

氏名	寶田 剛志
学位の種類	博士(薬学)
学位記番号	博乙322号
学位授与の日付	平成20年3月22日
学位授与の要件	論文博士(学位規則第4条第2項)
学位授与の題目	骨関節系細胞に発現するグルタメイトシグナル装置に関する分子薬理学的研究 (A Molecular Pharmacological Study on Glutamate Signaling Machineries Expressed in Bone and Cartilage)
論文審査委員(主査)	米田 幸雄(自然科学研究科・教授)
論文審査委員(副査)	辻 彰(自然科学研究科・教授), 横井 毅(医学系研究科・教授), 田熊 一敏(自然科学研究科・准教授), 谷浦 秀夫(自然科学研究科・准教授)

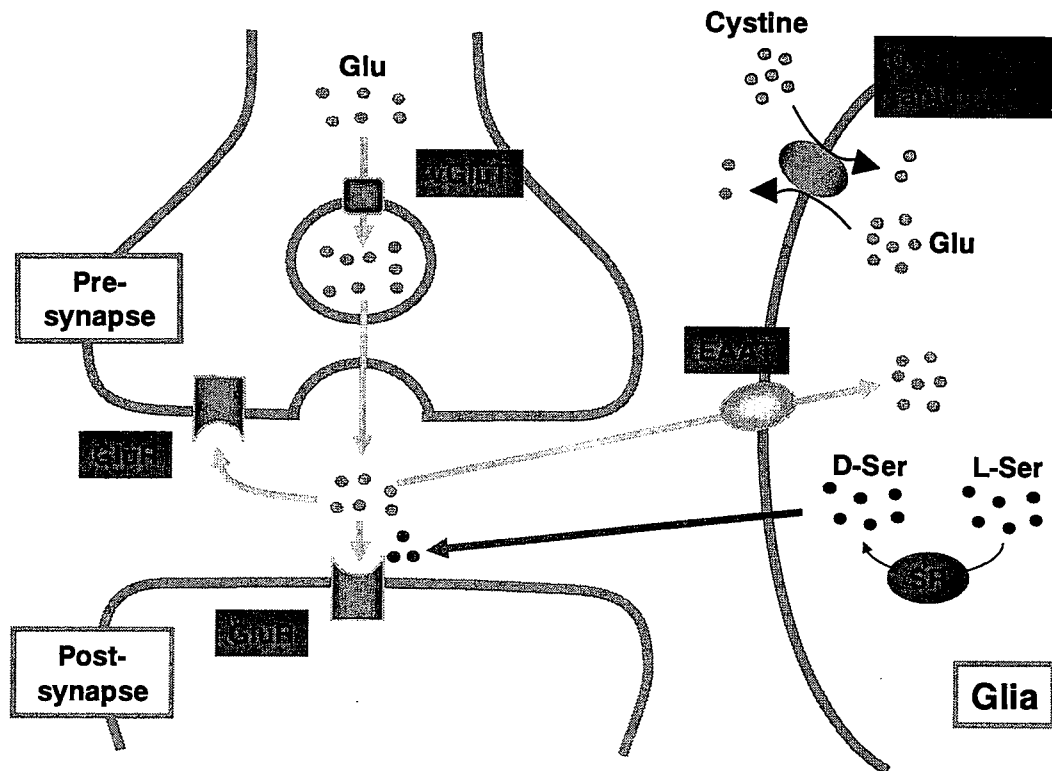
L-Glutamate (Glu) is an excitatory amino acid neurotransmitter in the mammalian central nervous system. We have previously shown the constitutive expression of functional Glu receptors required for the signal input in bone. This study was thus aimed at elucidation of possible functional expression of Glu transporters for the signal termination and of other Glu signaling machineries such as serine racemase (SR) for the signal modification through D-serine (D-Ser) synthesis in bone and cartilage. Glu was incorporated into intracellular locations through excitatory amino acid transporters expressed in cultured osteoblasts and through cystine/Glu antiporter expressed in cultured osteoclasts, respectively. A variety of molecular pharmacological analyses revealed that SR would be functionally expressed by chondrocytes and osteoblasts to participate in mechanisms associated with chondrogenic and osteoclastic differentiation. Moreover, the systemic administration of D-Ser significantly prevented the decreased bone mineral density and increased osteoclastic indices in femur of ovariectomized mice *in vivo*. These results suggest that Glu would play a role as a signal mediator through different signaling machineries toward maintenance of the cellular homeostasis in bone and cartilage.

