

## 15. 運動力学刺激伝達制御による骨メカノリミッターの解除

納富 拓也

大阪歯科大学 歯学部 薬理学講座

Key words : 力学的刺激, 骨代謝, 骨細胞, 細胞膜電位, 光遺伝学

### 緒言

老化や閉経に伴う骨粗鬆症患者数は1,000万人を超えると推定され、高齢化社会を迎えて、その患者数は増加し続けている。この治療・予防に、運動のような骨形成を促進する力学刺激は有効であると報告されている。骨粗鬆症治療薬において、骨形成促進薬は主としてPTH関連製剤に限られ、その副作用から投与期間も限定されている。このため、骨中の力学刺激伝達機構に基づいた骨形成を強力に促進する方法が求められるが、力学刺激による骨代謝・骨形態変動についてのメカニズムは未だ明確にされていない。骨の力学刺激適応により同レベルの運動負荷では骨量・骨強度は維持され、持続的に増加しない。同レベルの運動負荷により、持続的に骨量・骨強度を増大させることは、寝たきり・低活動度の高齢者にとって有用であるだけでなく、骨格強化から筋減弱症の改善・治療にもつながる。本研究では、この力学刺激適応を持続的に可能とする骨メカノリミッター機構を同定して、それを解除するシステムの構築を目指す。

### 方法および結果

#### 1. 骨細胞におけるメカノリミッター機構と関連分子の探索

骨メカノリミッター機構の細胞レベルでの現象について、骨細胞株 (MLO-Y4) を用いて検討を開始した。骨細胞に伸展刺激 (伸展幅 10%、1分) を1回おこなうと、力学的刺激反応の指標としてのリン酸化 ERK (pERK) が増加する (図 1A : 本研究を通して Total ERK の伸展刺激による変化は認められない)。この 10 分後に同レベルの伸展刺激をおこなうと、増加量の変化は認められない (図 1B)。しかしながら、伸展量を増加させて、伸展刺激をおこなうと (伸展幅 20%、1分)、pERK のさらなる増加が認められた (図 1C)。

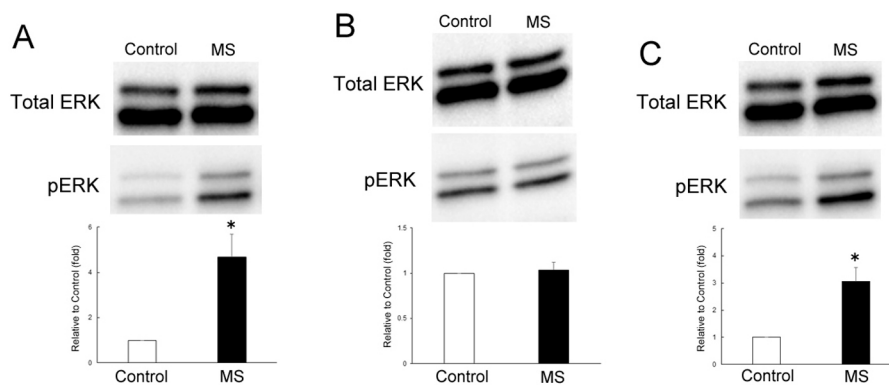


図 1. 伸展刺激後の pERK タンパク量の変化

(A) 伸展刺激 (MS) 後、pERK のタンパク量は、静置 (control) に比べて増加した。\*:  $p < 0.05$ ,  $n = 3$  (vs. Control) (Student's t-test).

(B) 1 回目の伸展刺激から 10 分後に再刺激では、pERK のタンパク量は、静置と変わらなかった。

(C) 10 分後の再刺激で、伸展量を 2 倍にすると、pERK のタンパク量は、静置に比べて増加した。\*:  $p < 0.05$ ,  $n = 3$  (vs. Control) (Student's t-test).

