

学位論文の全文に代えてその内容を要約したもの

愛知学院大学

甲 第 号	論文提出者 米田 真希
論文題目 マウス頭蓋冠由来骨芽細胞様細胞における機械的刺激受容チャネルの機能解析	

I. 緒言

骨は、骨芽細胞による骨形成と破骨細胞による骨吸収という2つの過程を経て、一定のリモデリングを受ける動的な組織である。また、骨芽細胞は骨基質成分の分泌を介して骨形成と組織石灰化を調節し、破骨細胞の分化に不可欠な因子を産生する。骨代謝とは、このような骨芽細胞による骨形成と破骨細胞による骨吸収のサイクルのことをいい、骨芽細胞と破骨細胞はともに骨恒常性にとって重要な因子である。

また、ひずみ、圧縮、ずり応力などの機械的刺激は、骨芽細胞や破骨細胞の機能を調節するために必須の要素であり、骨量もこれらの機械的刺激によって制御されている。

矯正歯科治療時、機械的刺激が歯に負荷されると、圧迫側歯槽骨では主に破骨細胞による骨吸収が、牽引側歯槽骨では主に骨芽細胞による骨形成・骨添加が活発になり、モデリングとリモデリングが局所的、選択的に生じていることが広く知られており、それらの作用により歯の移動が誘発されている。しかし、骨関連細胞が機械的刺激を受容している分子メカニズムは未だ十分に明らかとなっていない。そのため、骨代謝の分子メカニズムを理解することは、矯正歯科治療にとって重要なことである。

また、過去の報告では、流体刺激による機械的ひずみとずり応力が、骨芽細胞において Ca^{2+} 透過性機械刺激感受性チャネルの活性化を介して細胞内 Ca^{2+} 細胞 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) の上昇を引き起こすことが報告されている。機械的刺激を受容するイオンチャネルの中では、Transient Receptor Potential (TRP) チャネルファミリーが最も広く研究されており、低張圧刺激による TRPV4 および TRPM3 の活性化は骨芽細胞株 MC3T3-E1 において細胞内 Ca^{2+} 濃度を上昇させることが明らかとなっている。TRP チャネルファミリーのうち、機械的刺激受容チャネルである TRPV2、TRPM

4、および TRPM 7 は、ヒトおよびマウスの骨芽細胞で発現が認められているが、これらのチャネルが機械的刺激によって活性化されるかどうかはまだ報告されていない。

一方、近年 PIEZO 1 と PIEZO 2 を含む PIEZO ファミリーが Ca^{2+} 透過性カチオンチャネルとして同定された。PIEZO ファミリーは 2010 年に発見された機械的刺激受容チャネルであり、PIEZO1 においては 2-[5-[[2,6-Dichlorophenyl)methyl]thio]-1,3,4-thiadiazol-2-yl]pyrazine (Yoda1) によって活性化されることが報告されている。PIEZO1 は細胞内の張力変化に応じて開口し、細胞内にカチオンを流入させ、情報を伝える。しかし、細胞がどのように機械的刺激を細胞内シグナルに変換しているかという分子メカニズムや、細胞による機械的刺激の感知が生体内のどのような現象に関わっているかについては不明な点が多い。さらに骨芽細胞においては PIEZO1 の発現および機能について報告されているが、機械的刺激、特に流体刺激によるズリ応力に対する PIEZO 1 の機能については明らかになっていない。

そこで本研究では、PIEZO 1 および TRPV 4 に対する薬理学的アゴニストおよびアンタゴニスト、ならびに siRNA を用いることによって、MC3T3-E1 における PIEZO 1 および TRPV 4 の役割について検討することを目的として行った。

II. 実験材料および方法

1. 試薬

本実験において、以下の試薬を使用した。

1) 2-[5-[[2,6-Dichlorophenyl)methyl]thio]-1,3,4-thiadiazol-2-yl]pyrazine

(Yoda1) (Tocris-Bioscience, UK, Bristol) : PIEZO 1 アゴニスト

2) GSK1016790A (GSK) (Sigma/Aldrich, St, Louis, MO) : TRPV 4 アゴニスト

3) HC-067047 (HC) (Sigma/Aldrich) : TRPV 4 アンタゴニスト

4) GdCl_3 (Gd^{3+}) (Sigma/Aldrich) : 非選択的カチオンチャネル アンタゴニスト

5) ルテニウムレッド (RuR) (Sigma/Aldrich) : 非選択的カチオンチャネル アンタゴニスト

2. 細胞培養

本実験において、以下の細胞を使用した。

1) マウス頭蓋冠由来骨芽細胞株 (MC3T3-E1、理研セルバンク、つくば)