## 1. はじめに

グルタメイト(L-glutamate、Glu)は中枢神経系において興奮性神経伝達物質として働くアミノ酸であり、細胞膜上の Glu receptor(GluR)を介して細胞内に興奮性の情報を伝達することが知られている。Glu が情報伝達物質として機能するためには、各種 Glu シグナル装置が必要であるが、入力系としての GluR、出力系としての Vesicular glutamate transporter(VGLUT)および終止系としての Excitatory amino acid transporter(EAAT)がシグナル伝達に必須であるとされている。つまり、シナプス前細胞において VGLUT によりシナプス小胞内に取り込まれた Glu は、刺激によりシナプス間隙に放出されたのち、細胞膜上に存在する GluR に結合して細胞内シグナルを発生させる。その後シナプス間隙中の Glu は、速やかにグリア細胞膜に存在する EAAT により細胞内へ取り込まれ作用を終える。GluR の一種である N-methyl-D-aspartic acid(NMDA)受容体には、Strychnine 非感受性 Glycine(Gly)

結合部位が存在するが、この Gly 部位はグリア細胞に発現する Serine racemase(SR)により生合成された D-Serine(D-Ser)により機能調節を受ける。また、EAAT 以外にも Cystine/Glu antiporter は、Cystine と Glu の交換輸送を行うことにより、細胞内 Glutathione(GSH)合成に必須の役割を果たすことが知られている。

## Glutamate signaling machineries



近年我々は、GluR の一種である NMDA 受容体が、末梢組織である骨組織においても機能的に発現する事実を報告した。しかしながら、シグナル終止系として重要な Glu トランスポーターの末梢組織における解析はほとんど行われていないのが現状である。本研究では、これらトランスポーター群の末梢組織における発現解析を行うとともに、NMDA 受容体の活性修飾因子である D-Serine(D-Ser)の骨関節組織における機能的意義理学的を追究した。

### 2. 末梢組織における Glu 取り込み機構の解析

まず、機能的 Glu 受容体発現が報告されている精巣組織について検討した結果、各種 EAAT 分子の mRNA およびタンパク質発現とともに、温度依存性な  $[^3\text{H}]\text{Glu}$  取り込み活性が認められた。次いで、骨関節系組織についても検索を進めたところ、骨吸収を担う破骨細胞においては Cystine/Glu antiporter 分子を介する温度依存性および  $\text{Cl}^-$  依存性な  $[^3\text{H}]\text{Glu}$  取り込み活性が認められるのに対して、骨形成を担う骨芽細胞においては各種 EAAT を介する温度依存性、 $\text{Na}^+$  依存性および高親和性の  $[^3\text{H}]\text{Glu}$  取り込み活性が認められた。したがって、精巣や骨関節組織のような末梢組織においても、各種 Glu シグナル装置が機能的に発現する可能性が示唆される。

### 3. 軟骨組織における D-Ser の薬理学的研究

まず、軟骨組織における各種 NMDA 受容体サブユニットの発現を検討したところ、初代培養軟骨細胞において NR1、NR2D および NR3A の mRNA 発現が認められたが、これらの発現は肥大化軟骨細胞層に局限することが明らかとなった。また、培養軟骨細胞では NMDA 受容体アゴニストである Gly は、後期分化過程の指標である細胞石灰化を有意に促進したが、この促進効果は Gly 部位の antagonist である 5,7-dichlorokynurenic acid だけでなく、D-Ser によっても有意に拮抗された。しかしながら、抑制性 Gly 受容体 antagonist である Strychnine や Gly transporter 阻害剤である Sarcosine は、この Gly の促進作用に対して著明な変化を与えなかった。この成熟促進作用の細胞内メカニズムを検討する目的で、後期分化過程を制御する転写因子 Runx2 に注目した。その結果、Gly は Runx2 の mRNA 発現に対しては著変を与えないのに対して、Runx2 の転写活性化能を有意に促進したが、この効果は D-Ser により有意に拮抗された。前述の薬理学的特性と転写活性化能解析結果から、Gly による軟骨細胞成熟促進作用は、NR1/NR2D よりはむしろ NR1/NR3A から構成される NMDA 受容体を介する可能性が示唆される。したがって、次に D-Ser 合成酵素である SR の軟骨組織における機能的発現の可能性を検討した。軟骨組織切片上では、すべての軟骨細胞層に SR の mRNA 発現が認められただけでなく、初代培養軟骨細胞においても SR の発現が認められた。さらに、培養軟骨細胞においては D-Ser 放出活性が検出された。以上の結果より、Gly は NMDA 受容体を介して後期軟骨細胞分化過程に対して促進的に作用するのに対して、軟骨組織に発現する SR より合成された D-Ser は Gly による分化促進作用に対して拮抗的に作用する可能性が考えられる。

