

[別紙 1]

論文の内容の要旨

論文題目

骨芽細胞様細胞 (MC3T3-E1) の L-Arginine 刺激による  
細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  シグナル伝達機構の検討

—NO, cyclicGMP, cyclic nucleotide-gated channel 系の関与について—

指導教官 高戸 毅 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 12 年 4 月入学

医学博士課程

外科学専攻

氏名 古敷谷昇

## 緒言

1980 年に発見された内皮由来血管弛緩因子 (EDRF) は、1987 年に一酸化窒素 (NO) と同一であることが発表され、その様々な作用が検討されてきた。骨組織においても NO の作用が検討され、骨芽細胞において一酸化窒素合成酵素 (NOS) の eNOS が発現し、NO そのものは骨形成効果を持つことがわかってきた。NO の細胞内シグナル伝達機構については、cGMP が関与するという報告があるが、cGMP がどのような作用をもたらすかについてはほとんど解明されていない。細胞内カルシウムイオン ( $\text{Ca}^{2+}$ ) は基本的なシグナル伝達物質であり、細胞機能の発現に重要な役割を担っている。そこで本研究では骨芽細胞において NO あるいは NO に関連した物質を投与したときの細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度 ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) 変化を  $\text{Ca}^{2+}$  感受性蛍光試薬を使って記録し、生細胞の状態での反応変化を個々の細胞レベルで測定し、NO の  $\text{Ca}^{2+}$  のシグナルへの影響を検討した。この測定により、細胞内 NO の増加に伴って  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  が上昇する現象を見出し、その流入経路を検討し、cGMP を介した経路が存在することを解明した。

## 材料および方法

マウス胎仔頭蓋冠由来の骨芽細胞様細胞株 (MC3T3-E1) を使用した。

$[\text{Ca}^{2+}]_i$  を  $\text{Ca}^{2+}$  感受性蛍光試薬の Fura-2 を負荷し、2 波長の近紫外光を交互に細胞に照射して励起した蛍光から、それぞれの蛍光画像を記録することにより  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  を測定、解析した。NO に関連した物質として NO の基質である L-Arginine (L-Arg) を

用いた。

## I. L-Arg の作用の検討

### 1. L-Arg による $[Ca^{2+}]_i$ 変化の検討

$[Ca^{2+}]_i$  に対する L-Arg (3mM) の作用とその濃度依存性を検討した。光学異性体 D-Arg による  $[Ca^{2+}]_i$  変化を測定した。芳香族アミノ酸による  $Ca^{2+}$  Sensing receptor (CaSR) への反応を検討した。極性電荷側鎖アミノ酸による反応を検討した。NOS 競合的阻害剤 L-NMMA による  $[Ca^{2+}]_i$  変化を測定した。

### 2. L-Arg による NO 産生の検討

NO 感受性蛍光色素 DAF-2 を用いて細胞内 NO 測定を行った。Greiss 法により細胞外 NO 濃度の測定を行った。NO ガス投与による  $[Ca^{2+}]_i$  変化を検討した。

## II. $Ca^{2+}$ 流入経路の検討

細胞外部からの  $Ca^{2+}$  流入を阻害するとされている  $Ni^{2+}$ 、 $La^{3+}$  の作用を検討した。小胞体の  $Ca^{2+}$ -ATPase の  $Ca^{2+}$  の取り込みを抑制するとされているタプシガージン (TG) を使いストアー依存性  $Ca^{2+}$  エントリーの関与を検討した。細胞脱分極をおこし電位依存性  $Ca^{2+}$  チャネルを活性化するとされている  $K^+$ 、電位依存性 L 型  $Ca^{2+}$  チャネルの阻害剤とされているニカルジピンを使い電位依存性  $Ca^{2+}$  チャネルの関与を検討した。 $Na^+$ - $Ca^{2+}$  exchanger (reverse mode) の阻害剤とされている KB-R7943、 $Na^+$  イオノフォアである MONENSIN を使い  $Na^+$ - $Ca^{2+}$  exchanger の関与を検討した。

## III. cGMP の関与

NO ガス投与による cGMP 濃度を測定した。紫外線の照射により cGMP となる Caged cGMP による  $[Ca^{2+}]_i$  変化を  $Ca^{2+}$  感受性蛍光試薬 Fluo-3 を用いて測定した。グアニル酸シクラーゼの阻害剤とされている ODQ の  $[Ca^{2+}]_i$  に及ぼす作用を検討した。RT-PCR 法により cyclic nucleotide-gated channel (CNGC) の発現の検討を行った。

## 結果、考察

### I. L-Arg の作用の検討

L-Arg を投与し、有意な反応のあった中で最低濃度である 3mM の L-Arg を以下の実験に使用した。D-Arg の投与を行ったところ、 $[Ca^{2+}]_i$  の上昇は見られなかった。

