

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.

9. 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.
10. 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.
11. 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ニ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.
12. 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.
13. 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.

14. 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.
15. 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.
16. 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 による破骨細胞分化制御機構解明に関する研究」
分担研究者：山下 克美 (金沢大学・大学院自然科学研究科・助教授)

研究要旨：D-Serine は中枢神経系において 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。しかしながら末梢組織においても D-serine は存在することが知られているがその機能的役割は全く明らかとなっていない。これまでの報告により培養破骨細胞に機能的 NMDA レセプターが存在することが知られている。したがって、本年度は、培養破骨細胞に対する D-serine の影響について検討した。破骨前駆細胞株 RAW264.7 において RANKL 濃度依存的に TRAP 染色陽性を示す成熟破骨細胞数の増加が認められた。このような条件下において D-Ser は RANKL 存在下における TRAP 陽性細胞数に著変を与えなかった。これに対して、RANKL 非存在下において D-Ser 添加により、TRAP 陽性細胞数の増加とともに NF- κ B の転写活性の増強が認められた。

A. 研究目的

我々はこれまでに、ラット頭蓋骨由来初代培養骨芽細胞に、core binding factor alpha-1 (Cbfa1)を介する骨芽細胞の分化過程に特異的に関与する、Glu 受容体の一つである NMDA 受容体が存在する事を報告した。また、NMDA 受容体は破骨細胞による骨吸収を調節する事が報告されている。更に骨芽細胞には、Glu 受容体の AMPA 受容体、KA 受容体および III 型 mGluR の存在が認められ、また Glu シグナル伝達終止系として重要な意味を持

つ GluT やシグナル入力系として必須の VGluT も存在する事が報告されている。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に存在する 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、serine racemase (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。これまでの報告により培養破骨細胞に機能的

NMDA レセプターが存在することが知られているが、NMDA 受容体内在性機能調節因子としての D-serine の破骨細胞に対する機能的役割は全く明らかとなっていない。したがって、本年度は、培養破骨細胞に対する D-serine の影響について検討した。

RAW 264.7

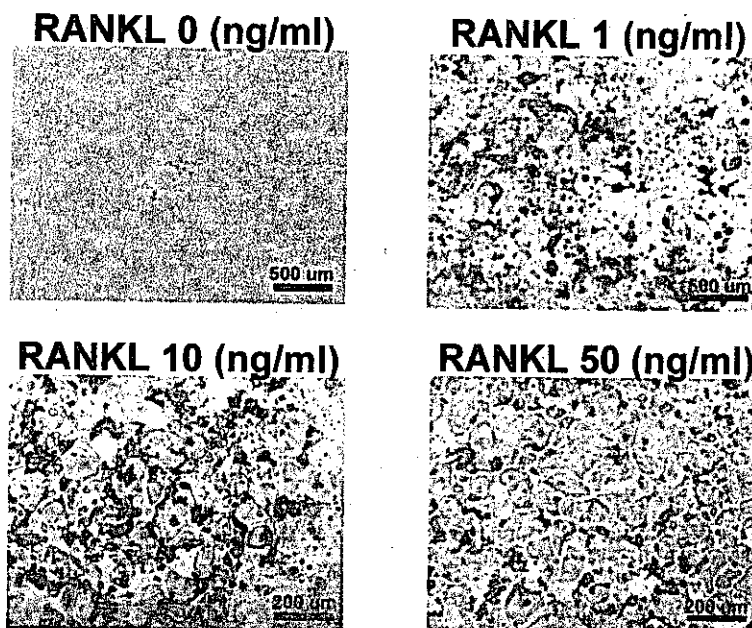


Fig. 1. Effects of RANKL in RAW264.7 cells

RAW264.7 cells were cultured in either the presence or absence of RANKL at 1, 10, 50 ng/ml for 4 DIV, followed by staining for TRAP.

B. 研究方法

RAW264.7 細胞は、各種薬物を含んだ 10% FBS-DMEM 中 2×10^4 cells/cm² の密度で各プレートに播種し、37°C、5% CO₂ 条件下で培養した。

4 日間培養した細胞を、PBS で 2 回洗浄した後、10% 中性緩衝ホルマリン液を

用い約 10 分間、室温で処理した。さらに PBS で 1 回洗浄し、EtOH:acetone=1:1 の液に 1 分間浸した後、溶液を完全に除去し風乾した。用時調製した TRAP 染色溶液 [50 mM Acetate buffer (pH 5.0), 0.22 mM Naphthol AS-MX phosphate, 1.33 mM

Fast red violet LB salt, 0.11 M N,N-dimethyl formamide] を添加し、37°C 20 ~30 分間反応させた。その後、TRAP 染色液を

