

# 家族性骨形成不全症の病態メカニズムの解明

## 小胞体 TRIC-B チャンネル欠損により骨形成不全に至る機構

### <概要>

京都大学薬学研究科の市村敦彦（特定助教）、趙成珠（特定研究員）らの共同研究グループは、小胞体カウンターイオンチャンネル TRIC チャンネル欠損が骨形成不全を引き起こす病態生理学的機構を解析し、その一端を解明しました。

TRIC チャンネルは京都大学薬学研究科にて 2007 年に発見された小胞体の陽イオンチャンネルであり、小胞体からの  $\text{Ca}^{2+}$  放出反応を促進することが示唆されています。TRIC チャンネルには 2 つのサブタイプがあり、このうちの TRIC-B チャンネルは、I 型コラーゲン非関連性の家族性骨形成不全症原因遺伝子の一つとして最近報告されました。しかし、その病態形成のメカニズムや、骨形成における TRIC-B の生理機能は不明でした。本研究では、TRIC-B チャンネルが骨形成不全を引き起こす病態生理学的解析を行い、骨芽細胞において TRIC-B 欠損がカルシウムシグナル異常を引き起こし、コラーゲンの細胞内異常蓄積と細胞外への分泌不全から骨形成不全へとつながることを明らかとしました。本成果は、TRIC-B 遺伝子変異による骨形成不全症の診断や治療に貢献することが期待されます。

本研究は、日本学術振興会科学研究費助成事業 若手(A) (研究代表者：市村敦彦)や、文部科学省・JST 科学技術人材育成のコンソーシアムの構築事業（京阪神グローバルリーダー育成コンソーシアム「K-CONNEX」）などの支援を受けて実施されました。本成果は、米国の科学雑誌『*Science Signaling*』に 5 月 17 日付けでオンライン出版されました。

### 1. 背景

骨形成不全症は、骨量の減少や骨の質的变化による脆弱化により、骨折や骨変形をはじめとした様々な病状を示す先天性疾患です。骨形成不全症の原因の多くは、骨を構成している I 型コラーゲンの構造的な変化及び翻訳後修飾の変化によって惹起される、合成/分泌不全、フォールディング/輸送異常、及び骨基質への取り込み障害といった、I 型コラーゲン遺伝子に関連した変異に起因しています。その一方で、I 型コラーゲンと関連しない骨形成不全症の原因遺伝子も複数発見されています。その中に、2007 年当分野で発見し、機能を同定した小胞体カウンターイオンチャンネル TRIC-B が含まれていました。

細胞内小器官である小胞体は  $\text{Ca}^{2+}$  を貯蔵し、各種の刺激に応答して  $\text{Ca}^{2+}$  を細胞質へ放出する機能を備えています。小胞体  $\text{Ca}^{2+}$  放出による細胞質の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇は恒常性や機能維

持に重要であり、筋細胞の収縮、伝達物質の放出、遺伝子の発現、細胞死や細胞増殖など様々な生理反応を制御しています。小胞体  $\text{Ca}^{2+}$  放出を担当するイオンチャネルとしてリアノジン受容体とイノシトール三リン酸受容体が知られており、それぞれ独自の機構により  $\text{Ca}^{2+}$  を放出します。両チャネルの開口に伴い陽イオンである  $\text{Ca}^{2+}$  が放出されると、小胞体内腔に負の電荷が発生することになり、以降の  $\text{Ca}^{2+}$  放出が抑制されることが推定されます。生理的条件下で観察される数十ミリ秒に及ぶ小胞体  $\text{Ca}^{2+}$  放出が持続するためには、この負電荷を中和する機構が必要であると想定されます。この機構を担う分子であるカウンターイオンチャネルとして、TRIC チャネルが 2007 年に当研究グループにて同定されました。動物においては、TRIC-A と TRIC-B の 2 種類の TRIC チャネルサブタイプが独自の組織特異的パターンにより分布しています。両サブタイプは 3 本の膜貫通セグメントを有して、核膜や小胞体膜内でホモ 3 量体を形成し、細胞内環境下では主に  $\text{K}^+$  透過性チャネルとして機能しています。TRIC-B チャネルは全身の様々な細胞において普遍的に発現していることが確認されており、肺胞上皮細胞におけるサーファクタント分泌に重要であり、その欠損により新生致死に至ることをこれまでに発見していました。

