

D-Ser の骨芽細胞成熟化に対する影響を検討するため、培養0日目から14日目まで D-Ser を、100 $\mu$ M から 1mM の濃度範囲で培養骨芽細胞に対して持続的に暴露したのち、培養14日目において ALP 活性を測定した。この際、D-Ser の光学異性体である L-Ser についても同様の解析を行った。その結果、D-Ser と L-Ser とともに、骨芽細胞における ALP 活性には著明な変化を与えなかった。次に、培養骨芽細胞に発現する NMDA 受容体の Gly site に対する D-Ser の影響を検討するため、D-Ser 存在下あるいは非存在下において、培養0日目から28日目まで Gly site blocker である 5,7-dichlorokynurenic acid (DCQX) を 100  $\mu$ M の濃度で培養骨芽細胞に対して持続的に暴露したのち、培養28日目の ALP 活性を測定した。その結果、DCQX を28日間持続的に培養骨芽細胞に暴露した場合、ALP 活性が有意に抑制されることが明らかとなり、更にこれに対して D-Ser は、DCQX による ALP 活性の抑制効果を有意に回復させた (Fig. 3)。

#### D. 考察

本章における重要な知見は、培養骨芽細胞に D-Ser 合成酵素である SR が存在し、骨芽細胞自身が合成した D-Ser が、骨芽細胞に発現する NMDA 受容体の内在性機能修飾因子として機能する可能性が示された事である。ALP は活動期の骨芽細胞に発現が多く認められ、石灰化開始部位である基質小胞において、有機リン酸エステル分解により無機リン酸塩濃度を高めることや、あるいはヒドロキ

シアパタイト結晶の形成を阻害するピロリン酸を分解することにより、石灰化を促進して骨形成を促進すると考えられている。ALP のノックアウトマウスが、血中および尿中の Ca と P に異常を認めることなく、くる病様の症状を示すことから、ALP は骨石灰化において重要な役割を果たすものと考えられる。また、基質小胞は骨芽細胞が産生する基質中で Ca および無機リン酸を取り込んでリン酸カルシウムを形成する。石灰化は、リン酸カルシウムがヒドロキシアパタイトとして沈着する現象と理解されるので、リン酸カルシウム沈着は骨芽細胞石灰化の指標となる。本研究結果において、骨芽細胞における ALP 活性が、NMDA 受容体の Gly site に対する阻害剤である DCQX により著明に抑制され、これに対して D-Ser が回復効果を示した事は、D-Ser が NMDA 受容体の Gly site に結合して骨石灰化を促進すること、更に言えば、骨形成を促進する可能性を示唆するものである。Cbfa1 は骨形成における骨芽細胞分化のマスターレギュレーター転写制御因子であり、Cbfa1 の欠損により骨形成が抑制され、その heterozygous mutation においても鎖骨頭蓋形成不全症を引き起こす。骨芽細胞に対する NMDA 受容体の阻害剤 MK801 の持続暴露は、Cbfa1 の DNA 結合能に加え、mRNA および蛋白質発現を有意に抑制する事を考えると、NMDA 受容体活性化は、Cbfa1 を介して骨芽細胞分化に対して促進的に作用する事が考えられる。この事は D-Ser が NMDA 受容体活性化を介して Cbfa1 を調節する可能性を強く示唆するもので

あり大変興味深い。また MK801 によるリン酸カルシウム蓄積の抑制作用が、骨芽細胞の培養初期においてのみ認められる事を考えると、D-Ser が骨芽細胞分化の初期において、NMDA 受容体の内在性機能調節因子として重要な生理学的作用を示す可能性が強く示唆される。この事は、骨芽細胞における SR の mRNA 発現は培養初期に高く、その後培養日数を重ねるにつれて減少傾向を示した事からも示唆される。以上の仮説を立てる上でひとつの矛盾点が存在する。それは、D-Ser の単独暴露において、骨芽細胞の ALP 活性に変化が認められなかった事である。この事は、培養メディウムの組成に起因するのではないかと考えている。今回用いた培養メディウムである  $\alpha$ MEM 中には約  $500\mu\text{M}$  の Glu と約  $400\mu\text{M}$  の Gly とが存在している。つまり、骨芽細胞に発現している NMDA 受容体は D-Ser 添加前から活性化状態であるため、D-Ser を入れたところで骨芽細胞の機能変化は生じなかったのではないかと。つまり、この活性化状態を抑制する物質、今回であれば DCQX を添加した場合に骨芽細胞の機能変化が現れ、D-Ser が回復効果を示した、と考えられるのではないだろうか。今後は、Glu や Gly の入っていない条件下で D-Ser の骨芽細胞に与える影響を解析していきたい。

#### E. 結論

1. 初代培養骨芽細胞には SR の mRNA および蛋白質の発現が認められる。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する。

2. 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。これに対して D-Ser は DCQX による ALP 活性抑制作用に対して、阻害作用を示す。
3. 以上の結果から、骨芽細胞においては D-serine はオートクラインあるいはパラクラインのように局所的因子として NMDA レセプターを介して骨芽細胞の成長を制御している可能性が示唆される。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Katsura Takano, Yoichi Nakamura and Yukio Yoneda (2003) Microglial cell death induced by a low concentration of polyamines. *Neuroscience* 120, 961-967.
2. Koji Murakami, Yoichi Nakamura and Yukio Yoneda (2003) Potentiation by ATP of lipopolysaccharide-stimulated nitric oxide production in cultured astrocytes. *Neuroscience* 117, 37-42.
3. 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.

##### 2. 学会発表

1. 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マイ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.
2. 高野 桂, 小椋 正人, 中村 洋一, 米田 幸雄 (2004) ラット脳由来培養マイ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.
3. 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マイ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.
4. 中村 洋一, 大巻 深穂, 村上 浩司, 米田

4. 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.