除去し、超純水で1回洗いさらに PBS で1回洗浄した後、PBS に置き換え、顕微鏡下で観察した。

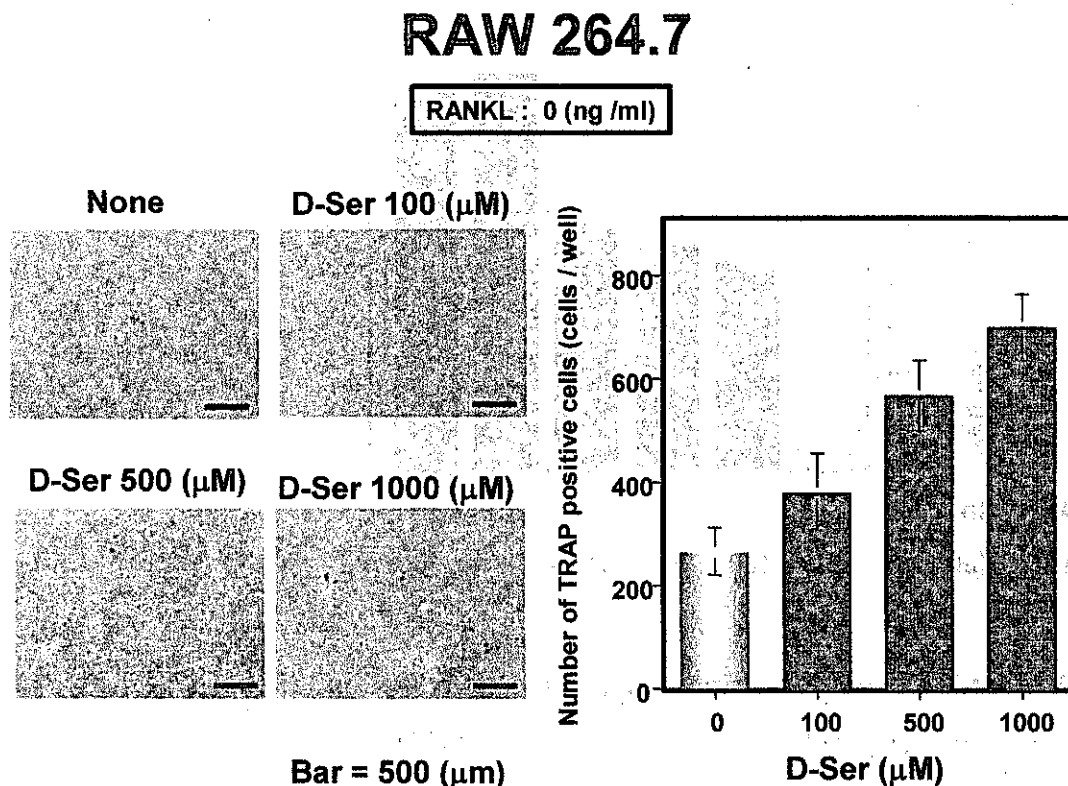


Fig. 2. Effects of D-Ser in RAW264.7 cells

RAW264.7 cells were cultured in either the presence or absence of 10 ng/ml RANKL in DMEM containing D-Ser at 100 to 1000 μM for 4 DIV, followed by staining for TRAP and counting the TRAP-positive mono- or multi-nuclear cells. Typical pictures are shown in the left panel, while number of TRAP positive cells are shown in the right panel where values represent the mean±S.E. obtained from six different experiments. **P<0.01, significantly different from each control value obtained in the absence of D-Ser.

RAW264.7 細胞を、 2×10^5 cells/cm² の密度でプレートに播種し、20~24 時間 37°C、5% CO₂ 条件下で培養した。その後、Plus reagent (Invitrogen) および Lipofectamine reagent (Invitrogen) で処理した NF-κB 結合ドメイン(5'-GGGGACTTCC-3')が 5 つ結合した NF-κB レポーター遺伝子 (pNF-κB-Luc) と、内部標準としての CMV プロモーター(pRL-CMV)を FBS 非存在

下で 1 時間トランスフェクトした。その後、培地を 10%FBS-DMEM に交換して 24 時間、37°C、5% CO₂ 条件下インキュベートした。その後、各種薬物で細胞を刺激し、24 時間後に細胞を回収し、Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) を用いてルシフェラーゼ活性を測定した。