このことは、Arginine が物理的に作用したのではなく、生体内の酵素反応で  $[Ca^{2+}]_i$  が上昇したことを示している。また、NOS の拮抗的阻害剤 L-NMMA により  $[Ca^{2+}]_i$  の上昇は抑制された。これにより L-Arg の  $[Ca^{2+}]_i$  上昇作用は NOS を介して引き起こされたことが示された。  $Ca^{2+}$  の存在下で CaSR を活性化し、CaSR の  $Ca^{2+}$  への感度を上昇させる可能性のあるアミノ酸を投与したが、  $[Ca^{2+}]_i$  の上昇反応は認められなかった。よって、本実験の条件下の L-Arg による  $[Ca^{2+}]_i$  の上昇反応は CaSR の関与がないことが示唆された。極性電荷側鎖アミノ酸の作用を検討したが、  $[Ca^{2+}]_i$  の上昇反応は認められなかった。このことから L-Arg による  $[Ca^{2+}]_i$  の上昇反応に極性電荷側鎖アミノ酸のもつ電荷の関与は小さいことが示された。細胞内 NO 産生量を NO 感受性蛍光色素 DAF-2 により測定した。 L-Arg 投与により細胞内の NO 産生量は増加していたが、 D-Arg 投与、 L-NMMA で前処理の後 L-Arg 投与では NO 産生量は増加していなかった。この結果により、 L-Arg を基質とする NOS の酵素反応で NO が産生されたことが示された。また、細胞外の NO 濃度を Greiss 法を用いて酸化窒素分析システムで測定した。 L-Arg を投与したものは、3mM まで濃度依存的に NO 産生量は増加し、 D-Arg 投与、 L-NMMA で前処理の後 L-Arg 投与では NO 産生量は増加していなかった。この結果からも、 L-Arg により NO が産生されることが直接証明された。 NO ガス直接投与による  $[Ca^{2+}]_i$  の反応を検討したところ、  $[Ca^{2+}]_i$  の上昇がみられた。よって、 NO が直接  $[Ca^{2+}]_i$  を上昇させることが示された。ここまでの結果で、 L-Arg により細胞内に NO が発生し、 NO 濃度が上昇することが示され、この細胞内に発生した NO により  $[Ca^{2+}]_i$  が上昇していることが示された。

## II. $Ca^{2+}$ 流入経路の検討

$[Ca^{2+}]_i$  の上昇時に、  $Ni^{2+}$ 、  $La^{3+}$  を投与すると  $[Ca^{2+}]_i$  は下降し投与前のレベルに戻った。これにより、 L-Arg 刺激による  $[Ca^{2+}]_i$  の上昇は細胞外からの流入であることが示されたので、以下、細胞外からの  $Ca^{2+}$  の流入経路を検討した。 TG は小胞体への  $Ca^{2+}$  の取り込みを抑制し、  $[Ca^{2+}]_i$  の一相目の変化がみられる。小胞体内の  $Ca^{2+}$  が不足すると細胞外からの  $Ca^{2+}$  の流入が引き起こされ、  $[Ca^{2+}]_i$  の上昇下降反応の二相目の変化がみられることがある。これがストアー依存性  $Ca^{2+}$  エントリー (CCE) である。しかし、本実験においては TG による一相性の反応しか認められなかった。また、細胞内外に  $Ca^{2+}$  がない状態にし、そこに  $Ca^{2+}$  を加えても  $[Ca^{2+}]_i$  の上昇が認められなかった。さらに、細胞外に  $Ca^{2+}$  がなければ L-Arg による  $[Ca^{2+}]_i$  の上昇はみられなかつ

た。以上により、 $[Ca^{2+}]_i$ の上昇をもたらす  $Ca^{2+}$ の主な供給源は細胞外  $Ca^{2+}$ であるが、CCE の関与はないことがわかった。最終濃度 10mM~100mM の範囲の濃度において  $K^+$ を投与したが、 $[Ca^{2+}]_i$ の上昇は認められなかった。また、ニカルジピンにより、L-Arg による  $Ca^{2+}$ の細胞内流入は抑制されなかった。よって、電位依存性  $Ca^{2+}$ チャネルは本実験の条件下では  $Ca^{2+}$ の細胞内流入に関与していないと考えられた。NCX は細胞内  $Ca^{2+}$ を細胞外へ排出するのがその主な作用であるが、細胞外  $Ca^{2+}$ を細胞内に流入させる機構も併せ持つ。よって、NCX は  $Ca^{2+}$ の流入経路の一つとして考えることができる。NCX blocker、また、 $Na^+$ イオノフォアにより NCX の機能を停止させた。両者とも L-Arg による  $Ca^{2+}$ の細胞内流入を阻害しなかった。よって、NCX は L-Arg による  $Ca^{2+}$ の細胞内流入に関与していないことが示された。

### III. cGMP の関与

NO ガス投与時に細胞中の cGMP 濃度が上昇したことから、NO により cGMP 濃度が上昇することが示された。Caged cGMP による  $[Ca^{2+}]_i$  変化の測定では、Fluo-3 の蛍光強度が上がった。これにより、細胞内 cGMP の増加で  $[Ca^{2+}]_i$  を上昇させることが示された。 $[Ca^{2+}]_i$  の上昇が ODQ によって抑えられたことから、本実験の  $[Ca^{2+}]_i$  の上昇には cGMP が関与していることが示された。これまでの結果により、L-Arg から NO 上昇、cGMP 上昇、 $Ca^{2+}$ 流入に至るシグナルが確認できた。この細胞外からの  $Ca^{2+}$ 流入経路として cGMP の上昇により開くチャネルである CNGC について検討した。RT-PCR 法により、CNGC のサブユニット A3、B1 が発現していた。骨関連細胞において CNGC の発現を示したのは本研究が初めてである。この結果により、CNGC が本実験の細胞内  $Ca^{2+}$ 流入経路として最も妥当な候補であると考えられた。

骨関連細胞においてこのようなシグナル伝達経路を検討したものは本研究が初めてである。L-Arg を基質とする NOS の酵素反応で NO が産生され、この NO を經由して  $[Ca^{2+}]_i$  が上昇し、cGMP がその経路に介在することを初めて報告した。流入経路は外部から細胞内に到るものであり、 $[Ca^{2+}]_i$  上昇は CNGC を介していることを明らかにした。

### 結語

今回、L-Arg による NO の細胞内経路の一端が明らかになった。骨芽細胞における CNGC の存在と、その channel を介した L-Arg、NO 刺激による  $Ca^{2+}$ 流入を検討した報告は現在までなく、新たな知見である。