

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：34408

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26282182

研究課題名(和文) 神経 - 膜電位変動を軸とする運動力学的刺激伝達機構の解明

研究課題名(英文) Exercise related mechanosignaling based on nervous system and changes in membrane potential

研究代表者

納富 拓也 (NOTOMI, Takuya)

大阪歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：70542249

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 10,800,000円

研究成果の概要(和文)：老化や閉経に伴う骨粗鬆症患者数は100万人といわれ、高齢化社会をむかえて、その患者数は増加し続けている。この治療・予防に運動のような力学的刺激は有効であると報告されている。本研究では、力学的刺激・神経系・細胞膜電位変動の関係について検討するために、光作動性膜電位操作分子を骨芽細胞・破骨細胞に組み入れるとともに、細胞膜電位を指標とした分子スクリーニングにより、数種類の標的分子を同定した。また、生体内での影響を検討するために、Invivo transfectionもしくは細胞移植をおこない、神経系による骨力学的刺激伝達機構に神経伝達物質受容体と細胞膜電位変動の関与を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Age-related bone diseases such as osteoporosis are serious problem in an aged society. Mechanical stress and resistance exercise is useful for preventing bone loss. To investigate the relationships between mechanical stress, nervous system and the changes in membrane potential, we overexpressed light-sensitive ion channel and pump in osteoblasts and osteoclasts and identified the targeting molecules via molecular screening based on membrane potential. In invivo experiments, invivo transfection for light-sensitive molecules and cell transplantation were used for investigating bone remodeling. In summary, our results indicate that changes in membrane potential and the receptor for neuronal transmitter affect bone mehanosignaling.

研究分野：骨生物学

キーワード：骨代謝 細胞膜電位 イオンチャネル 骨芽細胞 破骨細胞 光遺伝学

1. 研究開始当初の背景

老化や閉経に伴う骨粗鬆症患者数は1000万人といわれ、高齢化社会をむかえて、その患者数は増加し続けている。この治療・予防に運動のような力学的刺激は有効であると報告されている。しかしながら、力学的刺激の強い運動(レジスタンス運動)による骨代謝・骨形態変動についてのメカニズムは明確にされていない。これは、動物に運動負荷することの難しさが一因と考えられる。私は、このメカニズムを検討するために、ラットがヒトと同様に直立運動をおこなうスクワット運動と非侵襲的にレジスタンス運動をおこなうクライミング運動を開発した。また、神経伝達物質受容体と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、細胞膜電位変動と骨代謝の関係を検討してきた。

2. 研究の目的

本研究では、現在までの結果に基づいた神経伝達物質受容体・イオンチャネルを介した細胞膜電位変化を伴う力学的刺激による骨代謝機構の解明を目指す。力学的刺激伝達機構における神経系と細胞膜電位変動の役割を検討する。

3. 研究の方法

骨芽細胞・破骨細胞に膜電位操作分子を組み入れて、その機能検討をおこなった。骨芽細胞・破骨細胞機能の確認は、細胞内イオンイメージング、パッチクランプ法を用いて検討した。力学的刺激は、水流負荷もしくは伸展負荷を用いた。細胞分化の検討は、分化培地を用いて標準的方法によりおこなった。細胞膜電位操作および対象分子同定のために、FLIPR法により、分子スクリーニングをおこない、同定した分子機能と光照射による膜電位操作との関係をあわせて検討した。また、標的分子を導入したマウスもしくは遺伝子欠損マウスに力学的負荷をおこない、その影響を検討した。骨の質は、高精細マイクロCTおよび骨形態計測法・強度試験にて、その構造・強度を測定して評価した。