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「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」  
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：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報告した。本年度は、骨芽細胞において代謝調節型 Glu レセプター(mGluR)の発現を検討するとともにその機能解析を試みた。その結果、グループⅢ型の mGluR の発現が恒常的に認められた。また、フォルスコリンによる cAMP 上昇をグループⅢ型 mGluR アゴニストである L-AP4 が有意に阻害した。この阻害作用はアンタゴニスト CPPG により拮抗された。さらに parathyroid hormone による AP1/DNA 結合能上昇を L-AP4 は有意に阻害した。

#### A. 研究目的

現在のところ mGluR には 8 種類のサブタイプが存在することが知られている。さらに、mGluR はアゴニスト感受性の違い、薬理学的特性あるいは共役する細胞内セカンドメッセンジャーの違いなどにより 3 種のグループに分類される。すなわち、グループ I 型は、mGluR1 および mGluR5 のサブタイプであり、ホスホリパーゼ C 活性化によるイノシトールリン酸代謝回転亢進と細胞内  $Ca^{2+}$  濃度上昇を引き起こす。このグループ I 型 mGluR に対しては、quisqualic acid が最も高い親和性を示すが、その他にも (S)-3,5-DHPG および、trans-ACPD が、グループ I 型 mGluR の

高親和性アゴニストである。一方、グループ II 型(mGluR2 および mGluR3)およびグループ III 型(mGluR4, mGluR6, mGluR7 および mGluR8)は、いずれもアデニル酸シクラーゼ阻害を介して cAMP 産生を抑制する。グループ II 型および III 型の高親和性アゴニストとして、それぞれ DCG-IV、および L-AP4 が知られている。

中枢神経系において mGluR が様々な生理学的あるいは病理学的な状況に関与していることは周知の事実であるが、末梢組織における機能的 mGluR 発現についてもいくつか報告されている。膵臓 $\alpha$ 細胞に発現する mGluR8 が glucagon 分泌

を制御し、また膵臓β細胞に発現する mGluR3 あるいは mGluR5 が insulin 分泌を制御している。松果体に発現する mGluR3 は melatonin 合成を負に制御している。また、ラットおよび human の精巣においてイノシトール代謝回転亢進を引き起こす group I 型 mGluR の発現が確認されている。一次感覚求心性神経終末に group I 型および II 型 mGluR が発現しており、これらがさまざまな痛覚受容の調節に関与している。ラット肝細胞に mGluR5 が発現しており、そのレセプターを阻害することによって低酸素障害に対する耐性を示す。味蕾細胞に発現する mGluR4 が iGluR とともに甘み感受に関与している。さらには胸腺細胞、ケラチノサイト、あるいはメラノサイトなどにも mGluR の発現が認められている。

一方、骨組織における GluR の発現に関しは、前章にも述べたように iGluR を中心に解析されており、骨芽細胞あるいは破骨細胞での機能的 mGluR 発現に関しては十分明らかとなっていないのが現状である。したがって、本章ではラット頭蓋骨由来初代培養骨芽細胞における mGluR の機能的発現の可能性について検討した。

## B. 研究方法

生後 1-2 日齢の Wistar 系新生仔ラットを 70 % ethanol で消毒後に断頭し、頭蓋骨皮膚を剥離し、後頭骨部分を除いた頭蓋骨を phosphate buffer saline (PBS) 中へ摘出した。付着した血球や髄膜を除去し、PBS で洗浄した。頭蓋骨を酵素溶液(0.1 %

collagenase および 0.25 % trypsin を含む PBS) 10 mL 中で 37°C、5 分間攪拌後、細胞浮遊画分を吸引除去した。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 10 % fetal bovine serum (FBS)-α Minimum Essential Medium (αMEM) 中へ回収した。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。回収した画分を細胞ろ過用フィルターでろ過し、ろ液を 250g、5 分間遠心後、沈渣を 10 % FBS-αMEM で懸濁し、 $1 \times 10^4$  cell/cm<sup>2</sup> の密度で各プレートにはん種した。翌日、メディウムを 50μg/mL ascorbic acid および 5mM β-glycerophosphate を含む 10% FBS-αMEM へ交換し、この時点を培養 0 日目とした。1 日おきにメディウムを交換し最大 28 日目まで培養した。

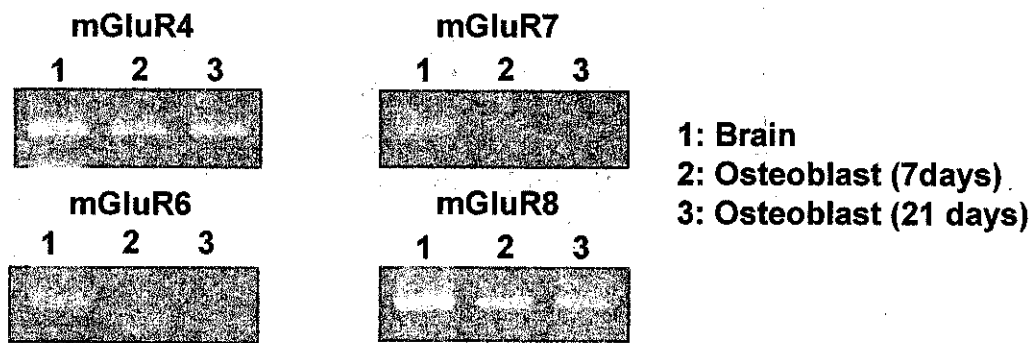
また、培養 7 日および 21 日目の細胞から mRNA を抽出し、mGluR を特異的に認識するプライマーを用いて RT-PCR を行った。

培養 7 日目および 21 日目の初代培養骨芽細胞を PBS で 2 回洗浄した後、1 mM 3-isobutyl-1-methyl-xanthine (IBMX) を用いて 37°C、20 分間反応させた。1 mM IBMX 存在下で各試薬を 37°C、10 分間反応させ cAMP enzymeimmunoassay kit (Amersham) を用いて cAMP 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。

## Metabotropic glutamate receptors (group III)

Subunit	Upstream (5'-3')	Downstream (5'-3')	Estimated base pair
mGluR4	TCATTTTCTCTCTGTTCCC	GACATGCTACACATCAGAGAC	340
mGluR6	CAAGTAGCAAGGTTGAGTGT	GGTTGTAGTGTGGATCAAG	363
mGluR7	GAACTCTGTGAAAATGTAGACC	TTAGGGAGTCCAGAATTACAG	321
mGluR8	CGAGGGTTATACTACCAGGT	TAGGTGCTGTGACAGATTCT	440