NF-κB

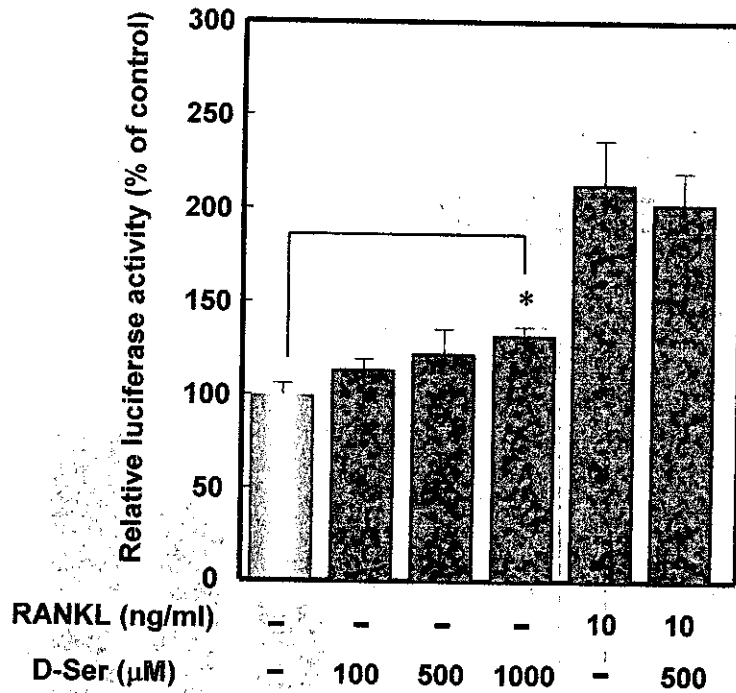


Fig. 3. Effects of D-Ser on transcriptional activities of NF-κB in RAW264.7 cells.

RAW264.7 cells were transiently co-transfected with the plasmids containing five tandem repeats of NF-κB binding site upstream of the luciferase gene and the pRL-CMV. The cells were stimulated with D-Ser at 100 to 1000 μM in either the presence or absence of 10 ng/ml RANKL for 24 hr followed by determination of luciferase activity. Values represent the mean±S.E. obtained from three different experiments. *P<0.05, significantly different from each control value obtained in the absence of D-Ser and RANKL.

C. 研究結果

本研究では RANKL 添加により成熟化破骨細胞へと分化する前破骨細胞株 RAW264.7 細胞を用いた。RAW264.7 細胞は RANKL 濃度依存的に TRAP 染色陽性で多核の成熟化破骨細胞に分化した (Fig. 1)。D-Ser の破骨細胞分化に対する影響を検討するため、10ng/ml の RANKL 存在下あるいは非存在下において、培養0日目から4日目までD-Serを、

100μM から 1mM の濃度範囲で RAW264.7 細胞に対して持続的に暴露したのち、培養4日目において TRAP 染色を行い、TRAP 染色陽性の細胞を計測した。その結果、10 ng/ml RANKL 存在下の培養では、いずれの濃度の D-Ser を添加しても、TRAP 染色陽性で多核の破骨細胞数には著明な変化は認められなかったが、RANKL 非存在下の培養では、添加する D-Ser の濃度依存的に、TRAP 染色

陽性で単核の細胞数の上昇が見られた (Fig. 2)。次に、RAW264.7 細胞における NF- κ B の転写活性に対する D-Ser の影響を検討するため、NF- κ B レポーター遺伝子を用いたレポーターアッセイを行った。その結果、RANKL 非存在下において 1mM の D-Ser によりルシフェラーゼ活性の有意な上昇が認められた。しかしながら、10 ng/ml の RANKL 存在下においては、500 μ M の D-Ser はルシフェラーゼ活性に対して有意な変化を与えなかった (Fig. 3)。

D. 考察

本研究における重要な知見は、D-Ser が培養破骨細胞の分化に対して促進的に作用する可能性が示された事である。

破骨細胞は、造血系幹細胞を起源とし、分化が進むに従い前破骨細胞、単核破骨細胞となり、単核破骨細胞が融合する事により成熟破骨細胞となる。今回我々は、前破骨細胞株 RAW264.7 細胞を用いて D-Ser の効果を検討した。RAW264.7 細胞は、RANKL 添加により成熟破骨細胞に分化する細胞であり、破骨細胞の分化段階を解析する際によく用いられている。この RAW264.7 細胞に D-Ser を添加したところ RANKL 存在下においては有意な変化は認められなかったが、RANKL 非存在下においては、TRAP 陽性の単核破骨細胞数の上昇が認められた。NF-

κ B は破骨細胞の分化過程において重要な役割を果たす転写制御因子であり、RANKL の受容体である RANK の下流には NF- κ B が存在する。D-Ser は、RANKL 存在下においては、RAW264.7 細胞の

NF- κ B の転写活性に対して影響を与えなかったが、RANKL 非存在下では、NF- κ B の転写活性を濃度依存的に上昇させた。つまり、D-Ser は NF- κ B 転写活性化を介して前破骨細胞の分化を促進する可能性が示唆される。RAW264.7 細胞には NMDA 受容体の発現が認められ、MK801 暴露により TRAP 陽性の破骨細胞数の減少が認められ、また NMDA 受容体アゴニストである NMDA 暴露により NF- κ B の構成サブユニットである p65 蛋白質の発現の上昇が認められている。更に、骨切片を用いた免疫染色法により破骨細胞に NMDA 受容体のサブユニットの一つである NR1 の発現が確認されている。従って、D-Ser が NMDA 受容体の Gly site に結合して破骨細胞分化が促進された可能性もある。しかしながら、初代培養破骨細胞においては、NR1 の発現は認められなかった (data not shown) ため、D-Ser の破骨細胞に対する作用点に対する考察は慎重に行うべきである。中枢神経系においては、神経細胞とアストロサイトとの間に細胞間ネットワークが構築されており、その一例として D-Ser の存在が挙げられる。SR はアストロサイトに強発現しており、神経細胞での発現はほとんど認められていない。つまり、アストロサイト由来の D-Ser が神経細胞に発現する NMDA 受容体の機能を調節すると考えられている。骨組織では、破骨細胞、骨芽細胞および軟骨細胞を中心に様々な細胞位置的にも近接して存在するので、種々のホルモンやサイトカインを介して細胞間ネットワークが構築されると考えられている。例えば、破骨細胞分化の決定的因子であ

