

厚生労働科学研究研究費補助金  
効果的医療技術の確立推進臨床研究事業

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 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 米田 幸雄

平成 16(2003)年 4 月

## 目次

I. 総括研究報告書	
骨細胞再生を基礎とする骨及び関節治療薬の開発研究	1
米田幸雄	
II. 分担研究報告	
1.D-serine による骨芽細胞成長制御機構解明に関する研究	15
中村洋一	
2.グルタミン酸による骨芽細胞成長制御機構解明に関する研究	23
谷浦秀夫	
3.骨芽細胞生存決定因子探求に関する研究	31
荻田喜代一	
4.D-serine による破骨細胞分化制御機構解明に関する研究	41
山下克美	
5.グルタミン酸による骨芽細胞成長制御機構解明に関する研究	47
檜井栄一	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	57
IV. 研究成果の刊行物・別刷	59

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：昨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報告した。本年度はマウス胎生 15.5 日の metatarsal を用いて、Glu シグナリング分子の発現検討および内軟骨性骨化による軟骨分化に対する Glu の影響を検討した。その結果、metatarsal において特定の mGluR の発現が認められた。また、metatarsal を高濃度 Glu で刺激すると、培養開始 5 日目においては metatarsal の全長には有意な差は認められなかったのに対して、濃度依存的に石灰化率の低下が認められた。さらにヘマトキシリンエオジン染色により増殖軟骨から肥大軟骨への分化異常が認められるとともに、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染色性の低下がともに観察された。

分担研究者

中村洋一

大阪府立大学大学院 教授

谷浦秀夫

金沢大学大学院 助教授

荻田喜代一

摂南大学 助教授

山下克美

金沢大学大学院 助教授

檜井栄一

金沢大学 助手

A. 研究目的

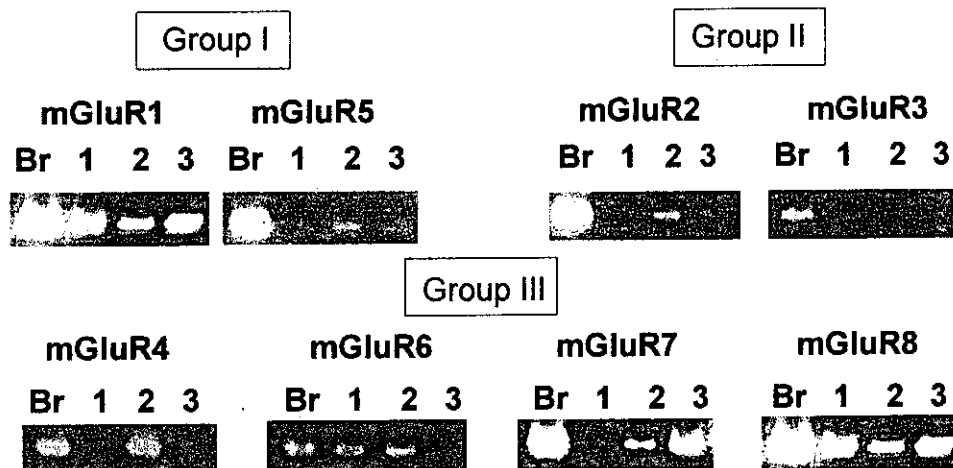
我々はこれまでに頭蓋骨由来初代培養骨芽細胞に、

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ことを見出した。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実を見出しており、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、何れもリモデリング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進める事を目的とし、昨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報告した。よって本年度は軟骨細胞における Glu シグナリング伝達機構の機能的解明をより詳細に検討する事を目的とし、マウス胎生 15.5 日の *metatarsal* を用いて、Glu シグナリング分子の発現と内軟骨性骨化による軟骨分化に対する Glu の影響を検討した。

## (mGluRs)



Br: mouse whole brain

1 : metatarsal(1 DIV) 2: metatarsal(3 DIV) 3 : metatarsal(5DIV)

**Fig. 1. Expression of mRNAs for mGluR in mouse brain and metatarsal.** mRNAs were extracted from mouse whole brain and metatarsal cultured for 1, 3 and 5 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

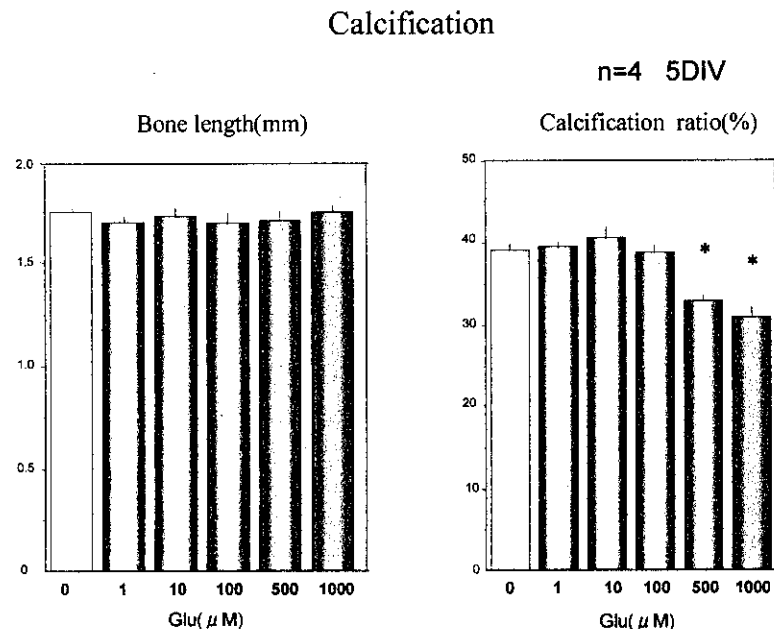
胎生 15.5 日目の胎児より metatarsal を摘

出し、0.25%牛胎児血清を含む MEM 中で最大 5 日間培養したのち、totalRNA を抽出

し、メタボトロピック型 GluR (mGluR)の発現を特異的に認識するプライマーを用いた RT-PCR 法を行った。また、1  $\mu$ M から 1 mM までの各濃度 Glu 添加条件下で metatarsal を 5 日間培養し、形態学的観察をヘマトキシリンエオジン染色、アルシアンブルー染色およびアルカリフォスファターゼ染色によ

り行った。

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. Effect of Glu on metatarsal bone length and calcification ratio.** Metatarsal were cultured in MEM in either the presence or absence of Glu at 1  $\mu$ M to 1 mM for 5 DIV, followed by determination of metatarsal bone length and calcification ratio. Values represent the mean $\pm$ S.E. obtained from four different experiments. \*P<0.05, significantly different from control value obtained in the absence of Glu.