37°C、5%CO₂ 存在下にて 10% 熱不活性化 FCS (GIBCO、Waltham、MA)、ペニシリン G (100 U/ml、明治製菓製薬会社、東京)、およびストレプトマイシン (100 μg/ml、明治製菓製薬株式会社) を含む α-MEM 培地にて培養した。

2) ヒト胎児腎臓 293 細胞株 (HEK、健康科学研究資源バンク、大阪)

37°C、5%CO₂ 存在下にて 10% 熱不活性化 FCS (GIBCO、Waltham、MA)、ペニシリン G (100 U/ml、明治製菓製薬会社、東京)、およびストレプトマイシン (100 mg/ml、明治製菓製薬株式会社) を含む D-MEM 培地にて培養した。

各種遺伝子の mRNA 発現量の検討においては、上記の細胞を 6 well plate に播種し、コンフルエントになるまで培養した後、RNA を抽出した。細胞内 Ca²⁺ 濃度測定においては測定の 3～4 日前に測定用のカバーガラス上に播種した。

3. ヒト胎児腎臓 293 細胞株 (HEK) におけるマウス Piezo1 のトランスフェクション

細胞は 60% の細胞密度になるまで培養し、リポフェクトアミン 3000 (Thermo Fisher Scientific、横浜) を使用して、マウス Piezo1 をクローニングした pcDNA3.1 プラスミドをトランスフェクションした。トランスフェクション後 36～48 時間後の細胞を実験に使用した。

4. RT-PCR と定量的 RT-PCR

マウスの Piezo 1、Piezo 2、Trpv 1～v 6 についての RT-PCR 増幅を実施した。ABI 2720 サーマルサイクラー (Applied Biosystems, Foster City, CA) を用いて、94°C で 15 秒の変性、55°C で 15 秒のアニーリング、および 72°C で 30 秒のプライマー伸長の条件のもとで行った。増幅された

目的遺伝子の PCR 産物を 1.5% アガロースゲル上で電気泳動し、1 mg/mL 臭化エチジウムで染色後、FAS III (TOYOBO、大阪) で評価した。

リアルタイム定量的 RT-PCR は Thermal Cycler Dice Real Time System (Takara Bio, Inc., 草津) を用いて行った。遺伝子産物の転写定量化を GAPDH と比較して行い、各 cDNA サンプルを 3 回試験した。PCR のサイクル条件は、95°C で 10 分間の初期変性を行なった後、95°C で 15 秒間の変性反応および 60°C で 1 分間の伸展反応を 45 サイクルで行なった。PCR プライマーを用いて Piezo 1, Piezo 2, Trpv 1 ~ v 6 の mRNA の発現レベルを評価した。

5. 細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) の測定

細胞を、実験を行う 3 ~ 4 日前にカバーガラス上に播種し、実験直前に Ca^{2+} 蛍光指示薬である Fura 2-AM (10 μ M) (同仁化学、熊本) を添加し、10 ~ 24°C の細胞外液 (137 mM NaCl, 5.9 mM KCl, 2.2 mM $CaCl_2$, 1.2 mM $MgCl_2$, 14 mM glucose, 10 mM HEPES, pH 7.4) 中にて暗室で 30 分間取り込ませた。その後、10 分間細胞外液を灌流し、Fura-2 AM を洗い流した。

ImageworkBench 6.0 (INDEC Medical Systems, Santa Clara, CA) によって駆動される Argus/HisCa イメージングシステム (浜松ホトニクス、浜松) を使用して 5 秒ごとに Fura-2 蛍光シグナルを測定した。各分析において、全細胞領域を、蛍光比を平均化するための領域として選択した。HEK および MC3T3-E1 における分析のために 1 枚のカバーガラス上に 20 ~ 50 個の細胞を集めた。そして、誤差を減らすために他のカバーガラスで同じ実験を繰り返した。濃度反応曲線を作成するため、集めたデータを Hill の式に当てはめた。

