

## 先端研究助成基金助成金(最先端・次世代研究開発支援プログラム) 実績報告書

本様式の内容は一般に公表されません

研究課題名	メカニカルストレスを利用した生体の巧みな適応機構と破綻システムの解明
研究機関・ 部局・職名	国立大学法人岡山大学 大学院医歯薬学総合研究科 助教
氏名	片野坂 友紀

1. 研究実施期間 平成23年2月10日～平成26年3月31日

2. 収支の状況

(単位:円)

	交付決定額	交付を受けた額	利息等収入額	収入額合計	執行額	未執行額	既返還額
直接経費	125,000,000	125,000,000	0	125,000,000	125,000,000	0	0
間接経費	37,500,000	37,500,000	0	37,500,000	37,500,000	0	0
合計	162,500,000	162,500,000	0	162,500,000	162,500,000	0	0

3. 執行額内訳

(単位:円)

費目	平成22年度	平成23年度	平成24年度	平成25年度	合計
物品費	362,806	41,220,047	16,213,114	25,094,737	82,890,704
旅費	0	441,750	15,360	71,940	529,050
謝金・人件費等	0	6,453,749	14,509,494	7,427,189	28,390,432
その他	0	6,017,940	3,247,612	3,924,262	13,189,814
直接経費計	362,806	54,133,486	33,985,580	36,518,128	125,000,000
間接経費計	330,000	16,140,000	10,290,000	10,740,000	37,500,000
合計	692,806	70,273,486	44,275,580	47,258,128	162,500,000

4. 主な購入物品(1品又は1組若しくは1式の価格が50万円以上のもの)

物品名	仕様・型・性能等	数量	単価 (単位:円)	金額 (単位:円)	納入 年月日	設置研究機関名
マイクロ冷却遠心機	久保田商事(株)製 3740 (アングルロータ AF-2048含む)	1	654,528	654,528	H23.04.04	岡山大学
共焦点レーザー顕微鏡	オリンパス(株) 製 FV1000- IX81ZDC- VBGR-Set	1	18,978,750	18,978,750	H23.07.06	岡山大学
顕微鏡用CO2インキュベータ	ONICS+INUG 2	1	971,250	971,250	H23.07.06	岡山大学
デジタルカメラ	浜松ホニクス (株) ORCA- Flash2.8 デジタルカメラ セット C11578- 10C	1	1,386,525	1,386,525	H23.11.30	岡山大学

様式20

高速フィルターチェンジャー	モレキュラーデバ イスジャパン Lambda DG- 4超高速フィル ターチェンジャー	1	3,354,435	3,354,435	H23.11.30	岡山大学
制御用コントローラ	モレキュラーデバ イス MetaPrecision PC, MetaFluor, フィルタ	1	1,823,850	1,823,850	H23.11.30	岡山大学
顕微鏡	オリンパス(株) IX71S1F- 3(ティルティング 広視野双眼 鏡筒 等含む)	1	1,457,190	1,457,190	H23.11.30	岡山大学
全自動セルカウンター	BIORAD製 TC10 プリン ター付	1	545,475	545,475	H24.02.07	岡山大学
GELDOC EZ PCシステム	バイオ・ラットラ ホ・ラトリス(株) 1708270J1P C(専用トレイ 含む)	1	1,449,000	1,449,000	H24.02.23	岡山大学
ラット・マウス兼用型トレッドミル	室町機械 (株)製 MK- 680	1	1,606,500	1,606,500	H24.05.11	岡山大学
リアルタイムPCRシステム	米国アプライ ドバイオシス テムズ社製 StepOnePlus -E	1	4,252,500	4,252,500	H24.05.25	岡山大学
オートクレーブ	株トミー精工 製 LSX-500	1	580,125	580,125	H25.05.29	岡山大学
マルチセルイメージングインキュベーター	パナソニックヘルス ケア(株)製 MCOK-5M	1	2,913,750	2,913,750	H25.12.18	岡山大学
超低温フリーザー	パナソニックヘルス ケア(株)製 MDF- U700VX	1	2,047,500	2,047,500	H26.02.12	岡山大学
ルミノ・イメージアナライザー	GEヘルスケア・ ジャパン(株)製 Amersham Imager 600シ ステム	1	3,386,250	3,386,250	H26.03.20	岡山大学