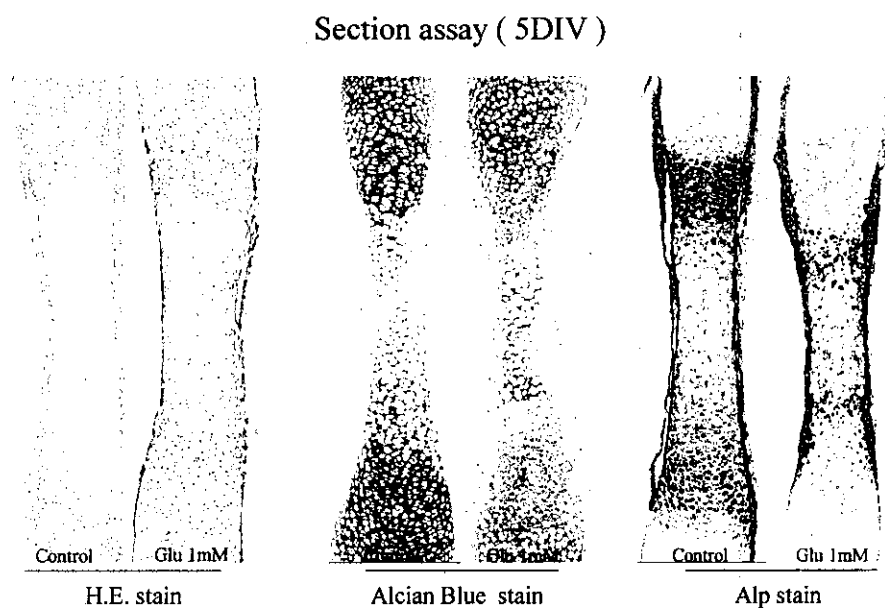
### C. 研究結果

各日数培養した metatarsal においてグループ I 型からグループ III 型までの特定のレセプター発現が観察された (Fig. 1)。特にグループ I 型の mGluR1 およびグループ III 型の mGluR8 はいずれの培養日数におい

ても恒常的にその発現が確認された。また、Glu 1  $\mu$ M から 1 mM までの各濃度添加条件下における metatarsal の全長および石灰化部位の比率を測定したところ、いずれの濃度の Glu においてもその全長には有意な差

は認められなかったのに対して、石灰化部位の比率は Glu 500  $\mu$ M 以上の濃度で有意に抑制された (Fig. 2)。また、この Glu による metatarsal 石灰化抑制作用は培養 3 日目から観察された。また Glu 1mM 添加条件下で 5 日間培養した metatarsal においてヘマトキシリンエオジン染色により組織学的にその

影響を検討したところ、増殖軟骨細胞から肥大化軟骨細胞への分化が大きく抑制されていることが明らかとなった (Fig. 3)。さらに Glu 添加によりアルシアンブルー染色性だけでなくアルカリフォスファターゼ染色性の低下がともに認められた (Fig. 3)。



**Fig. 3. Hematoxylin/Eosin staining, Alcian blue staining and alkalinephosphatase activity in metatarsal cultured with 1 mM Glu.** Metatarsal were cultured in MEM in either the presence or absence of Glu at 1 mM for 5 DIV, followed by determination of the activity of alcian blue staining and alkalinephosphatase in addition to hematoxylin/Eosin staining. Typical pictures are shown in this figure with similar results in three independent determinations.

## D. 考察

初代軟骨細胞だけでなく metatarsal 器官培養系においても特定の Glu シグナリング分子の発現が認められるとともに、Glu による成長抑制作用が観察された。したがって、軟骨細胞分化に対して Glu は決定的な役割を演じる可能性が示唆される。

今後は metatarsal 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. metatarsal において特定の mGluR の mRNA 発現が認められた。
2. metatarsal において高濃度 Glu 暴露によりその全長には差は認められなかったのに対して、石灰化部位の比率が有意に抑制された。
3. 組織学的な解析から Glu により、軟骨分化マーカー（アルシアンブルー、アルカリフォスファターゼ）の活性低下が認められた。
4. 以上の結果から、metatarsal には特定の Glu のシグナリング関連分子が発現しており、内軟骨性骨化にともなう軟骨分化に対して、Glu が分化抑制作用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. Tomoya Kitayama, Masanori Yoneyama, Keisuke Tamaki and Yukio Yoneda (2004) Regulation of neuronal differentiation by N-methyl-D-aspartate

receptors expressed in neural progenitor cells isolated from adult mouse hippocampus. *J. Neurosci. Res.* in press.

2. Takeshi Takarada, Eiichi Hinoi, Vladimir J. Balcar, Hideo Taniura and Yukio Yoneda (2004) Possible expression of functional glutamate transporters in rat testis. *J. Endocrinol.* in press.
3. Kiyokazu Ogita, Masaki Kubo, Norito Nishiyama, Mami Watanabe, Reiko Nagashima and Yukio Yoneda (2004) Enhanced binding activity of nuclear antioxidant-response element through possible formation of Nrf2/Fos-B complex after in vivo treatment with kainate in murine hippocampus. *Neuropharmacology*, 46, 580-589.
4. Takao Hirai and Yukio Yoneda (2004) Functional alterations in immature cultured rat hippocampal neurons after sustained exposure to static magnetic fields. *J. Neurosci. Res.* 75, 230-240.
5. Masanori Yoneyama, Tomoya Kitayama, Hideo Taniura and Yukio Yoneda (2004) Immunohistochemical detection by immersion fixation with Carnoy solution of particular non-N-methyl-D-aspartate receptor subunits in murine hippocampus. *Neurochem. Int.* 44, 413-422.
6. Keiji Inoue, Nobuyuki Kuramoto, Chie Sugiyama, Hideo Taniura, Katsumi Sakata, Yoshiaki Fujinami, Kiyokazu Ogita and Yukio Yoneda (2003) Fos-B expression is required for polyamine-induced increase in nuclear activator protein-1 DNA binding in discrete structures of murine brain. *J. Neurosci. Res.* 74, 199-209.
7. Keiji Inoue, Nobuyuki Kuramoto, Katsura Takano, Hideo Taniura, Katsumi Sakata, Kiyokazu Ogita, Akira Shirahata and Yukio Yoneda (2003) Possible correlation between abilities of a variety of polyamines to increase activator protein-1 DNA binding and to inhibit [<sup>3</sup>H]spermidine transport in nuclear fractions of murine brain. *Brain Res.* 987, 126-130.

8. Kiyokazu Ogita, Yoshiaki Fujinami, Masahiro Kitano and Yukio Yoneda (2003) Transcription factor activator protein-1 expressed by kainate treatment can bind to the non-coding region of mitochondrial genome in murine hippocampus. *J. Neurosci. Res.* 73, 794-802.
  9. Takeshi Takarada, Vladimir J. Balcar, Katsuhiko Baba, Akiko Takamoto, Gabriela B. Acosta, Katsura Takano and Yukio Yoneda (2003) Uptake of [<sup>3</sup>H]L-serine in rat brain synaptosomal fractions. *Brain Res.* 983, 36-47.
  10. Katsura Takano, Yoichi Nakamura and Yukio Yoneda (2003) Microglial cell death induced by a low concentration of polyamines. *Neuroscience* 120, 961-967.
  11. Nobuyuki Kuramoto, Keiji Inoue, Katsura Takano, Hideo Taniura, Katsumi Sakata, Kiyokazu Ogita and Yukio Yoneda (2003) A possible novel mechanism underlying temperature-dependent uptake of [<sup>3</sup>H] spermidine in nuclear fractions of murine brain. *Brain Res.* 981, 78-84.
  12. Eiichi Hinoi, Sayumi Fujimori and Yukio Yoneda (2003) Modulation of cellular differentiation by N-methyl-D-aspartate receptors in osteoblasts. *FASEB J.* 17, 1532-1534.
  13. 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.* 6, 564-571.
  14. 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.* 85, 1336-1346.
  15. 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.* 73, 416-426.
  16. Nobuyuki Kuramoto, Keiko Gion, Noriko Sanada and Yukio Yoneda (2003) Xenobiotic response element binding protein expressed in rat brain. *Recent Res. Dev. Biophys. Biochem.* 3, 599-611.
  17. 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.
  18. 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 excitable tissues. *Brain Res.* 967, 170-180.
  19. Koji Murakami, Yoichi Nakamura and Yukio Yoneda (2003) Potentiation by ATP of lipopolysaccharide-stimulated nitric oxide production in cultured astrocytes. *Neuroscience* 117, 37-42.
  20. 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.
  21. 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.
2. 学会発表
1. 宝田 剛志, 井上 真希, 大澤 壮登, 檜 井 栄一, 米田 幸雄 (2004) 前駆細胞株 RAW264.7 の破骨細胞分化における