る RANKL は、骨芽細胞の細胞膜上に存在し、破骨細胞が空間的に骨芽細胞と接近する事により、破骨細胞膜上に存在する RANK と結合し、破骨細胞の分化が促進する事が報告されている。我々の研究では、骨芽細胞において SR の発現は認められたが、初代培養破骨細胞においては、分化段階にかかわらず、SR の発現は認められなかった。これらの事を考え合わせると、D-Ser は RANKL 同様、骨芽細胞由来の破骨細胞分化促進因子である可能性があり大変興味深い。

近年我々を筆頭に、末梢組織における Glu シグナリング存在が提唱されているが、D-Ser が中枢神経系以外で NMDA 受容体の内在性機能調節因子として機能する可能性を提唱した報告は、本研究が始めてである。今回の我々の基礎研究結果が、骨代謝疾患や創薬への応用などに発展する事を期待し、更なる解析を進めたい。

E. 結論

1. RAW264.7 細胞において RANKL 濃度依存的に成熟破骨細胞の分化が促進した。
2. D-Ser は、RAW264.7 細胞において RANKL 存在下における TRAP 陽性細胞数には有意な差を与えなかった。
3. RAW264.7 細胞において、RANKL 非存在下において D-Ser 添加により、TRAP 陽性細胞数の増加、NF- κ B の転写活性の増強が認められる。
4. 以上の結果から、D-Ser は RANKL 同様、骨芽細胞由来の破骨細胞分化促進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. Y. Minemoto, S. Uchida, M. Ohtsubo, M. Shimura, T. Sasagawa, M. Hirata, H. Nakagama, Y. Ishizaka and K. Yamashita (2003) Loss of p53 Induces M-Phase Retardation Following G2 DNA Damage Checkpoint. *Arch. Biochem. Biophys.*, 412, 13-19.
2. O. Hashimoto, T. Ueno, R. Kimura, M. Ohtsubo, T. Nakamura, H. Koga, T. Torimura, S. Uchida, K. Yamashita and M. Sata (2003) Inhibition of proteasome-dependent degradation of Wee1 in G2 Arrested Hep3B Cells by TGF β 1. *Mol. Carcinogenesis*, 36, 171-182.
3. H. Koga, M. Harada, M. Ohtsubo, S. Shishido, H. Kumemura, S. Hanada, E. Taniguchi, K. Yamashita, R. Kumashiro, T. Ueno and M. Sata (2003) Troglitazone induces p27^{Kip1}-associated cell-cycle arrest through down-regulating Skp2 in human hepatoma cells. *Hepatology*, 37, 1086-1096.
4. B. Qi, Y. Qi, A. Watari, N. Yoshioka, H. Inoue, Y. Minemoto, K. Yamashita, T. Sasagawa and M. Yutsudo (2003) Pro-apoptotic ASY/Nogo-B protein associates with ASYIP. *J. Cell. Physiol.*, 196, 312-318.
5. J.P.H. Chow, W.Y. Siu, T.K. Fung, W.M. Chan, A. Lau, T. Azoor, C-P. Ng, K. Yamashita and R.Y.C. Poon (2003) DNA damage during the spindle-assembly checkpoint degrades CDC25A, inhibits cyclin-CDC2 complexes, and reverses cells to interphase. *Mol. Biol. Cell*, 14, 3989-4002.

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：檜井 栄一 (金沢大学薬学部・助手)

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 Glu シグナリング終止系である Glu トランスポーター発現と Glu 取り込み機構の解析を行った。RT-PCR 法により骨芽細胞において特定の Glu トランスポーターの発現が認められた。さらに $[^3\text{H}]\text{Glu}$ を用いた取り込み実験により、ナトリウム依存性、温度依存性、および飽和性を示す Glu 取り込み機構の存在が確認された。また、速度論的解析を行ったところ、高親和性と低親和性の 2 相性の取り込み活性が観察された。さらに今回使用したいずれの Glu トランスポーター阻害剤においても Glu 取り込みは有意に阻害された。

A. 研究目的

中枢神経系において Glu はシナプス前終末からシナプス間隙に放出された後、シナプス後側に存在する受容体に結合することでシグナルを伝達する。放出された Glu の作用はグリア細胞あるいはシナプス終末に存在するトランスポーターに Glu が結合することによって、あるいは細胞内に取り込まれることで不活性化される。Glu トランスポーターは Glu の除去因子としてシナプス伝達の終結に関与するほか、細胞外 Glu 濃度を低く保つことで神経細胞を Glu 興奮毒性から保護し、