4. 研究成果

FLIPRスクリーニングによる力学的刺激に反応する細胞膜上分子の探索および現在までに同定している分子の解析をおこなった。FLIPRスクリーニングでは、膜電位の変動を指標として分子の同定をおこなっているが、新たな標的分子Piezo, HCN, VSCCを同定して、検証をおこなった。同定した分子の細胞膜電位との関係を検討するために、骨関連細胞に光誘導膜電位操作分子(ChRWR, Arch)を導入して、細胞膜電位の役割を検討するとともに、力学的刺激に反応して変動する膜電位の役割をあわせて検討した。力学的刺激は、伸展刺激を用いた。CRISPR/CAS9による遺伝子欠損もしくはsiRNAによる遺伝子ノックダウンをおこない、同定した分子

の細胞膜電位および力学的刺激伝達機構における調節機能を認めた。非興奮性細胞における細胞膜電位変動の重要性も本結果から明らかとなった。

次に、同定した標的分子の一つPiezo1の力学的刺激伝達機構・骨代謝における役割を検討した。CRISPR/CAS9によりPiezo1の遺伝子欠損させた骨芽/骨細胞株(MC3T3/MLOY4)を用いて、力学的刺激(伸展刺激)を与えたところ、力学刺激反応指標がコントロール細胞株に比べて大きく減少した。この原因を検討するために、細胞外カルシウムを除去した後、力学的刺激をおこなったところ、コントロール細胞株では力学刺激反応指標が大きく減少したが、Piezo1欠損細胞株では、変化が認められなかった。また、力学的刺激の細胞膜電位変動を記録したところ、Piezo1遺伝子欠損では、コントロールと比較して変動幅が大きく減少した。これらの結果から、細胞膜電位とPiezo1の力学的刺激伝達機構への関与が示唆されたとともに、細胞外カルシウムの重要性が認められた。

生体内における力学的刺激・神経系・細胞膜電位変動の関係について検討するために、生体力学負荷(Invivo loading)を用いた。HCN1欠損マウスの脛骨に生体力学負荷をおこない骨量・骨形成を評価した。2週間の力学負荷により、海綿骨骨量・骨形成速度ともに増加したが、遺伝子欠損マウスではその増加量が低くなっていた。神経系の影響について、Invivo transfectionにて、脛骨近位部周辺の神経伝達物質受容体を遺伝子ノックダウンした後、生体力学的負荷をおこなった。その結果、遺伝子ノックダウンにより、力学的負荷により生じる骨形成速度増加が減少した。また、細胞膜電位変動との関係を検討するために、光誘導膜電位操作分子を導入した骨芽細胞を頭頂骨に移植して、頭頂骨に生体力学負荷をおこなった。頭頂骨骨量は、光照射により細胞膜電位変動+力学的負荷をおこなったマウスにて、大きく増加していた。神経遮断毒素による力学的刺激の骨力学刺激反応低下を踏まえると、これらの結果は、神経系による骨力学的刺激伝達機構に神経伝達物質受容体の関与を示す。

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8件)

1. Tetsuya Nakamoto, Yayoi Izu, Makiri Kawasaki, Takuya Notomi, Tadayoshi Hayata, Masaki Noda, Yoichi Ezura, Mice Deficient in CIZ/NMP4 Develop an Attenuated form of K/BxN-Serum Induced Arthritis. *J Cell Biochem*, 117: 4: 970-977, 2016, 査読有

