

## 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：16301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23890145

研究課題名（和文） 電位依存性プロトンチャンネルの破骨細胞における生理的役割の解明

研究課題名（英文） Physiological roles of the HVCN1 channel in osteoclast

研究代表者

佐々木 真理 (Sasaki Mari)

愛媛大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：80435817

研究成果の概要（和文）：破骨細胞の機能評価するための実験系の構築を行った。まず細胞レベルでの機能評価系に関しては、破骨細胞の初代培養系である骨芽細胞との共存培養のための骨芽細胞採取法を確立した。次に、生体内での破骨細胞機能評価のために、骨へ機械的刺激を加える実験系を構築した。その上で、破骨細胞での電氣的活動を調べるための実験手法を確立した。具体的には、細胞膜の膜電位変化を可視化する実験手法の確立である。

研究成果の概要（英文）：Experimental methods for analyzing the osteoclast function was established. For in vitro experiment, osteoclast precursor was co-cultured with osteoblast to differentiate to osteoclast. For in vivo experiment, mechanical testing machine was made for tibia loading. Using this machine the increasing of bone mass was evaluated. To study membrane potential of osteoclast, membrane potential change was measured by imaging technique.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：生理学一般

キーワード：イメージング イオンチャンネル

### 1. 研究開始当初の背景

研究代表者は、世界に先駆けて、長年不明であった電位依存性プロトンチャンネルの分子実体 (VSOP と命名) を明らかにし、さらに、細胞の膜電位制御に関わるであろうこの分子が、破骨細胞に発現していることを見出した(未発表)。一方、骨においては電氣的刺激が骨形成に重要であることがわかっているが、骨形成を担う骨芽細胞とカップリングする破骨細胞における電氣的な活動の存在とその意義は全くわかっていなかった。

### 2. 研究の目的

研究代表者は、電位依存性プロトンチャンネル VSOP のノックアウトマウスを駆使し、破骨細胞における VSOP の生理的役割を明らかにするとともに、破骨細胞における膜電位の機能的意義を解明し、破骨細胞機能異常状態に起因する、骨粗鬆症の新たな治療薬開発のための基礎基盤的知見を得ることを目的として研究を開始した。

### 3. 研究の方法

VSOP のノックアウトマウスの解析を行い、破骨細胞、骨芽細胞、骨細胞や骨髄環境に異常がないか調べる。VSOP が破骨細胞分化能に関与しているかを、*in vitro* の分化誘導系の実験を行い調べる。加えて分化成熟させた破骨細胞を象牙基質切片の上で培養し、骨吸収能を調べる。その際、破骨細胞に、膜電位感受性色素をとりこませておき、リアルタイムで骨吸収能と、細胞膜電位変化をとらえ、膜電位が破骨細胞機能に与える影響について調べる。骨代謝の評価に関しては、骨への機械的な刺激に対する応答を調べる。