5. 研究成果の概要

本研究では、機械刺激受容機構(メカトランスダクション)の分子基盤と生理的意義の解明を通して、メカニカルストレスを利用した生体の巧みな適応機構と、その破綻による病態発症および重篤化に至る共通原理を明らかにすることができた。具体的には、メカノセンサー候補分子を対象とした、臓器特異的なノックアウトマウスを作製し、様々な臓器において分子・細胞・臓器という多階層での解析を行った。その結果、生体で機能するメカノセンサー分子の同定、細胞のメカトランスダクションの精査、臓器機能および臓器の発生・発達・成熟におけるメカニカルシグナルの意義、様々なストレスへの適応機構や、その破綻による病態発症機構を解析することができた。

課題番号

LS086

**先端研究助成基金助成金(最先端・次世代研究開発支援プログラム)  
研究成果報告書**

本様式の内容は一般に公表されます

研究課題名 (下段英語表記)	メカニカルストレスを利用した生体の巧みな適応機構と破綻システムの解明
	Elucidation of biological adaptation and remodeling mechanisms to mechanical stress
研究機関・部局・ 職名 (下段英語表記)	国立大学法人岡山大学 大学院医歯薬学総合研究科 助教
	National University Corporation Okayama University, Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, Assistant Professor
氏名 (下段英語表記)	片野坂 友紀
	Yuki Katanosaka

## 研究成果の概要

(和文):

生体内では至るところで、伸展や剪断応力といった物理的な機械刺激(メカニカルストレス)が生じている。細胞は、このようなストレスを、発生過程や臓器機能発現に不可欠な生体情報として利用しているが、そのしくみは未だ不明である。本研究では、生体のメカニカルストレスをモニターする分子を明らかにし、様々な組織で特異的に発現抑制したマウスを世界で初めて開発して、体内の動的環境下における生理機能維持機構を解明した。この結果、様々な組織を対象に、動的環境変化に適応する分子機構や、その破綻による病態発症機構が明らかとなった。

(英文):

In many biological events, the mechanical forces provide the essential physiological information for the cells and organs to regulate their functions. However, the cellular mechanotransduction mechanisms have remained unclear. In this study, we generated the several types of tissue-specific mechanosensor knockout mice, and analyzed their phenotypes in the animal models. Our results provided the molecular basis for the maintenance of cell structure and functions through the mechanical feedback mechanism *in vivo*.

1. 執行金額 162,500,000 円

(うち、直接経費 125,000,000 円、 間接経費 37,500,000 円)

2. 研究実施期間 平成 23 年 2 月 10 日～平成 26 年 3 月 31 日

3. 研究目的

生体内では至るところで、伸展や剪断応力といった物理的な機械刺激(メカニカルストレス)が生じている。細胞の機械受容システムを介して伝達されるこのような刺激は、単に生体にとって不利益なストレスではなく、発生過程や臓器機能発現に不可欠な生体情報であることが次第に明らかになってきた。本研究では、体の各所に適正に備わった生体の機械受容システムの分子的基盤と生理的意義を解明することを通して、メカニカルストレスを利用した生体の巧みな適応機構と破綻システムを明らかにすることが目的である。

4. 研究計画・方法

(1) 体の各所に適正に備わった生体の機械受容システムの分子的基盤を解明する。

生体の機械受容システムの実体解明の核となるのは、メカノセンサー分子の同定と作動機構の解明である。これまでの基礎実験では、生体メカノセンサーは、1 分子ではその機能を十分に発揮できなかったことから、形質膜上では周囲の分子複合体と協調して機能していることが予想された。本研究では、メカノセンサーを対象として、生化学的に結合分子解析を行い、メカノセンス分子複合体の実体を解明する。得られた結果に基づいて、再構成実験を行い、メカノセンサー機能の変化を調べる。