6. 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を使用した。標的細胞から $20\ \mu\text{m}$ の距離に先端直径 $350\ \mu\text{m}$ の微小ピペットを設置し、細胞に機械的刺激を与えた。細胞外液は $7.67\ \mu\text{L/s}$ で流し、剪断応力 (τ) の計算は、ハーゲン-ポアズイユ方程式 ($\tau = 4\ \mu Q / \pi R^3$) を用いた。 (μ は動粘度、 Q は流速、そして R は毛細管の半径である。)

7. siRNA による Piezo1 と Trpv4(Transient Receptor Potential Vanilloid4)の特異的ノックダウン

マウス PIEZO1 (siPiezo1, Invitrogen, Carlsbad, CA) に対するステルス低分子干渉 RNA (siRNA) 二本鎖オリゴヌクレオチドの配列は、センス鎖の 5'-UACCGAUCUCCACAGAGACCAUGAUUA-3' およびアンチセンス鎖 5'-UAAUCAUGGUCUGUGGAGAUCCGUA-3' であり、マウス TRPV4 (siTRPV4, Invitrogen) はセンス鎖の 5'-CCAAGAUGUACGACCUGCUGCUUCU-3'、アンチセンス鎖の 5'-AGAAGCAGCAGGUCGUACAUCUUGG-3' であった。

siRNA 処理のネガティブコントロールとして、Medium GC Stealth RNAi Negative Control Duplex (siNC, Invitrogen) を使用した。35 mmdish または 24 well plate で増殖した細胞を、トランスフェクションの3時間前に培地で洗浄した。siRNA または siNC ($20\ \mu\text{M}$ 、35 mm ディッシュで $5\ \mu\text{L}$ 、24well プレートで $1.25\ \mu\text{L}$) および Lipofectamine RNAiMAX (35 mm dish で $2.5\ \mu\text{L}$ 、24well plate で $0.62\ \mu\text{L}$ 、Invitrogen) を Opti-MEM (Invitrogen) で $200\ \mu\text{l}$ (35 mm dish) または $50\ \mu\text{l}$ (24 well plate) になるようそれぞれ希釈・混合し、室温で20分間インキュベートして複合体を形成した。混合物全体を各 well に添加し、siRNA と siNC とともに最終濃度を $40\ \text{nM}$ となるようにした。その後、細胞を CO_2 チャンバーで96時間インキュベートした。

8. WST-1 による細胞増殖測定法

MC3T3-E1 を 2×10^4 cells/well の細胞密度になるよう 24 well plate に播種し 24 時間培養した後、薬物を添加し、さらに 24 時間培養した。細胞増殖試薬 WST-1 (Roche Applied Science, Penzberg, Germany) は、製造元の指示に従って使用した。テトラゾリウム塩 WST-1 により生じたホルマザン 450 nm での吸光度を 620 nm のバックグラウンド吸光度を差し引いた (SPARK, TECAN Japan Co. Ltd.)。

9. 統計分析

得られた実験データは平均±標準誤差として示した。2 群間および複数群にわたる統計的有意差検定は、Student の t-検定および ANOVA 検定を使用し検討した (Origin J9.1, LightStone、東京)。すべての検定で $p < 0.05$ をもって統計的に有意とみなした。

III. 結 果

1. MC3T3-E1 における

2-[5-[[[(2,6-Dichlorophenyl)methyl]thio]-1,3,4-thiadiazol-2-yl]pyrazine

(Yoda1) による PIEZO1 の活性

MC3T3-E1 における Piezo 1 および Piezo 2 の mRNA 発現量を調べるために RT-PCR を行った結果、Piezo 1 および Piezo 2 の mRNA 発現が認められた。さらに Piezo 1 の mRNA 発現は Piezo 2 の mRNA 発現より高かった。また、他の機械的刺激受容チャネルとして、TRPV 2 および TRPV 4 が MC3T3-E1

において発現することが報告されていることから、TRP チャンネルファミリーのうち、TRPV チャンネルサブファミリー (Trpv 1 ~v 6) の mRNA 発現についても検討した。その結果、MC3T3-E1 では、Trpv 1 ~v 6 すべての mRNA が発現していることについても明らかになった。

