

平成14年度厚生科学研究費補助金
(効果的医療技術の確立推進臨床研究事業)

総括及び分担研究報告書

骨細胞再生を基礎とする骨及び関節治療薬の開発研究

(課題番号 H13-痴呆・骨折-014)

平成15年4月

主任研究者 米田幸雄

(金沢大学大学院 自然科学研究科)

厚生労働科学研究費補助金(効果的医療技術の確立推進臨床研究事業)
総括研究報告書

研究課題「骨細胞再生を基礎とする骨及び関節治療薬の開発研究」

主任研究者 米田 幸雄 金沢大学大学院 自然科学研究科教授

研究要旨 我々は前年度、骨芽細胞において機能的な N-methyl-D-aspartate (NMDA) レセプターが存在することを報告した。しかしながら、我々を含め骨組織における glutamate (Glu) シグナリング機構解明に関する研究はリモデリング機構を担う骨芽細胞および破骨細胞を中心に行われており、軟骨組織における研究は世界的にも皆無である。したがって、本年度は、肋軟骨由来初代培養軟骨細胞における Glu シグナリング関連分子の機能的発現の可能性について検討した。RT-PCR 法により軟骨細胞において特定の Glu レセプターと Glu トランスポーターの発現が認められた。さらに培養細胞を高濃度 Glu で刺激すると、濃度依存的に細胞生存率の低下が認められ、さらに軟骨細胞成長マーカーであるアルシアンブルー染色性とアルカリフォスファターゼ活性の低下がともに観察された。

分担研究者

中村洋一

大阪府立大学 教授

谷浦秀夫

金沢大学 助教授

荻田喜代一

摂南大学 助教授

山下克美

金沢大学 助教授

倉本展行

金沢大学 助手

A 研究目的

我々はこれまでに頭蓋骨由来初代培養骨芽細胞に、Runx2/PEBPalphaA/CBFA1/AML3 を介した細胞分化過程に特異的に関与する機能的 N-methyl-D-aspartate (NMDA) レセプターが存在するを見出した。さらに破骨細胞においても NMDA レセプターによる骨吸収調節機構が存在する事が明らかとなっている。また、我々は NMDA レセプター以外にも、内在性 Glu 遊離を調節する AMPA レセプターが頭蓋骨由来培養骨芽細胞に発現する事を見出しており、骨組織において Glu は細胞間シグナル伝達に使用される内因性

のパラクラインあるいはオートクライン因子の1つである可能性を提唱している。このように近年、骨組織におけるGluシグナリングの解析は*in vitro* および *in vivo* 両面から進められてきているが、何れもリモテリック機構を担う骨芽細胞および破骨細胞に関する研究が主であり、軟骨細胞における研究は世界的にも皆無である。したがって本研究では、軟骨組織におけるGluシグナル

伝達機構を解明し、内軟骨性骨形成機構をはじめとした軟骨および骨格形成へのGluの生理的役割の追求、並びに変形性関節症を始めとした軟骨疾患に対する新規治療法の開発研究を目的とし、まず初代培養軟骨細胞におけるGluレセプター(GluR)、GluトランスポーターなどのGluシグナリング関連分子の発現とその機能解析を行った。

Ionotropic glutamate receptors

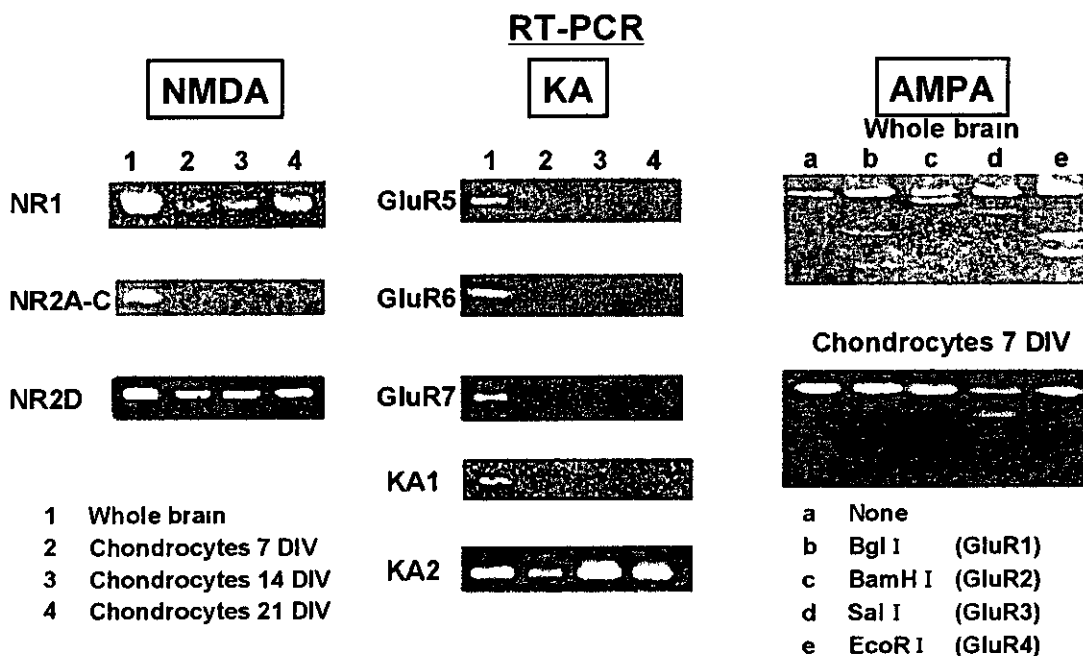


Fig. 1 Expression of mRNAs for iGluR in rat brain and cultured chondrocytes mRNAs were extracted from rat whole brain and chondrocytes cultured for 7 and 21 DIV, followed by RT-PCR using specific primers for each subunit The experiments were repeated at least three times using different animals with similar results

B 研究方法

Wistar系雌性ラットより肋軟骨を摘出し、酵素処理法により軟骨細胞を調製した。この軟骨細胞を、10%牛胎児血清を含むDMEM中で6~7日間培養したのち、50 µg/mL ascorbic acid含有DMEM中でさらに細胞を培養した。一定期間経過後に、イオノトロピック型GluR (iGluR)、メタボトロピック型GluR (mGluR)およびGluトランスポーターのmRNA発現を、それぞれ特異的に認識するプライマーを用いたRT-PCR法により検討した。また、各日数培養後の軟

骨細胞について、100 µMから1 mMまでの各濃度Glu添加条件下における細胞生存率の測定と形態学的観察、およびアルシアンブルー染色、アルカリフォスファターゼ活性などの各種軟骨成長マーカー測定を行った。

また、取り扱う実験動物に関しては、日本薬理学会実験動物倫理規定を順守するとともに、金沢大学動物実験施設において独自に制定された金沢大学宝町地区動物実験指針に則り実験計画を策定した。

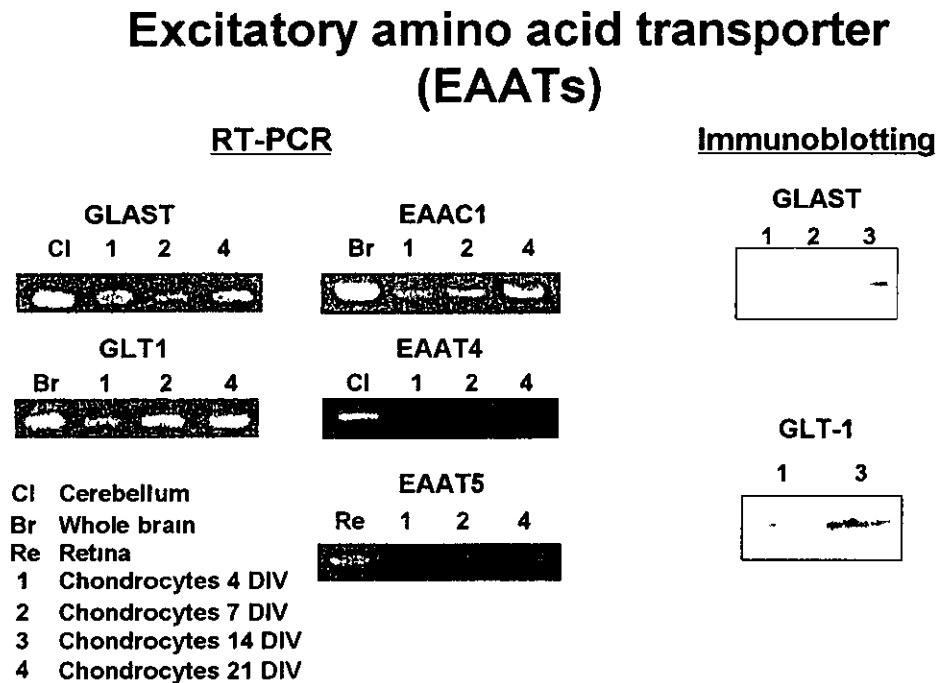


Fig. 2 Expression of Glu transporter in rat costal chondrocytes Chondrocytes cultured for 4, 7 and 21 DIV were subjected to determination of expression of Glu transporters by RT-PCR and immunoblotting Typical pictures are shown in this figure with similar results in three independent determinations