適正なシナプス伝達を維持している、と考えられている。Excitatory amino acid transporters (EAATs)は現在までに EAAT1、EAAT2、EAAT3 EAAT4、EAAT5 の 5 種類が報告されている。EAATs を介する Glu 取り込みはいずれも Na^+ 依存性で、 Na^+ 2-3 分子を共役輸送させ細胞外から Glu を 1 分子細胞内に取り込む。その際に、細胞内から K^+ と OH^- を 1 分子ずつ放出する。Glu 輸送の方向は常に Glu を取り込む方向に働くのではなく、推進力となるイオン勾配の状態が決定する。つま

り過度の脱分極や Na^+ 、 K^+ イオン勾配が減少した状態では、Glu トランスポーターは単にその取り込み機能を低下させるだけでなく、これらは細胞内 Glu を放出する担体となると考えられている。

いずれの器官においても興奮性アミノ酸が細胞間情報伝達物質として機能しうるためには少なくとも3種の機構が必要であろう。つまり、小胞内への興奮性アミノ酸を蓄積し細胞外へ放出する機構、放出されたシグナルを受容するための入力系そしてシグナルを終止するための終止系である。我々は前章までに Glu 放出機構や特定の機能的 GluR 発現が骨芽細胞において認められることを明らかにし、L-Glu が骨芽細胞において情報伝達物質として機能する可能性を提唱してきた。したがって Glu シグナル終止系である Glu 取り込み系が骨芽細胞に存在する可能性も十分に考えられる。事実、骨細胞と骨芽細胞に機械的刺激応答性を示す GLAST の発現が認められている。また、エクソン3を欠損した GLAST のスプライシングバリエント GLAST-1a が骨組織および脳に発現していることが明らかとなっている。しかしながらこれまでのところ骨芽細胞における詳細な Glu 取り込みプロファイリングは現在のところ十分明らかとなっていない。よって本研究では培養骨芽細胞における Glu トランスポーターの発現とその取り込み活性について検討した。

B. 研究方法

各日数培養した骨芽細胞を HKR で1回洗浄した後、HKR を加えて CO_2 インキュベーター内で1時間プレインキュベーションをおこなった。取り込み反応は10 nM の $[\text{}^3\text{H}]$ Glu を含む Glu 1 μM を添加し、 37°C で各時間おこなった。なお反応液の温度を精密に保つため、プレートは水浴中に置いた厚さ1 cm の銅板に固定して実験を行った。反応後、反応液を取り除き、10 mM の非放射標識 Glu を含む HKR で細胞を3回洗浄して反応を停止させた。細胞に1 N NaOH を加え1時間反応させた後、0.5 N HCl を加えて溶液を中和した。溶液の放射活性は、3 ml の Triton-toluene シンチレーターを用いて、その放射活性を液体シンチレーションカウンターにより測定した。

また、培養7日および21日目の細胞から mRNA を抽出し、各 Glu トランスポーターを特異的に認識するプライマーを用いて RT-PCR 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。

Glutamate transporters

Subtype	Upstream (5'-3')	Downstream (5'-3')	Estimated base pair
GLAST	GGGTTTTCATTGGAGGGTTGC	CCACGGGTTTCTCTGGTTCAT	572
GLT1	GGGTCATCCTGGATGGAGGT	CGTGTCGTCATAAACGGACTG	328
EAAC1	GACTGGGAAATATTCCGCAAGT	CGCACAGCGGAATGTAAC TGG	209
EAAT4	AGTCAACA ACTATGAGCTGAACTTT	GATGCTTCTGAGTGTCTGAG	311
EAAT5	CCATGGTCATTGTGCTCACC	TCTAGGCTGGCAGTGGCCAG	355

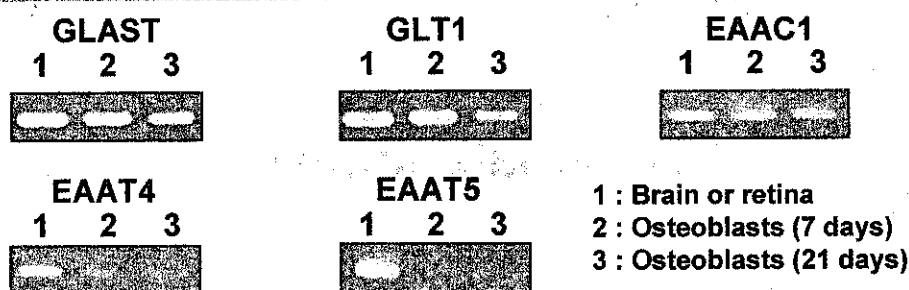


Fig. 1. Expression of mRNAs for Glu transporter in rat brain, retina and cultured osteoblasts. mRNAs were extracted from rat whole brain, retina and osteoblasts cultured for 7 and 21 DIV, followed by RT-PCR using specific primers for each Glu transporter. The experiments were repeated at least three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