- D-serineの役割. 日本薬学会第124年会, 大阪, 3月29-31日.
2. 上嶋 太一, 檜井 栄一, 宝田 剛志, 米田 幸雄 (2004) 培養軟骨細胞 ATDC5 における時計遺伝子の転写調節. 日本薬学会第124年会, 大阪, 3月29-31日.
  3. 土橋 友理子, 藤森 さゆ美, 檜井 栄一, 米田 幸雄 (2004) 培養骨芽細胞における酸化ストレスに対するピルビン酸の防御作用. 日本薬学会第124年会, 大阪, 3月29-31日.
  4. 藤森 さゆ美, 大澤 壮登, 檜井 栄一, 米田 幸雄 (2004) 骨芽細胞における高グルコース誘発性<sup>3</sup>H]GABA 取り込み能の増強. 日本薬学会第124年会, 大阪, 3月29-31日.
  5. 米山 雅紀, 玉置 啓祐, 米田 幸雄 (2004) 培養神経系前駆細胞におけるグルタメイトレセプターの発現. 日本薬学会第124年会, 大阪, 3月29-31日.
  6. 高野 桂, 小椋 正人, 中村 洋一, 米田 幸雄 (2004) ポリアミンによるラット由来培養ミクログリアの生存制御. 日本薬学会第124年会, 大阪, 3月29-31日.
  7. 杉山 千絵, 米田 幸雄 (2004) グループII型 mGluR の神経保護作用. 日本薬学会第124年会, 大阪, 3月29-31日.
  8. 岩本 直子, 伊藤 文昭, 米田 幸雄, 荻田 喜代一 (2004) トリメチルスズ誘発性神経細胞障害に伴う高分子熱ショック蛋白質の発現増強. 日本薬学会第124年会, 大阪, 3月29-31日.
  9. 西山 徳人, 新田 有紀, 米田 幸雄, 荻田 喜代一 (2004) 有機スズによる中枢神経障害に対するグルタチオン枯渇の影響. 日本薬学会第124年会, 大阪, 3月29-31日.
  10. 中道 範隆, 神戸 悠輝, 及川 弘崇, 米田 幸雄 (2004) NMDA 受容体チャネルの脱感作所要時間. 日本薬学会第124年会, 大阪, 3月29-31日.
  11. 平居 貴生, 米田 幸雄 (2004) 神経細胞における磁場シグナル応答性遺伝子. 第77回日本薬理学会年会, 大阪, 3月8-10日.
  12. 中道 範隆, 米田 幸雄 (2004) NMDA レセプターチャネルの脱感受性. 第77回日本薬理学会年会, 大阪, 3月8-10日.
  13. 眞田 法子, 谷浦 秀夫, 米田 幸雄 (2004) 細胞性粘菌の分化におけるグルタミン酸の役割. 第77回日本薬理学会年会, 大阪, 3月8-10日.
  14. 杉山 千絵, 米田 幸雄 (2004) グループII型代謝調節性グルタメイトレセプターの神経保護作用. 第77回日本薬理学会年会, 大阪, 3月8-10日.
  15. 高野 桂, 小椋 正人, 中村 洋一, 米田 幸雄 (2004) ラット脳由来培養ミクログリアとアストロサイトのポリアミン感受性の相違. 第77回日本薬理学会年会, 大阪, 3月8-10日.
  16. 西山 徳人, 米田 幸雄, 荻田 喜代一 (2004) マウス歯状回障害後の海馬CA3領域における神経再生の可能性. 第77回日本薬理学会年会, 大阪, 3月8-10日.
  17. 土橋 友理子, 藤森 さゆ美, 檜井 栄一, 米田 幸雄 (2004) 培養骨芽細胞における酸化ストレスに対するピルビン酸の防御作用. 第77回日本薬理学会年会, 大阪, 3月8-10日.
  18. 藤森 さゆ美, 檜井 栄一, 米田 幸雄 (2004) 高グルコース下培養骨芽細胞における<sup>3</sup>H]GABA 取り込み活性の上昇. 第77回日本薬理学会年会, 大阪, 3月8-10日.
  19. 上嶋 太一, 檜井 栄一, 宝田 剛志, 米田 幸雄 (2004) 培養軟骨細胞株 ATDC5 における時計遺伝子の転写調

