

# 力学的刺激を模倣する新型骨粗鬆症治療薬の開発を目指した力覚情報処理機構の解明

所属： 筑波大学 医学医療系 生体シグナル制御学研究室

助成対象者： 早田 匡芳

共同研究者：

## 概要（300字以内）

宇宙飛行士や寝たきり患者の骨量が減少することから、骨量を維持するには力学的負荷が必要である。しかし、力学的負荷がどのように骨量増加へ変換されるか、その分子実態は明らかではない。本研究では、骨に高い発現を示すイオンチャンネル **Bsic** の力覚-骨形成情報変換における役割に着目した。**Bsic** が機械的刺激依存的な細胞外 ATP 放出に関与するかどうかを検討した結果、**Bsic** を過剰発現した細胞では、機械的刺激依存的な細胞外 ATP が増加し、siRNA で **Bsic** をノックダウンした細胞では、それが減少した。また、**Bsic** KO マウスの作製に成功し、今後、骨量の解析を実施する計画である。

## Abstract

The fact that bone masses of astronauts and bedridden patients decrease suggests that mechanical stress is required for bone mass maintenance. However, little is known about molecular mechanism by which mechanical stress is converted into bone mass increase. In this study, we focused on a role of **Bsic** gene that encodes an ion channel and is highly expressed in bone for force sense-bone formation conversion mechanism. We examined whether **Bsic** is involved in mechanical stress-dependent extracellular ATP release. Mechanical stress-dependent extracellular ATP release was increased in **Bsic** -overexpressing cells and decreased in **Bsic** -knockdown cells, respectively. Next, we have succeeded in establishing **Bsic** KO mice and are planning to perform bone mass analysis.

## 研究内容

### 背景

要介護者認定者数は 584 万人 (H26 年 3 月末現在)、介護費用の総額は 9 兆 1,734 億円 (H25 年度累計) であり、要介護者数、介護費用共に年々増加の一途を辿っている (厚生労働省平成 25 年度 介護保険事業状況報告)。骨折・転倒は、介護が必要となった主な原因の第 4 位 (11.8%) であり (厚生労働省平成 25 年国民生活基礎調査)、超高齢化社会を迎える我が国においては、骨の健康を守り、骨粗鬆症を防ぎ、骨折を予防する事は重要な課題である。宇宙飛行士や長期間の寝たきり患者の骨量が減少することから、骨量を維持するには運動などの力学的刺激が必要である。しかしながら、力学的刺激がどのように生化学的あるいは電気的なシグナルに変換され、骨形成を担う骨芽細胞に骨形成を促進させる情報を伝達しているかは不明である。というのは、それを担う分子の実態が不明だからである。そのような力覚-骨形成情報変換分子を同定し、その分子の作動性薬剤を開発すれば、その薬剤は、力学的刺激非存在下でも骨形成を促進する新型骨粗鬆症治療薬となりうる。そこで、そのような分子の候補として、データベースを用いて、ゲノム上のイオン輸送に関与する全遺伝子の発現を調べたところ、骨芽細胞に非常に特異的に発現する機能未知イオンチャネル遺伝子 (Bsic) を同定した。その分子と似たイオンチャネルは、ATP 放出チャネルとして機能することが報告されている。骨芽細胞では、力学的刺激依存的に ATP が放出されることが知られている。

### 目的

そこで、本研究では、Bsic が、力学的刺激依存的な ATP 放出を介して、力覚情報を骨芽細胞へ伝達することにより、力学的刺激依存的な骨形成に重要な役割を果たしているのではないかと仮説を立て、Fam26e の力覚情報変換機構における役割を解明することを目的とする。

### 結果

Bsic 遺伝子の骨芽細胞分化過程における遺伝子発現の変化を検討するために、骨芽細胞株 MC3T3-E1 を石灰化条件下で培養し、RNA を抽出し、Bsic 遺伝子発現をリアルタイム PCR で検討した。その結果、培養 1 週間で発現がピークを迎え、その後、2 週、3 週と発現が低下した。この遺伝子ファミリーには、他に 4 遺伝子存在するが、3 つは発現しておらず、