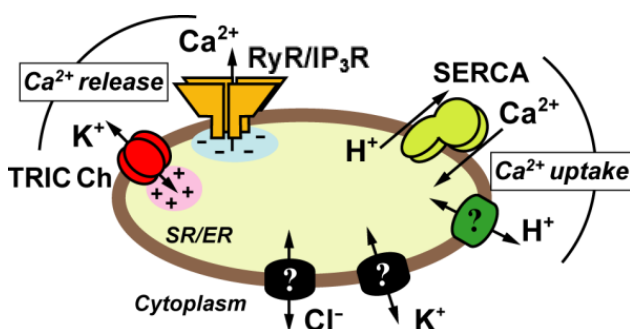


図 1 小胞体膜タンパク質の模式図 (Yazawa, et al., *Nature*, 2007)

リアノジン受容体(RyR)や IP<sub>3</sub> 受容体(IP<sub>3</sub>R)からの  $\text{Ca}^{2+}$  放出によって生じた小胞体内腔の負電荷を中和し、 $\text{Ca}^{2+}$  放出を持続させるために  $\text{K}^+$  を通すカウンターイオンチャネルとして TRIC チャネル(TRIC Ch)が同定されました。

2013 年、TRIC-B 遺伝子に欠失を起こす変異がアラビアとアルバニアの骨形成不全症家系で見つかりました。これらの家系における変異は TRIC-B 遺伝子に異なる影響をもたらすものでしたが、いずれも完全な TRIC-B タンパク質の欠損につながる可能性が高いものでした。更に最近、中国においても TRIC-B 遺伝子における変異が骨形成不全症につながる報告がなされました。これらの報告から、TRIC-B 遺伝子が骨形成にとって重要な役割を果たしていることが強く示唆されていましたが、TRIC-B 遺伝子変異によって骨形成不全症が引き起こされる病態メカニズムは不明でした。

## 2. 研究手法と成果

本研究では、TRIC-B 遺伝子を欠損しているマウスの骨を詳細に観察し、骨形成を司る複数の種類の細胞について TRIC-B 欠損の影響を調べました。TRIC-B 欠損マウスは出生まもなく呼吸不全により死亡するため、今回の研究は出生直前または直後のマウスを用いて行いました。全身の骨格標本を作製し、軟骨と硬骨をそれぞれ染め分けた上で観察を行いました。その結果、骨格のおよその構造には野生型と TRIC-B 欠損マウスで差はありませんでしたが、頭蓋骨や肋骨、大腿骨などの主要骨格で硬骨の石灰化の低下を示す結果が得られました (図 2)。実際に、骨は物理的にもろく、壊れやすいこともわかりました。また、大腿骨でのカルシウムやコラーゲンの沈着(図 3)の程度、頭蓋骨の厚さといった一連の組織学的解析結果から、TRIC-B 欠損マウスの骨はヒト家族性骨形成不全症患者と同様に、骨の形成不全という表現型を示すことが明らかになりました。

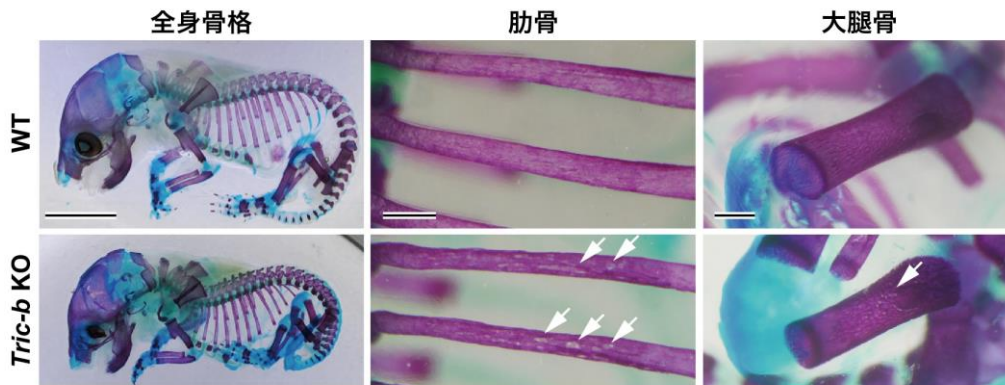


図 2 野生型(WT)並びに TRIC-B 欠損(*Tric-b* KO)マウスのアルシアンブルー・アリザリンレッド共染色像。全身骨格の構造に大きな差はない (左パネル)が、TRIC-B 欠損マウスの肋骨(中央パネル)や大腿骨(右パネル)を詳しく観察すると、赤く染色されない部分(白矢印)が観察され、石灰化の低下を示唆している。