- 節. 第 77 回日本薬理学会年会, 大阪, 3 月 8-10 日.
20. 王 麗楊, 檜井 栄一, 宝田 剛志, 大澤 壮登, 米田 幸雄 (2004) グルタミン酸による軟骨石灰化の抑制. 第 77 回日本薬理学会年会, 大阪, 3 月 8-10 日.
  21. 宝田 剛志, 大澤 壮登, 檜井 栄一, 米田 幸雄 (2004) 前駆細胞株 RAW264.7 における D-serine の破骨細胞分化促進作用. 第 77 回日本薬理学会年会, 大阪, 3 月 8-10 日.
  22. 玉置 啓祐, 山田 清文, 米山 雅紀, 米田 幸雄 (2004) ストレス負荷に伴うマウス海馬歯状回顆粒細胞への BrdU 取り込み活性の変化. 第 77 回日本薬理学会年会, 大阪, 3 月 8-10 日.
  23. 米山 雅紀, 玉置 啓祐, 米田 幸雄 (2004) 胎児脳内特定部位からの神経系前駆細胞の単離. 第 77 回日本薬理学会年会, 大阪, 3 月 8-10 日.
  24. スン ジュディ, 谷浦 秀夫, 米田 幸雄 (2004) カイニン酸刺激による immediate early gene の発現とヒストン修飾の関与. 第 77 回日本薬理学会年会, 大阪, 3 月 8-10 日.
  25. 後藤 康彰, 山田 清文, 平居 貴生, 米田 幸雄 (2004) 持続的磁場曝露に応答する海馬内遺伝子の探索. 第 77 回日本薬理学会年会, 大阪, 3 月 8-10 日.
  26. 飯島 壮悟, 谷浦 秀夫, 米田 幸雄 (2004) NMDA 腹腔内投与による海馬内 AP1 と Tex261 の発現誘導. 第 77 回日本薬理学会年会, 大阪, 3 月 8-10 日.
  27. 岩本 直子, 山室 晶子, 前田 定秋, 伊藤 文昭, 米田 幸雄, 荻田 喜代一 (2004) ユビキチン-プロテアソーム経路の阻害による HSP105 発現の増加. 第 77 回日本薬理学会年会, 大阪, 3 月 8-10 日.
  28. 及川 弘崇, 中道 範隆, 神戸 悠輝, 米田 幸雄 (2004) 培養神経細胞成熟に伴うニコチン応答性変化. 第 77 回日本薬理学会年会, 大阪, 3 月 8-10 日.
  29. Sng J.C.G., Hideo Taniura and Yukio Yoneda (2004) Histone modifications regulate the transcription of immediate early genes in kainate-induced status epilepticus. The 6th Biennial Meeting of the Asian-Pacific Society for Neurochemistry, Hong Kong, 4-7 February.
  30. Sougo Iijima, Hideo Taniura and Yukio Yoneda (2004) A gene expressed in response to systemic administration of NMDA in murine hippocampus. The 6th Biennial Meeting of the Asian-Pacific Society for Neurochemistry, Hong Kong, 4-7 February.
  31. Yasuaki Goto, Kiyofumi Yamada, Takao Hirai and Yukio Yoneda (2004) Cellular maturation after repetitive brief exposure to static magnetic fields in cultured rat hippocampal neurons. The 6th Biennial Meeting of the Asian-Pacific Society for Neurochemistry, Hong Kong, 4-7 February.
  32. 及川 弘崇, 中道 範隆, 神戸 悠輝, 米田 幸雄 (2003) インビトロ神経細胞成熟に伴うニコチン応答性細胞内遊離  $Ca^{2+}$  濃度変化. 日本薬学会北陸支部第 109 例会および平成 15 年度第 2 回総会, 富山, 11 月 30 日.
  33. 家亦 美佳, 藤森 さゆ美, 檜井 栄一, 米田 幸雄 (2003) 間葉系幹細胞株における神経性アミノ酸シグナリング分子の発現. 日本薬学会北陸支部第 109 例会および平成 15 年度第 2 回総会, 富山, 11 月 30 日.
  34. 檜井 栄一, 宝田 剛志, 上嶋 太一, 土橋 友理子, 藤森 さゆ美, 米田 幸雄 (2003) 転写制御因子 runx2/cbfa1 を介した NMDA レセプターによる骨芽細胞分化制御機構. 日本薬学会北陸支部第 109 例会および平成 15 年度第 2 回総会, 富山, 11 月 30 日.
  35. 王 麗楊, 宝田 剛志, 大澤 壮登, 檜井 栄一, 米田 幸雄 (2003) 軟骨石灰化に

- 対するグルタミン酸の抑制効果. 日本薬学会北陸支部第 109 例会および平成 15 年度第 2 回総会, 富山, 11 月 30 日.
36. 大橋 亮輔, 宝田 剛志, 上嶋 太一, 檜井 栄一, 米田 幸雄 (2003) グルタミン酸シグナル関連分子のラット滑膜細胞における機能的発現. 日本薬学会北陸支部第 109 例会および平成 15 年度第 2 回総会, 富山, 11 月 30 日.
  37. 上嶋 太一, 檜井 栄一, 宝田 剛志, 米田 幸雄 (2003) 骨芽細胞株 MCT3T3-E1 に発現する時計遺伝子の転写調節. 日本薬学会北陸支部第 109 例会および平成 15 年度第 2 回総会, 富山, 11 月 30 日.
  38. 井上 真希, 檜井 栄一, 宝田 剛志, 土橋 友理子, 村藤 康裕, 米田 幸雄 (2003) グルタミン酸トランスポーターの初代培養破骨細胞における発現. 日本薬学会北陸支部第 109 例会および平成 15 年度第 2 回総会, 富山, 11 月 30 日.
  39. 土橋 友理子, 檜井 栄一, 藤森 さゆ美, 宝田 剛志, 米田 幸雄 (2003) ラット頭蓋骨由来初代培養骨が細胞における機能的なモノカルボン酸トランスポーターの発現. 日本薬学会北陸支部第 109 例会および平成 15 年度第 2 回総会, 富山, 11 月 30 日.
  40. 米山 雅紀, 玉置 啓祐, 米田 幸雄 (2003) ラット胎児脳内特定部位からの神経系前駆細胞の単離. 日本薬学会北陸支部第 109 例会および平成 15 年度第 2 回総会, 富山, 11 月 30 日.
  41. 宝田 剛志, 土橋 友理子, 大澤 杜登, 檜井 栄一, 米田 幸雄 (2003) D-serine 合成酵素 serine racemase の初代培養骨芽細胞における発現. 日本薬学会北陸支部第 109 例会および平成 15 年度第 2 回総会, 富山, 11 月 30 日.
  42. 中道 範隆 (2003) 神経細胞のインビトロ成熟に伴う NMDA 受容体脱感作時間の変動. ファーマ・バイオフィオーラム 2003, 京都, 11 月 15-16 日.
  43. 平居 貴生 (2003) 初代培養海馬神経細胞に対する磁場暴露の影響. ファーマ・バイオフィオーラム 2003, 京都, 11 月 15-16 日.
  44. 藤森 さゆ美 (2003) 初代培養骨芽細胞における  $\gamma$ -アミノ酪酸 (GABA) の役割. ファーマ・バイオフィオーラム 2003, 京都, 11 月 15-16 日.
  45. 檜井 栄一, 王 麗揚, 宝田 剛志, 米田 幸雄 (2003) グルタミン酸シグナルによる関節組織の成長制御機構. 第 25 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム, 金沢, 11 月 13-14 日.
  46. 中道 範隆, 神戸 悠輝, 及川 弘崇, 米田 幸雄 (2003) NMDA 受容体脱感作メカニズムの解析. 第 25 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム, 金沢, 11 月 13-14 日.
  47. 藤森 さゆ美, 檜井 栄一, 米田 幸雄 (2003) 骨芽細胞に発現する GABA シグナル分子. 第 25 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム, 金沢, 11 月 13-14 日.
  48. 上嶋 太一, 檜井 栄一, 宝田 剛志, 米田 幸雄 (2003) 骨芽細胞株 MC3T3-E1 における時計遺伝子 period の発現調節機構. 第 104 回日本薬理学会近畿部会, 大阪, 11 月 7 日.
  49. 土橋 友理子, 檜井 栄一, 藤森 さゆ美, 宝田 剛志, 米田 幸雄 (2003) ラット頭蓋骨由来初代培養骨芽細胞におけるモノカルボン酸トランスポーター. 第 104 回日本薬理学会近畿部会, 大阪, 11 月 7 日.
  50. 大橋 亮輔, 檜井 栄一, 宝田 剛志, 上嶋 太一, 米田 幸雄 (2003) 初代培養滑膜細胞におけるグルタメイトシグナリング関連分子の機能的発現. 第 104 回日本薬理学会近畿部会, 大阪, 11 月 7 日.