C 研究結果

培養開始後 21 日目までは、アルシアンブルー染色性、アルカリホスファターゼ活性および type II collagen 発現は、いずれも培養日数の経過とともに著明に上昇した。細胞調製後 7 日および 21 日間培養した軟骨細胞において、iGluR では NR1、NR2D、GluR3 および KA2 各サブユニット mRNA 発現が確認された (Fig 1)。さらに、mGluR ではグループ I、II、III 型の各サブタイプ

のうち、mGluR1、mGluR2、mGluR4、mGluR5、mGluR6、mGluR8 の各 mRNA 発現が、ともに軟骨細胞の成熟度にかかわらず認められた。一方、7、14 および 21 日間培養した軟骨細胞において、Glu トランスポーターサブタイプの中でも、GLAST、GLT-1、および EAAC1 の mRNA 発現が確認されたが、EAAT4、および EAAT 5 の発現は観察されなかった (Fig 2)。これらの軟骨細胞においては、著

Chondrocytic markers

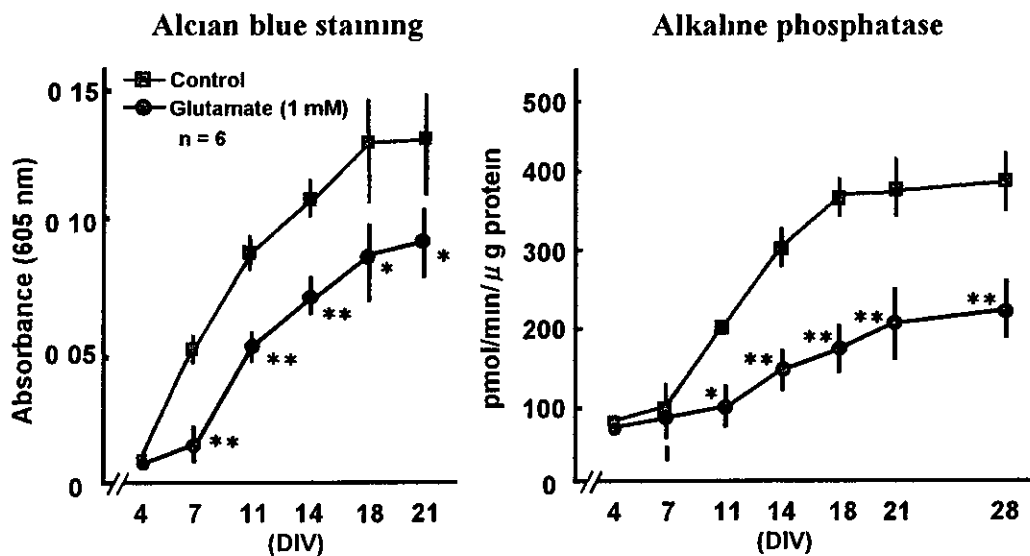


Fig 3 Alcian blue staining and alkaline phosphatase activity in chondrocytes cultured with Glu. Chondrocytes were cultured in DMEM in either the presence or absence of Glu at 1 mM for 28 DIV, followed by determination of the activity of alcian blue staining and alkaline phosphatase. Values represent the mean \pm SE obtained from six different experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, significantly different from each control value obtained in the absence of Glu.

明な³H]Glu 取り込み活性が検出されたか、この取り込み活性は温度依存性および Na⁺依存性を示しただけでなく、各種 Glu トランスポーター阻害剤添加により濃度依存的に阻害された。Glu 添加条件下で細胞を培養すると、300 μM から 1 mM までの濃度範囲で Glu 濃度依存的に細胞生存率が減少し、さらに、形態学的観察やアルシアンブルー染色性、あるいは ALP 活性測定においても、Glu 添加による軟骨細胞の成長活性阻害が観察された(Fig 3)。

D 考察

以上のように Glu トランスポーター、iGluR および mGluR など中枢神経系における Glu シグナリングに必要な分子機構を軟骨組織は持ち合わせているものと思われる。したがって、Glu は中枢神経系においては興奮性神経伝達物質として、さらには骨組織においては Glu 作動性神経由来に加えオートクラインあるいはパラクライン因子として、生体内のホメオスタシスの維持機構に二重の役割を果たしているものと思われる。

今後は軟骨細胞における GluR の生理的意義を解明することが第一の目標であり、骨芽細胞だけでなく破骨細胞あるいは骨細胞における Glu の生理的機能的意義についても早急に検討していく必要があるであろう。

E 結論

- 1 初代培養軟骨細胞において特定の iGluR および mGluR の mRNA 発現が認められた。
- 2 初代培養軟骨細胞において特定の Glu

トランスポーターの mRNA 発現が認められ、さらに GLAST および GLT-1 に関してはたんぱく質レベルにおいても認められた。

3 初代培養軟骨細胞において温度依存性、Na⁺依存性を示す³H]Glu 取り込み活性が検出された。

4 高濃度 Glu 添加により細胞生存率の減少が引き起こされ、さらに軟骨細胞成長マーカーであるアルシアンブルー染色性、およびアルカリフォスファターゼ活性の阻害が観察された。

5 以上の結果から、ラット肋軟骨由来初代培養軟骨細胞には特定の Glu のシグナリング関連分子が発現しており、未成熟な段階において、Glu が成長阻害活性を発揮する可能性が示唆される。

F 研究発表

1 論文発表

- 1 Naoto Hoshi, Jia-Sheng Zhang, Miho Omaki, Takahiro Takeuchi, Shigeru Yokoyama, Nicolas Wanaverbecq, Lorene K Langeberg, Yukio Yoneda, John D Scott, David A Brown and Haruhiro Higashida (2003) AKAP150 signaling complex promotes suppression of the M-current by muscarinic agonists *Nature Neurosci* in press
- 2 Kiyokazu Ogita, Hiroaki Okuda, Yasuhiro Yamamoto, Noriko Nishiyama and Yukio Yoneda (2003) In vivo neuroprotective role of NMDA receptors against kainate induced excitotoxicity in murine hippocampal pyramidal neurons *J Neurochem* in press
- 3 Masanori Yoneyama Tomoya Kitayama Hideo Taniura and Yukio Yoneda (2003) Immersion fixation with Carnoy solution for conventional immunohistochemical detection of particular N methyl D-aspartate receptor subunits in murine hippocampus *J Neurosci Res* in press