この現象に関して、先ず、細胞膜上分子に着目して検討を進めた。イオンチャネルの一つ、Piezo1 チャネル (Piezo1) は、力学的刺激に応じて活性化するイオンチャネルであり、カルシウムイオン透過性を有している。shRNA による *Piezo1* 遺伝子をノックダウンした骨細胞株とコントロール骨細胞株を作製した (図 2A)。これらを用いて、伸展刺激をおこなったところ (細胞外液組成: 145 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>)、*Piezo1* 遺伝子ノックダウンにより、pERK の増加量が大きく減少した (図 2B)。また、Piezo1 の阻害薬である GsMTx9 (100nM) を伸展刺激前 30 分間作用させて、伸展刺激をおこなったところ、遺伝子ノックダウンの結果と同様に、pERK の増加量が減少した (図 2C)。

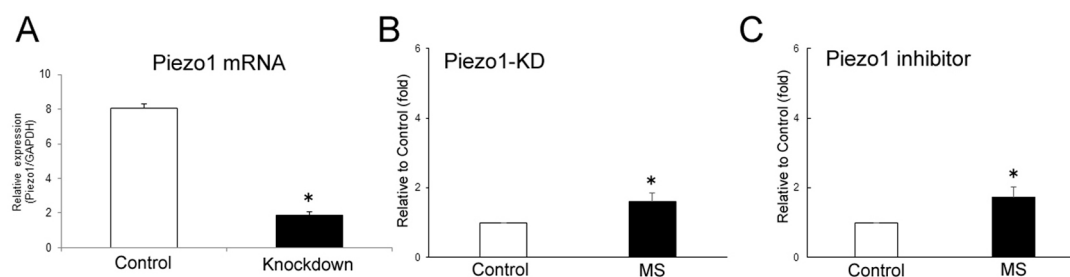


図 2. *Piezo1* ノックダウン・阻害による pERK タンパク量の変化

(A) *Piezo1* 遺伝子量は、piezo1-targeted shRNA を発現させた細胞株 (knockdown) にて、non-targeted shRNA を発現させた細胞株 (Control) に比べて減少した。\*:  $p < 0.05$ ,  $n = 10$  (vs. Control) (Student's t-test).

(B) *Piezo1* ノックダウン細胞株 (*Piezo1*-KD) では、伸展刺激後の pERK は増加したが、その増加量は通常の細胞株に比べて著しく低かった (図 1A を参照)。\*:  $p < 0.05$ ,  $n = 3$  (vs. Control) (Student's t-test).

(C) *Piezo1* 阻害薬 (*Piezo1*-inhibitor) を加えても伸展刺激後の pERK は増加したが、その増加量は通常の細胞株に比べて著しく低かった (図 1A を参照)。\*:  $p < 0.05$ ,  $n = 3$  (vs. Control) (Student's t-test).

続いて、Piezo1 を介した  $Ca^{2+}$  の細胞内への流入について検討するために、外液から  $Ca^{2+}$  を除いたところ、コントロール細胞では、伸展刺激による pERK の増加量が抑制されるが (図 3A)、*Piezo1* 遺伝子ノックダウン細胞では、その増加量は変わらなかった (図 3B)。骨細胞における細胞内力学的刺激伝達機構に、Piezo1 は  $Ca^{2+}$  の細胞外からの流入を介して関与していた。

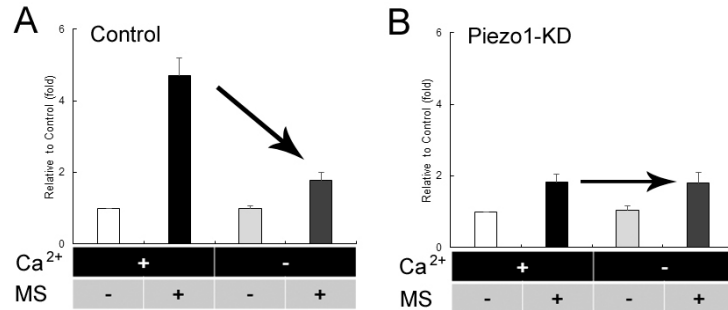


図 3. 細胞外カルシウムイオンの影響

- (A) Control 細胞株において、伸展刺激による pERK の増加量は、細胞外  $Ca^{2+}$  を除去すると著しく減少した。
- (B) *Piezo1*-KD 細胞株では、細胞外  $Ca^{2+}$  を除去しても、pERK の増加量に変化はなかった。

## 2. Piezo1 チャンネルの骨力学的刺激伝達機構における分子動態と役割

Piezo1 とメカノリミッター機構との関連性を検討するために、伸展刺激後 10 分後の再刺激実験をおこなった。コントロール細胞では、最初の刺激と同負荷刺激では pERK の増加が認められなかったが、*Piezo1* ノックダウン細胞では、同負荷刺激にて、pERK の増加が確認された (図 4A)。初回刺激直後に、GsMTx9 を添加し、10 分後に再刺激をおこなった場合でも、同負荷による pERK の増加が認められた (図 4B)。初回伸展刺激における *Piezo1* 遺伝子ノックダウンによる力学的刺激応答減少とは異なり (図 1A vs. 図 2B)、再刺激時の細胞内応答増加の結果は (図 1B vs. 図 4A)、再刺激時における Piezo1 による力学的刺激伝達機構の変化を示している。