(2) 生体の機械受容システムの生理的意義を解明する。

我々の対象としているメカノセンサー分子は、生体の各所で発現している。そこで、体の各所で特異的に発現抑制可能なコンディショナルノックアウトマウスを作製する。これらの各組織特異的メカノセンサー・ノックアウトマウスを対象に、各組織あるいは細胞の生理機能を解析することによって、メカニカルストレスを利用した細胞機能や構造の維持メカニズムを明らかにする。様々な組織特異的メカノセンサー・ノックアウトマウスを解析することによって、組織を超えて保存されたメカニカルストレス感知のための役割や、メカニカルストレスを利用した細胞構造や機能の維持メカニズムを明らかにする。

(3) メカニカルストレスを利用した生体の巧みな適応の分子基盤を解明する。

常に動的環境にさらされている生体組織において、恒常的に入力するメカニカルストレス・シグナルが、どのような機序で細胞構造や機能を維持しているか、その分子基盤を明らかにする。細胞レベルの実験において、伸展刺激によってメカノセンサー分子を介して活性化するシグナル経

路を明らかにする。また、個体レベルの実験では、メカニカルストレスを過剰に負荷するモデルマウスを作製して、その組織片を生化学的・分子生物学的に解析することにより、メカノセンサー分子を介して活性化するシグナル経路を明らかにする。また、メカノセンサーKOマウスを用いた実験によって、メカニカルストレスを過剰に負荷した場合においても、メカノセンサー分子を介したシグナル経路が活性化されないことを示す。

(4) 細胞の機械受容機構(メカトランスダクション)の破綻により引き起こされる病態発症のしくみを解明する。

作製した様々な組織を対象としたメカノセンサー・コンディショナルノックアウトマウスを用いて、表現解析を行い、どのような病態によく似た表現型を示すかについての情報を得る。これらの情報をもとに、病態モデル動物を用いて、メカノセンサーの発現、メカニカルシグナルの活性化に問題がないか解析する。また、メカノセンス複合体に含まれる結合因子等の発現様式や局在についても同様の解析を行い、各々の病態発症におけるメカニカルシグナルの役割を明らかにする。

## 5. 研究成果・波及効果

(1) 体の各所に適正に備わった生体の機械受容システムの分子的基盤の解明

### ①メカノセンサー分子の同定

我々は、伸展刺激依存的な細胞内  $Ca^{2+}$ 濃度の上昇を「細胞のメカニカル応答」の指標のうちの一つとしている。これまでの研究から、我々が対象としている分子がメカノセンサーであることを示す実験結果は、「異所発現系における過剰発現実験を用いて、メカニカル応答を示さない細胞が伸展刺激依存的な細胞内  $Ca^{2+}$ 濃度の上昇を示すようになること」に依存する。これまでの研究では、生体を構成する様々な細胞において、我々が対象とするメカノセンサー分子が発現していることは確認済みであったものの、実際にメカノセンサーとして機能することを示す実験結果は得られていなかった。本研究では、伸展刺激依存的な細胞内  $Ca^{2+}$ 濃度の上昇を指標として、メカノセンサー・発現抑制実験を行った。この結果、心筋細胞や血管を構成する細胞など、生体の様々な組織において、本分子依存的なメカニカル応答が確認され、この分子が確かにメカノセンサーとして生体で機能することを細胞レベルで証明できた。

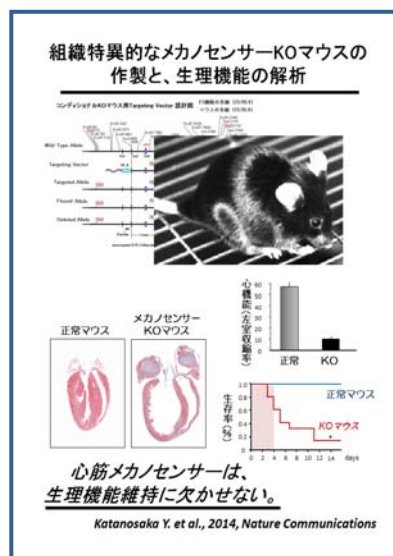
### ②メカノセンサー分子作動機構の解明

これまでの基礎実験では、生体メカノセンサーは、1分子ではその機能を十分に発揮できなかったことから、メカノセンス分子複合体を生化学的・分子生物学的に単離・解析した。この結果、これまで明らかにされていなかった複数の結合因子が得られた。これらのうちのいくつかは、細胞骨格として細胞の内側からメカノセンサー分子を支え、細胞内や形質膜で発生する力の伝搬に関与していることが予想された。これらの再構成実験については、現在進行中である。