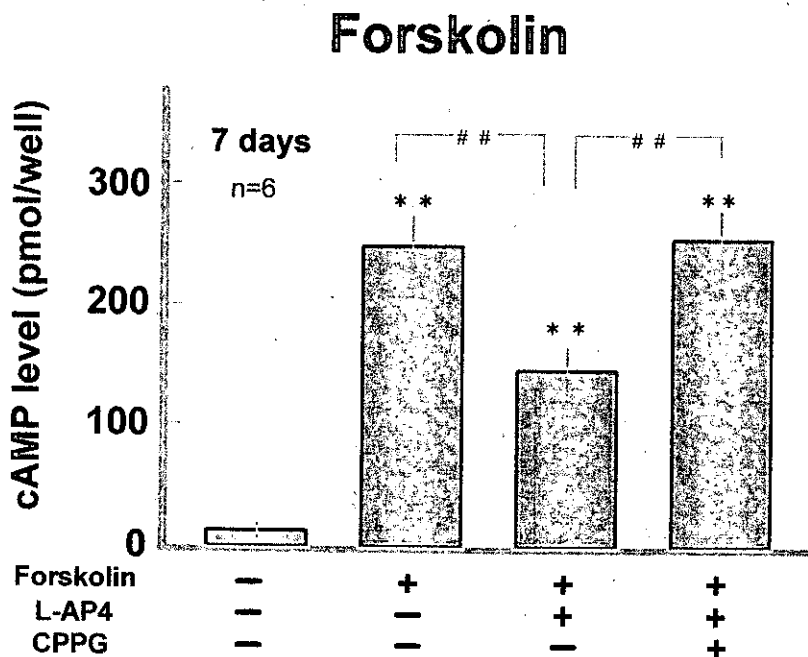


**Fig. 1. Expression of mRNAs for mGluR in rat brain and cultured osteoblasts.** mRNAs were extracted from rat whole brain and osteoblasts cultured for 7 and 21 DIV, followed by RT-PCR using specific primers for each group III mGluR. The experiments were repeated at least three times using different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

### C. 研究結果

初代培養骨芽細胞における mGluR の mRNA 発現を検討するため、group I 型である mGluR1 および mGluR5、group II 型である mGluR2 および mGluR3、そして group III 型である mGluR4、mGluR6、mGluR7 および mGluR8 についてそれぞれ特異的に認識するプライマーを用いた、RT-PCR 法による解析を行った。その結果、group I 型および group II 型の mRNA

は7日目および21日目のいずれの培養日数においても検出することができなかった。これに対して、group III 型である mGluR4 および mGluR8 の mRNA は7日目および21日目とともに発現していることが明らかとなった(Fig. 1)。また、これらレセプターの発現は sequencing により確認を行った。



**Fig. 2. Effects of group III mGluR agonist on forskolin-induced cAMP accumulation.** Osteoblasts were cultured for 7 DIV and then incubated with IBMX at 1 mM for 20 min, and subsequently with forskolin at 10  $\mu$ M in either the presence or absence of L-AP4 at 1 mM for 10 min, followed by determination of cAMP levels. CPPG was also added as needed at 2 mM. Values represent the mean  $\pm$  S.E. obtained from six different determinations. \*\* $P < 0.01$ , significantly different from each control value obtained in the presence of IBMX alone. ## $P < 0.01$ , significantly different from the value obtained in the presence of both forskolin and L-AP4. cAMP levels (pmol/well): control, 11.2  $\pm$  1.2; forskolin, 255.1  $\pm$  27.6; L-AP4/forskolin, 156.9  $\pm$  20.8; CPPG/ L-AP4/forskolin, 268.5  $\pm$  24.3.

次に培養骨芽細胞におけるグループIII型 mGluR の機能的発現をセカンドメッセンジャーである cAMP 応答性を指標に検討した。培養 7 日目においてホスホジエステラーゼ阻害剤である IBMX 存在下では cAMP は 11.2  $\pm$  1.2 pmol/well を示した。Forskolin 10  $\mu$ M 添加により cAMP は有意に上昇したが (255.1  $\pm$  27.6 pmol/well)、group III mGluR アゴニストである L-AP4 を 1 mM 添加することによりこの上昇は有意に抑制された (156.9  $\pm$  20.8 pmol/well)。

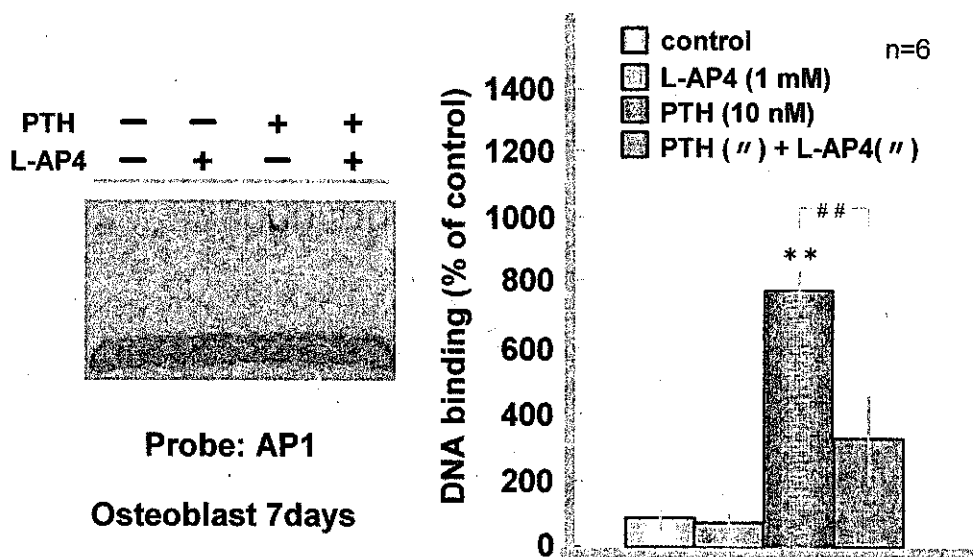
さらにこの L-AP4 の作用は group III mGluR アンタゴニストである CPPG の 2 mM 添加により有意に抑制された (268.5  $\pm$  24.3 pmol/well) (Fig. 2)。同様に PTH の影響について培養 7 日目および 21 日目において検討した。その結果、両培養日数において PTH 10 nM 添加により cAMP は有意に上昇し (7 日目: 845.0  $\pm$  61.3 pmol/well、21 日目: 1553.8  $\pm$  316.8 pmol/well)、L-AP4 はこの上昇を有意に抑制した (7 日目: 452.1  $\pm$  40.3 pmol/well、21 日



