

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：33902

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791988

研究課題名(和文) 神経 骨芽細胞共培養系における細胞間シグナル伝達機構の解明

研究課題名(英文) Intercellular communication between sympathetic or sensory neurons and osteoblasts in co-culture system

研究代表者

友寄 大介(兒玉大介)(Kodama, Daisuke)

愛知学院大学・歯学部・講師

研究者番号：40549979

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：近年、神経系による骨代謝制御機構が明らかにされつつある。一方で、交感神経、感覚神経と骨芽細胞間のシグナル伝達については不明な点が多い。本研究ではin vitro共培養系を用いて、神経-骨芽細胞間の直接的な相互シグナル伝達の有無およびそのメカニズムを検討した。本研究により得られた結果から、交感神経はノルアドレナリンを、感覚神経はグルタミン酸を介して骨芽細胞に直接的なシグナル伝達を行う可能性が示された。また機械刺激やbradykinin刺激によって骨芽細胞からATPやグルタミン酸が放出され、ATPは神経細胞への求心性伝達に、グルタミン酸は自己に作用し、自己のCaシグナルを担う可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Recent studies have revealed that sympathetic and sensory nervous systems are involved in bone metabolism. However, whether a direct cell communication between neurons and osteoblasts exists is still unknown. In this study, we investigated the signal transduction pathway between sympathetic neuronal cells or sensory neuronal cells and osteoblasts by using in vitro co-culture system. The results presented in this study suggest the following possibilities. In efferent pathway, sympathetic neuronal cells can directly communicate with osteoblasts by releasing noradrenaline. On the other hand, sensory neuronal cells can directly communicate with osteoblasts via glutamate. Additionally, the osteoblasts stimulated by mechanical stimulation or bradykinin release some transmitters, including ATP and glutamate. ATP released from osteoblasts plays a role in afferent signal transduction. On the other hand, glutamate released from osteoblasts mainly acts in autocrine manner.

研究分野：薬理学、神経薬理学

キーワード：共培養 骨芽細胞 交感神経 感覚神経 細胞間シグナル伝達 グルタミン酸 ATP

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 骨組織は骨芽細胞による骨形成と破骨細胞による骨吸収による活発な代謝を受けており動的平衡状態にある。骨代謝はホルモンやサイトカインなどの液性因子によって制御されている事が知られているが、近年、神経系による制御の存在も明らかになってきた。交感神経活性が亢進するモデル動物で骨量の減少が見られることや、感覚神経を除去したモデル動物で骨量が減少することから**交感神経、感覚神経がともに骨代謝を制御することが示されているが、具体的な情報伝達経路、即ち、神経から骨関連細胞への直接的な制御か、他の細胞を介した間接的な制御なのか、また情報伝達を担う分子などは十分に明らかになっていない。**

(2) 骨組織は日常において力学的な刺激を強く受ける組織であり、また骨吸収時には強酸に晒されるなど環境の変化を受けやすい組織である。骨細胞や骨芽細胞はこれらの環境刺激に対して応答し、骨代謝を制御していると考えられている。骨芽細胞は刺激に応答し、様々なサイトカインや伝達物質を放出し、自己分泌・傍分泌的に作用している。これらの放出される物質には神経に作用する物質も含まれることから、**骨芽細胞は環境刺激を感知し、伝達物質の放出を介して神経にその情報を伝える感覚器としての役割を持つ可能性が考えられる。**

## 2. 研究の目的

**交感神経および感覚神経と骨芽細胞の共培養系を用いて、両細胞間の情報伝達の有無およびその情報伝達経路を明らかにする。**骨代謝制御における神経系、骨芽細胞の生理的役割を明らかにすることは、骨粗鬆症をはじめとした骨代謝異常の新たな治療戦略を見出す助けとなると考えられる。

## 3. 研究の方法

### (1) In vitro 共培養法

マウス新生仔より交感神経細胞として上頸神経節 (SCG) を、感覚神経細胞として脊髄後根神経節 (DRG) をそれぞれ単離し、10% ウシ胎仔血清、神経栄養因子および Ara-C を添加した F-12 培地にて初代培養を行った。初代培養開始 2 日後にマウス骨芽細胞様細胞

MC3T3-E1 細胞を加え、共培養系とした。

### (2) 細胞内 Ca イメージング法

Ca<sup>2+</sup>感受性蛍光色素である fluo-3 および Cal-520 を細胞内に導入し、共焦点レーザー顕微鏡によって細胞内 Ca<sup>2+</sup>動態を観察した。室温、1.5 ml/min で細胞外液を灌流した。