C. 研究結果

初代培養骨芽細胞における Glu トランスポーターの mRNA 発現を検討したところ、培養 7 および 21 日目において、GLAST、GLT-1 および EAAC1 の発現が認められた (Fig. 1)。

Glu 取り込み実験では 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ascorbic acid および 5 mM β -glycerophosphate を含む 10% FBS- α MEM 中で 7 日間あるいは 21 日間培養した骨芽細胞を用いた。HKR buffer 中で培養骨芽細胞を 10 nM の $[^3\text{H}]$ Glu を含む Glu 1 μM を添加し、37°C あるいは 2°C で最大 20 分まで経時的に測定した。その結果、37°C では 10 分間は直線的に Glu 取り込みが増加し、その後、頭打

ちの傾向を示した。一方 2°C ではいずれの時間経過後においても Glu 取り込みは全くみられなかった (Fig. 2)。したがって、以下の実験では反応温度を 37°C とし、反応時間を 5 分とした。

次に、Glu 取り込みの基質濃度依存性について検討するため、最大 5 mM の Glu を添加し 5 分間の取り込み量を測定した。その結果、7 日目および 21 日目とともに Glu 濃度 250 μM までの高親和性と 5 mM までの低親和性の 2 相性の取り込み活性を示した。これらの結果を Woolf plot を用いて K_m 値および V_{max} 値を求めると、それぞれ以下のように算出された〔7 日

目: $K_m(\mu\text{M}): 26.0 \pm 5.8, 390.0 \pm 67.8$; V_{max} (pmol/min/mg protein): $960.3 \pm 121.5, 2043.3 \pm 312.4$ }, {21 日目: $K_m(\mu\text{M}): 42.1 \pm 10.7, 958.6 \pm 203.1$; V_{max} (pmol/min/mg protein): $290.7 \pm 33.4, 2718.8 \pm 384.7$ }]。
次に Glu 取り込みのイオン依存性について検討するため、HKR 中の NaCl を Choline Chloride(ChoCl)あるいは Sodium Gluconate (NaGlc)に置換し、37°Cで5分

間 [^3H] Glu の取り込み量を測定した。その結果、NaCl を ChoCl に置換した場合、 [^3H] Glu 取り込み量はほとんどみられなかったのに対して、NaGlc で置換した場合、NaCl と比較して有意な変化は見られなかった(Fig. 3)。次に K^+ イオノフォアの影響を検討するため、Valinomycin を 1 μM から 10 μM の範囲で [^3H] Glu と同時添加し、5 分間の取り込み量を測定した。

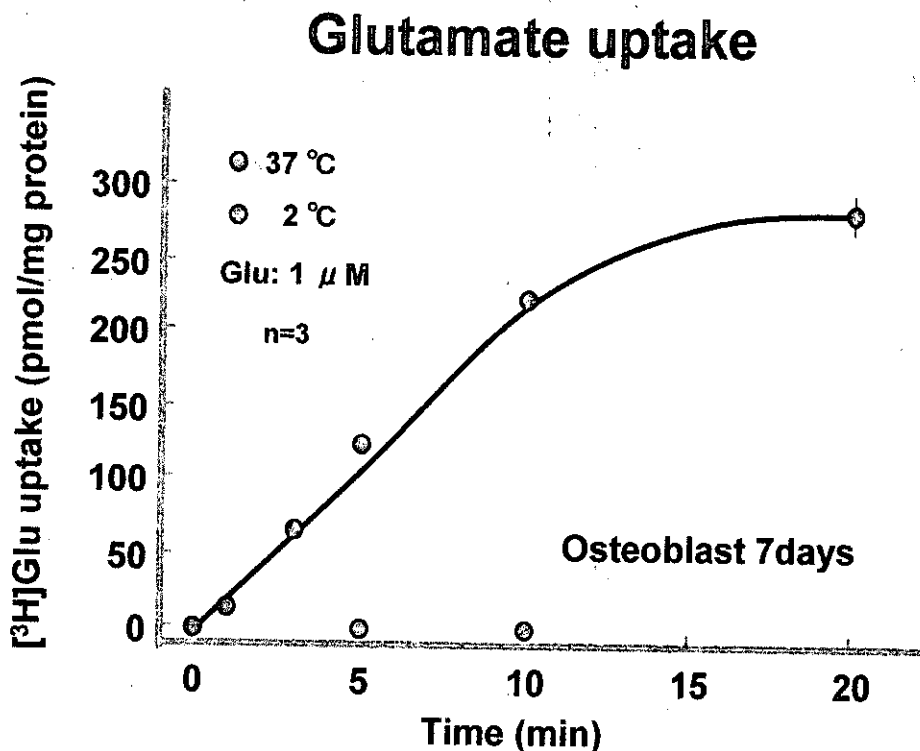


Fig. 2. Time course of [^3H] Glu uptake into cultured osteoblasts. Osteoblasts were cultured in αMEM for 7 DIV, followed by preincubation with HKR buffer for 1 h and subsequent incubation with 1 μM Glu containing 10 nM [^3H] Glu at 2 or 37°C for different periods of 1-20 min. Values are the mean \pm S.E. obtained from three different experiments.