- 4 Nobuyuki Kuramoto, Keiko Gion, Noriko Sanada and Yukio Yoneda (2003) Xenobiotic response element binding protein expressed in rat brain *Recent Dev Biophys Biochem* in press
- 5 Nobuyuki Kuramoto, Katsuhiko Baba, Keiko Gion, Chie Sugiyama, Hideo Taniura and Yukio Yoneda (2003) Xenobiotic response element binding enriched in both nuclear and microsomal fractions of rat cerebellum *J Neurochem* 85, 264-273
- 6 Nobuyuki Kuramoto, Keiji Inoue, Keiko Gion, Katsura Takano, Katsumi Sakata, Kiyokazu Ogita and Yukio Yoneda (2003) Modulation of DNA binding of nuclear transcription factors with leucine zipper motifs by particular endogenous polyamines in murine central and peripheral tissues *Brain Res* 967, 170-180
- 7 Koji Murakami, Yoichi Nakamura and Yukio Yoneda (2003) Potentiation by ATP of lipopolysaccharide stimulated nitric oxide production in cultured astrocytes *Neuroscience* 117 37-42
- 8 Yoichi Nakamura Miho Ohmaki, Koji Murakami and Yukio Yoneda (2003) Involvement of protein kinase C in glutamate release from cultured microglia *Brain Res* 962, 122-128
- 9 Tomoya Kitayama, Masanori Yoneyama and Yukio Yoneda (2003) Possible regulation by N methyl D aspartate receptors of proliferative progenitor cells expressed in adult mouse hippocampal dentate gyrus *J Neurochem* 84 767-780
- 10 Nobuyuki Kuramoto, Emi Goto, Yukito Masamune, Keiko Gion and Yukio Yoneda (2002) Existence of xenobiotic response element binding in *Dictyostelium* *Biochim Biophys Acta* 1578 1-11
- 11 Noritaka Nakamichi, Hiroshi Ohno, Yoichi Nakamura Takao Hirai, Nobuyuki Kuramoto and Yukio Yoneda (2002) Blockade by ferrous iron of Ca²⁺ influx through N methyl D aspartate receptor channels in immature cultured rat cortical neurons *J Neurochem* 83, 1-11
- 12 Eunchi Hinoi Sayumi Fujimori, Masanori Yoneyama and Yukio Yoneda (2002) Blocked by N methyl D aspartate of elevation of activator protein-1 binding after stress in rat adrenals *J Neurosci Res* 70, 161-171
- 13 Eunchi Hinoi, Sayumi Fujimori, Takeshi Takarada, Hideo Taniura and Yukio Yoneda (2002) Facilitation of glutamate release by ionotropic glutamate receptors in osteoblasts *Biochem Biophys Res Commun* 297, 452-458
- 14 Ken-ichi Ohtani, Hiroyasu Tanaka, Yukio Yoneda Hirokazu Yasuda, Akira Ito, Ryu Nagata and Mitsutaka Nakamura (2002) In vitro and in vivo antagonistic activities of SM 31900 for the NMDA receptor glycine binding site *Brain Res* 944, 165-173
- 15 Eunchi Hinoi, Sayumi Fujimori, Akihiro Takemori, Hiroaki Kurabayashi, Yoichi Nakamura and Yukio Yoneda (2002) Demonstration of expression of mRNA for particular AMPA and kainate receptor subunits in immature and mature cultured rat calvarial osteoblasts *Brain Res* 943, 112-116
- 16 Eunchi Hinoi, Sayumi Fujimori, Akihiro Takemori and Yukio Yoneda (2002) Cell death by pyruvate deficiency in proliferative cultured calvarial osteoblasts *Biochem Biophys Res Commun* 294, 1177-1183
- 17 Sayumi Fujimori, Eunchi Hinoi and Yukio Yoneda (2002) Functional GABAB receptors expressed in cultured calvarial osteoblasts *Biochem Biophys Res Commun* 293, 1445-1452
- 18 Kiyokazu Ogita, Hiroaki Okuda Masahiro Kitano, Kiyokazu Ozaki and Yukio Yoneda (2002) Expression of activator protein 1 complex with DNA binding activity in mitochondria of murine brain following in vivo treatment with kainate *J Neurosci* 22 2561-2570
- 19 Eunchi Hinoi Sayumi Fujimori Yoichi Nakamura Vladimir J Balcar Keita

- Kubo, Kiyokazu Ogita and Yukio Yoneda (2002) Constitutive expression of heterologous N methyl D aspartate receptor subunits in rat adrenal medulla *J Neurosci Res* 68, 36 45
- 20 Takao Hirai, Noritaka Nakamichi and Yukio Yoneda (2002) Activator protein 1 complex expressed by magnetism in cultured rat hippocampal neurons *Biochem Biophys Res Comm* 292, 200 207
- 21 Takao Hirai, Nobuyuki Kuramoto, Hiroko Maruyama, Vladimir J Balcar, Yoichi Nakamura and Yukio Yoneda (2002) Potentiation of nuclear activator protein-1 DNA binding following brief exposure to N-methyl-D aspartate in immature cultured rat hippocampal neurons *J Neurosci Res* 67, 523 532
- 22 Noritaka Namamichi, Takayuki Manabe and Yukio Yoneda (2002) Nuclear degradation of particular Fos family members expressed following injections of NMDA and kainate in murine hippocampus *Neurochem Res* 27, 131 138
- 23 Akiko Takamoto Louise B Quiggin, Inna Lieb, Evan Shave, Vladimir J Balcar and Yukio Yoneda(2002) Differences between D and L aspartate binding to the Na⁺-dependent binding sites on glutamate transporters in frozen sections of rat brain *Life Sci* 70, 991 1001
- 24 Noritaka Namamichi, Hiroshi Ohno, Nobuyuki Kuramoto and Yukio Yoneda (2002) Dual mechanisms of Ca²⁺ increases elicited by N-methyl-D-aspartate in immature and mature cultured cortical neurons *J Neurosci Res* 67 275 283
- 2 学会発表
- 1 奥田洋明、小井田雅夫、米田幸雄、萩田喜代一(2003)NMDA 受容体活性化に伴うカイン酸誘発性神経細胞死の抑制 第 123 年会日本薬学会、長崎、3 月 27 日
- 2 井上真希、檜井栄一、高野 桂、杉山千絵、米田幸雄(2003)過酸化水素による神経細胞死 第 123 年会日本薬学会、長崎、3 月 27 日
- 3 藤波義明、小井田雅夫、米田幸雄、萩田喜代一(2003)マウス脳内 Fos/Jun ファミリー蛋白質のミトコンドリア遺伝子への結合 第 123 年会日本薬学会、長崎、3 月 27 日
- 4 米山雅紀、北山友也、米田幸雄(2003)カイン酸投与に伴うNMDA レセプターの海馬内分布変化 第 123 年会日本薬学会、長崎、3 月 27 日
- 5 杉山千絵、谷浦秀夫、米田幸雄(2003)ラット初代培養神経細胞における代謝型グルタミン酸レセプター活性化の影響 第 123 年会日本薬学会、長崎、3 月 27 日
- 6 北山友也、米山雅紀、米田幸雄(2003)成熟マウス海馬由来神経系前駆細胞の分化態に対するNMDA シグナルの調整 第 76 回日本薬理学会年会 第 80 回日本生理学会大会、福岡、3 月 25 日
- 7 井上真希、檜井栄一、高野 桂、杉山千絵、米田幸雄(2003)過酸化水素による神経細胞死 第 76 回日本薬理学会年会 第 80 回日本生理学会大会、福岡、3 月 25 日
- 8 中村洋一、大巻深穂、村上浩司、米田幸雄(2003)培養ミクログリアからのグルタミン酸遊離におけるプロテインキナーゼ C の関与 第 76 回日本薬理学会年会 第 80 回日本生理学会大会、福岡、3 月 25 日
- 9 奥田洋明、西山徳人、小井田雅夫、米田幸雄、萩田喜代一(2003)マウス海馬歯状回におけるトリメチルスズ誘発性神経細胞障害後の神経再生の増強 第 76 回日本薬理学会年会 第 80 回日本生理学会大会、福岡、3 月 25 日
- 10 藤波義明、久保雅喜、小井田雅夫、米田幸雄、萩田喜代一(2003)マウス海馬におけるグルタメイトシグナルによる antioxidant-response element の活性化 第 76 回日本薬理学会年会 第 80 回日本生理学会大会、福岡、3 月 25 日
- 11 米山雅紀、北山友也、米田幸雄(2003)マウス海馬内 NMDA レセプターサブユニットの免疫組織化学的検出 第 76 回日本薬理学会年会 第 80 回日本生理学会大会、福岡、3 月 26 日

