

審査の結果の要旨

氏名 古敷谷 昇

本研究ではマウス胎仔頭蓋冠由来の骨芽細胞様細胞株 (MC3T3-E1) を用いて、非炎症条件下で骨形成効果を持つと思われる NO あるいは NO に関連した物質を投与したときの細胞内  $Ca^{2+}$  濃度 ( $[Ca^{2+}]_i$ ) 変化を個々の細胞レベルで測定し、NO の  $Ca^{2+}$  シグナルへの影響を検討した。本研究により得られた結果は下記の通りである。

1. 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。光学異性体 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  $Ca^{2+}$  Sensing receptor (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。

## 2. $Ca^{2+}$ 流入経路の検討

$[Ca^{2+}]_i$ の上昇時に、細胞外部からの $Ca^{2+}$ 流入を阻害するとされている $Ni^{2+}$ 、 $La^{3+}$ 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。タプシガージン(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った。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。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最終濃度10mM~100mMの $K^+$ を投与したが、 $[Ca^{2+}]_i$ の上昇は認められなかった。また、電位依存性 $Ca^{2+}$ チャネルの阻害剤とされている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。 $Na^+-Ca^{2+}$ exchanger(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。

## 3. cGMPの関与

細胞中のcGMP濃度をEIA法により測定した。NOガスを投与した細胞中の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。紫外線の照射により細胞内でcGMPとなる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。グアニル酸シクラーゼの阻害剤とされている ODQ によって  $[Ca^{2+}]_i$  の上昇が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。 $Ca^{2+}$  流入経路として cGMP の上昇により開くチャネルである cyclic nucleotide-gated channel (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。

以上、本論文は骨芽細胞様細胞において、L-Arg による NO の細胞内経路の一端を明らかにしたものである。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。さらに、eNOS および NO のシグナルの下流にある cGMP には骨形成作用があるとの報告があり、本研究は、外傷、先天異常による骨欠損、歯周病をはじめとする骨吸収性の疾患に対する今後の臨床応用に向けた研究に貢献するものと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。