

論文審査の要旨および担当者

愛知学院大学

報告番号	① 乙 第 号	論文提出者名	土屋 範果
論文審査 委員氏名	主査 後藤 滋巳 副査 戸荏 彰史 田中 貴信 宮澤 健		
論文題名	骨芽細胞におけるズリ応力誘発性 細胞内 Ca ²⁺ 濃度上昇へのグルタミン酸の関与		

インターネットの利用による公表用

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。マウス頭蓋骨由来骨芽細胞様細胞 (MC3T3-E1 細胞) に機械刺激を与えると細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) 上昇が起こる事が知られており、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇は骨芽細胞分化などの引き金となる重要な反応であるが、機械刺激による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇の詳細なメカニズムは明らかになっていない。また、様々な刺激を骨芽細胞に作用させると ATP やグルタミン酸が分泌されることが知られており、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おり、これらの受容体の活性化は、 Ca^{2+} 透過性チャネルを介した細胞外からの Ca^{2+} 流入または細胞内の Ca^{2+} ストアからの Ca^{2+} 放出を経て $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇を惹起している。そこで本研究では機械刺激によって骨芽細胞から分泌される伝達物質が $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇へ関与しているのではないかと仮説を立て、検討を行った。

機械刺激を骨などの硬組織に作用させると機械ひずみと組織液の移動に伴うずり応力が誘発されることが知られており、様々な研究チームがこの二つの刺激方法について検討し、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 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇が起こることが示された。しかし、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。

本研究では、機械刺激法として細胞外液を充填した微小ガラスピペット後端に空気圧をかける事で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、ずり応力を惹起する方法を用い、蛍光 Ca^{2+} イメージング法にて $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇を測定した。この微小ガラスピペットによるずり応力は、標的細胞のみに $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇を惹起し、再現性も良好であり、機械刺激感受性チャンネル阻害薬 (GdCl_3) を用いると $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇が消失したことから、優れた機械刺激法であると考えられた。また、ずり応力による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇は開口分泌阻害薬 (monensin、brefeldin A) により有意に抑制され、グルタミン酸受容体阻害薬 (LY341495、AP-5、CNQX) によっても $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇がほぼ消失した一方で、ATP 受容体阻害薬 (suramin) や ATP 分解酵素 (apyrase) によっては影響を受けなかった。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 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇を引き起こしたことを示唆している。

$[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇の経路には、細胞外からの Ca^{2+} 流入と細胞内 Ca^{2+} ストアからの Ca^{2+} 放出の経路が考えられる。そこで細胞内からの Ca^{2+} 放出の経路の寄与を調べるために、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) を使用したところ、ずり応力誘発性の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇を有意に抑制した。また、細胞外からの Ca^{2+} 流入の寄与を調べるために

Ca²⁺-free 細胞外液を用いたところ、ずり応力誘発性 [Ca²⁺]_i 上昇は完全に消失し、細胞外からの Ca²⁺流入と細胞内 Ca²⁺ストアからの Ca²⁺放出の経路の両方が関与している事が示された。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 Ca²⁺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 Ca²⁺ストアからの Ca²⁺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 Ca²⁺流入を引き起こす可能性が示された。更に、感覚神経細胞と骨芽細胞の共培養系において、骨芽細胞へのずり応力により隣接する感覚神経細胞においても [Ca²⁺]_i 上昇が見られた事より、骨芽細胞から神経細胞へ伝達物質の分泌を介したシグナル伝達が起こる可能性が考えられた。

ずり応力によって引き起こされる骨芽細胞からの伝達物質の分泌は、骨芽細胞の [Ca²⁺]_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細胞へ作用し骨リモデリングの調節に寄与する可能性がある。

以上、本研究は機械刺激による [Ca²⁺]_i 上昇の分子伝達機構を明らかにする事で、骨リモデリングのコントロールの可能性を提示しており、今後の歯科矯正学、歯科薬理学および関連諸学科に寄与するところが大きい、よって本論文は博士（歯学）の学位授与に値するものと判定した。