目:1120.8±181.8 pmol/well)。さらにこの L-AP4 の作用は CPPG の 2 mM 添加により有意に抑制された(7 日目:968.7±54.7

pmol/well、21 日目 :1811.2±303.5 pmol/well)。

### PTH/L-AP4 stimulation



**Fig. 3. Effect of L-AP4 on PTH-induced potentiation of AP1 DNA binding activity.** Calvarial osteoblasts were cultured for 7 DIV, followed by incubation with PTH at 10 nM in either the presence or absence of L-AP4 at 1 mM for 2 h and subsequent preparation of nuclear extracts for determination of AP1 DNA binding activity on gel shift assays. Typical autoradiograms are shown in the left panel where each lane shows a sample from one well on the culture plates, while densitometric percentages are shown in the right panel where each value represents the mean±S.E. obtained from six different determinations. \*\*P<0.01, significantly different from the value obtained in the absence of any added stimulants.

次に L-AP4 による cAMP 上昇抑制作用に対する pertussis toxin (PTX) の影響について検討した。細胞を 1 μM の PTX 存在下あるいは非存在下で 12 時間前処理した後、forskolin あるいは PTH 存在下で L-AP4 刺激をおこなった。その結果、PTX 前処理は forskolin あるいは PTH 刺激による cAMP 上昇に有意な影響は与えなかったのに対して、forskolin あるいは PTH 刺

激で誘導される cAMP 上昇に対する L-AP4 の抑制効果を有意に阻害した。培養 7 日目において PTH を 1 nM から 100 nM までの範囲で添加した後、2 時間後に細胞を回収して、API の DNA 結合能を測定した。その結果、PTH 添加により API DNA 結合能は濃度依存的に有意に上昇した。したがって次に、PTH 10 nM 刺激による API DNA 結合能上昇に対す

るグループⅢ型 mGluR アゴニストの影響について検討した。L-AP4 を 1 mM 添加し 2 時間後に DNA 結合能を測定した場合、API DNA 結合能に有意な変化はみられなかった。一方、PTH 10 nM 添加により API DNA 結合能は約 8 倍上昇したが、PTH/L-AP4 同時添加によりその上昇は有意に抑制された (Fig. 3)。

#### D. 考察

本章における重要な知見は初代培養骨芽細胞においていずれの細胞ステージにかかわらず group III mGluR の mGluR4 および mGluR8 の mRNA が共に発現しており、それはセカンドメッセンジャーである cAMP 応答性を示す、ということであり、我々の知る限りこれは mGluR を介した cAMP 生成調節機構が骨芽細胞の成長に関与する可能性を示した最初の報告であろう。

ラット大腿骨由来初代培養骨芽細胞には mGluR1 が発現しており、trans-ACPD は NMDA 誘導性細胞電流を減弱させる事が報告されている。この報告は、本研究で我々が示した mGluR の mRNA 発現プロファイリングと一致しないものと思われる。現在までに mGluR1 には少なくとも mGluR1a から mGluR1d までの 4 つのサブタイプが報告されている。しかしながら今回使用したプライマーは mGluR1a を選択的に認識するものである。したがって、このような矛盾は mGluR1 のサブタイプを考慮に入れると説明がつくかもしれない。一方 mGluR4 発現に関しても以前の報告と矛盾するが、これは大腿骨由来骨芽細胞

と頭蓋骨由来骨芽細胞では特定の GluR 発現が異なっているという可能性が提唱される。実際、大腿骨由来骨芽細胞は動的機械的圧力を加えることにより glucose 6-phosphate dehydrogenase 活性を上昇させるのに対して、頭蓋骨由来骨芽細胞ではこのような上昇は示さない。また、形態形成に関与する Indian hedgehog (Ihh) は PTH-related protein の分泌を制御することで軟骨分化を調節している事が知られているが、骨形成に関しては Ihh ノックアウトマウスでは頭蓋骨などの膜性骨化からなる部分は正常であるのに対して、内軟骨性骨化からなる長管骨の骨芽細胞の分化抑制が見られる。しかしながら、異なる発現プロファイルはもちろん異なる実験条件によるものであるという可能性は否定できない。

本研究で我々が行った条件下では mGluR アゴニストあるいはアンタゴニスト添加が成熟化マーカーであるカルシウム蓄積に有意な変化を与えなかった。Forskolin あるいは PTH は骨芽細胞の増殖あるいは分化に対して、細胞成熟度に応じて異なる作用を示すことが知られている。PTH は未分化な骨芽細胞の分化を特異的に促進するが、より成熟した骨芽細胞には負の制御をする。未分化間葉系細胞株 C3H10T1/2 細胞を用いた bone morphogenetic protein 依存性分化系においても同様な報告が見られる。さらに *in vitro* の系において PTH の骨芽細胞に対する作用にはその作用時間が重要である事も報告されている。したがって mGluR アゴニストやアンタゴニストを細胞分化期あるいは成熟化期特異的に作用させる

事やあるいは作用時間を限定して暴露させる必要もあると思われる。さらには prostaglandin E2やPTHなどのcAMP形成を介して骨芽細胞の成長を制御している因子とのクロストークも想定すべきであろう。

#### E. 結論

1. 初代培養骨芽細胞において mGluR4 および mGluR8 の mRNA 発現が観察された。
2. フォルスコリンによる cAMP 上昇は mGluR グループⅢ型アゴニストである L-AP4 により有意に抑制された。また、この L-AP4 による抑制はアンタゴニスト CPPG により回復した。
3. L-AP4 による cAMP 生成抑制作用は PTX 前処置により阻害された。
4. PTH による AP1 上昇を L-AP4 は有意に阻害した。
5. 以上の結果から、骨芽細胞においてはセカンドメッセンジャーである cAMP およびサードメッセンジャーである AP1 に応答性をしめず代謝調節型の GluR が存在する可能性が示唆される。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. 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.
2. 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.