その結果、Valinomycin はいずれの濃度においても Glu 取り込みには影響を与えなかった。さらに、 Na^+/K^+ ATPase の影響を検討するため、Oubain を 100 μM から

1000 μM の範囲で [^3H] Glu と同時添加し、5 分間の取り込み量を測定した。その結果、Oubain はいずれの濃度においても Glu 取り込みには影響を与えなかった。

1000 μM の範囲で $[\text{}^3\text{H}]$ Glu と同時添加し、5 分間の取り込み量を測定した。その結果、Oubain はいずれの濃度においても Glu 取り込みには影響を与えなかった。

次に、Glu 取り込みに対する EAATs 阻害剤の影響を検討したところ、(2S,3S,4R)-CCG/(2S,1'S,2'R)-2-(carboxyclopropyl)glycine、trans-4-

carboxy-L-proline/L-trans-pyrrolidine-2,4-dicarboxylic acid および L-(-)-threo-3-hydroxyaspartic acid のいずれの阻害剤も濃度依存的に $[\text{}^3\text{H}]$ Glu 取り込みを抑制し、各阻害剤の IC_{50} は以下のようになった [IC_{50} (μM): L-CCG-III, 19.8 ± 1.9 ; L-trans-2,4-PDC, 57.3 ± 3.0 ; L-THA, 3.2 ± 0.97]。

Replacement

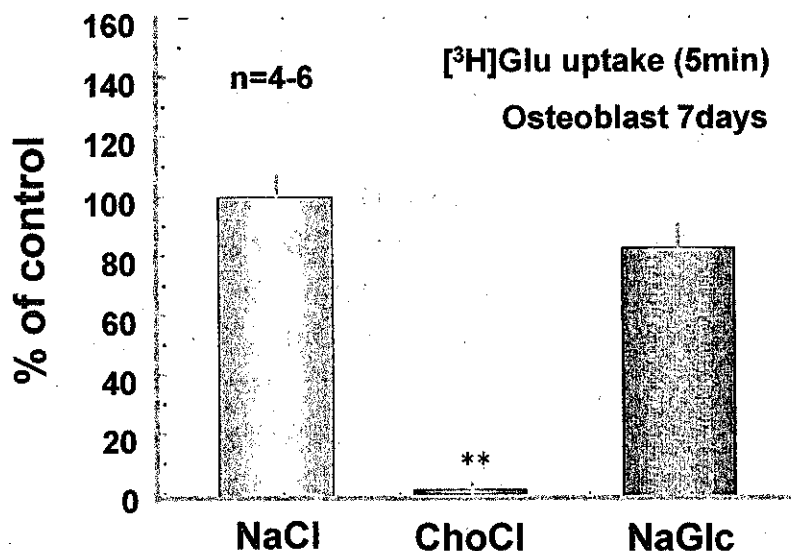


Fig. 3. Effects of Na^+ , K^+ and Cl^- on $[\text{}^3\text{H}]$ Glu uptake into cultured osteoblasts. Osteoblasts were cultured in αMEM for 7 DIV, followed by preincubation with HKR buffer for 1 h and subsequent incubation with 1 μM Glu containing 10 nM $[\text{}^3\text{H}]$ Glu at 37°C for 5 min in HKR buffer in which NaCl was isoosmotically substituted with ChoCl or NaGlc. Values are the mean \pm S.E. obtained from four to six different experiments. ** $P < 0.01$, significantly different from the control value obtained in the HKR buffer.

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 GLAST だけでなく GLT-1 と EAAC1 の恒常的な mRNA 発現が認められ、 ^3H Glu 取り込み実験により高親和性取り込みは細胞成熟度に応じて減少する、ということである。本研究は我々の知る限り、骨芽細胞において GLAST 以外の Glu トランスポーター発現確認と、 ^3H Glu 取り込みの詳細な解析を行った最初の報告である。

Glu は細胞内代謝やタンパク合成に使用されるため、その取り込みはほとんどすべての細胞で認められる。骨細胞および骨芽細胞においても機械的刺激応答性を示す GLAST の発現が認められており、また骨組織にエクソン 3 を欠損した GLAST の発現も確認されている。一方、GLAST ノックアウトマウスを形態学的組織学的に詳細に解析した結果、骨組織に異常は見られない、という報告もされている。しかしながら、前述のように骨組織における GLAST は刺激応答性であり、GLAST ノックアウトマウスと正常マウスとの機械的刺激負荷に対する応答性の違い、あるいは卵巣摘出後の反応性の違いなどさまざまな負荷に対する応答性を検討する必要があるであろう。また、我々は RT-PCR 解析により、初代培養骨芽細胞に GLAST だけでなく GLT-1 および EAAC1 の発現も確認している。さらに、軟骨細胞にも Glu トランスポーターの発現と ^3H Glu 取り込み活性を確認している。したがって、骨組織における Glu トランスポーターの機能的意義については、骨芽細胞における GLT-1 や EAAC を