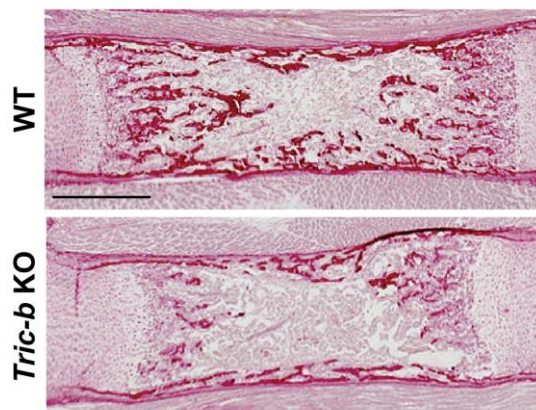


図 3 野生型(WT)並びに TRIC-B 欠損(*Tric-b* KO)マウスの大腿骨におけるコラーゲン染色像。コラーゲンが赤く染色されている。野生型と比較して濃く染色されている部分が少なく、骨の中心部分や側面部分での染色部位において染色が弱いことから、TRIC-B 欠損によるコラーゲンの減少が示唆される。

そこで次に、更なる組織学的解析と遺伝子発現解析を行い、骨の形成不全に寄与している細胞の種類を特定することを試みました。その結果、軟骨細胞よりも骨芽細胞や破骨細胞が寄与する骨化に影響が大きいことがわかりました。そこで、電子顕微鏡を用いて骨芽細胞、破骨細胞、軟骨細胞を調べてみました。その結果、骨形成不全に寄与しているのは、I型コラーゲンを合成、分泌して骨形成を促進している骨芽細胞に起こった異常である可能性が高いことがわかりました。即ち、コラーゲンを合成していると思われる活性化したTRIC-B欠損マウスの骨芽細胞において、異常に大きくふくらんだ小胞体が観察される一方で、コラーゲンを含む分泌顆粒が少なく、細胞外基質におけるコラーゲンファイバーの形成も減少していたことがわかりました (図 4)。