### 4. 骨組織における D-Ser の薬理学的研究

骨組織における SR の機能的発現の可能性を検討した結果、SR の mRNA 発現が海綿骨の骨梁表面部位に局限して認められた。しかしながら、培養破骨細胞においては SR の発現は認められなかったのに対して、培養骨芽細胞においては SR の mRNA およびタンパク質の発現が認められた。SR のプロモーター領域を解析した結果、骨芽細胞に発現する SR は転写因子 Nrf2 による転写調節を受けることが明らかとなった。次いで、D-Ser の骨芽細胞および破骨細胞に対する影響を検討した結果、D-Ser は培養骨芽細胞における Alkaline phosphatase 活性および  $Ca^{2+}$  蓄積能に対して著明な変化を与えなかったのに対して、破骨細胞の多核化および Cathepsin K の発現をともに有意に抑制した。以上の結果より、骨芽細胞には SR の発現が認められるにもかかわらず、D-Ser は骨芽細胞機能には著変を与えずに、破骨細胞成熟化を選択的に抑制する可能性が示唆される。

### 5. 卵巣摘出動物に対する D-Ser 投与の影響

D-Ser の骨量維持機構における意義を検討する目的で、閉経後骨粗鬆症モデルである卵巣摘出マウスを作成した。8週齢 ddY マウスに卵巣摘出術を施し、1 g/kg の用量で D-Ser を 28 日間、1 日 1 回腹腔内投与し、28 日目に大腿骨の骨密度を測定した。その結果、卵巣摘出に伴い大腿骨の骨密度は有意に低下したが、この低下は D-Ser 投与により有意に抑制された。骨組織切片を作成して Toluidine blue 染色を行った結果、卵巣摘出時に認められる海面骨の骨梁低下が D-Ser 投与によ

り明らかに抑制されることが判明した。さらに骨形態計測を行ったところ、D-Ser 投与は卵巣摘出動物に認められる骨芽細胞パラメーター(Osteoblast surface)に対しては影響を与えずに、各種破骨細胞パラメーター(Eroded surface/Bone surface、Osteoclast number/mm、Osteoclast surface)の上昇を有意に抑制した。以上の結果より、D-Ser 投与は破骨細胞成熟化を抑制することにより、卵巣摘出術による骨密度低下を防御する可能性が示唆される。

## 6. おわりに

本研究結果より、Glu シグナル終止系を担う Glu トランスポーター分子が末梢組織においても機能的に発現する可能性が示されたので、中枢神経系の場合と同様の Glu シグナリング機構が末梢組織においても存在する可能性が強く示唆される。さらに、軟骨細胞成熟化機構には NMDA 受容体を介して Gly と D-Ser 間のクロストーク機構が存在すること、および D-Ser 合成酵素である SR が骨関節組織における各種細胞分化制御機構に関与することを、本研究は世界に先駆けて提唱した。今回の基礎的研究成績が、各種骨関節系疾患の予防や治療に対する創薬分野への応用に発展することを期待したい。

## 学位論文審査結果の要旨

本研究では、脳内情報伝達物質グルタミン酸(Glu)のシグナル装置が、骨関節系細胞に機能的に発現する可能性について探索した。

まず、機能的 Glu 受容体が発現する精巣組織について、Glu トランスポーターの機能解析を行ったところ、mRNA およびタンパク質発現とともに、温度依存性 $^3\text{H}$ Glu 取り込み活性が認められた。同様に、骨リモデリングを営む破骨細胞と骨芽細胞、あるいは骨格成長や関節形成に関与する軟骨細胞にも、各種トランスポーターの mRNA とタンパク質発現だけでなく、温度依存性な $^3\text{H}$ Glu 取り込み活性が検出された。次いで、軟骨組織における各種 NMDA 受容体サブユニットの発現を検討した結果、軟骨細胞における NR1、NR2D および NR3A サブユニットの発現は、肥大化軟骨細胞層に限局することが明らかとなった。NMDA 受容体アゴニストの Glycine(Gly)は軟骨細胞の石灰化を促進したが、この促進効果は NMDA 受容体 antagonist や D-セリン(D-Ser)により有意に抑制された。次に、D-Ser 合成酵素である Serine racemase(SR)の骨関節組織における機能的発現の可能性を検討したところ、破骨細胞では SR 発現は認められないのに対して、軟骨細胞と骨芽細胞では SR の mRNA およびタンパク質発現が認められた。D-Ser は骨芽細胞の成熟過程に対しては著明な変化を与えなかったのに対して、破骨細胞の成熟化を有意に抑制した。さらに、D-Ser 投与は閉経後骨粗鬆症モデル動物である卵巣摘出マウスにおける骨密度減少を有意に抑制しただけでなく、骨形態計測の結果では、D-Ser は卵巣摘出時に認められる各種破骨細胞パラメーターの上昇を有意に抑制したが、骨芽細胞パラメーターには著変を与えなかった。

以上の研究成績は、骨関節系細胞における Glu シグナル装置の機能的発現を実証するだけでなく、D-Ser が破骨細胞成熟抑制を介して閉経後骨粗鬆症に対する予防的作用を発揮する可能性を世界に先駆けて提唱した点で、分子生物学的および薬理的観点からも高く評価されるので、論文審査委員会は本論文が博士(薬学)に値すると判断した。