1 つは、骨芽細胞分化過程で発現が上昇しなかった。つまり、Bsic は、骨芽細胞分化に特異性を示すと考えられる。

次に、Bsic タンパク質の細胞内局在を検討するために、Bsic-FLAG コンストラクトを作製し、MC3T3-E1 にトランスフェクションし、蛍光免疫染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡で観察し、得られた画像を 3D 再構築した。その結果、Bsic-FLAG は、細胞膜の基底部分（細胞とガラスの接着面）に局在していた。

次に、Bsic が、機械的刺激依存的な細胞外 ATP 放出に関与するかどうかを調べるために、Bsic-FLAG コンストラクトを骨芽細胞にトランスフェクションした。その後、培養液を除去し、細胞を塩類溶液で洗浄し、ルシフェラーゼとルシフェリンを含む塩類溶液 100  $\mu$ l を添加し、細胞を 30 分間室温で静置した。その後、培養プレートをプレートリーダーにセットし、発光測定開始後 10 秒で、400 $\mu$ l/s の速度で塩類溶液 50 $\mu$ l を注入し、その後、1 秒毎に発光を測定した。その結果、Bsic-FLAG を発現した細胞では、コントロールの細胞に比べて、細胞外 ATP 濃度が高かった。一方、Bsic を siRNA でノックダウンさせた細胞では、コントロール細胞に比べて、細胞外 ATP 濃度が低かった。以上の結果は、Bsic は、機械的刺激依存的細胞外 ATP 放出に関与することを示唆する。

次に、骨形成における Bsic の生理学的機能を検討するために、Bsic ノックアウト (KO) マウスの作製を試みた。近年、CRISPR/Cas9 による KO マウスの作製が盛んに行われるようになった。しかし、従来の方法では、特異性が高いとはいえなかった。そこで、今回は、CRISPR/Cas9 の変異体である Cas9 ニッカーゼ法を用いた。この酵素を用いることにより、標的配列が近傍に存在するときのみ、その領域で DNA の二重鎖の切断が生じる。標的配列を二箇所設定し、2 種類のガイド RNA と Cas9 ニッカーゼをマウスの受精卵 (C57BL/6N 系統) にマイクロインジェクションした。そして、産まれたマウスの尻尾から DNA を抽出し、Bsic 標的領域の DNA を PCR で増幅し、塩基配列を解読した。その結果、Bsic の遺伝子に、67 塩基配列の欠失をもつマウスを同定することができた。現在、KO マウスの系統を確立し、実験に必要な数のマウスを準備しているところである。

今後

Fam26eKO マウスの骨形態計測解析を実施する。Fam26e が骨量の維持に及ぼす影響を調べるために、2ヶ月齢マウスを用いて、骨形態計測学的解析を行う。野生型マウスと Fam26e KO マウス間で、骨量を比較し、骨形成速度、骨芽細胞数、骨細胞数など骨形成に関するパラメーター、破骨細胞面、破骨細胞数など骨吸収に関するパラメーターを比較する。

Fam26e が力覚情報変換分子であるかどうかを検討するために、Fam26KO マウスを、尾部懸垂あるいは、大腿神経と坐骨神経切除によって、2週間、非荷重状態下におき、骨量を測定する。通常、2週間の非荷重状態で骨量は低下するが、もし Fam26e に力覚情報変換機能があれば、Fam26e 非存在下では、力覚情報が伝わらず、骨量減少は抑制されるはずである。また、非荷重状態後に通常飼育を行うと、力学的刺激により骨量が回復するが、Fam26e KO マウスで、骨量が回復しないかどうか検討する。

#### 引用文献

該当無し

#### 本助成に関わる成果

該当無し