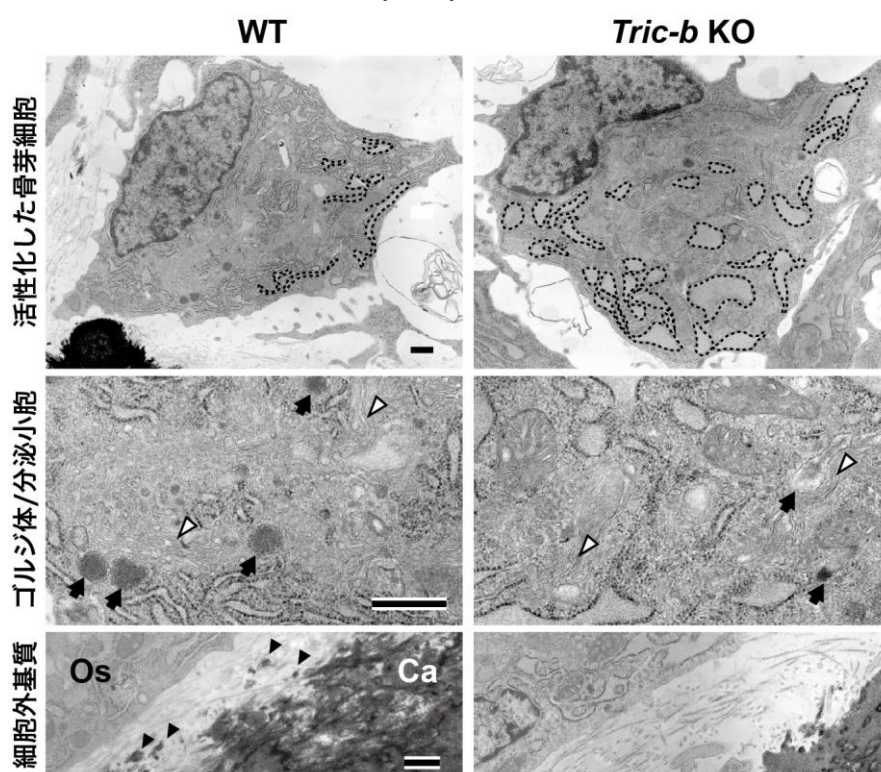


図 4 野生型(WT)並びに TRIC-B 欠損(*Tric-b* KO)マウス由来活性化した骨芽細胞の電子顕微鏡観察。活性化した骨芽細胞において、小胞体(破線で囲まれた部分)が TRIC-B 欠損マウスにおいては膨らんでいる (上段パネル)。これらの活性化骨芽細胞においては、ゴルジ体(白矢尻)が小さく、コラーゲンを含んだ分泌小胞(黒矢印)も小さい上数も少なかった (中段パネル)。骨芽細胞周囲は、通常コラーゲンを主とする骨基質と基質小胞(黒矢尻)に取り囲まれているが、TRIC-B 欠損マウスの骨芽細胞周囲ではこれらがまばらにしか存在しなかった (下段パネル)。

そこで、骨芽細胞に着目して更に詳細に解析を行いました。頭蓋骨から骨芽細胞の前駆細胞を単離し、試験管内にて成熟骨芽細胞に分化させました。野生型及び TRIC-B 欠損マウスに由来する培養骨芽細胞を用いて、細胞外基質の形成やコラーゲンの分泌量を調べま



した。その結果、TRIC-B 欠損骨芽細胞においてこれらがいずれも低下していることがわかりました。細胞外に分泌できない分、細胞の中にコラーゲンが蓄積していることもわかりました (図 5)。

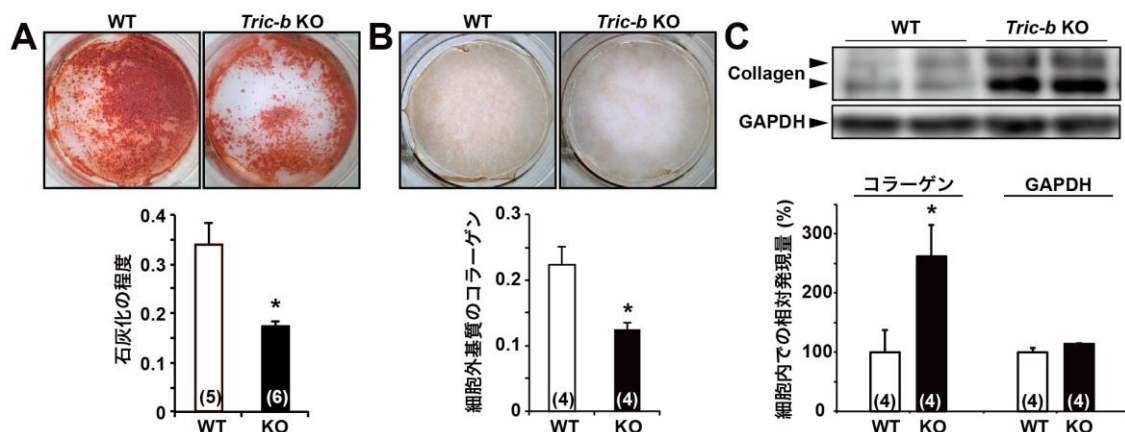


図 5 野生型(WT)並びに TRIC-B 欠損(*Tric-b* KO)マウス由来の培養骨芽細胞における、A.細胞外リン酸カルシウムの染色 B. 細胞外基質コラーゲンの免疫染色 C. 細胞内コラーゲンのウェスタンブロット  
TRIC-B 欠損マウス由来の骨芽細胞では A 石灰化が弱く、B 細胞外マトリクスを形成するコラーゲンが減少している代わりに、C 細胞内にとどまっているコラーゲンが多量に存在する ということがわかった。

細胞免疫染色を用いて細胞内でコラーゲンが蓄積している場所を特定したところ、本来小胞体で作られゴルジ体に運ばれるべきコラーゲンが、小胞体に異常に蓄積し野生型ではほとんどみられないような大きな塊になっていることが明らかになりました (図 6)。以上の結果から、TRIC-B の欠損は骨芽細胞においてコラーゲンの正常な細胞外への分泌を障害し、細胞内への異常蓄積を引き起こすことがわかりました。