3. 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.
  4. 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.
  5. 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]sepermidine in nuclear fractions of murine brain. *Brain Res.* 981, 78-84.
  6. 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.
  7. Nobuyuki Kuramoto, Katsuhiro 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.
- ##### 2. 学会発表
1. 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.
  2. 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.

3. 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.
4. 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.
5. 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.

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「骨芽細胞生存決定因子探求に関する研究」  
分担研究者：荻田 喜代一 (摂南大学薬学部・助教授)

研究要旨：骨芽細胞の生存決定要因の追究は、骨粗鬆症をはじめとする代謝性骨疾患の発症原因解明研究のみならず、治療方法開発研究のうえでも、極めて大きな病態生理学的意義を持つと推察される。よって、本研究では初代培養骨芽細胞を用いて、培養メディウム交換により引き起こされる細胞死について多面的解析を行った。初代培養骨芽細胞および骨芽細胞株 MC3T3-E1 において培養液を  $\alpha$  MEM から DMEM に交換する事により、著明な細胞生存率低下が認められた。さらにこの培養液交換にともなう細胞生存率低下は培養初期においてのみ観察された。次にこの原因を培養液中の成分の相違から検討したところ、DMEM にピルビン酸あるいはシステインを添加した培養液を用いた場合、培養液交換に伴う細胞生存率低下はほとんど認められなかった。

#### A. 研究目的

骨芽細胞は、繊維芽細胞、筋細胞、脂肪細胞および軟骨細胞と共通の未分化間葉系幹細胞を起源とする細胞で、骨形成において中心的な役割を果たしている。骨芽細胞系の細胞はその分化段階に応じて破骨細胞の分化・機能の調節、基質タンパク質や増殖因子およびサイトカインの産生・分泌、骨基質の石灰化など多様な機能を営んでいる。また、骨芽細胞は parathyroid hormone (PTH)、活性型 Vitamin D [1,25(OH)<sub>2</sub>D]、estrogen などのホルモンや各種の増殖因子・サイトカインの受容

体を発現しており、内分泌 (endocrine)、傍分泌/自己分泌 (paracrine/autocrine)、細胞内分泌 (intracrine) などの様式によりきわめて多様な調節を受けている。

骨組織においてアポトーシスは胎児期の四肢形態形成、骨格の成熟化、骨折治療過程、骨再生過程あるいは骨の代謝回転などさまざまな状況で重要な役割を演じていることが明らかとなっている。骨組織リモデリング過程には皮質骨と海綿骨において主に骨芽細胞と破骨細胞の 2 つの異なる細胞のカップリングが関与しており、破骨細胞による骨吸収と骨芽細

胞による骨形成の平衡関係はとても繊細に調節されている。そしてそのわずかな平衡関係の破綻が骨量減少やあるいは反対に骨量増加を引き起こす。リモデリング過程における骨形成の開始は前骨芽細胞の吸収面への定着とそれに引き続いて起こる増殖、分化過程からなり、それらは厳重に制御されている。したがって骨芽細胞の増殖、分化あるいはアポトーシスの平衡関係は骨芽細胞のポピュレーションサイズを決めうる大きな要因となりうる。

Glucocorticoid 過剰による骨粗鬆症では骨形成の低下と骨壊死が起こるが、これには骨髄間質細胞からの骨芽細胞および骨細胞形成の低下だけでなく、両細胞のアポトーシスの増加も大きな原因であることが明らかとなっている。また、骨粗鬆症の新たな治療薬として間歇的PTH投与が近年注目されているが、骨組織へのPTHによるアナボリック効果は骨芽細胞数を増加させるのではなく骨芽細胞のアポトーシスを抑制することが大きく貢献していることが明らかとなっている。さらにマウス初代骨芽細胞と数種の株化骨芽細胞を用いた *in vitro* での研究により、glucocorticoid 存在下によるアポトーシスがPTHにより有意に抑制される。また、PTHだけでなく bisphosphonate と calcitonin に関しても *in vitro* の系により、glucocorticoid 誘導性アポトーシスを有意に抑制する。

骨細胞は骨芽細胞が骨形成に際して自ら分泌した細胞外基質中に囲まれ、分化の過程で細胞突起を発達させ増殖能を失った細胞であるが、同細胞はマクロファージなどがアクセスしがたいため、アポトーシスを起こしてもすぐには除去されず骨小腔に痕跡がのこるのに対して、骨芽細胞はアポトーシスを起こしすぐに除去され観察されない可能性が高い。さらに局所的な骨細胞のアポトーシスは病因

となりうるため症例として観察されてきた。1977年に Parfitt らがアポトーシスのメカニズムは骨細胞と骨芽細胞に共通であり、計算上大部分の骨芽細胞は骨形成の途中で消失すると述べているが、上述のような報告はされているものの、これまで骨芽細胞におけるアポトーシスはあまり注目されていなかった。

したがって、骨芽細胞の生存決定要因の追究は、骨粗鬆症をはじめとする代謝性骨疾患の発症原因解明研究のみならず、治療方法開発研究のうえでも、極めて大きな病態生理学的意義を持つと推察される。よって、本研究では初代培養骨芽細胞を用いて、培養メディアウム交換により引き起こされる細胞死について多面的解析を行った。

