

論文の内容の要旨

氏名：鳥 越 剛

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：BzATP induces extracellular matrix proteins synthesis via the PYK2-ERK pathway
(BzATP は PYK2-ERK 経路を介して細胞外マトリックスタンパク合成を促進する)

骨の恒常性はホルモン、サイトカイン及びメカニカルストレスのような様々な要因によって調節されている。メカニカルストレスは成人において骨量の維持や骨の強度に影響を及ぼす主要な因子であり、医科及び歯科領域で骨折の治療や矯正歯科治療に応用されている。

ヌクレオチドの1つであるアデノシン三リン酸(ATP)は、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によって様々な細胞で細胞外にATPを放出することが報告されている。特に骨リモデリングに関与する骨芽細胞や破骨細胞では、メカニカルストレスや炎症などによってATPは、オートクリンまたはパラクリンのように細胞外に放出される。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Ca²⁺濃度の上昇を介して、Ca²⁺依存性エキソサイトーシスに関わる。これらのストレス応答性分子としての細胞外ATPの作用及びメカニカルストレスによって誘導されるATP産生は、細胞障害を伴わないことが報告されている。ATPはGタンパク共役型受容体のP2Yファミリーやリガンド依存性チャネル型受容体であるP2XファミリーのようなATP結合プリン作動性(P2)受容体の活性化を介して促進される。2'-(3)-O-(4-Benzoylbenzoyl) adenosine-5'-triphosphate (BzATP)はチャネル型受容体であるP2X7受容体の特異的アゴニストであり、BzATPがマウス由来骨芽細胞において細胞内Ca²⁺濃度上昇とリゾホスファチジン酸及びプロスタグランジンE₂の産生を介して骨形成を誘導することが報告されている。また、マウス頭蓋冠由来株化骨芽細胞様細胞(MC3T3-E1細胞)を用いた*in vitro*の実験で、メカニカルストレスである伸展力や低出力超音波がP2X7受容体を介して細胞外マトリックスタンパク(ECMP)の発現及び骨形成を促進することが報告されている。これらの報告は、メカニカルストレスによって誘導されるP2X7受容体特異的アゴニストBzATPが骨形成における重要な因子である可能性を示している。

Proline-rich tyrosine kinase2(PYK2)は非受容体型チロシンキナーゼであるfocal adhesion kinase (FAK) subfamilyに属する。PYK2はインテグリンのシグナル伝達に関与し、またインテグリンはメカニカルストレス誘導性ERKによって活性化される。さらに伸展力が、骨芽細胞の細胞内Ca²⁺依存性シグナル伝達物質であるPYK2を活性化することも報告されている。しかしながら、骨芽細胞のECMP発現におけるP2X7受容体アゴニストBzATPとPYK2との相互作用については明らかにされていない。そこで本研究は、骨芽細胞のBzATPが誘導したECMP産生に対するPYK2の影響を細胞生物学的及び分子生物学的に検討した。

骨芽細胞としてMC3T3-E1細胞を使用した。MC3T3-E1細胞を6ウェルプレートに播種した後、BzATPおよびPYK2阻害剤PF431396の存在または非存在下にて最大14日間培養した。培地は3日おきに交換した。ECMPであるtype I collagen(Col I), bone sialoprotein(BSP), osteopontin(OPN), osteocalcin(OCN)の遺伝子発現はreal-time PCR法、タンパク発現はWestern blotting法で調べた。また、PYK2、PYK2のリン酸化、ERK及びERKのリン酸化はWestern blotting法で調べた。

はじめに、骨芽細胞でBzATPがPYK2の活性化に及ぼす影響を明らかにするために、リン酸化-PYK2(p-PYK2)のタンパク発現を調べた。培養3、7日目においてBzATPはコントロールと比較してp-PYK2の発現を有意に増加させた。BzATP-PYK2のシグナルの下流経路を明らかにするために、培養1、3時間でのリン酸化-ERK(p-ERK)のタンパク発現を検索した。BzATPはコントロールと比較してp-ERKを有意に増加させる一方で、PYK2阻害剤PF431396は培養1、3時間でp-ERK2タンパク発現に対するBzATPの影響を抑制した。これらの結果は、骨芽細胞におけるBzATP刺激はPYK2-ERKの活性化を介することを示している。次に、骨芽細胞のBzATP誘導性ECMPのmRNA発現に対するPYK2の影響を調べた。BzATPはコントロールと比較してCol IのmRNA発現を培養3、7日目に有意に増加させた。BSPのmRNA発現

を全ての培養日数において有意に増加させた。OPN の mRNA 発現を培養 7 日目に有意に増加させた。さらに、OCN の mRNA 発現を培養 7, 14 日目に有意に増加させた。一方で、PYK2 阻害剤 PF431396 は培養 3, 7 日目の Co1 I, 培養 3 日目の BSP, 培養 7 日目の OCN の mRNA 発現に対する BzATP の影響を抑制した。しかしながら、OPN に対する影響は認められなかった。さらに BzATP 誘導性 ECMP のタンパク発現に対する PYK2 の影響を調べた結果、Co1 I および BSP のタンパク発現を培養 3 日目において BzATP は有意に増加させ、PYK2 阻害剤はその影響を抑制した。OCN のタンパク発現を培養 7 日目において有意に増加させ、PYK2 阻害剤は BzATP の影響を抑制した。以上のことから BzATP 誘導性 ECMP のタンパク発現に対する PYK2 の影響は mRNA 発現と同様な傾向であることが示された。

骨芽細胞が産生する ECMP である Co1 I, BSP, OCN 及び OPN は、骨芽細胞による石灰化物形成に関与している。Co1 I は骨組織の主要な ECMP で石灰化の過程でハイドロキシアパタイト結晶の核形成のための足場として働いている。BSP, OCN, および OPN はコラーゲンマトリックスの組織化において重要な役割を果たす非コラーゲン性マトリックスタンパクである。さらに、BSP は骨の石灰化結節形成におけるハイドロキシアパタイト形成の核となる役割を担っている。OCN は骨芽細胞に特異的に発現する Gla 残基を有する非コラーゲン性タンパクであり骨芽細胞分化を示す主要なマーカーである。OPN は機能が多様で宿主防御や組織修復などに働き、骨形成や骨のリモデリングに直接関与する。これまでの研究で、メカニカルストレスは OPN の mRNA 発現を誘導する一方で PYK2 は OPN 発現に影響を及ぼさないことが報告されている。今回の研究において、BzATP は OPN の mRNA 発現を誘導したが、PYK2 阻害剤 PF431396 は OPN の mRNA 発現に影響を及ぼさなかった。この結果は前述の研究との整合性を有しており、また BzATP が誘導する OPN 発現は FAK などの他のシグナル分子によって制御されている可能性が考えられた。

以上のことから、P2X7 を活性化するメカニカルストレスが、PYK2-ERK 経路を介して ECMP 発現を誘導する可能性が考えられた。よってメカニカルストレス誘導性 ECMP 産生は、PYK2-ERK 経路を介してインテグリン及び細胞外 ATP が関与していることが示唆された。