

# 学位論文内容の要旨

愛知学院大学

論文提出者

土屋 範果

論文題目

骨芽細胞におけるずり応力誘発性

細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度上昇へのグルタミン酸の関与

## I. 緒言

矯正歯科治療時には機械刺激により骨リモデリングが誘発される。機械刺激が骨リモデリングや骨量の制御因子の一つであることはよく知られているが、骨関連細胞が機械刺激を感受する分子機構は十分に明らかにされていない。機械刺激による骨代謝制御機構を解明することは、骨形成と骨吸収のコントロールを必要とする矯正歯科治療にとって重要である。

機械刺激を骨に作用させると細胞骨格のひずみと組織液の移動に伴うずり応力が誘発される。機械ひずみとずり応力の両方の刺激によって骨芽細胞で細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度 ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) の上昇が起こることが示されている。生理的レベルのずり応力は NO 産生などの細胞性応答を引き起こすのに対して、ひずみ刺激では生理的レベルより数倍大きい刺激を与えてもこれらの反応が誘発されなかったと報告されており、骨組織の機械刺激応答においてずり応力がより重要な役割を果たしていると考えられる。

ずり応力誘発性の  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇は、 $\text{Ca}^{2+}$  透過性機械刺激感受性チャネルを介していると考えられているが、詳細な機序は不明である。様々な刺激により骨芽細胞から ATP やグルタミン酸などの伝達物質が分泌されることや骨芽細胞と破骨細胞に ATP 受容体やグルタミン酸受容体が発現していることが報告されている。これらの受容体の活性化は、 $\text{Ca}^{2+}$  透過性チャネルを介した細胞外からの  $\text{Ca}^{2+}$  流入または細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$  ストアからの  $\text{Ca}^{2+}$  放出を経て  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇を惹起している。

本研究では機械刺激を受けた骨芽細胞の機械刺激伝達経路における伝達物質の役割を明らかにすることを目的とし、機械刺激を受けた骨芽細胞から分泌された伝達物質が自己に発現している受容体に作用することで $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を引き起こし、骨リモデリングの制御に関与しているのはいかと仮説を立て検討した。

## II. 実験材料および方法

### 1. 実験材料

本研究のすべての実験において、骨芽細胞としてマウス頭蓋骨由来骨芽細胞様細胞 (MC3T3-E1) を使用した。感覚神経細胞としてマウス新生仔から摘出した脊髄後根神経節細胞を初代培養した。

### 2. 細胞内 $Ca^{2+}$ イメージング法

$Ca^{2+}$  蛍光指示薬 fluo-3AM および Cal-520 により、共焦点レーザー顕微鏡を用いて $[Ca^{2+}]_i$  変化を記録した。

### 3. 機械刺激法

標的細胞へ局所ずり応力を与えるために、微小ガラスピペットと圧力制御装置 (Pressure System II) を使用した。微小ガラスピペット後端に約 6.8 kPa、持続時間 1 msec の空気圧をかけることで微小ガラスピペット先

端から細胞外液を押し出し、標的細胞周囲に水流を発生させ局所ずり応力を惹起した。

#### 4. 統計的処理

統計学的な有意差検定として2群の比較には Student の t-検定を、3群以上の比較には ANOVA の後 Bonferroni 補正した多重比較を行った。

### III. 結果

#### 1. 機械刺激方法の検討

微小ピペットを介した局所ずり応力が機械的ストレスとして適切かどうかを調べた。局所ずり応力の適用によって標的細胞のみで  $[Ca^{2+}]_i$  上昇が観察され、標的細胞周囲の細胞では  $[Ca^{2+}]_i$  上昇は認められなかった。これはピペットから押し出された水流が限局した狭い領域にのみ作用していることを示している。更に、この  $[Ca^{2+}]_i$  上昇は繰返し刺激に対しても良好な再現性を示した。また、機械刺激感受性  $Ca^{2+}$ 透過性イオンチャネル阻害薬である  $GdCl_3$  を  $10 \mu M$  作用させたところ、局所ずり応力による  $[Ca^{2+}]_i$  上昇は、完全に消失した。

#### 2. 局所ずり応力誘発性 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇への伝達物質開口分泌の関与

局所ずり応力による  $[Ca^{2+}]_i$  上昇に伝達物質の分泌が関与しているかどうか

かを調べるために開口分泌の阻害薬の作用を検討した。100  $\mu\text{M}$  の monensin や 10  $\mu\text{M}$  の brefeldin A による前処置は、局所ずり応力による  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇を有意に抑制した。

### 3. ずり応力によって骨芽細胞から分泌される伝達物質の同定

ずり応力により MC3T3-E1 細胞から分泌される伝達物質を特定するために、ATP 受容体阻害薬、ATP 分解酵素、グルタミン酸受容体阻害薬を作用させた。

10  $\mu\text{M}$  の suramin、5 U/ml の apyrase 存在下では、ずり応力誘発性の  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇に変化が認められなかったのに対し、グルタミン酸受容体阻害薬である 10  $\mu\text{M}$  の LY341495、10  $\mu\text{M}$  の CNQX、50  $\mu\text{M}$  の AP-5 の存在によりずり応力誘発性の  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇が阻害された。