- 12 王 麗楊、竹森章浩、檜井栄一、米田幸雄 (2003)ラット肋軟骨由来培養軟骨細胞における機能的グルタミン酸レセプターサブタイプの発現 第 76 回日本薬理学会年会 第 80 回日本生理学会大会、福岡、3 月 26 日
- 13 藤波義明、小井田雅夫、米田幸雄、荻田喜代一(2003)マウス脳内 Fos/Jun ファミリー蛋白質のミトコンドリア結合 日本薬学会第 123 年会、長崎、3 月 27 日
- 14 奥田洋明、小井田雅夫、米田幸雄、荻田喜代一(2003)NMDA受容体活性化に伴うカイン酸誘発性神経細胞死の抑制 日本薬学会第 123 年会、長崎、3 月 27 日
- 15 藤波義明、久保雅喜、小井田雅夫、米田幸雄、荻田喜代一(2003)マウス海馬におけるグルタメイトシグナルによる antioxidant-response element の活性化 第 76 回日本薬理学会総会、福岡、3 月 25 日
- 16 奥田洋明、西山徳人、小井田雅夫、米田幸雄、荻田喜代一(2003)マウス海馬歯状回におけるトリメチルスズ誘発性神経細胞障害後の神経再生の増強 第 76 回日本薬理学会総会、福岡、3 月 25 日
- 17 藤波義明、荻田喜代一、米田幸雄(2002)転写因子 activator protein-1 のミトコンドリア遺伝子への結合 第 2 回ミトコンドリア研究会年会、東京、12 月 20 日
- 18 荻田喜代一、米田幸雄(2002)転写因子 activator protein-1 のカイン酸によるミトコンドリア移行 第 2 回ミトコンドリア研究会年会、東京、12 月 19 日
- 19 祇園景子、倉本展行、米田幸雄(2002)代謝型グルタミン酸受容体による細胞性粘菌の分化制御の可能性 第 25 回日本分子生物学会年会、横浜、12 月 14 日
- 20 倉本展行、祇園景子、眞田法子、谷浦秀夫、米田幸雄(2002)XRE 結合蛋白質のラット小脳ミクロソーム画分における局在性 第 25 回日本分子生物学会年会、横浜、12 月 13 日
- 21 奥田洋明、佐藤素子、小井田雅夫、米田幸雄、荻田喜代一 (2002) 神経細胞保護作用における NMDA レセプターの役割 第 102 回日本薬理学会近畿部会、岡山、11 月 15 日
- 22 北山友也、米山雅紀、米田幸雄 (2002)成熟マウス海馬由来神経前駆細胞における機能的 NMDA 受容体発現の可能性 第 102 回日本薬理学会近畿部会、岡山、11 月 15 日
- 23 祇園景子、倉本展行、米田幸雄 (2002) 細胞性粘菌における代謝型グルタミン酸受容体による分化制御の可能性 第 102 回日本薬理学会近畿部会、岡山、11 月 15 日
- 24 平居貴生、米田幸雄 (2002) 海馬由来培養神経細胞およびアストログリア細胞に対する持続的磁場曝露の影響 第 102 回日本薬理学会近畿部会、岡山、11 月 15 日
- 25 竹森章浩、檜井栄一、米田幸雄 (2002) 培養軟骨細胞におけるグルタミン酸の成長阻害活性 第 102 回日本薬理学会近畿部会、岡山、11 月 15 日
- 26 藤森さゆ美、檜井栄一、米田幸雄 (2002) 初代培養骨芽細胞における GABA 取り込み機構 第 102 回日本薬理学会近畿部会、岡山、11 月 15 日
- 27 谷浦秀夫、桑島孝明、吉川和明 (2002) Necdin 相同蛋白質 Dlxin-1 による E2F1 依存性ニューロン死の促進作用について 第 102 回日本薬理学会近畿部会、岡山、11 月 15 日
- 28 奥田洋明、佐藤素子、小井田雅夫、米田幸雄、荻田喜代一(2002)NMDA レセプターを介する神経保護作用。第 52 回日本薬学会近畿支部大会、大阪、10 月 19 日
- 29 北山友也、米山雅紀、米田幸雄 (2002) 培養神経前駆細胞の NMDA シグナル応答性 第 32 回日本神経精神薬理学会年会、群馬、10 月 18 日
- 30 杉山千絵、平居貴生、米田幸雄(2002) ラット大脳皮質由来初代培養神経細胞における代謝型グルタミン酸レセプター活性化の影響 第 32 回日本神経精神薬理学会年会、群馬、10 月 18 日
- 31 井上真希、中道範隆、倉本展行、谷浦秀夫、米田幸雄 (2002) 遊離二価鉄イオンによる NMDA 受容体チャネルの開閉制御 第 32 回日本神経精神薬理学会年会、群馬、10 月 18 日
- 32 米山雅紀、北山友也、米田幸雄 (2002) NMDA レセプターサブユニットの免疫組織化学的検出 第 32 回日本神経精神薬理学会年会、群馬、10 月 18 日
- 33 高本晃子、宝田剛志、米田幸雄 (2002) アスパラギン酸の光学異性体を識別するグルタミン酸トランスポーターの探索 第 32 回日本神経精神薬理学会年会、群馬、10 月 18 日

- 34 平居貴生、米田幸雄 (2002) 持続的定常磁場曝露の培養神経細胞への影響 第 32 回日本神経精神薬理学会年会、群馬、10 月 18 日
- 35 村上浩司、中村洋一、米田幸雄 (2002) 培養アストロサイトに対する ATP の効果 第 32 回日本神経精神薬理学会年会、群馬、10 月 18 日
- 36 高野桂、中村洋一、米田幸雄 (2002) ポリアミンによる培養ミクログリアの細胞死 第 32 回日本神経精神薬理学会年会、群馬、10 月 18 日
- 37 眞田法子、祇園景子、倉本展行、谷浦秀夫、米田幸雄(2002) ラット小脳マイクロソーム画分における XRE 結合蛋白質局在の可能性 第 32 回日本神経精神薬理学会年会、群馬、10 月 18 日
- 38 伊藤実、祇園景子、倉本展行、谷浦秀夫、米田幸雄 (2002) ラット小脳由来初代培養神経細胞の XRE 結合能に対する内因性 AhR リガンドの影響 第 32 回日本神経精神薬理学会年会、群馬、10 月 18 日
- 39 平居貴生、米田幸雄 (2002) 定常磁場による神経活動の制御 第 32 回日本神経精神薬理学会年会、群馬、10 月 17 日
- 40 西山徳人、佐藤素子、奥田洋明、小井田雅夫、米田幸雄、荻田喜代一 (2002) トリメチルスズ誘発性神経細胞障害に伴う転写因子 AP-1 の発現 第 75 回日本生化学大会、京都、10 月 17 日
- 41 倉本展行、祇園景子、馬場勝弘、米田幸雄 (2002) ラット小脳に存在する XRE コア配列結合蛋白質 第 75 回日本生化学大会、京都、10 月 17 日
- 42 藤波義明、北野雅大、小井田雅夫、米田幸雄、荻田喜代一 (2002) 転写因子 AP-1 のミトコンドリア遺伝子への結合 第 75 回日本生化学大会、京都、10 月 15 日
- 43 久保雅喜、小井田雅夫、米田幸雄、荻田喜代一 (2002) グルタメイトシグナルを介する海馬内 antioxidant response element 結合の増強 第 75 回日本生化学大会、京都、10 月 15 日
- 44 奥田洋明、西山徳人、小井田雅夫、米田幸雄、荻田喜代一 (2002) トリメチルスズ誘発性海馬歯状回障害の神経再生による修復 第 75 回日本生化学大会、京都、10 月 15 日
- 45 祇園景子、倉本展行、眞田法子、米田幸雄 (2002) 細胞性粘菌のグルタミン酸レセプターによる分化制御の可能性 第 75 回日本生化学大会、京都、10 月 15 日
- 46 遠藤厚子、中道範隆、塚本佐知子、米田幸雄、太田富久 (2002) 旨味物質トリコロミン酸の初代培養神経細胞に対する作用 日本生薬学会第 49 年会、福岡、9 月 5-6 日
- 47 竹森章浩、檜井栄一、藤森さゆ美、米田幸雄 (2002) ピルビン酸欠如により誘発される培養骨芽細胞死 第 20 回日本骨代謝学会、岡山、7 月 27 日
- 48 藤森さゆ美、檜井栄一、米田幸雄 (2002) 頭蓋骨由来初代培養骨芽細胞における代謝調節型 GABA レセプターの発現 第 20 回日本骨代謝学会、岡山、7 月 27 日
- 49 高野桂、中村洋一、米田幸雄 (2002) 低濃度ポリアミンによるミクログリアのアポトーシス誘導 第 45 回日本神経化学学会大会、札幌、7 月 18 日
- 50 藤波義明、北野雅大、米田幸雄、荻田喜代一 (2002) 転写因子 AP-1 のミトコンドリア遺伝子非翻訳領域への結合 第 45 回日本神経化学学会大会、札幌、7 月 18 日
- 51 平居貴生、米田幸雄 (2002) Effect of exposure to static magnetic field on AP-1 DNA binding in cultured rat hippocampal neurons 第 45 回日本神経化学学会大会、札幌、7 月 18 日
- 52 眞田法子、馬場勝弘、倉本展行、米田幸雄 (2002) Expression of XRE binding proteins in rat cerebellum 第 45 回日本神経化学学会大会、札幌、7 月 18 日
- 53 高崎理少、植月太一、谷浦秀夫、吉川和明 (2002) E2F1 に誘導されるニューロンの細胞死に対する Necdin の抑制作用 第 45 回日本神経化学学会大会、札幌、7 月 18 日
- 54 谷浦秀夫、福永典子、植月太一、吉川和明 (2002) Negative regulation of neural progenitor cell proliferation by necdin 第 45 回日本神経化学学会大会、札幌、7 月 18 日
- 55 北山友也、米山雅紀、米田幸雄 (2002) Neurospheres isolated from hippocampus of adult mice 第 45 回日本神経化学学会大会、札幌、7 月 17 日
- 56 藤森さゆ美、檜井栄一、米田幸雄 (2002) Functional expression of GABA_B receptors in