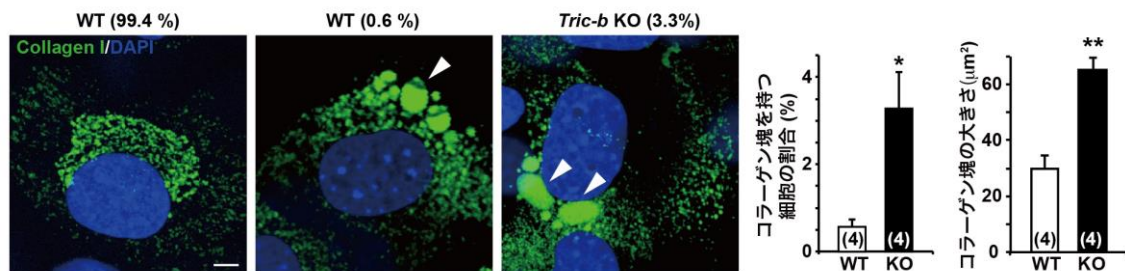


図 6 野生型(WT)並びに TRIC-B 欠損(*Tric-b* KO)マウス由来の培養骨芽細胞における細胞内コラーゲンの免疫染色像. 野生型のほとんど(99.4%)の骨芽細胞ではコラーゲンは網目状に染色された (左パネル)が、ごく稀(0.6%)に塊状に染色される細胞が存在した。TRIC-B 欠損マウス由来の骨芽細胞においては、野生型の 5 外程度(3.3%)の頻度で塊状にコラーゲンが染色される細胞が存在しており(右パネル及び左グラフ)、塊自体の大きさも平均 2 倍程度に大きくなっていた (右パネル及び右グラフ)。

コラーゲンを含む小胞体で合成されたタンパク質の細胞内小器官間輸送や、細胞外への分泌の様々なプロセスにカルシウムは必須の分子として関わっていることが知られています。TRIC-B はイオンチャネルであり、小胞体からのカルシウム放出を補助していると考えられているため、TRIC-B 欠損によるコラーゲンの分泌異常はカルシウムシグナルの異常に起因する可能性が考えられました。そこで、骨芽細胞において、TRIC-B 欠損によるカルシウムシグナルを調べました。その結果、TRIC-B 欠損骨芽細胞において、小胞体カルシウムの放出が障害されており、小胞体内にカルシウムが過剰蓄積していることがわかりました(図 7)。こういった細胞内カルシウム濃度調節(いわゆるカルシウムハンドリング)異常は、肺胞上皮細胞などでも観察されており、TRIC-B が様々な細胞において正常なカルシウムハンドリングに必要な分子であることを示唆しています。

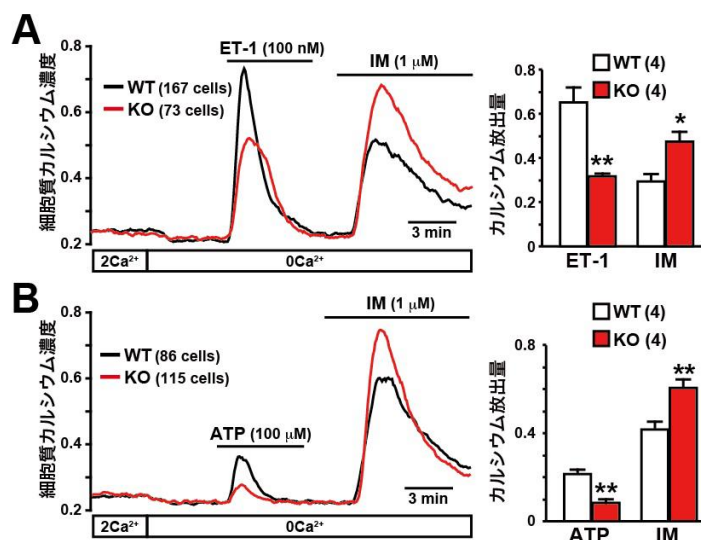


図7 野生型(WT)並びにTRIC-B欠損(*Tric-b* KO)マウス由来の培養骨芽細胞における、カルシウムハンドリングの定量的解析。培養骨芽細胞における実験から、**A**. エンドセリン(ET-1)や**B**. アデノシン三リン酸(ATP)による刺激に対する $Ca^{2+}$ 放出が弱くなっており、イオノマイシン(IM)刺激による小胞体内 $Ca^{2+}$ 強制放出量が増加していた。このことから、TRIC-B欠損骨芽細胞において、 $Ca^{2+}$ ハンドリングに異常があることが示唆される。