次に、PIEZO 1 のアゴニストである Yoda 1 を MC3T3-E1 に添加し、MC3T3-E1 における PIEZO 1 の機能的発現を確認した。0.1~3.0 μ M の Yoda1 を添加したところ、濃度依存的に細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) が上昇し、50%の反応に必要な有効濃度 (EC_{50}) は 0.2 μ M であった。さらに、Yoda1 による細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇は、非選択的カチオンチャンネル阻害薬である Gd^{3+} およびルテニウムレッド (RuR) の添加によって有意に抑制された。以上の結果より、骨芽細胞 MC3T3-E1 において PIEZO 1 が機能発現しており、Yoda 1 添加により細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇することが明らかとなった。

次に HEK 細胞にマウス Piezo1 (mPiezo1) をトランスフェクションし、Yoda 1 を作用させた (HEK-mPiezo 1)。その結果、MC3T3-E1 と同様に、Yoda 1 により濃度依存的に細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇し、その EC_{50} は約 0.2 μ M であった。さらに、Yoda1 による細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇は、 Gd^{3+} および RuR の添加によって有意に抑制された。

2. MC3T3-E1 および HEK-mPiezo1 における機械的刺激の効果

PIEZO 1 は機械的刺激受容チャンネルであり、流体刺激によるずり応力ならびに膜伸張を伴う機械的刺激によって活性化される。そこで、MC3T3-E1 における機械的刺激に対する PIEZO 1 の感受性を確認するために、MC3T3-E1 に機械的刺激を与え、細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化を測定した。標的細胞から約 20 μ m の距離に設置した微小ピペットを通してずり応力による機械的刺激を細胞に

与えた。その結果、MC3T3-E1 において機械的刺激により細胞内 Ca^{2+} 濃度が有意に上昇した。さらに PIEZO1 アゴニストである Yoda-1 に対しても細胞内 Ca^{2+} 濃度が有意に上昇した。また、ずり応力の強さを 7.67、3.33、16.7 $\mu\text{L/s}$ と三段階に変化させて MC3T3-E1 に与えたところ、刺激に応じて細胞内 Ca^{2+} 濃度は上昇した。また、同様に PIEZO1 アゴニストである Yoda-1 に対しても細胞内 Ca^{2+} 濃度が有意に上昇した。さらに、この機械的刺激誘発細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇は Gd^{3+} および RuR により有意に抑制された。また、HEK 細胞(HEK-CT)および mPIEZO 1 をトランスフェクションした HEK 細胞(HEK-mPiezo 1)に機械的刺激を与えた場合、HEK-CT と比較して HEK-mPiezo 1 では大きな細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇が誘発された。また HEK-mPiezo 1 では 1.0 μM Yoda1 による細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇もより大きく、ずり応力による機械的刺激による細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇の結果と相関が見られた。これらの結果より、MC3T3-E 1 において PIEZO 1 が機械的刺激を受容するチャンネルであることが示唆された。

3. MC3T3-E1 における PIEZO 1 のノックダウン

MC3T3-E1 の機械的刺激誘発細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇作用における PIEZO 1 の寄与について、さらに詳細に検討を行うため、Piezo 1 を標的とした siRNA (siPiezo 1) を用いて Piezo 1 のノックダウンを行った。siPiezo 1 を導入した MC3T3-E1 において、Piezo 1 の mRNA 発現レベルは、対照群 (siNC 処置 MC3T3-E1) と比較して、20%まで有意に減少した。また、Yoda 1 による細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇は siPiezo1 処置 MC3T3-E1 において有意に減少した。これらの結果は、siPiezo1 により PIEZO 1 が効果的にノックダウンされたことを強く示している。

次に、siPiezo 1 処置 MC3T3-E1 に機械的刺激を与え、細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化について検討した。

また、ポジティブコントロールとして TRPV 4 選択的アゴニストである GSK1016790A (GSK) を添加した。1.0 μ M Yoda 1 による細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇は、siPiezo 1 を導入した MC3T3-E1 において有意に減少したことから、これらの細胞において PIEZO 1 の機能発現がノックダウンできていることが示された。しかし、siPiezo 1 処置 MC3T3-E1 における機械的刺激誘発細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇は、siNC 処置 MC3T3-E1 における反応とほとんど変化しなかった。また、ポジティブコントロールである GSK による細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇についても変化がなかった。これらの結果から、Piezo 1 は MC3T3-E1 における機械的刺激誘発 Ca^{2+} 濃度上昇には寄与しないことが示唆された。

