

Title	Chronic bradykinin treatment alters 1 , 25-dihydroxyvitamin D3 -induced calcium current modulation in pre-osteoblasts
Author(s)	内田, 悠志
Journal	歯科学報, 112(5): 656-657
URL	http://hdl.handle.net/10130/2949
Right	

氏名(本籍)	内田悠志 (埼玉県)
学位の種類	博士(歯学)
学位記番号	第1858号(甲第1124号)
学位授与の日付	平成22年3月31日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	Chronic bradykinin treatment alters $1\alpha, 25$ -dihydroxyvitamin D_3 -induced calcium current modulation in pre-osteoblasts
掲載雑誌名	Cell Calcium 第51巻 5号 383~392頁 2012年5月
論文審査委員	(主査) 末石 研二教授 (副査) 井上 孝教授 柴原 孝彦教授 田崎 雅和教授 東 俊文教授

論文内容の要旨

1. 研究目的

活性型ビタミンDは骨芽細胞において、コラーゲン、オステオカルシン、オステオポンチンなどの骨基質の形成に重要な働きをする。さらに活性型ビタミンDはカルシウムイオンの恒常性にも関与し、様々なカルシウムシグナルを用いて細胞機能を調節することが知られている。

電位依存型カルシウムチャネルは細胞内カルシウムイオンの濃度およびカルシウムシグナルを調節する膜タンパク質である。さらに電位依存型カルシウムチャネルは、細胞内カルシウムイオン濃度だけではなく、細胞の興奮性、細胞の生存、細胞の分化・増殖、酵素活性の調節、遺伝子発現の調節などをも司ることが知られている。しかしながら活性型ビタミンDの電位依存型カルシウムチャネルに対する働きの詳細は明らかになっていない。

そこで今回我々は、骨芽細胞において活性型ビタミンD受容体が電位依存型カルシウムチャネルを調節するかどうか、およびその細胞内セカンドメッセンジャーを調べることにした。

さらにブラジキニン長期投与後の状態を慢性炎症状態と想定し、その状態における細胞内セカンドメッセンジャーおよびイオンチャネルに対する効果の変化についても検討した。

2. 研究方法

マウス培養骨芽細胞(MC3T3-E1)に全細胞膜記録型パッチクランプ法を適用し、電位固定法で膜電位を -40 mVに固定し、 -10 mVへの脱分極刺激を与えることにより、全細胞膜を流れるカルシウムイオン電流を記録した。電位刺激はアクソン社コンピュータソフトウェア「pCLAMP ver10」を用い、ヘカ・エレクトロン社増幅器「L/M-EPC7」を介して細胞に与えた。イオン電流の解析は「pCLAMP ver10」で行なった。活性型ビタミンD, SQ22536, U-73122, PD98, 059, GC, guinacrine, ブラジキニンは灌流外液から与えた。

3. 研究成果および結論

10nM 活性型ビタミンDは7細胞においてカルシウムイオン電流を $73.3 \pm 49.4\%$ 促進させた。アデニル酸シクラーゼ阻害薬であるSQ22536を前投与した細胞では、この促進作用が $9.6 \pm 3.2\%$ まで減少した($n=7$)。ホスフォリパーゼC阻害薬であるU-73122を前投与した細胞では、促進作用の減少はみられなかった($84.6 \pm 29.0\%$, $n=7$)。ミトゲン活性化チロシンキナーゼ(MAPK)阻害薬であるPD98, 059を前投与した細胞では、

促進作用の減少はみられなかった(90.1±42.4%, n=7)。グアニル酸シクラーゼ阻害薬である GC を前投与した細胞では、促進作用の減少はみられなかった(61.0±32.6%, n=7)。ホスホリパーゼ A₂阻害薬である guinacrine を前投与した細胞では、促進作用の減少はみられなかった(64.8±32.1%, n=7)。

骨芽細胞に炎症状態を再現すべく、細胞にブラジキニンの長期投与(24時間)を行ない、同様の実験を行なった。ブラジキニン長期投与をした細胞においては、10nM 活性型ビタミンDはカルシウムイオン電流を48.0±10.9%減少させた。さらにこの細胞を MAPK 阻害薬である PD98,059を前投与した細胞では、この減少が発現せず、逆に促進作用へと転換した(66.7±33.5%, n=7)。

上記の結果より、通常状態では活性型ビタミンDはアデニル酸シクラーゼを介して電位依存型カルシウムチャネルを促進することが明らかになった。一方、ブラジキニン長期投与後の状態では、アデニル酸シクラーゼを介する経路に MAPK が関与し、電位依存型カルシウムチャネルを抑制することが明らかになった。

論文審査の要旨

活性型ビタミンDは骨芽細胞やその他器官に働きかけ、カルシウムイオンの調節などを行ない、またカルシウムイオンはカルシウムチャネルにより細胞内濃度が調節され、その機能は細胞の分化・増殖、アポトーシス、酵素活性の調節、遺伝子発現の調節など様々な作用が知られている。しかしながら活性型ビタミンDのカルシウムチャネルに対する働きは詳細になっていない。

そこで我々はパッチクランプ法を用い、電位依存型カルシウムチャネルにおけるカルシウム電流の計測を行なった。細胞内カルシウムシグナルの解析を行なうために、細胞内セカンドメッセンジャー阻害薬を用い、アデニル酸シクラーゼ、ホスホリパーゼC、ミトゲン活性型チロシンキナーゼ(MAPK)それぞれの経路について検討を行なった。また、慢性炎症状態を想定し、細胞にブラジキニンの長期投与を行なうことで、変化が生じるかどうかについても検討を行なった。

その結果、通常状態において活性型ビタミンDによるカルシウム電流の促進は、アデニル酸シクラーゼを介する経路であることが明らかになった。またブラジキニン長期投与後の状態では、活性型ビタミンDによるカルシウム電流の抑制は、アデニル酸シクラーゼの経路に MAPK も関与していることが明らかになった。

本審査委員会は、1) ブラジキニン濃度及び投与時間の妥当性について、2) 矯正治療との関連性について、3) 電位依存型以外のカルシウムチャネルの影響について、4) 炎症時における MAPK の意義について、などの質疑が行なわれ、概ね妥当な解答が得られた。

さらに今後の展望として、他の細胞との比較・検討などの提案がなされた。また実験方法、引用文献の記載法などについて修正すべき点が指摘された。

本研究で得られた結果は、今後の歯学の進歩、発展に寄与するところ大であり、学位授与に値するものと判定された。