(2) 生体の機械受容システムの生理的意義の解明

体の各所で特異的に発現抑制可能なコンディショナルノックアウトマウスを作製した。これらの各組織特異的メカノセンサー・ノックアウトマウスを対象に、各組織あるいは細胞の生理機能を解析し、メカニカルストレスを利用した細胞機能や構造の維持メカニズムを明らかにした。

例えば、薬物投与から3日後に心臓でのみメカノセンサー分子の発現が抑制されるように遺伝子改変したマウスの場合、成体マウスに薬物を投与後、心室は心筋症の終末像でみられるような状態へと拡大し重篤な心不全をひき起こした。このメカノセンサー・ノックアウトマウスは、薬物投与から10日以内に約70%の個体が死亡した(右図)。



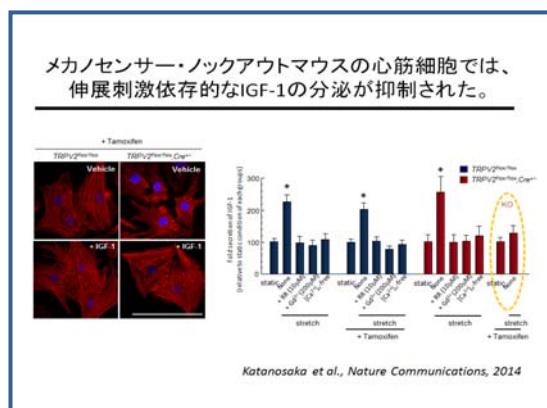
このことは、拍動によって常に動き続けている心臓がうまく機能するには、このメカノセンサーが欠かすことのできない分子であることを示している。

また、本研究では、複数の組織を対象としたメカノセンサー・ノックアウトの作製に成功している。いずれも、組織特有のメカニカル応答を反映する生理機能に異常をきたしたことから、組織を超えてメカニカルストレス感知のための役割をこのメカノセンサーが担っていることが明らかとなった。

(3) メカニカルストレスを利用した生体の巧みな適応の分子基盤の解明

常に動的環境にさらされている生体組織において、恒常的に入力するメカニカルストレス・シグナルが、どのような機序で細胞構造や機能を維持しているかを明らかにした。

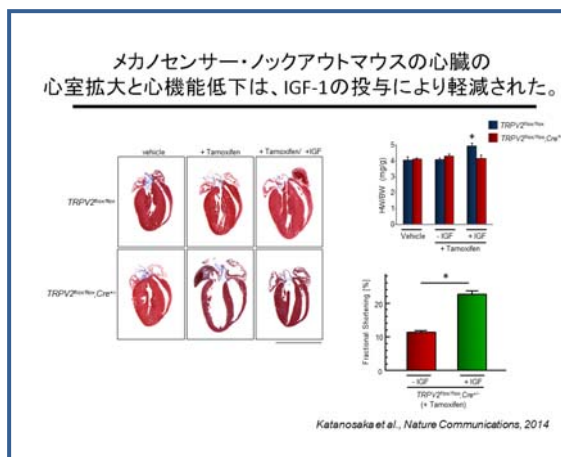
例えば、心筋細胞を用いた実験において、伸展刺激によって活性化されるメカノセンサーの下流で働く細胞内シグナル経路を明らかにした。心筋細胞では、伸展刺激依存的に細胞からIGF-1が分泌されることが明らかとなった(右図)。さらに、培養液中に放出されたIGF-1は、細胞内のIGF受容体/PI3 kinase/Akt経路を活性化させ、細胞形態や機能を維持することに繋がっていることが明らかとなった。