51. 宝田 剛志, 檜井 栄一, 土橋 友理子, 大澤 壮登, 米田 幸雄 (2003) 初代培養骨芽細胞における serine racemase の発現. 第 104 回日本薬理学会近畿部会, 大阪, 11 月 7 日.
52. 井上 真希, 檜井 栄一, 宝田 剛志, 土橋 友理子, 村藤 康裕, 米田 幸雄 (2003) 初代培養破骨細胞におけるグルタミン酸トランスポーターの発現. 第 104 回日本薬理学会近畿部会, 大阪, 11 月 7 日.
53. 米田 幸雄, 檜井 栄一 (2003) 骨関節系細胞におけるグルタメイトシグナリング分子の機能的発現. 第 31 回薬物活性シンポジウム -薬物感受性の発現制御と創薬-, 横浜, 11 月 5-6 日.
54. Junko Tashiro, Yukio Yoneda, Takahiro Kubota, Ryotaro Yoshida (2003) Apoptotic Death of Allograft by A Type of Activated Macrophage. 第 76 回日本生化学会, Yokohama, Japan, October 15-18.
55. Mami Watanabe, Hiroaki Okuda, Yukio Yoneda, Kiyokazu Ogita (2003) Neuroprotective effect of the K<sup>+</sup> channel blocker 4-aminopyridine against kainate-induced neuronal cell death through the activation of NMDA receptors. 第 76 回日本生化学会, Yokohama, Japan, October 15-18.
56. Reiko Nagashima, Yoshiaki Fujinami, Ichiro Shigemori, Yukio Yoneda, Fumiaki Ito, Kiyokazu Ogita (2003) Organotin-induced damage in the mitochondrial DNA of murine hippocampus. 第 76 回日本生化学会, Yokohama, Japan, October 15-18.
57. Norito Nishiyama, Hiroaki Okuda, Yukio Yoneda, Kiyokazu Ogita (2003) Enhanced neurogenesis in the dentate gyrus following neurodegeneration induced by organotin. 第 76 回日本生化学会, Yokohama, Japan, October 15-18.
58. Yuhki Nitta, Mami Watanabe, Norito Nishiyama, Yukio Yoneda, Kiyokazu Ogita (2003) Activation of JNK/SAPK pathway in murine hippocampus after trimethyltin treatment. 第 76 回日本生化学会, Yokohama, Japan, October 15-18.
59. Yuhki Nakatani, Yoshiaki Fujinami, Yukio Yoneda, Kiyokazu Ogita (2003) Translocation of glucocorticoid receptors into the mitochondrial fractions in murine brain after dexamethasone treatment. 第 76 回日本生化学会, Yokohama, Japan, October 15-18.
60. 中道 範隆, 神戸 悠輝, 及川 弘崇, 米田 幸雄 (2003) NMDA 受容体脱感作の可能性. 第 33 回日本神経精神薬理学会年会, 奈良, 10 月 8-10 日.
61. 後藤 康彰, 平居 貴生, 山田 清文, 米田 幸雄 (2003) 海馬由来神経細胞における反復性定常磁場曝露の影響. 第 33 回日本神経精神薬理学会年会, 奈良, 10 月 8-10 日.
62. 平居 貴生, 米田 幸雄 (2003) 海馬神経細胞障害に対する反復性定常磁場曝露の回復的效果. 第 33 回日本神経精神薬理学会年会, 奈良, 10 月 8-10 日.
63. 西山 徳人, 新田 有紀, 米田 幸雄, 萩田 喜代一 (2003) TMT 誘発性神経細胞死における酸化ストレスの関与. 第 33 回日本神経精神薬理学会年会, 奈良, 10 月 8-10 日.
64. 伊藤 実, 大野 博司, 倉本 展行, 杉山 千絵, 谷浦 秀夫, 米田 幸雄 (2003) 脳内ビタミンD 感応性エレメント結合について. 第 33 回日本神経精神薬理学会年会, 奈良, 10 月 8-10 日.
65. 及川 弘崇, 中道 範隆, 神戸 悠輝, 米田 幸雄 (2003) インビトロ神経細胞成熟に伴うニコチン性シグナル伝達機構の変化. 第 33 回日本神経精神薬理学会年会, 奈良, 10 月 8-10 日.
66. 杉山 千絵, 谷浦 秀夫, 米田 幸雄 (2003) グループ II 型 mGluR を介する AP1 DNA 結合能の調節. 第 33 回日本

- 神経精神薬理学会年会, 奈良, 10月8-10日.
67. 神戸 悠輝, 中道 範隆, 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に対するピルビン酸の保護効果. 第33回日本神経精神薬理学会年会, 奈良, 10月8-10日.
  68. 玉置 啓祐, 米山 雅紀, 山田 清文, 米田 幸雄 (2003) Non-NMDA レセプターサブユニットの免疫組織化学的分析. 第33回日本神経精神薬理学会年会, 奈良, 10月8-10日.
  69. 米山 雅紀, 北山 友也, 米田 幸雄 (2003) 成熟マウス海馬由来神経系前駆細胞の分化能に対するNMDA シグナルの影響. 第33回日本神経精神薬理学会年会, 奈良, 10月8-10日.
  70. 岩本 直子, 伊藤 文昭, 米田 幸雄, 荻田 喜代一 (2003) 高分子熱ショック蛋白質ファミリーの脳内分布. 第33回日本神経精神薬理学会年会, 奈良, 10月8-10日.
  71. 西山 徳人, 新田 有紀, 渡邊 真未, 米田 幸雄, 荻田 喜代一 (2003) マウス海馬におけるトリメチルスズによるJNK/SAPK 経路の活性化. 第46回日本神経化学会, 新潟, 9月24-26日.
  72. 岩本 直子, 山室 晶子, 長嶋 玲子, 前田 定秋, 伊藤 文昭, 米田 幸雄, 荻田 喜代一 (2003) 神経芽細胞腫 SH-SY5Y における小胞体ストレスによる高分子熱ショック蛋白質の発現. 第46回日本神経化学会, 新潟, 9月24-26日.
  73. 荻田 喜代一, 西山 徳人, 渡邊 真未, 米田 幸雄 (2003) カイニン酸によるNrf2/Fos-B 複合体の形成を介するantioxidant-response element 結合の増強. 第46回日本神経化学会, 新潟, 9月24-26日.
  74. 中道 範隆, 神戸 悠輝, 及川 弘崇, 米田 幸雄 (2003) 初代培養神経細胞のインビトロ成熟に伴うNMDA 受容体チャンネル感受性変化. 第46回日本神経化学会, 新潟, 9月24-26日.
  75. 宝田 剛志, 檜井 栄一, 谷浦 秀夫, 米田 幸雄 (2003) 精巣内における特定グルタミン酸シグナリング分子の機能的発現. 第46回日本神経化学会, 新潟, 9月24-26日.
  76. 杉山 千絵, 谷浦 秀夫, 米田 幸雄 (2003) グループ II 型 mGluR シグナルを介するAPI DNA 結合能の調節. 第46回日本神経化学会, 新潟, 9月24-26日.
  77. 玉置 啓祐, 山田 清文, 米山 雅紀, 北山 友也, 米田 幸雄 (2003) イオノトロピック型グルタメイトレセプターの免疫組織化学的検出. 第46回日本神経化学会, 新潟, 9月24-26日.
  78. 米山 雅紀, 北山 友也, 米田 幸雄 (2003) NMDA 受容体による成熟脳海馬由来神経系前駆細胞の分化制御. 第46回日本神経化学会, 新潟, 9月24-26日.
  79. 藤森 さゆ美, 檜井 栄一, 家亦 美佳, 村藤 康裕, 米田 幸雄 (2003) 骨芽細胞におけるGABA トランスポーター. 第46回日本神経化学会, 新潟, 9月24-26日.
  80. 中村 洋一, 北川 貴志, 村上 浩司, 米田 幸雄 (2003) 培養アストロサイトにおける細胞外SOD の発現とその活性. 第46回日本神経化学会, 新潟, 9月24-26日.
  81. 神戸 悠輝, 中道 範隆, 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に対するピルビン酸の防御作用. 第46回日本神経化学会, 新潟, 9月24-26日.
  82. 後藤 康彰, 山田 清文, 平居 貴生, 米田 幸雄 (2003) 海馬由来培養神経細胞成熟に対する持続的磁場曝露の影響.

