

論文の内容の要旨

氏名：間 中 総一郎

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：Low-intensity pulsed ultrasound-induced ATP increases bone formation
via the P2X7 receptor in osteoblast-like MC3T3-E1 cells

（低出力超音波刺激によって誘導された ATP は P2X7 受容体を介して骨芽細胞による骨形成を促進する）

骨リモデリングは、ホルモン、サイトカインあるいはメカニカルストレスなどの外的因子によって調整されている。成人における骨量は、メカニカルストレスによる骨リモデリングを介して維持され、これは骨量と強度に影響を及ぼす因子の一つであると考えられている。

ATP は、アデニンヌクレオチドの一種で、筋収縮や能動輸送など生体内の多くの生理作用におけるエネルギー担体として重要である。伸展、流水剪断、培地交換あるいは浸透圧等のメカニカルストレスは、様々な細胞において ATP 産生を誘導することが報告されている。メカニカルストレス負荷によって産生された ATP は、細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇を介して、 Ca^{2+} 依存性エキソサイトシスに関わっている。これらのストレス応答性分子として産生される細胞外 ATP と、メカニカルストレスによって誘導される ATP は、細胞障害を伴わないことが報告されている。

ATP 受容体の 1 つである P2 受容体は、骨芽細胞および破骨細胞で発現し、イオンチャネル型受容体である P2X ファミリーおよび G タンパク共役型受容体である P2Y ファミリーの 2 つのグループに分けられている。メカニカルストレスや炎症によって放出された ATP は、骨リモデリングに対して、オートクリンまたはパラクリンの的に作用する。骨芽細胞は P2X 受容体および P2Y 受容体の両方を発現し、マウス頭蓋冠細胞の P2X7 受容体は、流水剪断によって活性化される。また、骨芽細胞上の P2X7 受容体の pore 形成が、メカニカルストレス負荷による骨形成に影響を及ぼすことも明らかにされている。P2X7 受容体ノックアウトマウスは、長骨の長さに変化はないが、膜性骨化の減少や、メカニカルストレス負荷によって骨形成が抑制されることが報告されている。これらの報告は、P2X7 受容体が、メカニカルストレス応答性を有することで骨形成に関与することを示唆しているものと考えられている。さらに ATP は、骨芽細胞の細胞膜上に存在する P2X7 受容体を介して、プロスタグランジン (PG) E_2 およびリン脂質誘導体であるリゾホスファチジン酸 (LPA) の産生を誘導し、骨形成を促進することも報告されている。PGE₂ は、細胞膜リン脂質（主にホスファチジルコリン）からホスホリパーゼ A₂ (PLA₂) の作用で遊離することで生合成されるアラキドン酸からなるエンコサノイドの一つである。シクロオキシゲナーゼ (COX) は、アラキドン酸を PGE₂ に変換させる酵素で、刺激や炎症によって発現が誘導される。

低出力超音波 (LIPUS) は、超音波出力が 100 mW/cm² 未満のものを示し、医科および歯科領域で臨床応用されているメカニカルストレスの一種である。さらに、LIPUS がマウス骨髄細胞からの脂肪分化を抑制し、骨形成を誘導することが報告されている。LIPUS は音響放射力、音響直進流および表面波伝播のような直接的かつ間接的効果を発揮するものの、音波エネルギーの熱への変換はなく、cavitation 効果は発生しないとされている。LIPUS 刺激に関しては、ヒト骨肉腫由来株化骨芽細胞 Saos-2 細胞において、その刺激によって細胞外 ATP 産生を介して RANKL 発現と骨芽細胞の増殖が促されたことが報告されている。しかし、LIPUS 刺激によって誘導された ATP が、骨芽細胞の COX-2 産生および細胞外マトリックスタンパク (ECMPs) 発現に及ぼす影響については不明な点が多い。そこで本論文の著者は、1) LIPUS 刺激が骨芽細胞に負荷されることによって、細胞外へ ATP が放出され、骨芽細胞上の P2X7 受容体が活性化されるか、さらに、2) 活性化された P2X7 受容体を介して、ECMPs 産生および COX-2 の遺伝子発現が促進されるかを検討した。

骨芽細胞として、マウス頭蓋冠由来の株化骨芽細胞様細胞 (MC3T3-E1 細胞) を使用し、P2X7 受容体競合的アンタゴニスト A438079 の存在または非存在下で、OSTEOTRON D² によって LIPUS (発振周波数 1.5 MHz, 超音波出力 30 mW/cm²) を細胞へ 30 分/日の負荷または非負荷下で最大 14 日間培養した。細胞外 ATP 産生は Luminescence kit, COX-2, RUNX2, Osterix および ECMPs (I 型コラーゲン, BSP, OPN および OCN) の遺伝子発現は real-time PCR 法で、RUNX2, Osterix および ECMPs のタンパク発現は Western blotting 法または ELISA 法で調べた。アルカリホスファターゼ活性 (ALPase 活性) は、naphthol AS-MX phosphate を基質とした ALP 染色、細胞生存率はトリパンブルー染色で調べた。細胞外リン酸濃度は Malachite Green

Phosphate Assay Kit, ECM内のカルシウム含有量はCalcium E-Test kitを用いて定量的に測定した。さらに, shRNAによるP2X7受容体ノックダウン細胞を作製し, real-time PCRおよびWestern blotting法でP2X7受容体がノックダウンしていることを確認した後, ECMPsの遺伝子発現をreal-time PCR法で検討した。

細胞のATP産生は, コントロールと比較して, LIPUS刺激1分および3分で有意に細胞外ATPの産生を誘導した。RUNX2, OsterixおよびP2X7受容体の発現に影響を及ぼさずLIPUS刺激時間を検討したところ, 経時的にRUNX2, OsterixおよびP2X7受容体のmRNA発現を有意に増加させ, そのうち最も影響が大きかったのは30分間刺激であった。P2X7受容体競合的アンタゴニストのA438079を添加すると, LIPUS刺激によって増加したRUNX2とOsterixのmRNAおよびタンパク発現は, コントロールと同等な発現量を示した。また, LIPUS刺激によって増加したECMPsのmRNAおよびタンパク発現も, A438079添加によってコントロールレベルまで減少した。LIPUS刺激は, ALPase活性と細胞生存率に影響を及ぼさなかったが, 細胞外リン酸濃度およびECM内のカルシウム含有量は有意に増加させた。一方, A438079添加によって, 細胞外リン酸濃度とECM内のカルシウム含有量はコントロールと同程度であった。さらに, P2X7受容体ノックダウン細胞でLIPUS刺激によるECMPsのmRNA発現の影響を検討したところ, sh control細胞で増加したI型コラーゲン, BSP, OPNおよびOCNのmRNA発現を, P2X7受容体ノックダウン細胞であるsh P2X7細胞はコントロールと同等な発現量を示した。

本研究の結果から, LIPUS刺激誘導性の細胞外ATPは, P2X7受容体を介してALPase活性の影響を受けることなく, 細胞外リン酸濃度の増加とECMPs産生を促進させ, 骨芽細胞の骨形成能を促進することが示唆された。