## B. 研究方法

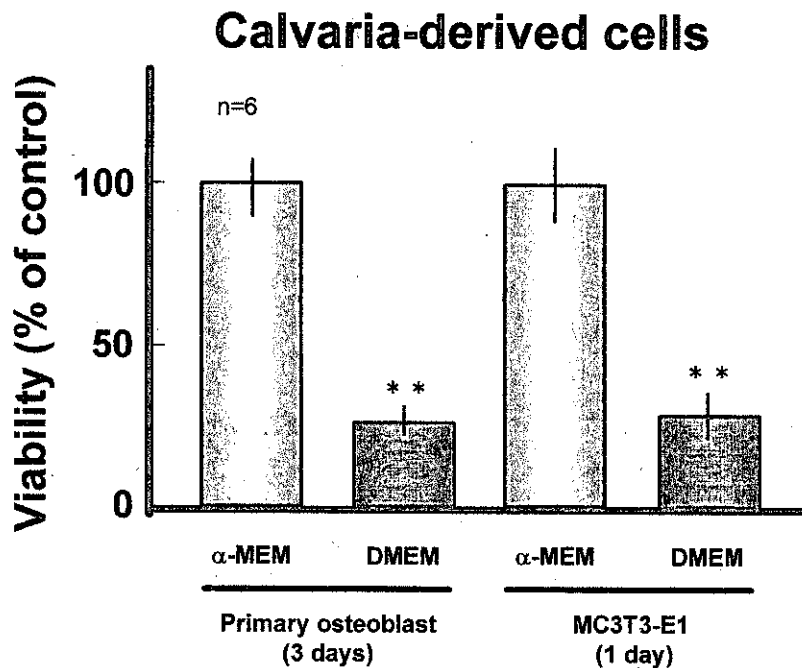
生後 1-2 日齢の Wistar 系新生仔ラットを 70 % ethanol で消毒後に断頭し、頭蓋骨皮膚を剥離し、後頭骨部分を除いた頭蓋骨を phosphate buffer saline (PBS) 中へ摘出した。付着した血球や髄膜を除去し、PBS で洗浄した。頭蓋骨を酵素溶液 (0.1 % collagenase および 0.25 % trypsin を含む PBS) 10 mL 中で 37°C、5 分間攪拌後、細胞浮遊画分を吸引除去した。新しい酵素溶液 10 mL を添加し 37°C、10 分間攪拌後、細胞浮遊画分を 10 % fetal bovine serum (FBS)- $\alpha$  Minimum Essential Medium ( $\alpha$ MEM) 中へ回収した。同様の攪拌操作をさらに 3 回繰り返す、それぞれの細胞浮遊画分を回収した。回収した画分を細胞ろ過用フィルターでろ過し、ろ液を 250g、5 分間遠心後、沈渣を 10 % FBS- $\alpha$ MEM で懸濁し、 $1 \times 10^4$  cell/cm<sup>2</sup> の密度で各プレートにはん種した。翌日、メ

ディウムを 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ascorbic acid および 5 mM  $\beta$ -glycerophosphate を含む 10 % FBS- $\alpha$ MEM へ交換し、この時点を培養 0 日目とした。1 日おきにメディアウムを交換し最大 28 日目まで培養した。

各培養日数経過後に細胞培養メディアウムを目的の化合物を含む 10 % FBS-DMEM に交換した。各時間経過後に

メディアウムを 10 % FBS- $\alpha$ MEM に交換し、cell counting kit-8 (DOJINDO)を添加後一定時間経過後に、450 nm の吸光度を測定した (参照波長 650 nm)。

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した。



**Fig. 1. Effect of medium change to DMEM on survivability of different cultured cells.** Rat calvarial osteoblasts were cultured in  $\alpha$ MEM for 3 DIV and mouse calvarial MC3T3-E1 cells for 1DIV, respectively. Culture medium was exchanged to  $\alpha$ MEM or DMEM, followed by determination of vital cell numbers 12 h after exchange. Values represent the mean $\pm$ S.E. obtained from six different determinations. \*\* $P < 0.01$ , significantly different from each control value obtained in cultured cells with exchange to  $\alpha$ MEM.

### C. 研究結果

培養メディアウムを DMEM へ交換することによって引き起こされる細胞生存率の変化を初代培養骨芽細胞、MC3T3-E1、

ST2 および初代培養軟骨細胞を用いて検討した。初代培養骨芽細胞および初代培養軟骨細胞は $\alpha$ MEMで3日間、MC3T3-E1

細胞は $\alpha$ MEMで1日間そしてST2細胞はRPMI1640で1日間培養した後、各細胞のメディウムをDMEMに交換し、その12時間後に細胞生存率を測定した。その結果、初代培養骨芽細胞およびMC3T3-E1の両細胞では共にDMEMへのメディウム交換により $\alpha$ -MEMへの交換と比較して細胞生存率は約75%減少した(Fig.1)。これに対してメディウム交換に伴う細胞生存率低下はST2細胞および初代培養軟骨細胞では認められなかった。