- 第46回日本神経化学会, 新潟, 9月24-26日.
83. 平居 貴生, 米田 幸雄 (2003) 海馬由来初代培養神経細胞における反復的磁場曝露の保護効果. 第46回日本神経化学会, 新潟, 9月24-26日.
84. 伊藤 実, 大野 博司, 倉本 展行, 杉山 千絵, 谷浦 秀夫, 米田 幸雄 (2003) ラット脳内におけるビタミンD感応性エレメント結合について. 第46回日本神経化学会, 新潟, 9月24-26日.
85. 中道 範隆, 神戸 悠輝, 及川 弘崇, 米田 幸雄 (2003) 大脳皮質由来神経細胞のインビトロ成熟に伴うNMDA受容体脱感作の変化. 日本薬学会北陸支部第1回総会及び第108回例会, 金沢, 7月12日.
86. 平居 貴生, 米田 幸雄 (2003) 初代培養海馬神経細胞における定常磁場曝露によるシグナル受容機構の解析. 日本薬学会北陸支部第1回総会及び第108回例会, 金沢, 7月12日.
87. 米山 雅紀, 米田 幸雄 (2003) 培養神経系前駆細胞に対するNMDAの長期曝露効果. 日本薬学会北陸支部第1回総会及び第108回例会, 金沢, 7月12日.
88. 高野 桂, 米田 幸雄, 中村 洋一 (2003) 低濃度ポリアミンによる培養ミクログリアの細胞死誘導. 日本薬学会北陸支部第1回総会及び第108回例会, 金沢, 7月12日.
89. 杉山 千絵, 谷浦 秀夫, 米田 幸雄 (2003) グループII mGluRを介するAP1 DNA結合能の調節. 日本薬学会北陸支部第1回総会及び第108回例会, 金沢, 7月12日.
90. 伊藤 実, 大野 博司, 谷浦 秀夫, 米田 幸雄 (2003) 中枢神経細胞におけるビタミンDとグルタメイトシグナリングの相互作用. 日本薬学会北陸支部第1回総会及び第108回例会, 金沢, 7月12日.
91. 藤森 さゆ美, 檜井 栄一, 家亦 美佳, 村藤 康裕, 米田 幸雄 (2003) 初代培養骨芽細胞におけるGABAトランスポーターの発現. 日本薬学会北陸支部第1回総会及び第108回例会, 金沢, 7月12日.
92. 土橋 友理子, 檜井 栄一, 王 麗揚, 米田 幸雄 (2003) ビルビン酸による骨芽細胞死保護効果. 日本薬学会北陸支部第1回総会及び第108回例会, 金沢, 7月12日.
93. 宝田 剛志, 檜井 栄一, 大澤 壮登, 米田 幸雄 (2003) 骨芽細胞におけるAMPAレセプターを介したグルタミン酸放出機構. 日本薬学会北陸支部第1回総会及び第108回例会, 金沢, 7月12日.
94. 檜井 栄一, 上嶋 太一, 大橋 亮輔, 米田 幸雄 (2003) 培養骨芽細胞における機能的NMDAレセプターの発現. 日本薬学会北陸支部第1回総会及び第108回例会, 金沢, 7月12日.
95. Taichi Ueshima, Eiichi Hinoi and Yukio Yoneda (2003) The expression of clock genes in bone cells. 1st Joint Meeting of the International Bone and Mineral Society and the Japanese Society for Bone and Mineral Research, Osaka, Japan, June 3-7.
96. Yuriko Tsuchihashi, Sayumi Fujimori, Eiichi Hinoi and Yukio Yoneda (2003) The protective effect of Pyruvate on cell death in cultured osteoblasts. 1st Joint Meeting of the International Bone and Mineral Society and the Japanese Society for Bone and Mineral Research, Osaka, Japan, June 3-7.
97. Sayumi Fujimori, Eiichi Hinoi and Yukio Yoneda (2003) The Expression of GABA transporter system in osteoblasts. 1st Joint Meeting of the International Bone and Mineral Society and the Japanese Society

- for Bone and Mineral Research, Osaka, Japan, June 3-7.
98. Noritaka Nakamichi, Yuki Kambe and Yukio Yoneda (2003) Desensitization of NMDA receptors during in vitro maturation in cultured rat cortical neurons. The 4th International Symposium on Receptor Mechanisms, Signal Transduction and Drug Effects, Fukui, Japan, May 22-24.
  99. Chie Sugiyama, Hideo Taniura and Yukio Yoneda (2003) Signaling through metabotropic glutamate receptors to nuclear activator protein-1 in cultured rat cortical neurons. The 4th International Symposium on Receptor Mechanisms, Signal Transduction and Drug Effects, Fukui, Japan, May 22-24.
  100. Takeshi Takarada, Eiichi Hinoi, Hideo Taniura and Yukio Yoneda (2003) Glutamatergic signaling machineries expressed in rat testis. The 4th International Symposium on Receptor Mechanisms, Signal Transduction and Drug Effects, Fukui, Japan, May 22-24.
  101. Masanori Yoneyama, Tomoya Kitayama and Yukio Yoneda (2003) Expression of functional heteromeric N-Methyl-D-aspartate receptor channels in cultured neural progenitor cells prepared from adult murine hippocampus. The 4th International Symposium on Receptor Mechanisms, Signal Transduction and Drug Effects, Fukui, Japan, May 22-24.
  102. Takao Hirai and Yukio Yoneda (2003) Possible functional alterations induced by sustained magnetism in cultured rat hippocampal neurons. The 4th International Symposium on Receptor Mechanisms, Signal Transduction and Drug Effects, Fukui, Japan, May 22-24.
  103. 西山 徳人, 新田 有紀, 佐藤 素子, 渡邊 真未, 米田 幸雄, 荻田 喜代一 (2003) 海馬歯状回顆粒細胞における有機スズによる SAPK/JNK 経路の活性化. 第 103 回日本薬理学会近畿部会, 福井, 5 月 22 日.
  104. 杉山 千絵, 谷浦 秀夫, 米田 幸雄 (2003) ラット大脳皮質由来初代培養神経細胞における mGluR 活性化の影響. 第 103 回日本薬理学会近畿部会, 福井, 5 月 22 日.
  105. 中道 範隆, 神戸 悠輝, 米田 幸雄 (2003) インビトロ神経細胞成熟に伴う NMDA 受容体脱感作の変化. 第 103 回日本薬理学会近畿部会, 福井, 5 月 22 日.
  106. 宝田 剛志, 檜井 栄一, 米田 幸雄 (2003) ラット精巣におけるグルタミン酸トランスポーターの発現. 第 103 回日本薬理学会近畿部会, 福井, 5 月 22 日.
  107. 檜井 栄一, 藤森 さゆ美, 米田 幸雄 (2003) 骨芽細胞における AMPA レセプターを介するグルタミン酸放出機構. 第 103 回日本薬理学会近畿部会, 福井, 5 月 22 日.
  108. 平居 貴生, 米田 幸雄 (2003) 海馬由来初代培養神経細胞における反復性磁場曝露の治療有効性の解析. 第 103 回日本薬理学会近畿部会, 福井, 5 月 22 日.
  109. 米山 雅紀, 北山 友也, 米田 幸雄 (2003) 成熟マウス海馬由来神経前駆細胞における NMDA シグナルによる分化制御. 第 103 回日本薬理学会近畿部会, 福井, 5 月 22 日.
  110. 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. 第 123 回日本薬学会年会, 長崎, 3 月 27 日.
  111. 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. 日本薬学会第 123 年会, 長崎, 3 月 27 日.
  112. 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