### 4. $\text{Ca}^{2+}$ シグナル経路の評価

$[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇の経路には、細胞外からの  $\text{Ca}^{2+}$ 流入と細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ ストアからの  $\text{Ca}^{2+}$ 放出の経路が考えられる。細胞外からの  $\text{Ca}^{2+}$ 流入の寄与を調べるために  $\text{Ca}^{2+}$ -free 細胞外液を用いたところ、ずり応力誘発性  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇は完全に消失した。また、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ ストアからの  $\text{Ca}^{2+}$ 放出の寄与を調べるためにホスホリパーゼ C 阻害薬の U73122 (0.1  $\mu\text{M}$ ) と  $\text{IP}_3$  受容体阻害薬の 2-APB (100  $\mu\text{M}$ ) の作用を検討したところ、ずり応力誘発性  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇は部分的に抑制された。

## 5. 分泌された伝達物質の生理的役割の検討

以上の結果より、局所ずり応力によって骨芽細胞からグルタミン酸が分泌される可能性が示された。グルタミン酸は神経伝達物質としても知られており、周囲の神経細胞への情報伝達を担っている可能性がある。神経-骨芽細胞共培養系を用いて骨芽細胞に局所ずり応力を作用させたところ、骨芽細胞の反応後に近接する神経細胞でも反応が認められた。

## IV. 考察

身体活動時、骨で発生する機械的ひずみは硬組織の微小ネットワーク内で細胞外液の移動によるずり応力を発生させる。ずり応力は機械刺激が機械刺激感受性  $\text{Ca}^{2+}$ 透過性イオンチャネルを活性化させ、細胞外からの  $\text{Ca}^{2+}$ 流入を引き起こし、骨芽細胞の  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇を誘発すると考えられている。一方で、細胞外からの  $\text{Ca}^{2+}$ 流入だけでなく細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ ストアからの  $\text{Ca}^{2+}$ 放出にも依存しているとの報告もある。また、ATP やグルタミン酸が骨芽細胞から分泌されること、これらの伝達物質の受容体が骨芽細胞に発現していることが知られている。本研究では、機械刺激を受けた骨芽細胞の機械刺激伝達経路における伝達物質の役割を明らかにすることを目的とし、骨芽細胞から分泌された伝達物質がずり応力誘発性の  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇において重要な役割を果たす可能性を検討した。

これまでの刺激方法は、培養系全体を刺激する方法が主流であり、どの細胞が伝達物質を分泌しているかを明確にすることが不可能であった。そこで本研究では微小ガラスピペットと圧力制御装置により、標的細胞のみ刺激可能な限局的な水流を作用させる方法を用いた。この刺激方法により標的細胞へ繰り返し局所ずり応力を作用させると、標的細胞のみで再現性良く  $[Ca^{2+}]_i$  上昇が認められた。更に、この反応は機械刺激感受性チャネルの阻害薬である  $GdCl_3$  によって、完全に妨げられた。微小ガラスピペットによる限局的な水流は、ずり応力を一つの骨芽細胞のみに作用させることが可能な優れた機械刺激方法であると考えられた。

局所ずり応力誘発性の  $[Ca^{2+}]_i$  上昇は開口分泌阻害薬の monensin や brefeldin A、代謝型およびイオンチャネル内蔵型のグルタミン酸受容体抑制薬 (LY341495、CNQX、AP-5) によって有意に抑制された。この結果は、グルタミン酸がずり応力によって骨芽細胞から分泌され、分泌されたグルタミン酸が自己の受容体に作用することで  $[Ca^{2+}]_i$  上昇を引き起こしたことを示唆している。更に代謝型グルタミン酸受容体の下流に存在する PI-PLC 経路の抑制薬 (2-APB、U73122) は、ずり応力誘発性の  $[Ca^{2+}]_i$  上昇を有意に抑制した。これらの結果は、代謝型グルタミン酸受容体を介した細胞内  $Ca^{2+}$  ストアからの  $Ca^{2+}$  放出が  $[Ca^{2+}]_i$  上昇に関与していることを示唆する。一方で、 $Ca^{2+}$ -free 細胞外液中ではずり応力誘発性の  $[Ca^{2+}]_i$  上昇が完全に消失したことより、ずり応力誘発性の  $[Ca^{2+}]_i$  上昇には細胞外からの  $Ca^{2+}$  流入がよ

りシグナル経路の上流にあると考えられた。

以上の結果よりずり応力によって機械刺激感受性チャネルを介した  $\text{Ca}^{2+}$  流入が最初に誘発され、次いでグルタミン酸が分泌され、自己の代謝型グルタミン酸受容体を介した  $\text{Ca}^{2+}$  ストアからの  $\text{Ca}^{2+}$  放出とイオンチャネル内蔵型のグルタミン酸受容体を介した  $\text{Ca}^{2+}$  流入を引き起こす可能性が示された。ずり応力誘発性のグルタミン酸は、骨芽細胞において機械刺激による  $\text{Ca}^{2+}$  情報伝達を制御する役割を果たしていると考えられた。 $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇は骨芽細胞分化などの多くの現象の最初のイベントである。更にグルタミン酸は骨芽細胞分化に対する促進作用の他に破骨細胞の骨吸収能に抑制性の影響を及ぼすことが報告されている。従って、ずり応力誘発性のグルタミン酸分泌が骨芽細胞と破骨細胞へ作用することにより、機械刺激による骨量増加に寄与している可能性が考えられた。

また、神経細胞と骨芽細胞の共培養系において骨芽細胞のみに局所ずり応力を作用させたところ、数秒の時間差の後に神経細胞においても  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇が見られた。これは機械刺激により骨芽細胞から分泌された伝達物質が神経細胞への情報伝達を担う可能性を示している。

機械刺激による骨芽細胞からのグルタミン酸分泌は、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇に伴う骨芽細胞分化を促進する他、周囲の骨関連細胞や神経系へ作用し骨量増加に寄与する可能性が高いと考えられた。