4. MC3T3-E1 における機械的刺激による TRPV 4 活性化

TRPV 4 は GSK により活性化されると細胞内 Ca^{2+} 濃度を上昇させ、この活性化は TRPV 4 アンタゴニストである HC-067047 (HC) の存在により抑制されるため、GSK および HC に対する MC3T3-E1 の感受性について検討した。その結果、GSK は MC3T3-E1 の細胞内 Ca^{2+} 濃度を濃度依存的に上昇させた。また、3 nM GSK による細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇は 100 nM HC の添加によりほぼ完全に抑制された。さらに、MC3T3-E1 における機械的刺激誘発細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇は 100 nM HC の添加により有意に抑制された。この結果は、MC3T3-E1 において TRPV 4 が機械的刺激を受容することを示唆している。さらに機械的刺激誘発細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇における TRPV 4 の寄与についてさらに詳細に検討するため、TRPV 4 をノックダウンさせた MC3T3-E1 を用いて検討を行った。TRPV 4 を標的とした siRNA (siTrpv 4) およびネガティブコントロール siRNA (siNC) を導入した MC3T3-E1 では、Trpv 4 および Piezo 1 の mRNA 発現量は低下した。これらの細胞を用いて、GSK を濃度依存的に作用させ、TRPV 4 がノックダウンされていることを確認した。また、siNC およ

び siTrpv 4 を導入した MC3T3-E1 に機械的刺激、GSK、および Yoda 1 を作用させ、細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化について検討した。その結果、siTrpv 4 を処置した MC3T3-E1 では、機械的刺激および GSK による細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇作用は明らかに抑制された。以上の結果は、MC3T3-E1 における機械的刺激による細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇は TRPV 4 を介して生じていることを示している。しかしながら、siTrpv 4 処置 MC3T3-E1 では、Yoda 1 による細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇も有意に減少した。そこで TRPV 4 をノックダウンすることにより、Yoda 1 の濃度反応曲線が変動するかを検討したところ、Yoda 1 による細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇が抑制された。つまり、TRPV 4 が PIEZO 1 の機能を変化させている可能性があることが示唆された。そこで次に、Yoda 1 誘発細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇に対する HC の影響を検討した。MC3T3-E1 を 100 nM HC で前処理すると、Yoda 1 誘発細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇は抑制され、特に Yoda 1 の濃度が低いほど、よりその作用は抑制された。また、PIEZO 1 および TRPV 4 を共発現させた HEK においても、HC を用いた前処理により Yoda 1 誘発細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇が抑制された。Yoda 1 誘発細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇に TRPV 4 による反応が含まれることが示唆された。しかし、TRPV 4 のみを発現させた HEK に対して Yoda 1 は影響を及ぼさなかった。また、HEK-CT と比較し HEK-mPiezo1 は、GSK による反応は誘発されなかった。さらに、HEK-mPiezo1 は HC による Yoda1 誘発細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇に対して抑制効果を持たなかった。これらの結果から、PIEZO 1 および TRPV 4 の両方が発現している MC3T3-E1 おいて、Yoda 1 は PIEZO 1 の活性化を介して TRPV 4 依存性 Ca^{2+} 濃度反応を誘発していると考えられる。

5. MC3T3-E1 の細胞増殖に対する PIEZO 1 と TRPV 4 の効果

鈴木らの報告によると、TRPV 4 の活性化がヒト脳毛細血管内皮細胞の細胞増殖を増強すること

を明らかにしている。対照的に、PIEZO 1 のノックダウンはヒト滑膜肉腫細胞株 SW982 の細胞増殖を減少させることも報告している。MC3T3-E1 では、PIEZO 1 と TRPV 4 が機能的に発現するため、それらが MC3T3-E1 の細胞増殖に及ぼす影響について検討した。