- cultured calvarial osteoblasts 第45回日本神経化学会大会、札幌、7月17日
- 57 宝田剛志、VJバルツァー、馬場勝弘、高本晃子、米田幸雄 (2002) Accumulation of [³H]L-serine in rat brain synaptosomal fractions 第45回日本神経化学会大会、札幌、7月17日
- 58 米田幸雄、檜井栄一、藤森さゆ美 (2002) Functional heteromeric NMDA receptors expressed in cultured rat calvarial osteoblasts 第45回日本神経化学会大会、札幌、7月17日
- 59 井上真希、檜井栄一、藤森さゆ美、竹森章浩、米田幸雄 (2002) Functional metabotropic glutamate receptor group III subtype expressed in primary cultures of rat calvarial osteoblasts 第45回日本神経化学会大会、札幌、7月17日
- 60 奥田洋明、西山徳人、山本泰弘、米田幸雄、荻田喜代一 (2002) トリメチルスズによるマウス歯状回顆粒細胞の一過性障害 第45回日本神経化学会大会、札幌、7月17日
- 61 桑島孝明、谷浦秀夫、吉川和明 (2002) Dixin-1, a necdin/MAGE homologous protein, enhances E21F1-induced neuronal apoptosis 第45回日本神経化学会大会、札幌、7月17日
- 62 Masanori Yoneyama, Tomoya Kitayama, Yoichi Nakamura and Yukio Yoneda (2002) Immunohistochemical detection of ionotropic glutamate receptor subunits in murine hippocampus XIVth World Congress of Pharmacology, San Francisco, USA, July 11
- 63 Nobuyuki Kuramoto, Noritaka Nakamichi and Yukio Yoneda (2002) Modulation by ferrous ions of opening of NMDA receptor channels in cultured rat cortical neurons XIVth World Congress of Pharmacology, San Francisco USA, July 11
- 64 Keiko Gion, Katsuhiko Baba, Nobuyuki Kuramoto and Yukio Yoneda (2002) Possible high expression of XRE binding proteins in rat cerebellum XIVth World Congress of Pharmacology, San Francisco, USA, July 10
- 65 Akihiro Takemori, Eiichi Hinoi, Yoichi Nakamura and Yukio Yoneda (2002) Glutamate transporters expressed in cultured rat costal chondrocytes XIVth World Congress of Pharmacology, San Francisco, USA, July 9
- 66 Yukio Yoneda, Eiichi Hinoi and Sayumi Fujimori (2002) NMDA receptors expressed in cultured rat calvarial osteoblasts XIVth World Congress of Pharmacology, San Francisco, USA, July 9
- 67 Koji Murakami, Yoichi Nakamura and Yukio Yoneda (2002) ATP Modulation of LPS-induced NO production in Cultured Astrocyte and Microglia XIVth World Congress of Pharmacology, San Francisco, USA July 9
- 68 Hiroaki Okuda, Motoko Sato, Masao Koida Yukio Yoneda and Kiyokazu Ogita (2002) Neuroprotection of hippocampal cells against kainate-induced excitotoxicity by in vivo treatment with NMDA XIVth World Congress of Pharmacology, San Francisco, USA, July 9
- 69 Kiyokazu Ogita, Yoshiaki Fujinami, Naoko Iwamoto, Fumiaki Ito, Masao Koida and Yukio Yoneda (2002) Kainate signals modulate expression of high-molecular-weight heat shock proteins in murine brain XIVth World Congress of Pharmacology, San Francisco, USA, July 9
- 70 Yoshiaki Fujinami, Masahiro Kitano, Hiroaki Okuda, Masao Koida, Yukio Yoneda and Kiyokazu Ogita (2002) Localization of transcription factor AP-1 in mitochondria of hippocampal neurons through activation of kainate signals XIVth World Congress of Pharmacology, San Francisco, USA, July 9
- 71 竹森章浩、檜井栄一、米田幸雄 (2002) 初代培養軟骨細胞におけるグルタミン酸取り込み 第101回日本薬理学会近畿部会、大阪、6月21日
- 72 藤皮義明、北野雅大、小井田雅夫、米田幸雄、荻田喜代一 (2002) グルタメイトシグナルを介する転写因子 AP-1 のミトコンドリア遺伝子への結合 第101回日本薬理学会近畿部会、大阪、6月21日
- 73 平居貴生、米田幸雄 (2002) 初代培養海馬神経細胞における持続的磁場曝露の影響 第101回日本薬理学会近畿部会、大阪、6月21日