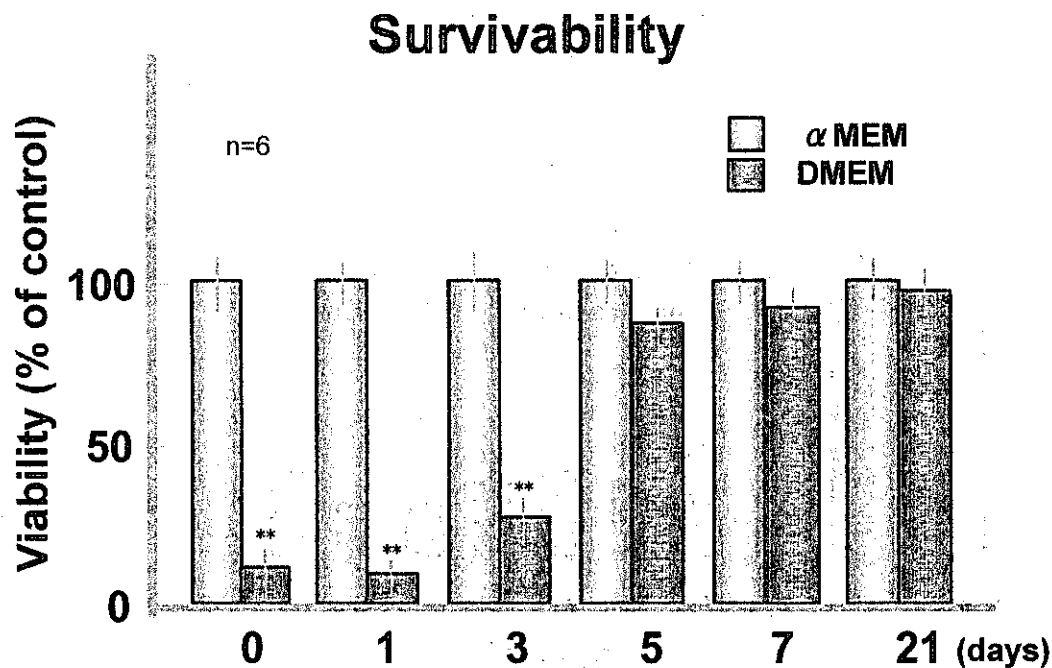
初代培養骨芽細胞において培養液交換によって引き起こされる細胞生存率低下が培養日数に依存するかどうかを検討するため、細胞を0日間から最大21日間 $\alpha$ MEM中で培養した後、メディウムをDMEMに交換し、その12時間後に細胞生存率を測定した。その結果、培養開始後3日目までの初代培養骨芽細胞では、培養メディウムを $\alpha$ MEMからDMEMに交換すると、その12時間後には骨芽細胞の生存率は著明に減少した。これに対して、5日間以上 $\alpha$ MEM中で培養した細胞では、培養液をDMEMに交換しても12時間後の細胞生存率は著変を示さなかった(Fig. 2)。

培養0、1および3日間までの初代培養骨芽細胞においてメディウム交換後12時間後までに有意な細胞生存率低下が認められたので、次にその時間経時的変化を詳細に解析した。その結果、培養0日

目の細胞では、培養メディウム交換後2時間目には既に50%以上の細胞死が誘発され、交換後4時間目には殆ど全ての細胞が死滅した。これに対して、培養1日目の細胞では、メディウム交換2時間後でも60%以上の細胞の生存が確認されたが、交換後8時間目には殆どの細胞が死滅した。一方、培養3日目の細胞では、メディウム交換後6時間目に初めて著明な細胞死が観察され、12時間後まで時間依存的に細胞生存率は低下した。

メディウム交換によって引き起こされる細胞死の判定を行うため、3日間培養した細胞について、培養メディウム交換6時間後に細胞をHoechst33342とpropidium iodideで染色して、蛍光顕微鏡で観察した。その結果、Hoechst33342で染色した場合、メディウム交換にかかわらずすべての生細胞の核が染色されるが、メディウム交換により細胞核凝集を示す細胞がいくつか認められた。また、同細胞においてpropidium iodideで染色した場合、メディウム交換により高い染色性を示す細胞が複数観察された。次に同様に3日間培養した細胞について、培養メディウム交換6時間後に細胞からDNAを抽出した後、電気泳動することによりDNA fragmentationを観察した。その結果、メディウム交換によりDNA fragmentationが観察された。



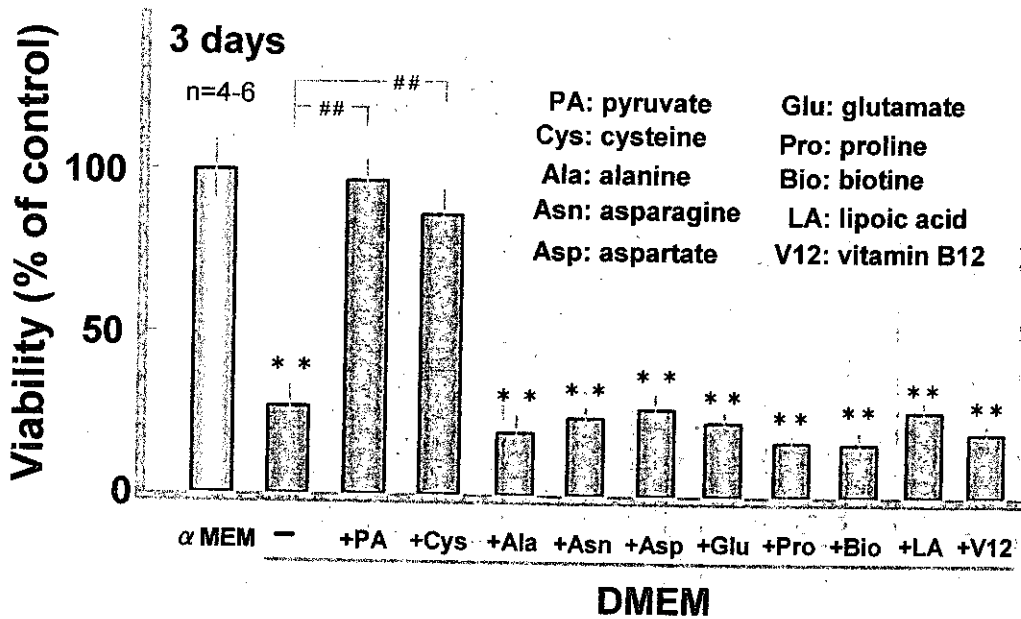


**Fig. 2. Effect of medium change into DMEM on survivability of primary cultured calvarial osteoblasts.** Cells were cultured in  $\alpha$ MEM for appropriate periods indicated up to 21 DIV, with subsequent medium change into  $\alpha$ MEM or DMEM, followed by determination of vital cell numbers 12 h after exchange. Values represent the mean  $\pm$  S.E. obtained from six different determinations. \*\* $P < 0.01$ , significantly different from each control value obtained in cultured cells with exchange to  $\alpha$ MEM.