### (3) 刺激方法

#### 灌流適用

ストック用の薬液を細胞外液にて希釈した後、灌流させて各種薬物を適用した。

#### 電気刺激

外径 1.5 mm、内径 1.17 mm のホウケイ酸ガラスキャピラリーをプラーにて引き伸ばし、先端抵抗 1-5 M の微小ガラス電極を作成した。微小ガラス電極の先端を標的とした神経細胞突起の近傍に設置し、約 10-20 V、0.5 sec で電気刺激を行った。

#### 局所水流刺激

電気刺激と同様にガラスキャピラリーを引き伸ばし、先端径約 30 μm にしたガラスピペットに細胞外液を充填し、標的細胞から約 30 μm 離れた位置に設置した。圧装置によりピペット後端に約 6.8kPa、1 msec の空気圧をかけ、標的細胞周囲に局所水流を発生させた。

## 4. 研究成果

(1) 交感神経および感覚神経から骨芽細胞への直接的な情報伝達経路の解明

先行研究で SCG-MC3T3-E1 共培養系においてサソリ毒による刺激が SCG における [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 上昇と、それに続く MC3T3-E1 細胞における [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 上昇を引き起こすこと、α1 アドレナリン受容体遮断薬である prazosin の存在下では SCG の反応に影響を与えず、MC3T3-E1 細胞の反応のみ抑制されるという結果が報告されている。この結果は交感神経からノルアドレナリンが放出され、MC3T3-E1 細胞に作用していることを示唆しているが、サソリ毒が系全体に強力に作用するため、神経から大量に放出された伝達物質が傍分泌的に作用している可能性が否定できなかった。

本研究では SCG-MC3T3-E1 共培養系および DRG-MC3T3-E1 共培養系において単一の神経細胞 (SCG または DRG) を電気刺激することで隣接する MC3T3-E1 細胞においても細胞内

Ca<sup>2+</sup>濃度 ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) 上昇が見られるかどうかを検討した。電気刺激によって刺激直後に神経細胞における [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 上昇が起こり、数秒から数十秒の間隔をあけて神経細胞と隣接する MC3T3-E1 細胞で [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 上昇が見られた。これらの結果は神経細胞から MC3T3-E1 細胞に対して直接的な経路を介してシグナル伝達が行われたことを示唆している。

先行研究と同様に SCG-MC3T3-E1 共培養系において SCG を電気刺激した時の MC3T3-E1 細胞の反応は prazosin によって抑制された。一方、DRG-MC3T3-E1 共培養系においては prazosin によって MC3T3-E1 細胞の反応は抑制されなかった。これらの結果から SCG の活性化によりノルアドレナリンが放出され α<sub>1</sub> アドレナリン受容体を介して MC3T3-E1 細胞に直接的なシグナル伝達が行なわれることが示唆された。

DRG ニューロンからはサブスタンス P、CGRP などのニューロペプチドに加え、グルタミン酸などの伝達物質が放出されることが知られている。DRG-MC3T3-E1 共培養系において DRG を電気刺激した時の MC3T3-E1 細胞の反応は AMPA 型グルタミン酸受容体遮断薬である CNQX によって抑制された。一方、SCG-MC3T3-E1 共培養系において CNQX はいずれの細胞の [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 上昇にも影響を与えなかった。これらの結果から DRG の活性化によりグルタミン酸が放出され AMPA 型グルタミン酸受容体を介して MC3T3-E1 細胞に直接的なシグナル伝達が行なわれることが示唆された。

以上より、**神経-骨芽細胞間に求心性の直接的なシグナル伝達経路が形成され得ることが示唆された。また交感神経からはノルアドレナリンが、感覚神経からはグルタミン酸が伝達物質として働く可能性が示された。**

## (2) 骨芽細胞から感覚神経への直接的情報伝達経路の解明

神経-骨芽細胞間における求心性シグナル伝達について検討を行った。SCG-MC3T3-E1 共培養系および DRG-MC3T3-E1 共培養系において骨芽細胞を選択的に刺激するために2つの方法を確立した。第一には微小ガラスピペットと圧装置を用いた局所水流による機械刺激を与える方法、第二に SCG および DRG と MC3T3-E1 細胞との薬物反応性の違いを利用し、MC3T3-E1 細胞を選択的に刺激する方法

である。

局所水流刺激によって標的とした骨芽細胞のみで [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 上昇を誘発することが可能な刺激条件を検討し、3-(3)-に記載した刺激条件を確立した(局所水流刺激によって誘発される MC3T3-E1 細胞の [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 上昇のメカニズムについて検討した結果を4-(3)で述べる)。SCG-MC3T3-E1 共培養系、DRG-MC3T3-E1 共培養系いずれにおいても MC3T3-E1 細胞に対する局所水流刺激によって標的とした MC3T3-E1 細胞のみならず、隣接した SCG および DRG においても [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 上昇が見られた。