この事実は、細胞へ負荷されたメカニカルストレスが、メカノセンサーを介した細胞内情報伝達機構を介して、自分自身の形態や機能維持に反映されているという良い例であり、細胞のメカニカルフィードバック現象の存在と分子基盤を示している。

さらに、個体レベルでもこのメカニカルフィードバックシステムが維持されているか明らかにするために、心臓で特異的にメカノセンサーをノックアウトしたマウスを用いた。この成体マウスは、前述のように、薬物でメカノセンサーを抑制後、約1週間で心室の拡大と心機能低下を示す。

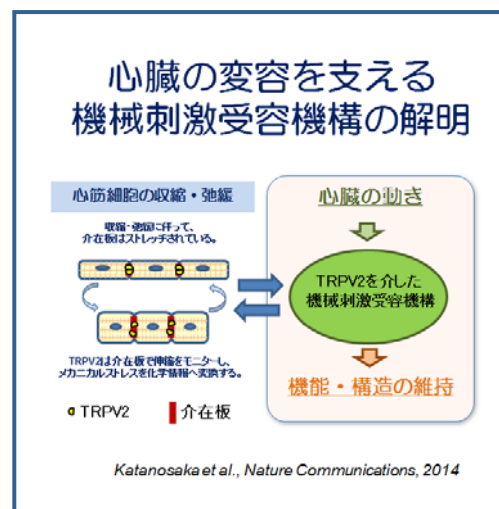
この成体マウスを用いて、薬物でメカノセンサー発現を抑制した直後より1週間、IGF-1を腹腔へ投与して、心臓形態と心機能を、IGF-1投与無しの場合と比較した。この結果、IGF-1投与群は、優位にメカノセンサー分子の欠損が引き金となる心室の拡大や、重篤な心機能低下が部分的に軽減していた(右図)。このことから、メカノセンサー分子から入力するメカニカルシグナルを介して心臓の形態や機能を維持するメカニズムは、個体レベルでも保存されているシステムであることが明らかとなった。



また、心臓以外の他の組織についても、細胞レベルのメカニカルフィードバック現象を明らかにし、これが個体レベルでも確かに利用されていることを明らかにし、現在一部のものに関して論文投稿中であり、他のものについては論文作製中あるいは研究続行中である。

#### (4) 細胞の機械受容機構(メカトランスダクション)の破綻により引き起こされる病態発症のしくみの解明

本報告書の一連の流れに基づいて、心臓での実験結果に焦点を置く。心肥大や心不全発症の原因は多元的であるものの、血行動態負荷は病態発症の唯一の共通ルートである。本研究において、メカノセンサー・ノックアウトマウスが、数日以内に重篤な心不全を引き起こし、適応的な肥大応答を経ずに心室拡大を示したことは大変興味深い。このことは、心臓のメカノセンサー分子は、常に血行動態をモニターしており、血行動態の変化に応じて、心臓の壁を厚くするような適応的肥大応答を引き起こすための指令を送る役目を担うことを示している。



これらのことは、このメカノセンサーを介した動的環境のモニター機構および管理機構(メカニカルフィードバック機構)に異常が生じると、様々な病態が生じることとなる事を示唆している。つまり、メカノセンサーを介した細胞構造や機能維持機構を支える経路の分子群は、様々な病態の原因分子である可能性が高いことが明らかとなったと言える。本実験結果をもとに、現在病態モデル動物を用いて、メカノセンサーの発現、メカニカルシグナルの活性化に問題がないか解析している最中であり、すでに病態生理的に重要であるいくつかの結果が得られつつある。また、メカノセンサー複合体に含まれる結合因子等の発現様式や局在についても同様の解析を行い、各々の病態発症におけるメカニカルシグナルの役割を明らかにしているところである。