介した Glu 取り込みや、あるいは骨芽細胞や骨細胞だけでなく軟骨細胞あるいは破骨細胞における Glu トランスポーター発現も考慮に入れる必要があるものと思われる。

前章までに我々は機能的な iGluR の発現を報告している。さらに cAMP 応答性をしめす代謝調節型の GBAB_B レセプターの発現も見出している（未発表）。今回、iGluR アゴニスト刺激により Glu 取り込みが有意に阻害され、GBAB_B レセプターアゴニストでは有意な変化は認められなかった。iGluR アゴニストによる阻害は Glu 放出促進機構と関連している可能性も考えられるが、いずれにしても iGluR の機能性を表しているであろう。

また最近、我々は初代培養骨芽細胞を用いて GABA トランスポーター3 発現と ^3H GABA 取り込み活性を確認している。しかしながら、特定のアミノ酸が骨芽細胞において細胞間情報伝達物質として機能しうるために必要な3つの機構、つまり小胞内への興奮性アミノ酸を蓄積し細胞外へ放出する機構、放出されたシグナルを受容するための入力系そしてシグナルを終止するための終止系のすべてを備えているのは現在のところ Glu のみであり、Glu トランスポーターの生理的機能的意義の早急な解明が望まれる。

E. 結論

1. 初代培養骨芽細胞において GLAST、GLT-1 および EAAC1 の mRNA 発現が観察された。
2. ^3H Glu を用いた取り込み実験により、骨芽細胞においてはナトリウム依存

温度依存性および飽和性を示す Glu 取り込み機構の存在が確認された。

3. 速度論的解析により、高親和性と低親和性の 2 相性の取り込み活性が観察された。

4. 今回使用したいずれの Glu トランスポーター阻害剤においても Glu 取り込みは有意に阻害された。

5. 以上の結果から、骨芽細胞においてはシグナルを受け取る Glu レセプターやシグナルを放出するベジクル型 Glu トランスポーターだけでなく Glu トランスポーターを介したシグナル終止系も存在しており、Glu は全身性因子としてだけでなく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. 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. 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.
3. Eiichi Hinoi, Takeshi Takarada and Yukio Yoneda (2004) Glutamate signaling system in bone. *J.Pharmacol.Sci.* in press.
4. Eiichi Hinoi, Takeshi Takarada, Taichi Ueshima, Yuriko Tsuchihashi and Yukio Yoneda (2004) Glutamate signaling in periphery. *Eur. J. Biochem.* 271, 1-13.

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³H]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. 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.
6. 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³H]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.
7. 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.
8. 王 麗揚, 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.
9. 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.
10. 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.

11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. 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.
16. 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.
17. 宝田 剛志, 土橋 友理子, 大澤 壮登, 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.
18. 檜井 栄一, 王 麗楊, 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.
19. 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.
20. 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.
21. 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.
22. 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.
23. 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.
24. 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.
25. 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.
26. 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.

27. 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.
28. 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.
29. 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.
30. 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.
31. 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.
32. 土橋 友里子, 檜井 栄一, 王 麗楊, 米田 幸雄 (2003) ピ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.
33. 宝田 剛志, 檜井 栄一, 大澤 杜登, 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.
34. 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.
35. 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.
36. 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.
37. Takeshi Takarada, Eiichi Hinoi, Hideo Taniura and Yukio Yoneda (2003) Glutamatergic signaling machineries expressed in rat testis. The 4th International Symposium on Rechanisms, Signal Transduction and Drug Effects, Fukui, Japan, May 22-24.
38. 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.
39. 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.
40. 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.
41. 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.
42. 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 26 日.

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yoichi Nakamura Miho Ohmaki Koji Murakami Yukio Yoneda	Involvement of protein kinase C in glutamate release from cultured microglia.	Brain Res.	962	122-128	2003
Koji Murakami Yoichi Nakamura Yukio Yoneda	Potentialiation by ATP of lipopolysaccharide-stimulated nitric oxide production in cultured astrocytes.	Neuroscience	117	37-42	2003
Eiichi Hinoi Sayumi Fujimori Yukio Yoneda	Modulation of cellular differentiation by N-methyl-D-aspartate receptors in osteoblasts.	FASEB J.	17	1532-1534	2003
Katsura Takano Yoichi Nakamura Yukio Yoneda	Microglial cell death induced by a low concentration of polyamines.	Neuroscience	120	961-967	2003
Takao Hirai Yukio Yoneda	Functional alterations in immature cultured rat hippocampal neurons after sustained exposure to static magnetic fields.	J. Neurosci. Res.	75	230-240	2004
Eiichi Hinoi Takeshi Takarada Taichi Ueshima Yuriko Tsuchihashi Yukio Yoneda	Glutamate signaling in peripheral tissues.	Eur. J. Biochem.	271	1-13	2004
Eiichi Hinoi Takeshi Takarada Yukio Yoneda	Glutamate Signaling System in Bone.	J. Pharmacol. Sci.	94	215-220	2004