Yoda 1 は濃度依存的に細胞増殖を減少させたが、非選択的カチオンチャネル阻害薬である Gd^{3+} を添加しても、その現象作用は抑制されなかった。さらに Yoda 1 添加による細胞増殖の減少と PIEZO 1 の関与を検討するために、siPiezo 1 処置 MC3T3-E1 に Yoda 1 を添加した。その結果、PIEZO 1 をノックダウンすることにより細胞生存率をコントロール (siNC) の約 50% まで減少させたが、PIEZO 1 ノックダウンにより Yoda 1 による細胞増殖減少作用はほぼ完全に抑制された。以上より、PIEZO 1 の活性化が MC3T3-E1 の細胞増殖を抑制することが明らかとなった。一方、MC3T3-E1 を GSK で処理すると、濃度依存的に細胞増殖を抑制した。さらに、HC の添加および TRPV 4 のノックダウンにより、GSK による細胞増殖の抑制をほぼ完全に抑制した。以上の結果より、Piezo 1 と TRPV 4 は MC3T3-E1 において細胞増殖に関与することが明らかとなった。

IV. 考 察

本研究では、骨芽細胞 MC3T3-E1 におけるずり応力による機械刺激受容機構について検討し、機械的刺激受容チャネルである、PIEZO 1 および TRPV 4 が機能発現することを明らかにした。さらに TRPV 4 は PIEZO 1 よりも、ずり応力による機械的刺激に対して感受性が高いことも明らかとなった。また PIEZO 1 と TRPV 4 が高発現すると、Yoda 1 は PIEZO 1 の活性化を介して TRPV 4 を介した細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を誘発することを初めて明らかにした。さらに PIEZO 1 および TRPV 4 の活性化は MC3T3-E1 の細胞増殖を減少させたことから、PIEZO 1 および TRPV 4 は骨芽細胞の

細胞増殖に関与していることが示唆された。

1) MC3T3-E1 における PIEZO 1 の機械的刺激受容機構と刺激法について

新規機械的刺激受容チャネルである PIEZO は、神経細胞および骨細胞を含む非神経細胞に豊富に発現している。関節軟骨細胞では、PIEZO 1 および PIEZO 2 が膜伸張のためのメカノセンサーとして機能している。一方、PIEZO 1 は間葉系幹細胞および MC3T3-E1 を含むマウスおよびヒトの骨芽細胞にも発現していることが明らかとなっている。機械的刺激による直接的な PIEZO 1 活性化メカニズムは明らかにされていないが、0.01~0.03 MPa の範囲の高圧培養条件は、PIEZO 1 を介して骨形成を効果的に促進することが報告されている。この報告は、PIEZO 1 が骨芽細胞における細胞分化の調節因子であることを明確に示唆している。その報告と同様に、本研究では、PIEZO 1 アゴニストである Yoda 1 が MC3T3-E1 において細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を誘発した。さらに siPiezo 1 導入による PIEZO1 ノックダウンが、MC3T3-E1 における Yoda1 誘発細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を有意に抑制したという結果は、PIEZO 1 が MC3T3-E1 において機能的に発現していることを強く示している。しかし、本研究における流体刺激によるずり応力を伴う機械的刺激（推定 17.3 dyn/cm²）では、siPiezo1 処置 MC3T3-E1 と siNC 処置 MC3T3-E1 と比較して機械的刺激によって誘発される細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇には変化が認められなかった。これらの結果は、たとえ MC3T3-E1 において PIEZO1 が機能的に発現していたとしても、本研究で用いた機械的刺激条件では PIEZO 1 が反応に寄与しないということを示している。

流体刺激 (7.67 μ L/s) によるずり応力を伴う 17.3 dyn/cm² の刺激はマウス PIEZO 1 の活性化に効果的ではなかったが、HEK-mPiezo 1 は HEK-CT よりも機械的刺激に対して大きな反応を示した。

この結果は、本研究で用いた機械的刺激が PIEZO 1 を十分に活性化できることを示唆している。しかしながら、PIEZO 1 が本質的に機械的刺激感受性であっても、実際の刺激に対する反応性は刺激の種類、膜成分、および細胞マトリックスに依存している可能性がある。実際、機械的刺激感受性チャネルである PIEZO 1 と TRPV 4 は、軟骨細胞における膜の伸張、たわみ、押し込みなどの機械的刺激に対して感受性が高いことが報告されており、MC3T3-E1 における流体刺激によるずり応力では PIEZO 1 を活性化するには不十分であったという可能性が考えられる。MC3T3-E1、マウス腸間膜動脈およびヒト胎盤動脈の血管内皮細胞において、 $20 \mu\text{L/s}$ の液流を伴う機械的刺激は PIEZO 1 様チャネル活性を誘発することが報告されており、MC3T3-E1 において他の機械的刺激を与えることにより PIEZO 1 が活性化する可能性も考えられた。