- 74 奥田洋明、西山徳人、小井田雅夫、米田幸雄、荻田喜代一 (2002) トリメチルスズによる歯状回顆粒細胞障害の可逆性 第 101 回日本薬理学会近畿部会、大阪、6 月 21 日
- 75 高野桂、中村洋一、米田幸雄 (2002) ポリアミンによる培養マイクログリアの細胞死誘導 第 101 回日本薬理学会近畿部会、大阪、6 月 21 日
- 76 倉本展行、祇園景子、眞田法子、米田幸雄 (2002) 各種酵素阻害剤添加に伴う細胞性粘菌の分化能変化 第 101 回日本薬理学会近畿部会、大阪、6 月 21 日
- 77 祇園景子、倉本展行、米田幸雄 (2002) 細胞性粘菌の XRE 結合能と細胞分化制御の関連性 第 101 回日本薬理学会近畿部会、大阪、6 月 21 日
- 78 Nobuyuki Kuramoto, Katsuhiko Baba, Keiko Gion and Yukio Yoneda (2002) Xenobiotic responsive element binding in rat brain X International Congress of the Czech and Slovak Neurochemical Society, Casta, Slovakia, June 1-5
- 79 Jan Platenik, Vladimir J Balcar, Nobuyuki Kuramoto Keita Kubo and Yukio Yoneda (2002) Abundance of SER133-Phosphorylated cyclic AMP response element binding protein in the mitochondria-enriched subcellular fractions from rat cerebral cortex X International Congress of the Czech and Slovak Neurochemical Society, Casta, Slovakia June 1-5
- 80 Chie Sugiyama Vladimir J Balcar and Yukio Yoneda (2002) Signaling to nuclear transcription factors through metabotropic glutamate receptors in cultured cortical neurons X International Congress of the Czech and Slovak Neurochemical Society, Casta, Slovakia, June 1-5
- 81 Yukio Yoneda and Eiichi Hinoi (2002) Glutamate receptors expressed in particular peripheral tissues X International Congress of the Czech and Slovak Neurochemical Society, Casta, Slovakia, June 1-5
- 82 Masanori Yoneyama Tomoya Kitayama and Yukio Yoneda (2002) Distribution profiles of particular ionotropic glutamate receptor subunits in murine hippocampus X International Congress of the Czech and Slovak Neurochemical Society, Casta, Slovakia June 1-5
- 83 倉本展行、後藤恵美、正宗行人 (2002) 細胞性粘菌の核内受容体による細胞分化制御の可能性 第 122 回日本薬学会年会、千葉、3 月 28 日
- 84 五十嵐元、山下千佳子、倉本展行、正宗行人 (2002) 細胞性粘菌の機能蛋白質の脱リン酸化に伴う細胞密度制御の可能性 第 122 回日本薬学会年会、千葉、3 月 28 日
- 85 尾田千春、倉本展行、五十嵐元、山下千佳子、Issaeva Marina、正宗行人 (2001) 細胞性粘菌における多細胞体形成時の新規細胞密度制御遺伝子の解析 第 122 回日本薬学会年会、千葉、3 月 28 日
- 86 田淵克則、倉本展行、五十嵐元、尾田千春、Issaeva Marina、正宗行人 (2002) 細胞性粘菌の分泌性蛋白質がになう細胞分化制御機構の解明 第 122 回日本薬学会年会、千葉、3 月 28 日
- 87 藤波義明、伊藤文昭、小井田雅夫、米田幸雄、荻田喜代一 (2002) グルタミン酸シグナルを介する高分子熱ショック蛋白の発現変化 日本薬学会第 122 年会、千葉、3 月 27 日
- 88 荻田喜代一、奥田洋明、北野雄大、尾崎清和、小井田雅夫、米田幸雄 (2002) グルタミン酸シグナルを介した転写因子 AP-1 のミトコンドリア移行 日本薬学会第 122 年会、千葉、3 月 27 日
- 89 高野桂、中村洋一、米田幸雄 (2002) ポリアミンによる培養マイクログリアの細胞機能抑制 日本薬学会第 122 年会、千葉、3 月 27 日
- 90 奥田洋明、山本泰弘、小井田雅夫、米田幸雄、荻田喜代一 (2002) トリメチルスズによるマウス海馬歯状回顆粒細胞障害 日本薬学会第 122 年会、千葉、3 月 27 日
- 91 竹森章浩、檜井栄一、藤森さゆ美、倉林広明、中村洋一、米田幸雄 (2002) ビルビン酸の初代培養骨芽細胞死に対する防御作用 日本薬学会第 122 年会、千葉、3 月 27 日
- 92 中道範隆、大野博司、中村洋一、米田幸雄 (2002) 遊離 Fe^{2+} の NMDA 受容体チャネル開口調節作用 日本薬学会第 122 年会、千葉、3 月 26 日

- 93 藤森さゆ美、檜井栄一、中村洋一、米田幸雄 (2002)培養骨芽細胞における機能的 GABA B受容体の発現 日本薬学会第 122 年会、千葉、3 月 26 日
- 94 杉山千絵、高本晃子、VJバルツァー、中村洋一、米田幸雄 (2002)ラット大脳皮質培養神経細胞における各種グルタメイトレセプター活性化に伴う AP1 DNA 結合の変動 日本薬学会第 122 年会、千葉、3 月 26 日
- 95 米山雅紀、北山友也、中村洋一、米田幸雄 (2002)マウス脳海馬内イオトロピック型グルタメイトレセプターサブユニットの免疫組織化学的検出 日本薬学会第 122 年会、千葉、3 月 26 日
- 96 村上浩司、大巻深穂、中村洋一、米田幸雄 (2002)ミクログリアからの NO およびグルタミン酸放出の ATP による抑制 日本薬学会第 122 年会、千葉、3 月 26 日
- 97 荒町勝英、中村洋一、米田幸雄 (2002)培養アストロサイトにおけるポリアミンの輸送活性 日本薬学会第 122 年会、千葉、3 月 26 日
- 98 宝田剛志、高本晃子、馬場勝弘、米田幸雄 (2002)ラット脳シナプトゾーム画分における [3H]L-Serine の取込み活性 日本薬学会第 122 年会、千葉、3 月 26 日
- 99 高本晃子、VJバルツァー、米田幸雄 (2002)小脳に発現するグルタミン酸トランスポーターの機能 日本薬学会第 122 年会、千葉、3 月 26 日
- 100 馬場勝弘、米田幸雄、中村洋一 (2002)ラット小脳におけるXRE結合蛋白質の解析 第 75 回日本薬理学会年会、熊本、3 月 15 日
- 101 奥田洋明、北野雄大、小井田雅夫、米田幸雄、荻田喜代一 (2002) カイニン酸処理による海馬ミトコンドリアcAMP-responsive element 結合の増強 第 75 回日本薬理学会年会、熊本、3 月 14 日
- 102 檜井栄一、藤森さゆ美、中村洋一、米田幸雄 (2002)初代培養骨芽細胞におけるグループ IIIメタボトロピック型グルタメイトレセプターの機能的発現 第 75 回日本薬理学会年会、熊本、3 月 14 日
- 103 北山友也、米山雅紀、中村洋一、米田幸雄 (2002)成熟マウス中枢神経系増殖細胞に対するNMDA投与の影響 第 75 回日本薬理学会年会、熊本、3 月 14 日
- 104 中道範隆、大野博司、中村洋一、米田幸雄 (2002)NMDA受容体を介する細胞内遊離Ca²⁺維持機構のインビトロ加齢に伴う変化 第 75 回日本薬理学会年会、熊本、3 月 14 日
- 105 倉本展行、後藤恵美、米田幸雄、正宗行人 (2002)細胞性粘菌に存在する核内受容体による細胞分化制御の可能性 第 4 回粘菌研究会、東京、3 月 7-8 日
- 106 倉本展行、五十嵐元、尾田千春、正宗行人 (2002)細胞膜上に存在するリン酸化蛋白質による細胞性粘菌の集合体細胞密度制御の可能性 第 4 回粘菌研究会、東京、3 月 7-8 日

厚生労働科学研究費補助金(効果的医療技術の確立推進臨床研究事業)
分担研究報告書

研究課題「骨細胞再生を基礎とする骨及び関節治療薬の開発研究」
(主任研究者 米田幸雄)

分担研究課題「ポリアミンによるマクロファージ系細胞の機能制御」
分担研究者 中村洋一 (大阪府立大学大学院農学生命科学研究科・教授)

研究要旨 内在性塩基性低分子であるポリアミン(スペルミン, スペルミジン)が、動物細胞の増殖・分化をはじめ様々な調節作用を果たしていることが明らかとなりつつある。骨の吸収の中心的役割を果たす破骨細胞に及ぼすポリアミンの作用については興味深いか、本研究では同しくマクロファージ系の細胞である中枢ミクログリアを中心材料として、ポリアミン分子による細胞機能調節の仕組みを検討した。培養ミクログリアを低濃度のポリアミンに暴露すると、LPS刺激による一酸化窒素産生が著しく抑制され、また細胞死が誘導された。この細胞死は核染色体の凝集や断片化DNAの増加が観察されることから、アポトーシスによるものであることが強く示唆された。

A 研究目的

骨は静的に構築されているのではなく、常にその吸収/形成を伴うダイナミックな平衡で構築されていることは、そのバランスを精妙に調節している機構が存在することを意味している。中枢における最も重要な興奮性神経伝達物質としてのグルタミン酸の位置づけがほぼ確実となった現在では、末梢各組織におけるグルタミン酸のシクナリンク機構が注目されている。骨芽細胞、破骨細胞、軟骨細胞などの骨組織を構成する各種細胞もその例に漏れない。ポリアミンは、動物細胞内においてDNA, RNAなどの核酸に結合している内在性の低分子有機カチオンであり、核内情報伝達系の調節分子として

機能している。従来ポリアミンの主な生理作用は、DNAの安定化や複製促進、蛋白合成の活性化に伴う細胞の増殖や分化の促進とされてきた。しかし近年、特定の内因性ポリアミンかグルタミン酸(Glu)受容体のサブタイプであるNMDA受容体のCa²⁺チャネルの開口を顕著に促進したり、AMPA受容体のチャネルを細胞内部から抑制したりするなど、細胞膜上に存在する受容体やイオンチャネルに対して相互作用を有する事が報告され、新たなポリアミンの細胞間シクナリンク調節作用も注目されている。