2. **Takuya Notomi (Corresponding author)**, Miyuki Kuno, Akiko Hiyama, Yoichi Ezura, Masashi Honma, Toru Ishizuka, Kiyoshi Ohura, Hiromu Yawo, Masaki Noda, Membrane depolarization regulates intracellular RANKL transport in non-excitabe osteoblasts. *Bone*, 81: 1: 306-314, 2015, 査読有
 3. **Takuya Notomi (Corresponding author)**, Miyuki Kuno, Akiko Hiyama, Kiyoshi Ohura, Masaki Noda, Timothy M. Skerry, Zinc-Induced Effects on Osteoclastogenesis Involves Activation of Hyperpolarization-Activated Cyclic Nucleotide Modulated Channels via Changes in Membrane Potential. *J Bone Miner Res*, 30: 9: 1618-1626, 2015, 査読有
 4. Takayuki Yamada, Yoichi Ezura, Tadayoshi Hayata, Shuichi Moriya, Jumpei Shirakawa, **Takuya Notomi**, Smriti Aryal, Makiri Kawasaki, Yayoi Izu, Kiyoshi Harada, Masaki Noda, β 2 Adrenergic receptor activation suppresses (BMP)-induced alkaline phosphatase expression in osteoblast-like MC3T3E1 cells. *J Cell Biochem*, 116: 6: 1144-1152, 2015, 査読有
 5. Shuichi Moriya, Tadayoshi Hayata, **Takuya Notomi**, Smriti Aryal, Tetsuya Nakamoto, Yayoi Izu, Makiri Kawasaki, Takayuki Yamada, Jumpei Shirakawa, Kazuo Kaneko, Yoichi Ezura, Masaki Noda, PTH Regulates β 2-Adrenergic Receptor Expression in Osteoblast-like MC3T3-E1 Cells. *J Cell Biochem*, 116: 1: 142-148, 2015, 査読有
 6. **Takuya Notomi (Corresponding author)**, Ikuaki Karasaki, Yuichi Okazaki, Nobukazu Okimoto, Yushi Kato, Kiyoshi Ohura, Masaki Noda, Toshitaka Nakamura, Masashige Suzuki, Insulinogenic sucrose + amino acid mixture ingestion immediately after resistance exercise has an anabolic effect on bone compared with non-insulinogenic fructose + amino acid mixture in growing rats. *Bone*, 65: 1: 42-48, 2014, 査読有
 7. Jumpei Shirakawa, Yoichi Ezura, Shuichi Moriya, Makiri Kawasaki, Takayuki Yamada, **Takuya Notomi**, Tetsuya Nakamoto, Tadayoshi Hayata, Atsushi Miyawaki, Ken Omura, Masaki Noda, Migration Linked to Fucci-Indicated Cell Cycle Is Controlled by PTH and Mechanical Stress. *J Cell Physiol*, 229: 10: 1353-1358, 2014, 査読有
 8. Chiho Watanabe, Masahiro Morita, Tadayoshi Hayata, Tetsuya Nakamoto, Chisato Kikuguchi, Li Xue, Yasuhiro Kobayashi, Naoyuki Takahashi, **Takuya Notomi**, Keiji Moriyama, Tadashi Yamamoto, Yoichi Ezura, Masaki Noda, Stability of mRNA influences osteoporotic bone mass via CNOT3. *Proc Natl Acad Sci USA*, 111: 7: 2692-2697, 2014, 査読有
- 〔学会発表〕(計 13 件)
1. **Takuya Notomi**, Miyuki Kuno, Akiko Hiyama, Yoichi Ezura, Kiyoshi Ohura, Masaki Noda, Changes in membrane potential regulates RANKL intracellular transport via voltage-gated calcium channels in osteoblasts, ASBMR 2016 Atlanta, Georgia, USA, 16th September, 2016
 2. **Takuya Notomi**, Miyuki Kuno, Akiko Hiyama, Kiyoshi Ohura, Masaki Noda, Timothy M. Skerry, Zinc-induced effects on osteoclastogenesis involves activation of HCN channels via changes in membrane potential, ASBMR 2015 Seattle, Washington, USA, 11th October, 2015
 3. **Takuya Notomi**, Miyuki Kuno, Yoichi Ezura, Kiyoshi Ohura, Masaki Noda, Membrane depolarization regulates intracellular RANKL transport in non-excitabe osteoblasts, 13th Congress of the International Society of Bone Morphometry, Tokyo, Japan, 28th April, 2015
 4. Makiri Kawasaki, Tadayoshi Hayata, Tetsuya Nakamoto, **Takuya Notomi**, Shuichi Moriya, Takayuki Yamada, Yayoi Izu, Yoichi Ezura, Masaki Noda, TGF-beta impairs cilia morphology via suppression of Ift88 expression in chondrocytic ATDC5 cells, 13th Congress of the International Society of Bone Morphometry, Tokyo, Japan, 28th April, 2015