SCG および DRG と MC3T3-E1 細胞との薬物反応性の検討を行い、発痛物質である bradykinin に対して MC3T3-E1 細胞が両神経細胞に比べて著しく感受性が高いという結果が得られた。またヒト正常骨芽細胞である SaM-1 細胞も MC3T3-E1 細胞と同様に bradykinin に対して高い感受性を示すことが分かった。SCG-MC3T3-E1 共培養系および DRG-MC3T3-E1 共培養系において神経細胞が反応しない低濃度の bradykinin を灌流適用したところ、MC3T3-E1 細胞のみならず SCG および DRG においても [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 上昇が見られた。

以上の結果から**神経-骨芽細胞間に求心性の直接的なシグナル伝達経路が形成され得ることが示唆された。**

続いて、この求心性シグナル伝達のメカニズムについて特に DRG-MC3T3-E1 共培養系を用いて、より詳細な検討を行った。一般的に bradykinin の受容体で B<sub>1</sub> および B<sub>2</sub> 受容体は Gq 共役型であり、細胞内 Ca<sup>2+</sup> ストアからの Ca<sup>2+</sup> 放出により [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 上昇を引き起こす。灌流液中の Ca<sup>2+</sup> を除去した状態で、共培養系への bradykinin を適用すると MC3T3-E1 細胞の [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 上昇は見られたが、DRG においては消失した。この結果から DRG における [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 上昇は直接 bradykinin が作用したのではないことが確認された。MC3T3-E1 からの伝達経路として伝達物質の開口分泌を介した経路とギャップ結合を介した経路が考えられるため、それぞれの阻害薬の影響を検討したところ、開口分泌阻害薬によって DRG における [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 上昇が抑制される一方、ギャップ結合阻害薬によっては DRG の反応は抑制されなかった。以上の結果から、DRG における [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 上昇は何らかの伝達物質の放出を介した反

応であると考えられる。さらに伝達物質および受容体を特定するために非選択的ATP受容体遮断薬およびP2X<sub>7</sub>受容体遮断薬、AMPA型、NMDA型、代謝型グルタミン酸受容体のそれぞれの遮断薬の作用を検討したところ、DRGにおける[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>上昇は非選択的ATP受容体遮断薬およびP2X<sub>7</sub>受容体遮断薬によって抑制されたのに対し、いずれのグルタミン酸受容体遮断薬によっても抑制されなかった。

以上の結果より、**bradykininによって刺激された骨芽細胞からATPが開口分泌され、P2X<sub>7</sub>受容体を介して感覚神経に直接シグナル伝達が起こる可能性が示唆された(図1)**。Bradykininは炎症時などに産生される発痛物質であり、骨芽細胞は骨においてbradykininが産生された時に高感度に反応し、感覚神経にその情報を伝える役割を担っている可能性が明らかとなった。これらは炎症による骨吸収、またそれに伴う骨の痛みのメカニズム解明の一助となると考えられる。

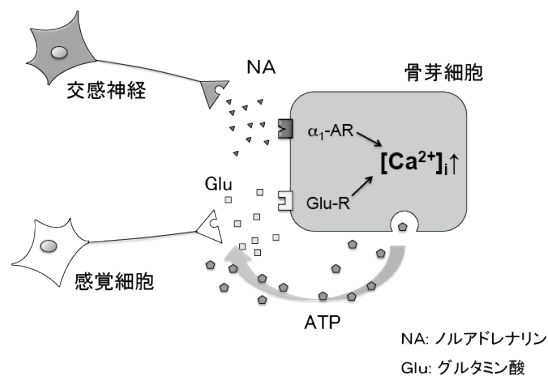


図1 交感神経および感覚神経と骨芽細胞の相互シグナル伝達

### (3) 骨芽細胞の機械刺激受容におけるグルタミン酸放出の機能の解明

一般に、荷重による骨量増加や脱荷重による骨量減少が起こることが知られており、機械刺激は骨代謝調節において重要な役割を果たしていると考えられる。一方、骨が機械刺激を受容する詳細なメカニズムについては明らかになっていない。多くの研究において骨に対する荷重によって骨細管の細胞外液に流動が生じ骨細胞や骨芽細胞にずり応力が加わることで機械刺激応答が引き起こされると考えられている。本研究においてもMC3T3-E1細胞に対して局所水流によるずり応力を加えることで[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>上昇が引き起こされた。この局所水流により誘発される