- ドリア遺伝子への結合. 日本薬学会第 123 年会, 長崎, 3 月 27 日.
113. 米山 雅紀, 北山 友也, 米田 幸雄 (2003) カイニン酸投与に伴う NMDA レセプターの海馬内分布変化. 日本薬学会第 123 年会, 長崎, 3 月 27 日.
114. 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. 日本薬学会第 123 年会, 長崎, 3 月 27 日.
115. 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 24-26 日.
116. 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 24-26 日.
117. 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 24-26 日.
118. 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 24-26 日.
119. 中村 洋一, 大巻 深穂, 村上 浩司, 米田 幸雄 (2003) 培養マイ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 24-26 日.
120. 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 回日本薬理学会年会. 第 80 回日本生理学会大会, 福岡, 3 月 24-26 日.
121. 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 回日本薬理学会年会. 第 80 回日本生理学会大会, 福岡, 3 月 24-26 日.
122. 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 24-26 日.
123. 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 24-26 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「D-Serine による骨芽細胞成長制御機構解明に関する研究」  
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:我々はこれまでに、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。中枢神経系において D-Serine は NMDA レセプターの機能調節作用を示す。したがって本研究では D-serine による NMDA レセプター調節作用が骨芽細胞においても存在する可能性について追求した。初代培養骨芽細胞において serine racemase (SR)の mRNA および蛋白質の発現が認められるのに対して初代培養破骨細胞においては検出されなかった。また、培養骨芽細胞における SR の mRNA 発現量は、培養日数が経過するに従い減少した。さらに、初代培養骨芽細胞において D-Ser 添加により、ALP 活性には有意な差は認められなかったが、D-Ser は DCQX による ALP 活性抑制作用に対して、阻害作用を示した。

#### A. 研究目的

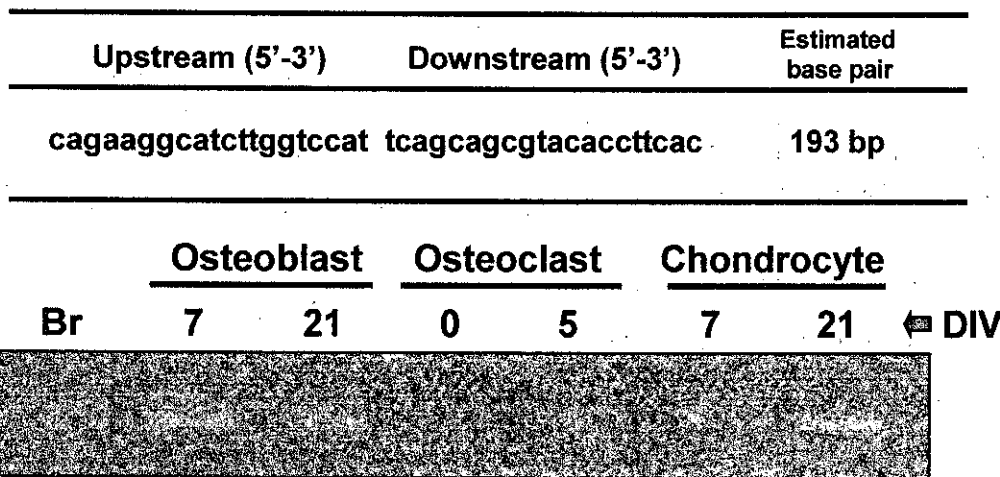
NMDA 受容体は、哺乳動物中枢神経系において記憶の形成等、様々な脳の機能の中心的な働きを担っていることは周知の事実であるが、これに対しアストロサイト中存在する L-Ser は、神経細胞に対し栄養因子として作用するだけでなく、SR により D-Ser に変換されたのち、細胞外に放出されて、NMDA 受容体の Gly site に結合する内在性機能調節因子として機能していることが報告されている。D-Ser は、哺乳類脳において生涯を通じて高い濃度を保つ唯一の D-アミノ酸である。脳内の内在性 D-Ser は、発達に伴って分布

パターンを変化させるが、いずれの時期においても NMDA 受容体と類似した分布を示す。また D-Ser は、Glu の NMDA 受容体に対する様々な作用(脱分極、Ca<sup>2+</sup>流入、NMDA 受容体チャンネル内の phencyclidine 結合部位への放射性リガンド結合の増強、cGMP の産生、GABA やノルアドレナリンをはじめ種々の神経伝達物質の放出、培養神経細胞死)を増強する事が報告されている。脳組織には、L-Ser から D-Ser を生合成する SR 活性が認められるのに対し、D-Ser を分解する酵素としては D-amino acid oxidase (DAO)

が知られており、内在性 D-Ser 濃度と逆相関する分布を持つ。上述した D-Ser による NMDA 受容体の機能調節作用が *in vivo* においても重要である事は、D-Ser が、①精神分裂病症状発現薬が引き起こす行動および脳内神経活動の異常、②精神分裂病患者の症状、③小脳変成モデルマウスの小脳性失調、などを改善する事から推測される。

本研究においては、中枢神経系において認められる D-Serine による NMDA 受容体の機能調節作用が、機能的な NMDA 受容体の発現が認められる骨芽細胞においても認められるのではないかとの仮説を立て以下の解析を進めるとともに、D-Ser が他の骨関連細胞に与える影響についても同時に解析を行った。

## RT-PCR (Serine racemase)



**Br: Whole Brain**

**Fig. 1. Expression of mRNA for SR in rat brain, cultured osteoblasts, osteoclasts and chondrocytes.**

mRNAs were extracted from rat whole brain, osteoblasts cultured for 7 to 21 DIV, osteoclasts cultured for 0 to 5 DIV and chondrocytes cultured for 7 to 21 DIV, followed by RT-PCR using specific primers for SR. The experiments were repeated at least three times using different samples with similar results.