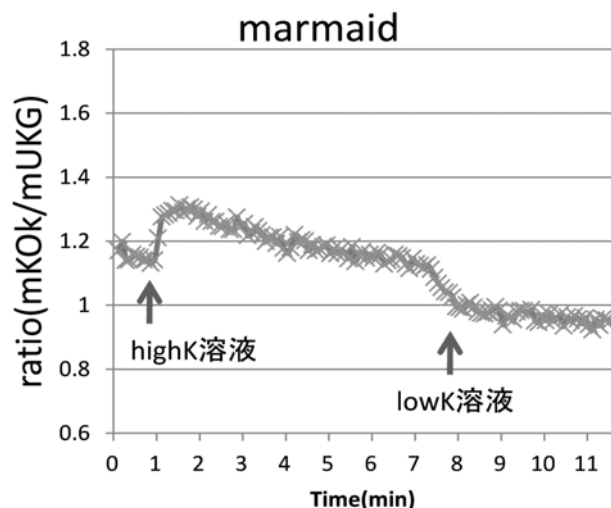
### 4. 研究成果

VSOP のノックアウトマウスの愛媛大学医学部動物実験施設への導入が予定より大幅に遅

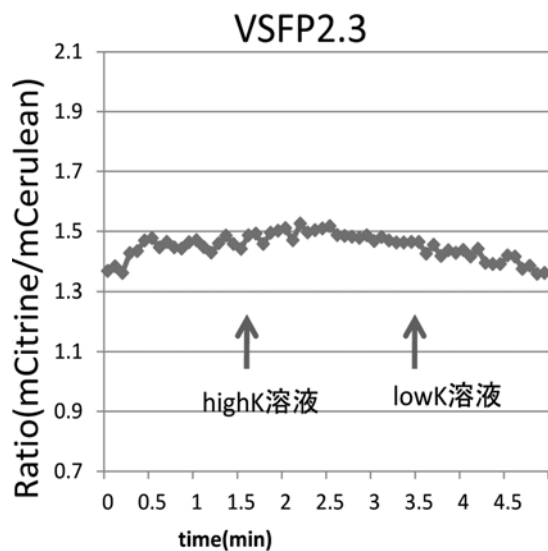
れたが、現在、順調に増えてきて、実験を行えるようになった。

まず、破骨細胞の分化能に関する実験では、破骨細胞の初代培養培養系である、骨芽細胞との共存培養のための骨芽細胞採取法を研究室内で確立した。

膜電位イメージングについては、DiBAC などの化学合成色素を用いた実験を行ったが、破骨細胞分化のように長期間に及ぶイメージングには、退色や細胞毒性の問題から、適切ではないことが明らかとなったことから、タンパク質性のプローブを用いる実験に切り替えた。特に本研究課題で計画していた 2 光子励起顕微鏡を用いた膜電位計測は実績がないことから、まず最初に 3 つのタンパク質性膜電位プローブ mermaid, VSFP2.3, VSFP2.4 を 2 光子励起顕微鏡で使用する際の実験条件を検討した。その結果、mermaid に関しては、1 光子励起の時よりは FRET 効率がよい反面、短波長側に予期せぬ吸収が存在することが分かった。

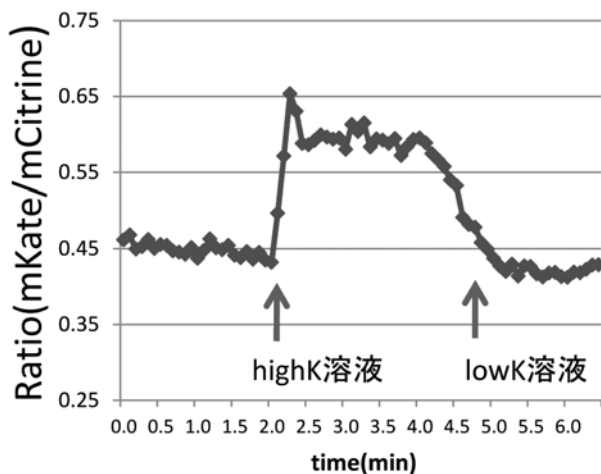


VSFP2.3 は 1 光子励起では VSFP2.4 よりも FRET 効率がよいが、2 光子励起では、VSFP2.3 では FRET がほぼおこらないことが分かった。



反面 VSFP2.4 は FRET 効率が 1 光子励起よりよいことが分かった。VSFP2.4 は mermaid や VSFP2.3 より長波長プローブであるため、より *in vivo* での観察に向いていることから、本研究課題を遂行するにあたり、最も適したプローブは VSFP2.4 であることがわかった。

### VSFP2.4

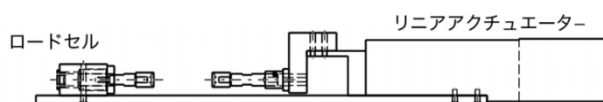


本研究課題の 2 年目に、VSFP2.4 をさらに改良し細胞膜への発現が改善された VSFP-Butterfly が発表されたことから、さっそくこれを購入した。

破骨細胞での実験を行う前に、ポジティブコントロールとしてまずは、興奮性細胞である神経細胞に VSFP-Butterfly を発現させた上で、膜電位イメージングを行ったところ、神経活動をとらえた蛍光強度変化をとらえることができた。このため、VSFP-Butterfly を本研究でももちいることとしたが、破骨細胞への遺伝子導入が困難であることから、レンチウイルスベクターをもちいた発現系にて遺

伝子導入することとし、VSFP-Butterfly をレンチウイルス用ベクターへ遺伝子構築した。

一方、VSOP の骨代謝における役割解明のために、骨への機械的刺激に対する応答を評価する系の構築を行った。脛骨へ機械的な刺激を行うための装置の開発を共同研究者とともに行った。この装置を用いて脛骨へ繰り返し圧迫刺激を行い、骨新生がおこることを確認した。



### 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. Sasaki M, 他 7 名

Autoimmune disorder phenotypes in HVCN1 gene deficient mice.

*Biochem J.* 2013 Mar 1;450(2):295-301.

(査読あり) doi:10.1042/BJ20121188

[学会発表] (計 3 件)

#### 1. 佐々木 真理 他 7 名

電位依存性プロトンチャネルの欠損は自己免疫疾患様表現型を示す

第 90 回日本生理学会大会 東京 2013 年 3 月 27-29 日

#### 2. 佐々木 真理

新規膜電位感受性分子の発見とその意義

第 90 回日本生理学会大会 東京 2013 年 3 月 27-29 日

国際学会

3. Yutaro Tsubakihara, Mari Sasaki (発表者)

他 8 名

Analysis of the roles of Arkadia during  
osteoblast differentiation

TGF meeting 2012 , 28, August  
(Netherland)

[その他]

入澤彩、女性生理学者奨励賞 受賞

佐川喜一賞 受賞

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

佐々木 真理 (Sasaki Mari)

愛媛大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：80435817