一方で、骨を吸収し新陳代謝を促す破骨細胞の培養細胞系を用いた実験では、カルシウムハンドリングや骨吸収能力に TRIC-B 欠損による大きな異常は観察されませんでした。以上の結果から、TRIC-B 遺伝子の欠損や変異によって生じる骨形成不全は、骨芽細胞からのコラーゲン分泌に対する障害の結果として引き起こされたものと考えられました (図 8)。

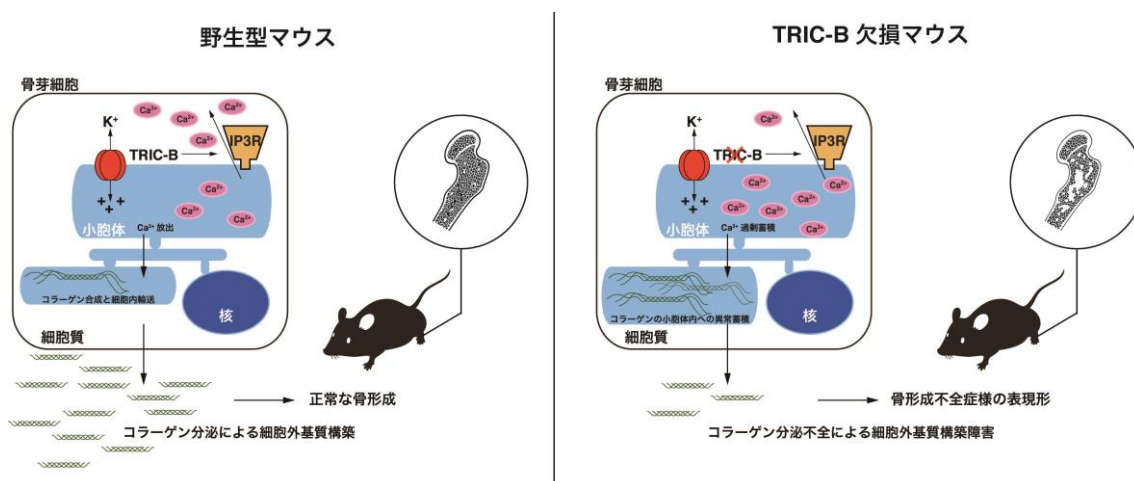


図 8 野生型並びに TRIC-B 欠損マウスにおける骨形成概略図。TRIC-B 欠損マウスの骨芽細胞において、カルシウムハンドリング異常に起因する小胞体カルシウムの過剰蓄積が生じ、小胞体におけるコラーゲン異常蓄積と分泌不全が起こった結果、細胞外基質の構築が障害され、結果的に骨形成不全症様の表現形に至るものと考えられます。

### 3. 波及効果

TRIC-B 欠損マウスは有用な骨形成不全症モデル動物であることが判明しました。TRIC-B チャンネルが骨芽細胞におけるコラーゲン分泌を通じた骨形成に関与しているという新たな発見は、骨形成の分子メカニズムを理解するための基礎研究に貢献するものであり、骨形成不全症の診断や治療への応用も期待されます。また、今回の一連の結果や過去の TRIC-B 欠損マウスを用いた解析から、小胞体におけるカルシウムハンドリングと分泌タンパク質プロセッシングは密接に関連することが示唆されます。骨量の減少を始めとして、小胞体カルシウムハンドリングの機能不全・機能不良に起因して発生する分泌タンパク質の異常が関与する病態が他にも存在する可能性があり、今回の発見は小胞体カルシウムに関与する疾患の病態解明に資するものと考えられます。

#### 4. 今後の予定

骨粗しょう症治療における骨密度増強の目的で、ビタミン薬、ホルモン薬や破骨細胞抑制薬などが現在用いられています。TRIC-B 欠損マウスへの多種の薬剤投与を試み、本病態を効果的に改善する薬物治療を検討します。また、大きな異常はないと考えられる破骨細胞や軟骨細胞についても TRIC-B 欠損による変化が起きていないか細かい解析を行うことにより、骨形成全体における TRIC-B の生理機能の全容の解明を目指します。