2) MC3T3-E1 における TRPV 4 の機械的刺激受容機構について

細胞膜のひずみを伴う機械的負荷、圧縮、および流体刺激によるずり応力は、骨細胞、破骨細胞、および骨芽細胞などの骨関連細胞の機能を調節するために極めて重要な刺激である。そのため、これまでに骨関連細胞と機械的刺激に関する研究は広く行われており、 $10\sim 12 \text{ dyn/cm}^2$ の機械的刺激を MC3T3-E1 に与えた場合、電位依存性 L 型 Ca^{2+} チャネルおよび他の機械的刺激感受性チャネルの活性化を介して、細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇が誘発されることが明らかとなっている。一方、マウス骨芽細胞では、 5 dyn/cm^2 の流速で十分に TRPV 4 を活性化することも明らかになっている。マウス骨芽細胞では、細胞周囲にクッションとして機能して機械的負荷を弱める細胞外マトリックスが存在するため、血管内皮細胞に対するずり応力と比較して、骨芽細胞に対する実際のずり応力は低くなっている可能性がある。これらの生理学的な視点で考えると、本研究において

MC3T3-E1 に適用された機械的刺激 (17.3 dyn/cm^2) は比較的高いと考えられ、細胞膜上で機能的に働いている機械的刺激受容チャネルを決定するのに十分であると考えられる。最近、骨形成の促進に PIEZO 1 が必要不可欠であると報告されたが、骨芽細胞で PIEZO 1 がどのように活性化されるかを理解するためにはさらなる検討が必要である。

また、これまでに軟骨細胞の機械的刺激受容機構に TRPV 4 が直接関与していることや、TRPV 4 ノックダウンが機械刺激誘発マトリックス産生促進を有意に抑制することが報告されている。さらにヒト TRPV 4 遺伝子の変異は関節機能障害を引き起こすことも示されている。一方骨芽細胞において、細胞分化は TRPV 4 の発現を誘導し、これは機械的刺激による細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇にとって極めて重要であることが報告されている。

本研究において、TRPV 4 アゴニスト GSK1016790A(GSK)およびアンタゴニスト HC-067047(HC)、ならびに siTrpv 4 を処置した TRPV 4 ノックダウン細胞を用いた実験で、MC3T3-E1 における TRPV 4 の機能的発現を明らかにした。さらに、MC3T3-E1 における流体刺激によるずり応力に対する反応は、HC 存在下および siTrpv 4 処置 TRPV 4 ノックダウン細胞において有意に減少した。これらの結果は、TRPV 4 が MC3T3-E1 の機械的刺激受容に寄与することを強く示唆している。これらの結果と同様に、マウス骨芽細胞における TRPV 4 のノックダウンは、ずり応力による細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を抑制することが示されている。しかしながら、TRPV 4 ノックアウトマウスにおいて流体刺激による一過性細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇が観察されており、この結果は骨芽細胞において TRPV 4 以外の機械的刺激感受性チャネルが流体刺激によって活性化することを示している。

3) Yoda 1 による TRPV 4 依存性細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇について

本研究では、MC3T3-E1 において HC 添加により機械的刺激が有意に抑制された。また TRPV 4 をノックダウンした MC3T3-E1 においては機械的刺激を与えても細胞内 Ca^{2+} 濃度は上昇しなかった。また、Yoda 1 は PIEZO 1 の活性化を介して TRPV 4 依存性反応を誘発しており、Yoda 1 誘発細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇には TRPV 4 依存性成分が含まれることが明らかとなった。本実験において、MC3T3-E1 は PIEZO 1 および TRPV 4 を介した機械的刺激誘発細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇が認められた。実際マウスの骨芽細胞では、機械的刺激による PIEZO 1 の活性化により、アルカリホスファターゼ、オステオカルシン、およびコラーゲン I の発現が増強され、また低張圧刺激による TRPV 4 活性化は RANKL や NFATc 1 などの骨リモデリング因子の発現を促進する。一方、マウスの骨芽細胞では、機械的刺激と細胞分化がそれぞれ PIEZO 1 と TRPV 4 の発現を促進することが示されている。

