi (**Corresponding author**), Yoichi Ezura, Masaki Noda, Identification of two pore channel 2 as a novel regulator of osteoclastogenesis, *J. Biol. Chem.*, 287(42): 35057-64, 2012

3: Aryal Smiriti, Kentaro Miyai, Yoichi Ezura, Tadayoshi Hayata, Takuya Notomi, Tetsuya Nakamoto, Tony Pawson, Masaki Noda, Nck1 deficiency accelerates unloading-induced bone loss, *J. Cell. Physiol* 228: 7: 1397-1403, 2013

4: Daisuke Miyajima, Tadayoshi Hayata, Takafumi Suzuki, Hiroaki Hemmi, Yoichi Ezura, Tetsuya Nakamoto, Takuya Notomi, Teruo Amagasa, Ralph T Böttcher, Mercedes Costell, Reinhard Fässler, Masaki Noda. Profilin1 regulates sternum development and endochondral bone formation. *J. Biol. Chem.*, 287(40): 33545-53, 2012

5: Ryo Hanyu, Vanessa L. Wehbi, Tadayoshi Hayata, Shuichi Moriya, Timothy N. Feinstein, Yoichi Ezura, Masashi Nagao, Yoshitomo Saita, Hiroaki Hemmi, Takuya Notomi, Tetsuya Nakamoto, Ernestina Schipani, Shu Takeda, Kazuo Kaneko, Hisashi Kurosawa, Gerard Karsenty, Henry M. Kronenberg, Jean-Pierre Villardaga and Masaki Noda. Anabolic action of parathyroid hormone regulated by the beta2-adrenergic receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(19): 7433-7438, 2012

6: Tomomi Sakuma, Tetsuya Nakamoto, Hiroaki Hemmi, Sohei Kitazawa S, Riko Kitazawa, Takuya Notomi, Tadayoshi Hayata, Yoichi Ezura, Teruo Amagasa and Masaki Noda. CIZ/NMP4 is expressed in B16 melanoma and forms a positive feedback loop with RANKL to promote migration of the melanoma cells. *J Cell Physiol* 227: 7: 2807-2812, 2012

[学会発表] (計12件)

国際会議 1: Takuya Notomi, Yoichi Ezura, Masaki Noda, Lysosomal Calcium Channel, TPC2, Regulates Osteoclastogenesis via Generation of Intracellular Ca²⁺ Response and Subsequent NFATc1 Localization: A Novel Mechanism of Osteoclastic Ca²⁺ Signaling, ASBMR 2012, Minneapolis, Minnesota, USA, 2012

2: Shuichi Moriya, Tadayoshi Hayata, Jumpei Shirakawa, Tetsuya Nakamoto, Takuya Notomi, Yoichi Ezura, Kazuo Kaneko, Masaki Noda, Parathyroid Hormone Stimulates Tob1 Expression in Osteoblastic Cells in vitro and in vivo, ASBMR 2012, Minneapolis, Minnesota, USA, 2012

3: Shirakawa Jumpei, Yoichi Ezura, Takuya

Notomi, Tadayoshi Hayata, Tetsuya Nakamoto, Shuichi Moriya, Ken Omura, Masaki Noda, PTH Enhances Mechanical Stress-induced Osteoblast Proliferation in Calvarial Derived Osteoblasts via Up-regulation of CyclinD1 Expression, ASBMR 2012, Minneapolis, Minnesota, USA, 2012

4: Chiho Watanabe, Masahiro Morita, Yoichi Ezura, Tetsuya Nakamoto, Tadayoshi Hayata, **Takuya Notomi**, Keiji Moriyama, Tadashi Yamamoto, Masaki Noda, Cnot3 (Ccr4-not complex subunit3), a Regulator of mRNA Stability, Regulates Bone Mass and Gene Expression Related to Osteoclast Formation, ASBMR 2012, Minneapolis, Minnesota, USA, 2012

5: Yoichi Ezura, Tadayoshi Hayata, Tetsuya Nakamoto, **Takuya Notomi**, Takeshi Muneta, Ichiro Sekiya, Masaki Noda, Identification of Signature Genes Selectively Expressed in Mesenchymal Stem Cells Derived from Synovial Joint Tissues, ASBMR 2012, Minneapolis, Minnesota, USA, 2012

6: Smriti Aryal A.C, Kentaro Miyai, Yoichi Ezura, Tadayoshi Hayata, **Takuya Notomi**, Tetsuya Nakamoto, Tony Pawson, Masaki Noda, Nck, an Actin Cytoskeleton Modulator, Controls Expression of Osteocytic Genes, Phosphate Homeostasis by Regulating FGF 23 Expression in Bone and Maintains Bone Mass, ASBMR 2012, Minneapolis, Minnesota, USA, 2012

7: Makiri Kawasaki, Tetsuya Nakamoto, **Takuya Notomi**, Tadayoshi Hayata, Yoichi Ezura, Masaki Noda, TGF-β1 Decreases Ift88 Expression in Chondrocytic Cell Line ATDC5, ASBMR 2012, Minneapolis, Minnesota, USA, 2012

国内会議 1: 納富拓也、江面陽一、野田政樹、Two Pore Channel 2 を介したリソソーム由来 Ca²⁺による新たな破骨細胞分化制御機構、第 30 回 日本骨代謝学会、東京、2012

2: 川崎真希理、中元哲也、**納富拓也**、早田匡芳、江面陽一、野田政樹、一次繊維タンパク Bbs3 は骨代謝に関与する、第 30 回 日本骨代謝学会、東京、2012

3: 渡辺千穂、江面陽一、早田匡芳、中元哲也、**納富拓也**、森山啓司、野田政樹、骨量制御の新転写後性分子機構：mRNA deadenylase である Ccr4-not complex 構成因子 Cnot3 の欠失による高回転型の骨量減少の解析、第 30 回 日本骨代謝学会、東京、2012

4: 守屋秀一、早田匡芳、中元哲也、**納富拓也**、江面陽一、金子和夫、野田政樹、骨芽細胞における G タンパク質共役型受容体(GPCR)による RANKL 制御の検討、第 30 回 日本骨代

謝学会、東京、2012

5: 江面陽一、早田匡芳、中元哲也、**納富拓也**、関谷一郎、宗田大、野田政樹、ヒト骨髄および滑膜由来間葉系細胞において異なる CpG メチル化を示す遺伝子群の探索と骨軟骨細胞分化の制御に関わる転写因子群の抽出：RUNX2 および RUNX3, D+X5, ALX4 遺伝子、第 30 回 日本骨代謝学会、東京、2012

〔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〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

納富拓也 (TAKUYA NOTOMI)

東京医科歯科大学・歯と骨の GCOE 拠点・
特任講師

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：