骨芽細胞の生存に必須な物質を、 $\alpha$ MEM と DMEM 間の組成相違を基に検討した。pyruvate、cysteine、alanine、asparagine、aspartate、glutamate、proline、biotin、lipoic acid および vitamin B12 は DMEM 中には含まれていないが  $\alpha$ MEM 中には含まれている。 $\alpha$ MEM 中で 3 日間骨芽細胞を培養し、これら各化合物を  $\alpha$ MEM に含まれている濃度で 1 種類ずつ添加した DMEM を用いてメディアウム交換し、その 12 時間後に細胞生存率測定を行った。その結果、1 mM pyruvate と 500  $\mu$ M cysteine を添加した DMEM でメ

ディアウム交換すると細胞生存率低下は観察されなかった。これに対して pyruvate と cysteine 以外の化合物では細胞生存率低下抑制効果は全く見られなかった (Fig. 3)。ついで pyruvate の細胞生存率低下抑制効果を評価するため、形態学的解析を行った。培養 3 日目の細胞のメディアウムを DMEM 単独、あるいは 1 mM pyruvate を添加した DMEM でメディアウム交換した後、その 12 時間後に顕微鏡下で観察を行った。その結果、1 mM pyruvate 添加により DMEM により誘導される細胞死をほぼ完全に防ぐことが明らかとなった。

## Substitution



**Fig. 3. Differences in components between αMEM and DMEM.** Calvarial osteoblasts were cultured in αMEM for 3 DIV, with subsequent medium replacement to DMEM containing one of a variety of components present in αMEM but not in DMEM, followed by determination of cell survivability 12 h after medium change. Values represent the mean±S.E. obtained from six different determinations. \*\*P<0.01, significantly different from the value obtained in cultured cells with exchange to αMEM in place of DMEM. ##P<0.01, significantly different from the value obtained in cells with medium change into DMEM alone.

### D. 考察

本研究における主要な知見は(1)細胞分化あるいは成熟化期ではなく比較的早い細胞増殖期に標準メディウムであるαMEMをDMEMに交換することによって顕著な細胞生存率低下が認められる。(2)メディウム交換によって引き起こされるこのような細胞生存率低下はpyruvateの添加により抑制される。これらの結果は、pyruvateが細胞増殖期において必須の生存決定因子である可能性を示唆するが、pyruvateの正確な細胞死救出機構あるいはpyruvateの由来について

は現在のところはっきりわかっていない。DMEMへのメディウム交換で見られたように、αMEMをMEMに交換することによっても細胞生存率は低下し、これはMinimum Essential Mediumに1 mM pyruvateを添加することによって防御される(data not shown)。マウス骨髄由来の間質細胞株ST2はascorbic acidに応答して骨芽細胞に分化することが知られている。したがって、本研究では実験中ST2細胞は骨芽細胞への分化誘導しないよう、ascorbic acidを含まないRPMI1640メディ

ウム中で培養を行った。非骨芽細胞系細胞の結果と考え合わせると、細胞生存率減少は pyruvate 欠損下に骨芽細胞系にコミットされた細胞に限局して起こる現象かもしれない。

本研究で cysteine および GSH もまた培養 3 日目において細胞生存に対して保護的な作用を示した。GSH は glutamate、glycine そして cysteine から合成されるチオール化合物であり、主要な細胞内抗酸化物質である。Cysteine は GSH 合成の律速前駆物質であるが、cysteine は細胞毒性に対する保護的な効果を持っているだけでなく、肝細胞、腎臓の細胞株あるいは初代培養神経細胞に対して細胞毒性を発揮することも明らかとなっている。これに対して、酸化的ストレスに対する pyruvate の保護的作用は神経細胞、胸腺細胞、ウシ肺動脈内皮細胞のような様々な細胞で報告されている。Pyruvate は非酵素的に過酸化水素と反応し二酸化炭素、水そしてカルボン酸を生成し ( $\text{CH}_3\text{COCOO}^- + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{CH}_3\text{COO}^- + \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ )、過酸化水素からヒドロキシラジカルの生成を抑制する。メディアウム交換によって引き起こされる細胞死に対する pyruvate あるいは cysteine の保護的作用は、一部は細胞内あるいは細胞外での抗酸化作用に起因している可能性も考えられる。Pyruvate の保護的な作用はミトコンドリア内でのエネルギー代謝に対する役割に起因している可能性も考えられる。しかしながら、lactate を 1 mM あるいは 5 mM 添加することにより培養 3 日目においてメディアウム交換によって引き起こされる細胞死は

防御できない。これらの結果を考え合わせると、細胞死に対する pyruvate の保護的な作用はミトコンドリア内でのエネルギー代謝よりもむしろ抗酸化的防御機構によるものである可能性が高いであろう。

以上のように pyruvate 欠損により初代培養骨芽細胞およびマウス頭蓋骨由来 MC3T3-E1 細胞の分化あるいは成熟化期ではなく細胞増殖期において細胞死が誘導されることはあきらとなった。Pyruvate の正確な細胞死防御機構については現在のところ不明である。Pyruvate の本質的な重要性についてのさらなる研究が必要であろう。

## E. 結論

1. 初代培養骨芽細胞および骨芽細胞株 MC3T3-E1 において培養液交換に伴い細胞生存率低下が認められた。
2. 培養液交換による細胞生存率低下は培養初期においてのみ認められた。
3. 組織学的解析から培養液に伴う細胞死にはアポトーシスが関与している可能性が示唆される。
4. 培養液にともなう細胞死はピルビン酸あるいはシステイン添加により防御された。
5. 以上の結果から、ピルビン酸あるいはシステインは骨芽細胞の増殖期において細胞生存に必須の因子である可能性が示唆される。

## F. 研究発表

1. 論文発表
1. 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.
2. 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.
  3. 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.
  4. 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.
  5. 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.
  6. 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.
  7. 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.
2. 学会発表
    1. 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.
    2. 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ミン枯渇の影響. 日本薬学会第 124 年会, 大阪, 3 月 29-31 日.
    3. 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.
    4. 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.
    5. 西山 徳人, 新田 有紀, 米田 幸雄, 荻田 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.
    6. 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.
    7. 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.
    8. 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