

# 論文審査の要旨および担当者

愛知学院大学

報告番号	① 乙	第 号	論文提出者名	米田 真希
論文審査 委員氏名	主査 後藤 滋巳 副査 戸荏 彰史 中田 和彦 宮澤 健			
論文題名	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			

インターネットの利用による公表用

骨は、骨芽細胞による骨形成と破骨細胞による骨吸収を経て、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。具体的には、まず RT-PCR 実験を行い、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。次に Piezo1 チャネル作動薬である 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。さらに、これらはカチオンチャネル非選択的阻害薬である  $Gd^{3+}$  および RuR の添加によって抑制された。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、これは  $Gd^{3+}$  および RuR により抑制された。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。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。これらの結果から、Piezo 1 は MC3T3-E1 における機械的刺激誘発  $\text{Ca}^{2+}$ 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  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度を濃度依存的に上昇させ、3 nM GSK による細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度上昇は 100nM HC により抑制された。さらに、機械的刺激誘発細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度上昇は 100nM HC により抑制された。また、siTRPV 4 -MC3T3-E1 は、機械的刺激および GSK による細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度上昇作用は抑制された。これは、機械的刺激による細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 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  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度上昇も減少した。さらに、100nM HC で前処理すると、Yoda 1 誘発細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度上昇は抑制された。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  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度上昇が抑制された。これにより Yoda 1 誘発細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 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、また HEK-mPiezo1 は、GSK による反応は誘発されなかった。さらに、HEK-mPiezo1 は HC による Yoda1 誘発細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度上昇に対して抑制効果を持たなかった。これらの結果から、Yoda 1 は PIEZO 1 の活性化を介して TRPV 4 依存性  $\text{Ca}^{2+}$ 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、 $\text{Gd}^{3+}$ を添加しても、その作用は抑制されなかった。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。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。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。よって、Piezo 1 と TRPV 4 は細胞増殖に関与することが明らかとなった。以上をまとめると、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、Yoda 1 は PIEZO 1 の活性化を介して TRPV 4 依存性細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  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。本研究では、骨芽細胞における機械的刺激受容機構を示し、今後の歯科矯正学、薬理学および関連諸学科に寄与するところが大きい。よって本論文は博士(歯学)の学位授与に値するものと判定した。