6. 研究発表等

<p>雑誌論文</p> <p>計 4 件</p>	<p>(掲載済み一査読有り) 計 2 件</p> <p>Kanagawa M, Yu CC, Ito C, Fukada SI, Hozoji-Inada M, Chiyo T, Kuga A, Matsuo M, Sato K, Yamaguchi M, Ito T, Ohtsuka Y, <b>Katanosaka Y</b>, Miyagoe-Suzuki Y, Naruse K, Kobayashi K, Okada T, Takeda S, Toda T. Impaired viability of muscle precursor cells in muscular system with glycosylation defects and amelioration of its severe phenotype by limited gene expression. <b>Hum Mol Genet. 2013, 22:3003-3015</b></p> <p>Hata M, Naruse K, Ozawa S, Kobayashi Y, Nakamura N, Kojima N, Omi M, <b>Katanosaka Y</b>, Nishikawa T, Naruse K, Tanaka Y, Matsubara T. Mechanical Stretch Increases the Proliferation While Inhibiting the Osteogenic Differentiation in Dental Pulp Stem Cells. <b>Tissue Eng Part A. 2013, 19:625-633.</b></p> <p>(掲載済み一査読無し) 計 0 件</p> <p>(未掲載一査読有り) 計 2 件</p> <p><b>Katanosaka Y</b>, Iwasaki K, Ujihara Y, Takatsu S, Nishitsuji K, Kanagawa M, Sudo A, Toda T, Katanosaka K, Satoshi M, Naruse K. TRPV2 is critical for the maintenance of cardiac structure and function in mice. <b>Nature Communications, 2014, doi: 10.1038/ncomms4932</b> (筆頭および責任著者として)</p> <p>Saito F, Kanagawa M, Ikeda M, Hagiwara H, Masaki T, Ohkuma H, <b>Katanosaka Y</b>, Shimizu T, Sonoo M, Toda T, Matsumura K. Overexpression of LARGE suppresses muscle regeneration via down-regulation of insulin growth factor 1 and aggravates muscular dystrophy in mice. <b>Hum Mol Genet. 2014, [Epub ahead of print]</b></p>
<p>会議発表</p> <p>計 10 件</p>	<p>専門家向け 計 10 件</p> <p>(1) 岩崎慶一郎・高津理美・氏原嘉弘・毛利聡・片野坂友紀、「心不全発症における NCX1 の役割」、広島県、2011 年 10 月 22 日～23 日、中国四国生理学会 (日本生理学会中国四国支部)</p> <p>(2) 毛利聡・岩崎慶一郎・片野坂友紀、「麻酔薬の心機能に与える影響」、フランス・パリ、2012 年 3 月 1 日～3 日、第 1 回 heart and brain 国際会議 (heart and brain committees 主催)</p> <p>(3) 片野坂友紀、「生体での機械感覚を受容する分子の同定」、2011 年 6 月 25 日、第 38 回脳研究セミナー (岡山大学脳研究セミナー主催)</p> <p>(4) Kimiaki Katanosaka, Takeda Kazuhiro, <b>Yuki Katanosaka</b>, Satomi Takatsu, Kashio Makiko, Makoto Tominaga, Kazue Mizumura. Immunohistochemical detection of heat-sensitive primary afferent neurons and their correlation with transient receptor potential vanilloid 1 and 2 in mice. 第 34 回日本比較生理生化学会 (2012 年 7 月 6 日～8 日 ; 葉山)</p> <p>(5) Kimiaki Katanosaka, Satomi Takatsu, Kazue Mizumura, Keiji Naruse, <b>Yuki Katanosaka</b> A role for transient receptor potential vanilloid 2 in mechanical nociception and a stretch-evoked response of primary afferent neurons. 第 35 回日本神経生理学会 (2012 年 9 月 18 日～21 日 ; 名古屋)</p> <p>(6) Kimiaki Katanosaka, Kazuhiro Takeda, <b>Yuki Katanosaka</b>, Satomi Takatsu,</p>