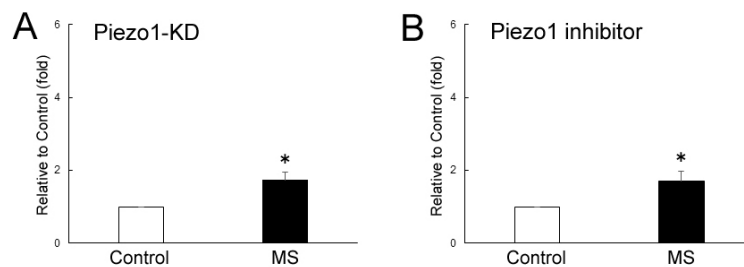


図 4. 再刺激時の piezo1 チャンネルの関与

- (A) *Piezo1*-KD 細胞株では、再刺激時の pERK 増加が認められた。(図 1B を参照：通常細胞株では認められなかった。)\*:  $p < 0.05$ ,  $n = 3$  (vs. Control) (Student's t-test).
- (B) Piezo1 阻害薬でも、再刺激時の pERK 増加が認められた。\*:  $p < 0.05$ ,  $n = 3$  (vs. Control) (Student's t-test).

細胞膜上分子の局在様式は、力学的刺激伝達の初期応答に重要である。Piezo1 の細胞内局在と力学刺激伝達機構の関与について、蛍光分子を用いて検討した。Piezo1 の C 末に赤色蛍光タンパクである cherry を付加した piezo1-cherry を作製した。この piezo1-cherry を骨細胞株に遺伝子導入をおこない、伸展刺激をおこなった。伸展刺激後に、

樹状突起先端部に移行することが観察された (図 5)。また、この局在様式の変化は、伸展刺激の強度に応じて変化した。この局在様式変化と細胞内力学的刺激応答の関係について、検討中である。

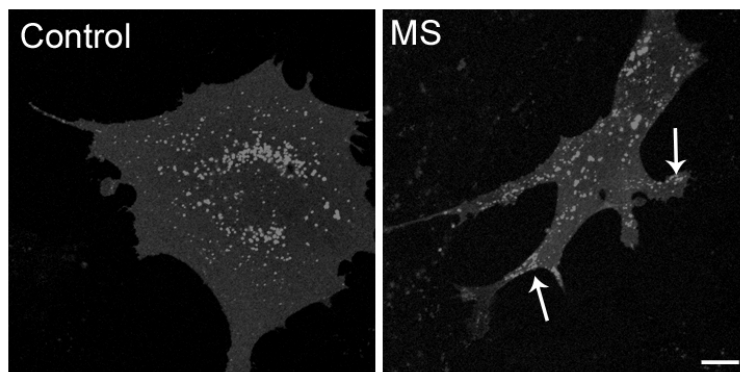


図 5. 伸展刺激前後の Piezo1 チャンネル局在様式

Piezo1-cherry を強制発現させた骨細胞株に伸展刺激をおこなうと、刺激前 (Control) に比べて、刺激 10 分後 (MS) では、蛍光斑点が細胞周辺・樹状突起先端に移行した (矢印)。  
Scale Bar: 20  $\mu$  m.

Piezo1 阻害による細胞内応答の増加のメカニズムについて検討を進めるために、細胞膜電位に焦点をあてた。力学的刺激に応じて、細胞膜電位は脱分極する。また、われわれの開発した光遺伝学を骨生物学に応用した方法にて<sup>1-2)</sup>、骨細胞に光照射により細胞膜電位の脱分極誘導をおこなうと、光刺激の初回時・再刺激時どちらも pERK の増加が認められた。細胞膜電位感受性色素を用いて、同負荷再刺激時の細胞膜電位変動を確認したところ、再刺激時では蛍光強度が全体的に低下した (図 6A)。しかしながら、Piezo1 ノックダウン細胞においては、1 回目と類似した再刺激時の細胞膜電位変動が観察された (図 6B)。これらのことから、Piezo1 は、再刺激時の細胞膜電位変動の発生に関与していると考えられるが、そのメカニズムについては不明であり、今後の研究にて追求していく。