本研究では骨の形成・吸収を制御する重要な内在性因子の一つとして、ポリアミンが機能している可能性に注目した。

骨の吸収の中心的役割を果たす破骨細胞に及ぼすポリアミンの作用については興味深いが、本研究では同しくマクロファージ系の細胞である中枢ミクログリアを中心材料として、ポリアミン分子による細胞機能調節の仕組みを検討した。

B 研究方法

1 ミクログリアの培養 ラット新生仔全脳細胞を2-4週間培養し、形成された単層細胞の上に現れる球形の小型細胞を振盪および遠心により集め96-wellプレートに二次培養した。二次培養に浮遊細胞用のプレートを用いることにより、ほぼ純粋なミクログリア細胞が得られた。

2 アストロサイトの培養 ラット胎仔大脳皮質をトリプシン処理により単離し2週間程度の培養の後96-wellに蒔き代えてLPS刺激作用に対するポリアミンの効果を検討した。

3 一酸化窒素(NO)産生 リポポリサッカライド(LPS)刺激によるNO産生は試薬添加24時間後の培養上清中のNO₂をDAN試薬法により定量し評価した。

4 細胞生存率の測定 生存細胞数を定量化するため、トータルなミトコントリア活性をCCK8キットを用いて測定した。

5 アポトーシスによる細胞死の確認 Hoechst33342染色における核の形態を観察した。またTUNEL染色法を用いて断片化DNAを可視化し陽性細胞数について検討した。さらに細胞質に存在する断片化DNA量をELISAキットにより定量した。

5 倫理面への配慮 細胞培養に用いた動物の取り扱いには金沢大学動物実験指針に基づいた。

C 研究結果

ポリアミンによるマクロファージ系細胞のアポトーシス誘導作用

培養ミクログリアをリポポリサッカライド(LPS)で刺激した時のNO産生活性は、1-10 μMのスペルミン、あるいはスペルミシン添加により濃度依存的に減少し、10 μMでほぼ完全に抑制された。プロレスチンは有意な変化を及ぼさなかった。

スペルミシンあるいはスペルミン添加24時間後の細胞ミトコントリア活性は、LPS刺激の有無にかかわらず、顕著に抑制された。その作用濃度域は上記のNO産生阻害とほぼ等しくEC50は1-3 μMであった。興味深いことに、同じ中枢クリアであるアストロサイトの細胞活性はポリアミンにより変化を受けず、むしろ増強させる傾向があった。(図1参照)

ミクログリアの細胞障害がアポトーシスによるものであることを、核染色剤であるHoechst33342を用いて形態的に確かめた。10 μMスペルミシンに24時間暴露すると、大半の細胞で核の凝集が確認された。さらにTUNEL染色によりほとんどの細胞の細胞質が濃染され、断片化DNAが細胞質に大量に存在することが示唆された。

アポトーシスが起きていることを定量的にも確認するために、細胞に前もってBrdUを取り込ませた後、10 μMスペルミンあるいはスペルミシンに暴露し、細胞質内の断片化DNAをELISA法により定

量した。細胞質内の断片化 DNA 量は暴露開始 12 時間前後から著しく増加した。またその増加はポリアミンの濃度依存性に起こることが明らかとなった。(図 2 参

照) その濃度域は 1-10 μM で、上述の NO 産生阻害およびミトコンドリア活性抑制の場合と同じであった。

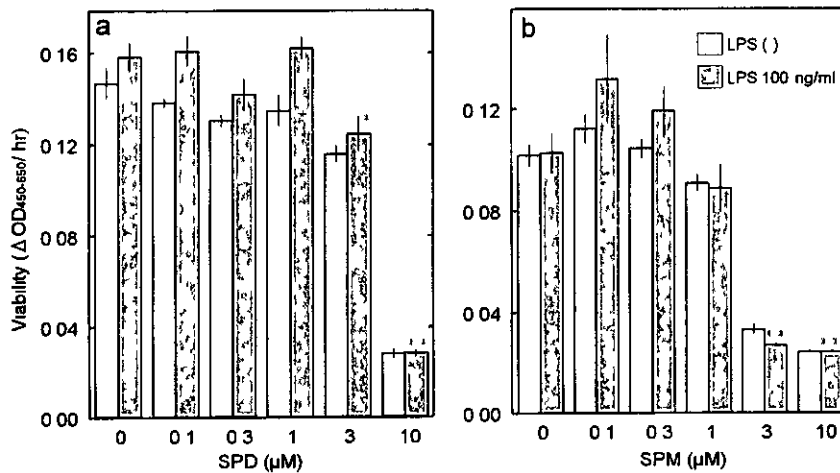


Fig 1 Effect of spermidine and spermine on the viability of cultured microglia. Microglia were incubated with various concentrations of SPD (a) and SPM (b) together with or without 100 ng/ml LPS for 24 h. Then, cell viability was evaluated by the measurement of total mitochondrial activity with Cell Counting Kit

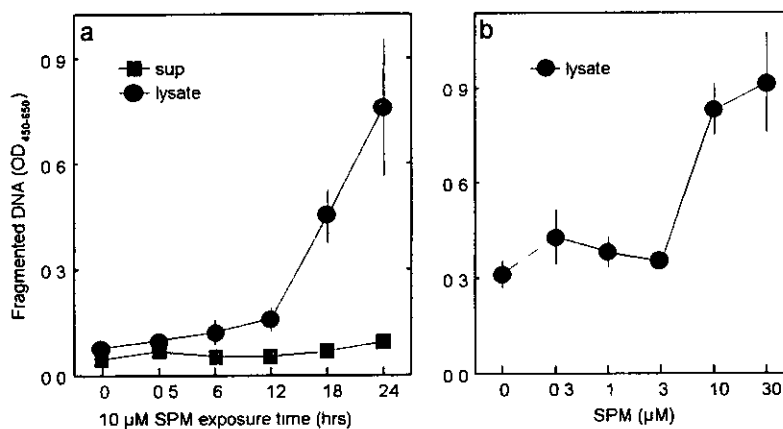


Fig 2 DNA fragmentation induced by spermine treatment. Microglia were treated with 10 μM SPM and the time course of increase in the fragmented DNA was measured in culture medium and cell lysate (cytoplasm) by ELISA assay (a). After incubation with various concentrations of spermine for 24 h, fragmented DNA in cell lysate was measured (b).

D 考察

ポリアミンかグルタミン酸シクナリ

シク機構の有力な調節因子であることは、骨形成・吸収機能においてもポリアミン

の作用を明らかにする必然に迫られる。骨吸収を司る破骨細胞の各種細胞機能にポリアミンがいかなる作用を示すのかを明らかにすることか本研究の最終目標であるか、同じマクロファージ系の細胞であるミクログリアにおいて、低濃度ポリアミンがアポトーシスを誘導することか見出された。他の組織や細胞では、ポリアミン作用は10-100 μM の濃度域で観察されるのが通常であり、ここで見られたポリアミンの作用濃度はこれまで報告されている各種のポリアミン作用の中でも、最も低濃度であった。このアポトーシス誘導作用はアストロサイトでは観察されず、前年度の検討で明らかになった如く、アストロサイトはポリアミンの輸送によりマクロファージ系細胞の活性化の消長を制御している可能性がある。

骨形成・吸収機能を果たす各種細胞種においても、ポリアミンによる各種細胞機能調節の可能性を検証する必要がある。末梢におけるグルタミン酸シグナリングのポリアミン調節機構についてさらなる研究が展開されることが期待される。

E 結論

- 1 ミクログリアのポリアミン暴露による細胞死はアポトーシスによるものであることが3つの観察方法により確認された。
- 2 このミクログリアに対するポリアミンの作用濃度はこれまで報告されている各種のポリアミン作用の中でも、最も低濃度で効果が見られるものであった。
- 3 この極低濃度のポリアミン作用がいかなる機構により引き起こされるもの

