

学位論文内容の要旨

愛知学院大学

論文提出者

米田真希

論文題目

マウス頭蓋冠由来骨芽細胞様細胞における機械的刺激受容チャネルの機能解析

I. 緒言

骨は、骨芽細胞による骨形成と破骨細胞による骨吸収という2つの過程を経て、一定のリモデリングを受ける動的な組織である。また機械的刺激は、骨芽細胞や破骨細胞の機能や骨量を制御している。矯正歯科治療時、機械的刺激が歯に負荷されると、圧迫側では破骨細胞による骨吸収が、牽引側では骨芽細胞による骨形成が活発になり、それにより歯の移動が誘発されている。しかし、骨関連細胞が機械的刺激を受容している分子機構は未だ十分に明らかとなっていない。また、機械的刺激受容チャネルである TRPV 2、TRPM 4、および TRPM 7 は、ヒトおよびマウスの骨芽細胞で発現が認められているが、機械的刺激によって活性化されるかどうかは報告されていない。一方、PIEZO ファミリーは 2010 年に発見された機械的刺激受容チャネルであるが、まだ不明な点が多い。そこで本研究では、MC3T3-E1 における PIEZO 1 および TRPV 4 の役割について検討した。(図 1; 矯正治療における機械的刺激受容機構)

II. 実験材料および方法

1. 試薬

1) 2-[5- [(2,6-ジクロロフェニル)メチル]チオ]-1,3,4-チアジアゾール-2-イル]-ピラジン (Yoda1) : PIEZO 1 アゴニスト

2) GSK1016790A (GSK) : TRPV 4 アゴニスト

3) HC-067047 (HC) : TRPV 4 アンタゴニスト

4) $GdCl_3(Gd^{3+})$: 非選択的カチオンチャネルアンタゴニスト

5) ルテニウムレッド (RuR) : 非選択的カチオンチャネルアンタゴニスト

2. 細胞培養

マウス頭蓋冠由来骨芽細胞株 (MC3T3-E1) およびヒト胎児腎臓 293 細胞株 (HEK293) を使用し、それぞれ 10% 熱不活性化 FCS、ペニシリン G、ストレプトマイシンを含む培地にて培養した。

3. RT-PCR と定量的 RT-PCR

マウスの *Piezo 1~2*、*Trpv 1~v6* について mRNA の発現レベルを評価した。(表 1; PCR プライマーの塩基配列)

4. 細胞内 Ca^{2+} 濃度の測定

細胞を実験の 3~4 日前にカバーガラス上に播種し、実験直前に Ca^{2+} 蛍光指示薬を添加し、30 分間取り込ませた。その後、Fura-2 蛍光シグナルを測定した。

5. 機械刺激法

細胞へずり応力を与えるために微小ガラスピペットと圧力制御装置を使用した。細胞から 20 μm の距離に先端直径 350 μm の微小ピペットを設置し、機械的刺激を与えた。(図 2; 機械刺激法)

6. WST-1 による細胞増殖測定法

MC3T3-E1 を 24 時間培養した後、薬物を添加し、さらに 24 時間培養し、吸光度を測定した。

7. 統計分析

得られた実験データは平均±標準誤差として示した。統計的有意差検定は、Student の t-検定および ANOVA 検定を使用した。p<0.05 を統計的に有意と見なした。

III. 結 果

RT-PCR 実験を行った結果、Piezo 1 および Trpv 4 の mRNA が発現していることが明らかになった。(図 3A, B)次に 0.1~3.0 μ M の Yoda1 を添加したところ、濃度依存的に細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇した。(図 3C)さらに、これらは Gd^{3+} および RuR の添加によって抑制された。(図 3D)次に、ずり応力による機械的刺激を細胞に与えたところ、細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇し(図 A)、これは Gd^{3+} および RuR により抑制された(図 C)。また HEK-CT および HEK-mPiezo 1 に機械的刺激を与えた場合、HEK-mPiezo 1 においてより大きな細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇が誘発された(図 5D)。また HEK-mPiezo 1 では 1.0 μ M Yoda1 による細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇もより大きかった。(図 5D)

また、Yoda 1 による細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇は siPiezo1-MC3T3-E1 において減少した(図 6B)。さらに、siPiezo 1 -MC3T3-E1 に機械的刺激を与えたところ、細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇は、siNC とほとんど変化しなかった(図 6C)。これらの結果から、Piezo 1 は MC3T3-E1 における機械的刺激誘発 Ca^{2+} 濃度上昇には寄与しないことが示唆された。

また、GSK は細胞内 Ca^{2+} 濃度を濃度依存的に上昇させ(図 7A)、3 nM GSK

による細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇は 100nM HC により抑制された(図 7B)。さらに、機械的刺激誘発細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇は 100nM HC により抑制された(図 7C)。また、siTRPV 4-MC3T3-E1 は、機械的刺激および GSK による細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇作用は抑制された(図 8B, C)。これは、機械的刺激による細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇は TRPV 4 を介して生じていることを示している。