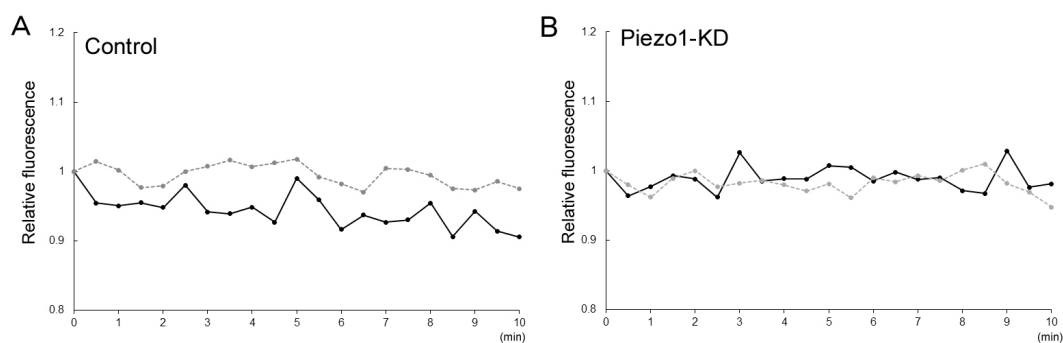


図 6. 伸展刺激による細胞膜電位変動

(A) Control 細胞株において、伸展刺激後の膜電位感受性色素の蛍光強度は、1 回目 (点線) に比べて、再刺激 (黒線) で全体的に低下した。  
(B) Piezo1-KD 細胞株では、1 回目、再刺激時を比較して、蛍光強度の差は認められなかった。

### 3. 生体内における骨メカノリミッター機構の検討

生体内での骨メカノリミッター機構の可能性を探索するために、自発的クライミング運動モデルを用いた。自発的クライミング運動モデルは、金網製タワーを上り下りして、動物に運動負荷をかけるモデルである<sup>3)</sup>。この運動負荷で

は、運動開始後 4 週間にて、骨量の増加が認められる。この骨量増加作用を加速させるために、Piezo1 阻害薬を右脛骨部周辺に投与して、1 週間後に海綿骨骨量をマイクロ CT により比較した。その結果、1 週間後では左右の海綿骨骨量に有意な差は認められなかった。

## 考 察

本研究では、同レベル負荷での持続的な骨量増大作用を可能とするための力学的刺激伝達機構について検討した。細胞培養系にて、骨メカノリミッター機構に関与する因子の一つとして細胞膜上分子である力学的負荷感受性イオンチャネル Piezo1 を同定したが、この作用機序には未だ不明な点が多く、今後の検証が必要である。また、力学的負荷伝達機構における、細胞膜電位の関与をあわせて明らかにした。細胞膜電位変動の発生に Piezo1 が関与するメカニズムを明らかにできていないが、今後、パッチクランプ実験を通して追求していく。生体内での検証は、開始されたばかりであり、詳細な条件検討が必要であるが、硬組織への光遺伝学応用により、研究を進めていく。

## 文 献

- 1) Notomi T, Kuno M, Hiyama A, Ezura Y, Honma M, Ishizuka T, Ohura K, Yawo H, Noda M. Membrane depolarization regulates intracellular RANKL transport in non-excitabile osteoblasts. *Bone*. 2015;81:306-14. doi: 10.1016/j.bone.2015.07.031. PubMed PMID: 26211991.
- 2) Notomi T, Kuno M, Hiyama A, Ohura K, Noda M, Skerry TM. Zinc-Induced Effects on Osteoclastogenesis Involves Activation of Hyperpolarization-Activated Cyclic Nucleotide Modulated Channels via Changes in Membrane Potential. *J Bone Miner Res*. 2015;30(9):1618-26. doi: 10.1002/jbmr.2507. PubMed PMID: 25762086.
- 3) Notomi T, Okimoto N, Okazaki Y, Nakamura T, Suzuki M. Tower climbing exercise started 3 months after ovariectomy recovers bone strength of the femur and lumbar vertebrae in aged osteopenic rats. *J Bone Miner Res*. 2003;18(1):140-9. doi: 10.1359/jbmr.2003.18.1.140. PubMed PMID: 12510816.