であるのかは不明であるか、全く新しい知見であるが故に骨組織の細胞に於いても検証する必要がある。

F 研究発表

論文発表

- 1 Koji Murakami, Yoichi Nakamura and Yukio Yoneda (2003) Potentiation by ATP of lipopolysaccharide-stimulated nitric oxide production in cultured astrocytes *Neuroscience* 117, 37-42
- 2 Yoichi Nakamura, Miho Ohmaki, Koji Murakami and Yukio Yoneda (2003) Involvement of protein kinase C in glutamate release from cultured microglia *Brain Res* 962, 122-128
- 3 Noritaka Nakamichi, Hiroshi Ohno, Yoichi Nakamura, Takao Hirai, Nobuyuki Kuramoto and Yukio Yoneda (2002) Blockade by ferrous iron of Ca^{2+} influx through *N*-methyl-D-aspartate receptor channels in immature cultured rat cortical neurons *J Neurochem* 83, 1-11
- 4 Eiichi Hinoi, Sayumi Fujimori, Akihiro Takemori, Hiroaki Kurabayashi, Yoichi Nakamura and Yukio Yoneda (2002) Demonstration of expression of mRNA for particular AMPA and kainate receptor subunits in immature and mature cultured rat calvarial osteoblasts *Brain Res* 943, 112-116
- 5 Eiichi Hinoi, Sayumi Fujimori, Yoichi Nakamura, Vladimir J Balcar, Kenta Kubo, Kiyokazu Ogita and Yukio Yoneda (2002) Constitutive expression of hetero-logous *N*-methyl-D-aspartate

receptor subunits in rat adrenal medulla
J Neurosci Res 68, 36-45

- 6 Takao Hirai, Nobuyuki Kuramoto, Hiroko Maruyama, Vladimir J Balcar, Yoichi Nakamura and Yukio Yoneda (2002) Potentiation of nuclear activator protein-1 DNA binding following brief exposure to *N*-methyl-D-aspartate in immature cultured rat hippocampal neurons *J Neurosci Res* 67, 523-532

学会発表

- 1 中村洋一, 大巻深穂, 村上浩司, 米田幸雄 (2003) 培養ミクログリアからのグルタミン酸遊離におけるプロテインキナーゼCの関与 第76回日本薬理学会年会 第80回日本生理学会大会, 福岡, 3月25日
- 2 村上浩司, 中村洋一, 米田幸雄 (2002) 培養アストロサイトに対するATPの効果 第32回日本神経精神薬理学会年会, 群馬, 10月18日
- 3 高野桂, 中村洋一, 米田幸雄 (2002) ポリアミンによる培養ミクログリアの細胞死 第32回日本神経精神薬理学会年会, 群馬, 10月18日
- 4 高野桂, 中村洋一, 米田幸雄 (2002) 低濃度ポリアミンによるミクログリアのアポトーシス誘導 第45回日本神経化学学会大会, 札幌, 7月18日
- 5 Masanori Yoneyama, Tomoya Kitayama, Yoichi Nakamura and Yukio Yoneda (2002) Immunohistochemical detection of ionotropic glutamate receptor subunits in murine hippocampus XIVth World Congress of Pharmacology, San

Francisco, USA, July 11

- 6 Akihiro Takemori, Eiichi Hinoi, Yoichi Nakamura and Yukio Yoneda (2002) Glutamate transporters expressed in cultured rat costal chondrocytes XIVth World Congress of Pharmacology, San Francisco, USA, July 9
- 7 Koji Murakami, Yoichi Nakamura and Yukio Yoneda (2002) ATP Modulation of LPS-induced NO production in Cultured Astrocyte and Microglia XIVth World Congress of Pharmacology, San Francisco, USA, July 9
- 8 高野桂, 中村洋一, 米田幸雄 (2002) ポリアミンによる培養ミクログリアの細胞死誘導 第101回日本薬理学会近畿部会, 大阪, 6月21日
- 9 高野桂, 中村洋一, 米田幸雄 (2002) による培養ミクログリアの細胞機能抑制 日本薬学会第122年会, 千葉, 3月27日
- 10 竹森章浩, 檜井栄一, 藤森さゆ美, 倉林広明, 中村洋一, 米田幸雄 (2002) ピルヒン酸の初代培養骨芽細胞死に対する防御作用 日本薬学会第122年会, 千葉, 3月27日
- 11 中道範隆, 大野博司, 中村洋一, 米田幸雄 (2002) 遊離 Fe^{2+} のNMDA受容体チャネル開口調節作用 日本薬学会第122年会, 千葉, 3月26日
- 12 藤森さゆ美, 檜井栄一, 中村洋一, 米田幸雄 (2002) 培養骨芽細胞における機能的GABA B受容体の発現 日本薬学会第122年会, 千葉, 3月26日

- 13 杉山千絵, 高本晃子, V J ハルツァー, 中村洋一, 米田幸雄 (2002) ラット大脳皮質培養神経細胞における各種グルタメイトレセプター活性化に伴う AP1 DNA 結合の変動 日本薬学会第 122 年会, 千葉, 3 月 26 日
- 14 米山雅紀, 北山友也, 中村洋一, 米田幸雄 (2002) マウス脳海馬内イオノトロピック型グルタメイトレセプターサブユニットの免疫組織化学的検出 日本薬学会第 122 年会, 千葉, 3 月 26 日
- 15 村上浩司, 大巻深穂, 中村洋一, 米田幸雄 (2002) ミクログリアからの NO およびグルタミン酸放出の ATP による抑制 日本薬学会第 122 年会, 千葉, 3 月 26 日
- 16 荒町勝英, 中村洋一, 米田幸雄 (2002) 培養アストロサイトにおけるポリアミンの輸送活性 日本薬学会第 122 年会, 千葉, 3 月 26 日
- 17 馬場勝弘, 米田幸雄, 中村洋一 (2002) ラット小脳における XRE 結合蛋白質の解析 第 75 回日本薬理学会年会, 熊本, 3 月 15 日
- 18 檜井栄一, 藤森さゆ美, 中村洋一, 米田幸雄 (2002) 初代培養骨芽細胞におけるグループ(Ⅲ)メタホトロピック型グルタメイトレセプターの機能的発現 第 75 回日本薬理学会年会, 熊本, 3 月 14 日
- 19 北山友也, 米山雅紀, 中村洋一, 米田幸雄 (2002) 成熟マウス中枢神経系増殖細胞に対する NMDA 投与の影響 第 75 回日本薬理学会年会, 熊本, 3 月 14 日
- 20 中道範隆, 大野博司, 中村洋一, 米田幸雄 (2002) NMDA 受容体を介する細胞内遊離 Ca²⁺維持機構のインビトロ加齢に伴う変化 第 75 回日本薬理学会年会, 熊本, 3 月 14 日

厚生科学研究費補助金（効果的医療技術の確立推進臨床研究事業）

分担研究報告書

研究課題「骨細胞再生を基礎とする骨及び関節治療薬の開発研究」

（主任研究者 米田幸雄）

分担研究課題「骨肉腫細胞における Necdin と hnRNP U による協調的細胞
増殖抑制機構」

分担研究者 谷浦秀夫 （金沢大学大学院・自然科学研究科 助教授）

研究要旨 Necdin は、ニューロンなどの分裂終了細胞に発現しており、強制発現によりさまざまな細胞の増殖を抑制する。胚性がん P19 細胞より作製した cDNA library を酵母 two-hybrid 法でスクリーニングしたところ、hnRNP U が Necdin 結合蛋白質として同定された。hnRNP U の Necdin 結合領域を in vitro 結合実験で同定したところ C 末側の領域であった。また hnRNP U は核マトリックス蛋白質であることが知られているが、骨肉腫細胞 SAOS-2 cell へのさまざまな hnRNP U deletion mutants の発現実験より C 末端領域しかしながら necdin 結合領域とは異なる領域が核マトリックスへの局在に必須であることがわかった。内在性の necdin と hnRNP U もまた胚性がん P19 細胞の核マトリックスで複合体を形成していた。Necdin を骨肉腫細胞 SAOS-2 cell に強制発現させると核マトリックス上では核小体に局在したが、hnRNP U との共発現により核マトリックス全体に分布し hnRNP U の局在と一致した。さらに同様の条件下で、Necdin と hnRNP U による協調的な細胞増殖抑制が観察された。これらのことから核マトリックスを介した Necdin と hnRNP U による協調的細胞増殖抑制機構が考えられた。