しかし、siTrpv 4-MC3T3-E1 では、Yoda 1 による細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇も減少した(図 8D)。さらに、100nM HC で前処理すると、Yoda 1 誘発細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇は抑制された(図 E 左)。また、PIEZO 1 および TRPV 4 を共発現させた HEK においても、HC を用いた前処理により Yoda 1 誘発細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇が抑制された(図 E 右)。これにより Yoda 1 誘発細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇に TRPV 4 による反応が含まれることが示唆された。しかし、TRPV 4 のみを発現させた HEK に対して Yoda 1 は影響を及ぼさず(図 9A)、また HEK-mPiezo1 は、GSK による反応は誘発されなかった(図 9B)。さらに、HEK-mPiezo1 は HC による Yoda1 誘発細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇に対して抑制効果を持たなかった(図 C)。これらの結果から、MC3T3-E1 において、Yoda 1 は PIEZO 1 の活性化を介して TRPV 4 依存性 Ca^{2+} 濃度反応を誘発していると考えられる。

次に PIEZO 1 と TRPV 4 が MC3T3-E1 の細胞増殖に及ぼす影響について検討した。Yoda 1 は濃度依存的に細胞増殖を減少させたが(図 10A)、 Gd^{3+} を添加しても、その作用は抑制されなかった(図 10B)。さらに PIEZO 1 をノックダウンすることにより細胞生存率を約 50%まで減少させ、Yoda 1 による細胞

増殖減少作用はほぼ完全に抑制された(図 C)。一方、MC3T3-E1 を GSK で処理すると、濃度依存的に細胞増殖を抑制した(図 D)。さらに、HC の添加および TRPV 4 のノックダウンにより、GSK による細胞増殖の減少を抑制した(図 E, F)。以上の結果より、Piezo 1 と TRPV 4 は MC3T3-E1 において細胞増殖に関与することが明らかとなった。

IV. 考察

本研究において、Yoda 1 が MC3T3-E1 において細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を誘発し、さらに PIEZO1 ノックダウンが、Yoda1 誘発細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を有意に抑制した。これは、PIEZO 1 が MC3T3-E1 において機能発現していることを示している。しかし、本研究におけるずり応力を伴う機械的刺激 (17.3 dyn/cm^2) では、Piezo1 をノックダウンしても機械的刺激による細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇に変化が認められなかった。これは、PIEZO1 が機能的に発現していたとしても、本研究で用いた条件では PIEZO 1 が反応に寄与しないということを示している。PIEZO 1 が本質的に機械的刺激感受性であっても、刺激に対する反応性は刺激の種類、膜成分、および細胞マトリックスに依存している可能性がある。実際、機械刺激感受性チャネルである PIEZO 1 と TRPV 4 は、軟骨細胞における膜の伸張、たわみ、押し込みなどの機械的刺激に対して感受性が高いことが報告されており、MC3T3-E1 におけるずり応力では PIEZO 1 を活性化するには不十分であり、他の刺激法により PIEZO 1 が活性化する可能性も考えられた。

これまでに骨関連細胞と機械的刺激に関する研究は広く行われており、機械的刺激を MC3T3-E1 に与えた場合、電位依存性 L 型 Ca^{2+} チャネルなどを介して、細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇が誘発されることが明らかとなっている。一方、マウス骨芽細胞では、ずり応力で TRPV 4 を活性化することも明らかになっている。本研究のずり応力に対する反応は、HC 存在下および TRPV 4 ノックダウン細胞において有意に減少した。これらの結果は、TRPV 4 が機械的刺激受容に寄与することを強く示唆している。また、Yoda 1 は PIEZO 1 の活性化を介して TRPV 4 依存性反応を誘発しており、Yoda 1 誘発細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇には TRPV 4 依存性成分が含まれることが明らかとなった。(図 11; Yoda-1 による TRPV4 依存性細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇)

これまでにカチオンチャネルの活性化は、細胞増殖に影響を及ぼすことが示されている。本研究において、Yoda1 による PIEZO 1 活性化は MC3T3-E1 の細胞増殖を阻害した。PIEZO 1 のノックダウンは細胞増殖を 50% まで減少させるため、PIEZO 1 自体が細胞増殖にとって重要であることを示している。同様に GSK を作用した場合、TRPV 4 活性化は細胞増殖を抑制した。HC 添加および TRPV 4 のノックダウンにより GSK の作用が抑制されたことから MC3T3-E1 の細胞増殖において TRPV 4 が重要であり、TRPV 4 の機械的刺激誘発活性は骨芽細胞増殖を減少させる可能性がある。また、TRPV 4 をノックダウンすることにより PIEZO 1 の機能が抑制されることも明らかとなったため、骨芽細胞における Piezo 1 および TRPV 4 依存性細胞増殖に関与する

メカニズムをさらに検討する必要がある。

V. ま と め

MC3T3-E1 には機械的刺激受容チャネルである PIEZO 1 が発現していたが、本実験で行なったずり応力による機械的刺激では機能しなかった。対して、TRPV 4 は機能発現しており、ずり応力を伴う機械的刺激を受容していることが明らかとなった。また、PIEZO 1 および TRPV 4 が高発現すると Yoda 1 は PIEZO 1 の活性化を介して TRPV4 依存性細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を誘導していた。さらに、PIEZO 1 と TRPV 4 は骨芽細胞における細胞増殖の調節因子であることが考えられた。