5. Takayuki Yamada, Yoichi Ezura, Tadayoshi Hayata, Shuichi Moriya, Jumpei Shirakawa, **Takuya Notomi**, Smriti Aryal, Makiri Kawasaki, Yayoi Izu, Kiyoshi Harada, Masaki Noda, BMP-induced alkaline phosphatase expression in osteoblast-like MC3T3E1 cells is suppressed by $\beta 2$ adrenergic receptor activation, 13th Congress of the International Society of Bone Morphometry, Tokyo, Japan, 28th April, 2015
 6. Jumpei Shirakawa, Yoichi Ezura, Shuichi Moriya, Makiri Kawasaki, Takayuki Yamada, **Takuya Notomi**, Tadayoshi Hayata, Atsushi Miyawaki, Ken Omura, Masaki Noda, Morphological and dynamic analysis of migration linked to FUCI-indicated cell cycle under the influence of PTH and mechanical flow signals, 13th Congress of the International Society of Bone Morphometry, Tokyo, Japan, 28th April, 2015
 7. **納富拓也**, 大浦清、野田政樹、レジスタンス運動直後のインスリン高刺激性糖摂取は、インスリン低刺激性糖摂取に比べて骨量・骨強度を増大させる、第 56 回 歯科基礎医学会、福岡国際会議場、福岡県、福岡市、2014 年 9 月 26 日
 8. 天野均、**納富拓也**、大浦清、スフィンゴシン 1 リン酸は in vitro の破骨細胞形成系において分化促進する、第 56 回 歯科基礎医学会、福岡国際会議場、福岡県、福岡市、2014 年 9 月 26 日
 9. **Takuya Notomi**, Ikuaki Karasaki, Yuichi Okazaki, Nobukazu Okimoto, Yushi Kato, Kiyoshi Ohura, Masaki Noda, Toshitaka Nakamura, Masashige Suzuki, Insulinogenic sucrose+amino acids mixture ingestion immediately after resistance exercise has an anabolic effect on bone compared with non-insulinogenic fructose+amino acids mixture in growing rats, ASBMR 2014 Houston, Texas, USA, 13th September 2014
 10. Yoichi Ezura, Tadayoshi Hayata, **Takuya Notomi**, Ichiro Sekiya, Masaki Noda, Preferentially expressed genes in synovium derived stromal cells include atypical genes not expressed highly in mouse synovium but in embryonic cartilages, ASBMR 2014 Houston, Texas, USA, 13th September 2014
 11. **納富拓也**、唐崎郁晃、岡崎雄一、沖本信和、加藤雄士、大浦清、野田政樹、中村利孝、鈴木正成、レジスタンス運動直後のインスリン高刺激性糖（砂糖）+アミノ酸溶液摂取は、インスリン低刺激性糖（果糖）+アミノ酸溶液摂取に比べて骨量・骨強度を増大させる、第 32 回 日本骨代謝学会、大阪国際会議場、大阪府、大阪市、2014 年 7 月 25 日
 12. 川崎真希理、早田匡芳、中元哲也、**納富拓也**、江面陽一、野田政樹、培養軟骨細胞 ATDC5 において、TGF-beta1 は一次繊毛構成遺伝子 Ifi88 の発現を抑制し、一次繊毛を短縮させる、第 32 回 日本骨代謝学会、大阪国際会議場、大阪府、大阪市、2014 年 7 月 25 日
- 〔図書〕(計 1 件)
1. **納富拓也** (宮村実晴編)、ニュー運動生理学(運動と骨格:骨形態)、真興交易(株)医書出版部、262-270 頁、2014
6. 研究組織
- (1)研究代表者
- 納富 拓也 (NOTOMI, Takuya)
大阪歯科大学・歯学部・講師
研究者番号: 7 0 5 4 2 2 4 9