	<p>Makiko Kashio, Makoto Tominaga, Kazue Mizumura TRPV1- and V2-negative Heat-sensitive Primary Afferent Neurons in Mouse Dorsal Root Ganglia. The 5th Asian Pain Symposium (The 44th NIPS International Symposium) 2013 年 12 月 18 日から 20 日; Okazaki Conference Center, Japan</p> <p>(7) Kimiaki Katanosaka, Satomi Takatsu, Kazue Mizumura, Keiji Naruse, <b>Yuki Katanosaka</b> Analysis of physiological functions of transient receptor potential vanilloid 2 (TRPV2) in adult primary sensory neurons using a tissue specific conditional knockout mouse. The 91th Annual Meeting of the Japan Physiological Society, 2014年3月16日から18日; Kagoshima, Japan</p> <p>(8) 片野坂公明, 高津理美, 成瀬恵治, <b>片野坂友紀</b> 「培養DRGニューロンのストレッチ応答へのTRPV2 への関与」,第60回 中部生理学会地方会、2013年10月25日から26日, 岐阜、日本</p> <p>(9) 氏原嘉洋, 岩崎慶一郎, 高津理美, 西辻光希, 橋本謙, 成瀬恵治, 毛利聡, <b>片野坂友紀</b> 「T 管膜構造維持における Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>交換体の役割」 第 65 回 中国四国生理学会地方会 2013 年 11 月 2 日から 3 日, 岡山、日本</p> <p>(10) <b>片野坂友紀</b> 「メカニカルストレスを利用した筋細胞の機能維持」第1回 若手による骨格筋研究会、2013年11月26日から27日、京都、日本</p> <p>一般向け 計 0 件</p>
<p>図 書</p> <p>計 0 件</p>	
<p>産業財産権 出願・取得 状況</p> <p>計 0 件</p>	<p>(取得済み) 計 0 件</p> <p>(出願中) 計 0 件</p>
<p>Web ペー ジ (URL)</p>	<p><a href="http://www.okayama-u.ac.jp/tp/release/release_id182.html">http://www.okayama-u.ac.jp/tp/release/release_id182.html</a> 岡山大学プレスリリース</p>
<p>国民との科 学・技術対 話の実施状 況</p>	<p>(1) 標 題：岡大サイエンスカフェ 「生き物と適応」 実施日：平成 23 年 12 月 21 日 場 所：岡山大学創立五十周年記念館 対象者：社会人および学生・生徒 参加者数：60 人 内 容：体内に備わったストレス応答のしくみを、「血行動態変化（メカノセンサー）に対する心臓の巧みな適応力」をモデルとしてわかりやすく説明した。 <a href="http://www.okayama-u.ac.jp/tp/event/event_id580.html">http://www.okayama-u.ac.jp/tp/event/event_id580.html</a></p> <p>(2) 平成 25 年度 岡山大学公開講座 「生き物を支える細胞の巧みな振る舞い； 心臓が大きくなるしくみをモデルに」（平成 26 年 3 月 8 日 岡山大学一般講義棟 B11 講義室） 高校生以上を対象、参加者 50 人、血行動態の変化により心肥大を引き起こす仕組みをモデルに、外環境に適応しようとする細胞の能力について紹介した。</p>

## 様式21

新聞・一般 雑誌等掲載 計0件	
その他	

### 7. その他特記事項

本研究成果の一部である「心機能・構造維持におけるメカノセンサーの役割」に関する研究成果は、実施期間中までにアクセプト通知を受け、平成26年5月29日にNature Communications誌に掲載された。これを受けて、翌日の5月30日、31日にかけて、以下の新聞各社による報道がなされた。

(新聞報道一覧)

Nature Communications誌で発表された心臓のポンプ機能を維持する仕組みの発見について報道。

共同通信 <http://www.47news.jp/CN/201405/CN2014052901001849.html>

山陽新聞 <http://iryo.sanyo.oni.co.jp/hosp/h/055/c2014053011373635>

毎日新聞 <http://mainichi.jp/area/okayama/news/20140530ddl33040528000c.html>

日本経済新聞 [http://www.nikkei.com/article/DGXNASDG2904R\\_R30C14A5CR8000/](http://www.nikkei.com/article/DGXNASDG2904R_R30C14A5CR8000/)

科学新聞

マイナビニュース <http://news.nicovideo.jp/watch/nw1089058>

他（地方紙多数）