4) PIEZO 1 および TRPV 4 の活性化による細胞増殖への影響

これまでにカチオンチャネルの活性化は、チャネルの種類および、または細胞種に応じて、細胞増殖に影響を及ぼすことが示されている。また、鈴木らは PIEZO 1 をノックダウンするとヒト滑膜肉腫細胞株 SW982 の細胞増殖は抑制されるが、Yoda 1 による PIEZO 1 の活性化は細胞増殖に影響を及ぼさないことを報告している。対照的に、TRPV 4 活性化は、ヒト脳毛細血管内皮細胞における細胞増殖を増強することも報告している。その他にも、PIEZO1 は MC3T3-E1 を含む骨芽細胞分化の初期段階において重要な役割を担っていること、PIEZO 1 依存性 ERK1/2 および p38MAPK シグナル伝達は、骨芽細胞における BMP 2 発現の誘導を介して分化を促進することも明らかとなっている。本研究において、Yoda1 による PIEZO 1 活性化は MC3T3-E1 の細胞増殖を阻害した。本

研究では、PIEZO 1 が MC3T3-E1 における機械的刺激誘発性応答に関与していなかったため、この Yoda 1 依存的な細胞増殖の減少が生理学的な反応であるかどうかは明らかではない。それにもかかわらず、PIEZO 1 のノックダウンは Yoda 1 を作用させなくても細胞増殖を 50%まで減少させるため、これは PIEZO 1 自体が細胞増殖にとって重要であることを強く示唆している。同様に、高濃度の GSK を MC3T3-E1 に作用した場合、TRPV 4 活性化は細胞増殖を抑制した。HC 添加および TRPV 4 のノックダウンにより GSK の作用が抑制されたことから MC3T3-E1 の細胞増殖において TRPV 4 が重要であることが考えられる。したがって、TRPV 4 の機械的刺激誘発活性は骨芽細胞増殖を減少させる可能性がある。しかし、PIEZO 1 と同様に、TRPV 4 のノックダウンは細胞増殖を 60%に減少させたため、TRPV 4 が MC3T3-E1 の細胞増殖にどのような役割を果たしているかは不明である。また、MC3T3-E1 において TRPV 4 をノックダウンすることにより PIEZO 1 の機能が抑制されることも明らかとなった。本研究では、PIEZO 1 および TRPV 4 が細胞増殖にどのように関与するのか、その分子メカニズムを解明することはできなかった。今後は、骨芽細胞における PIEZO 1 および TRPV 4 依存性細胞増殖に関与するメカニズムをさらに検討する必要がある。

V. ま と め

本研究では、PIEZO 1 および TRPV 4 に対する薬理学的アゴニストおよびアンタゴニスト、ならびに siRNA を用いることによって、MC3T3-E1 における PIEZO 1 および TRPV 4 の機能的役割について詳細に検討することを目的として行った。

1) MC3T3-E1 における PIEZO 1 の機械的刺激受容機構と刺激法

MC3T3-E1 には機械的刺激受容チャネルである PIEZO 1 が発現していたが、本実験で行ったずり

応力による機械的刺激では PIEZO1 は機能しなかった。

2) MC3T3-E1 における TRPV 4 の機械的刺激受容機構について

MC3T3-E1 には機械的刺激受容チャネルである TRPV 4 が機能発現しており、流体刺激によるずり応力を伴う機械的刺激は TRPV 4 が受容していることが明らかとなった。

3) Yoda 1 による TRPV 4 依存性細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇について

PIEZO 1 および TRPV 4 が高発現すると Yoda 1 は PIEZO 1 の活性化を介して TRPV4 依存性細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を誘導していた。

4) PIEZO 1 および TRPV 4 の活性化による細胞増殖への影響

MC3T3-E1 において PIEZO 1 と TRPV 4 の活性化は細胞増殖を減少させるため、PIEZO 1 と TRPV 4 は骨芽細胞における細胞増殖の調節因子であることが考えられた。