#### 5. 謝辞

本研究は、日本学術振興会科学研究費助成事業 若手(A) 研究代表者: 市村敦彦)、文部科学省及び国立研究開発法人日本医療研究開発機構 創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業、文部科学省・JST 科学技術人材育成のコンソーシアムの構築事業 (京阪神グローバルリーダー育成コンソーシアム「K-CONNEX」) などの支援を受けて実施されました。

#### 6. 論文タイトルと著者

Mice lacking the intracellular cation channel TRIC-B have compromised collagen production and impaired bone mineralization

Chengzhu Zhao, Atsuhiko Ichimura, Nianchao Qian, Tsunaki Iida, Daiju Yamazaki, Naruto Noma, Masataka Asagiri, Koji Yamamoto, Shinji Komazaki, Chikara Sato, Fumiyo Aoyama, Akira Sawaguchi, Sho Kakizawa, Miyuki Nishi, and Hiroshi Takeshima

*Science Signaling*, doi: 10.1126/scisignal.aad9055

#### 7. 用語解説

**小胞体:** 小胞体とは真核細胞の細胞内小器官の一種です。主な役割として、タンパク質や脂質の合成、機能的なタンパク質へ導く折りたたみや各種の修飾、異常なタンパク質の分解、分泌があります。更に、もうひとつの重要な役割として、カルシウムの貯蔵と刺激に応じた放出があります。小胞体からのカルシウム放出は、細胞膜に存在する各種の受容体を始めとした様々な刺激に応じて細胞内へシグナルを伝える重要な生理的役割を担っています。

**カルシウム:** カルシウムは主として骨や歯として、“ハイドロキシアパタイト”と呼ばれる、



リン酸と結合した形で存在しており、生体内の重要な構成成分の一つです。更に、カルシウムは重要な生理機能を担っています。それが、細胞内におけるシグナル分子としての働きです。カルシウムは細胞質内液中には非常に少ない量しか存在しておらず、細胞外液中の 1000 分の 1 以下の濃度しかありません。細胞内では小胞体に貯蔵されています。細胞膜に存在する様々な受容体や電位変化といった刺激に応じて細胞外からのカルシウム流入や小胞体からのカルシウム放出が起こります。これが細胞の中にシグナルを伝え、筋細胞の収縮、伝達物質の放出、遺伝子の発現、細胞死や細胞増殖等の刺激に応じた生理機能が発揮されます。このため、カルシウムの正常な小胞体内貯蔵や刺激に応じた適切な放出と再取り込み、細胞外からの流入等は生体の維持にとって不可欠といえます。

**TRIC チャンネル:** trimeric intracellular cation(TRIC)チャンネル。小胞体カルシウム放出を担当するイオンチャンネルとしてリアノジン受容体とイノシトール三リン酸受容体が知られており、それぞれ独自の機構によりカルシウムを放出します。両チャンネルの開口に伴い陽イオンであるカルシウムが放出されると、小胞体内腔に負の電荷が発生することになり、以降のカルシウム放出が抑制されることが推定されます。生理的条件下で観察される数十ミリ秒に及ぶ小胞体カルシウム放出が持続するためには、この負電荷を中和する機構が必要であると想定されます。この機構を担う分子であるカウンターイオンチャンネルとして 2007 年に当研究グループが同定した 2 種類の新規小胞体膜タンパク質を TRIC-A 並びに TRIC-B と名づけました。TRIC-A は心筋や骨格筋など興奮性の組織・細胞に、TRIC-B は全身で普遍的に発現していることがわかっており、それぞれの発現細胞において正常なカルシウム放出を補助する重要な生理機能を担っていることが明らかになってきています。

**I 型コラーゲン:** コラーゲンは主として脊椎動物の真皮や骨、軟骨などを構成するタンパク質の一つであり、細胞外基質を構成する主たる成分でもあります。I 型コラーゲンは複数の種類が存在するコラーゲンの中で、脊椎動物では最も多量に存在するコラーゲンです。骨を構成する主たる成分の一つであり、 $\alpha 1$  鎖 1 本と  $\alpha 2$  鎖 2 本が集まって形成されています。骨芽細胞が I 型コラーゲンを合成・分泌しています。

**細胞外基質:** 細胞の外側に存在する構造体の創傷です。多細胞生物において、細胞の外側の空間を充填する物質であり、骨格としての役割を果たします。骨や軟骨はこういった細胞外基質として形成されたものです。その他にも、細胞接着の際の足場としての役割や、細胞増殖因子を保持する役割も担っています。