### B. 研究方法

生後 1-2 日齢の Wistar 系新生仔ラットを断頭し、頭蓋骨皮膚を剥離したのち、

後頭骨部分を除いた頭蓋骨前頭部を GPBS (5.5 mM g lucose を含む PBS) 中

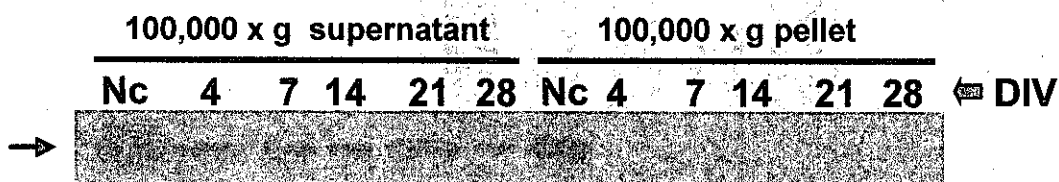
へ摘出した。摘出後の頭蓋骨から付着した血球や髄膜を除去後、GPBS で洗浄した。頭蓋骨を酵素溶液(0.2 % collagenase を含む $\alpha$ MEM) 10 mL 中で 37°C、5 分間攪拌させ細胞を分散後、細胞浮遊画分を吸引除去した。この処理をもう一度繰り返した後、新しい酵素溶液 10 mL を添加し 37°C、10 分間攪拌後、細胞浮遊画分を回収した。同様の攪拌操作をさらに 3 回繰り返し、それぞれの細胞浮遊画分を回収した。回収画分を細胞ろ過用フィルターでろ過し、ろ液を 250g、5 分間遠心分離後、得られた沈渣を 10 % FBS- $\alpha$ MEM で懸濁したのち、 $2.5 \times 10^3$  cell/cm<sup>2</sup> の密度で各プレートに播種した。細胞調製の翌日には、メディウムを 50  $\mu$ g/mL ascorbic acid、5 mM  $\beta$ -glycerophosphate および各種培養

試薬を含む 10 % FBS- $\alpha$ MEM に交換し、この時点を経験 0 日目とした。培養メディウムは 1 日おきに交換し、最大 28 日目まで細胞を培養した。

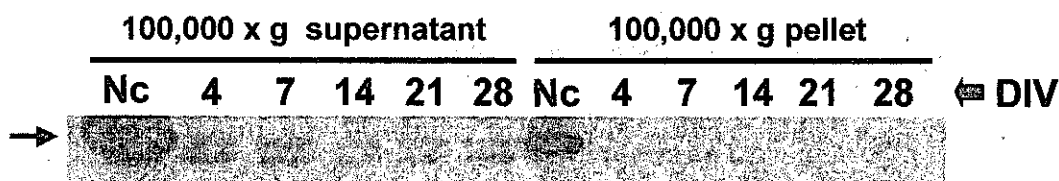
各日数培養した細胞を、GPBS で 2 回洗浄したのち、Lysis buffer (0.1 M Tris-HCl (pH7.5); 0.1% Triton X-100) 500 $\mu$ L 中で細胞を超音波破碎した。細胞破碎液 10 mL と Assay buffer(0.05 M 2-amino-2-methyl-1-propanol; 2 mM MgCl<sub>2</sub>; 10 mM p-nitrophenyl phosphoric acid) 200 $\mu$ L を混合し、37°C で 30 分間反応させた。反応後、直ちに 405 nm の吸光度を測定した。また、細胞破碎液の蛋白量を Bio-Rad protein assay reagent (Biorad 社)を用いて測定し、蛋白および反応時間あたりの活性を求めた。

## Western blotting (Serine racemase)

### Primary osteoblast



### MC3T3-E1



**Fig. 2. Expression of protein for SR in cultured osteoblasts.**

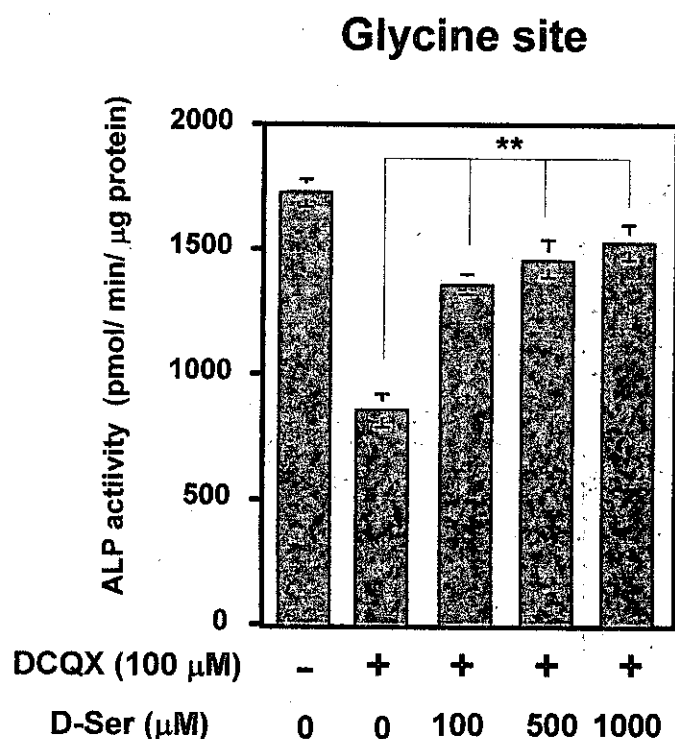
Osteoblasts cultured for 4, 7, 14, 21 and 28 DIV were subjected to determination of expression of SR on immunoblotting assays using antibodies against SR.

### C. 研究結果

骨組織に存在する各種細胞(骨芽細胞、軟骨細胞および破骨細胞)におけるSRのmRNA発現を検討するため、SR特異的なプライマーを用いたRT-PCR法により検討した。その結果、全脳標品だけでなく、培養7日目と21日目の骨芽細胞および培養21日目の軟骨細胞において、SRのmRNA発現が認められた。しかしながら、破骨細胞や、あるいは培養初期の軟骨細胞においては、mRNA発現が認

められなかった (Fig. 1)。

次に抗SR抗体を用いたwestern blotting法により、初代培養骨芽細胞および骨芽細胞株であるMC3T3-E1におけるSRの蛋白質発現を検討した。その結果、初代培養骨芽細胞とMC3T3-E1の両方において、100,000x gで遠心分離した上清に、SR蛋白質発現が認められたが、その沈査にはほとんど発現が認められなかった (Fig. 2)。



**Fig.3. ALP activity in osteoblasts cultured with D-Ser in either the presence or absence of DCQX.**

Osteoblasts were cultured with D-Ser in either the presence or absence of 100  $\mu$ M DCQX for 28 DIV, followed by determination of the activity of ALP. Values represent the mean $\pm$ S.E. obtained from six different experiments. \* $P$ <0.05, significantly different from each control value obtained in the presence of DCQX alone.