[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>上昇は細胞外Ca<sup>2+</sup>の除去や機械刺激感受性チャンネル阻害薬によって消失する一方、細胞内Ca<sup>2+</sup>ストアからのCa<sup>2+</sup>放出を抑制するIP<sub>3</sub>受容体阻害薬やホスホリパーゼC阻害薬によっても有意に抑制された。さらに開口分泌阻害薬によっても有意に抑制された。これらの結果から局所水流による[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>上昇には機械刺激感受性チャンネルの活性化に続き、何らかの分子が放出され、自己分泌的に作用する経路の関与が示唆された。

骨芽細胞への脱分極刺激などによりATPやグルタミン酸などの分子が放出されることが知られているため、局所水流刺激による[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>上昇に対するATP受容体遮断薬およびグルタミン酸受容体遮断薬の作用を検討した結果、ATP受容体遮断薬によっては影響を受けなかったが、AMPA型、NMDA型、代謝型グルタミン酸受容体阻害薬のいずれによっても[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>上昇は大きく抑制され、これらの併用により[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>上昇は大部分が抑制された。さらにグルタミン酸の灌流適用によって引き起こされる[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>上昇に対して機械刺激感受性チャンネル阻害薬は全く影響を受けなかったことから、グルタミン酸受容体が直接機械刺激によって活性化されている可能性は否定された。

以上の結果より、**骨芽細胞において局所水流によるずり応力刺激は機械感受性チャンネルの活性化を引き起こし、グルタミン酸の放出を誘発し、グルタミン酸が自己の受容体に作用する事で[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>上昇に大きく寄与していることが明らかとなった(図2)**。機械刺激による骨代謝制御メカニズムの解明は長期臥床による骨量の低下などを抑制する方略の開発につながる可能性が考えられる。

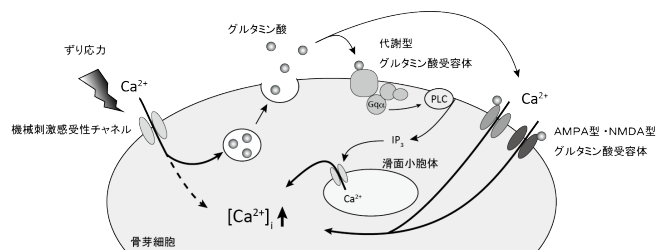


図2 骨芽細胞の機械刺激受容におけるグルタミン酸放出の関与

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計1件)

Norika Tsuchiya、Daisuke Kodama、Shigemi Goto、Akifumi Togari、Shear stress-induced  $Ca^{2+}$  elevation is mediated by autocrine-acting glutamate in osteoblastic MC3T3-E1 cells、Journal of Pharmacological Sciences、2015、127 巻、pp.311-318、  
査 読 有 、 DOI: 10.1016/j.jphs.2015.01.005

### 〔学会発表〕(計10件)

兒玉 大介、戸蒔 彰史、Bidirectional communication between sensory neuronal cells and osteoblasts by exocytosis of neurotransmitters、第 88 回日本薬理学会年会、2015.3.18-20、名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)

土屋 範果、兒玉 大介、後藤 滋巳、戸蒔 彰史、骨芽細胞における機械刺激によるグルタミン酸放出とその生理的役割、第 73 回日本矯正歯科学会大会、2014.10.20-22、幕張メッセ(千葉県・千葉市)

兒玉 大介、戸蒔 彰史、神経-骨芽細胞共培養系における細胞間シグナル伝達、第 56 回歯科基礎医学会学術大会、2014.9.25-27、福岡国際会議場(福岡県・福岡市)

土屋 範果、兒玉 大介、後藤 滋巳、戸蒔 彰史、骨芽細胞の機械刺激応答におけるグルタミン酸放出の役割、第 49 回骨 Ca 代謝研究会、2014.6.27、名古屋大学(愛知県・名古屋市)

兒玉 大介、戸蒔 彰史、In vitro 共培養系における骨芽細胞から感覚神経へのシグナル伝達、第 34 回日本歯科薬物療法学会学術大会、2014.6.21-22、大阪歯科大学(大阪府・大阪市)

兒玉 大介、戸蒔 彰史、Bidirectional communication between sensory neuronal cells and osteoblasts in an in vitro co-culture system、第 87 回日本薬理学会年会、2014.3.19-21、東北大学(宮城県・仙台市)

兒玉 大介、戸蒔 彰史、骨芽細胞と神経細胞の共培養実験法の確立と細胞間相互作用の検討、日本口腔組織培養学会設立 50 周年記念大会、2013.11.23-24 日本歯科大学(東京都・千代田区)

土屋 範果、兒玉 大介、後藤 滋巳、戸蒔 彰史、骨芽細胞の機械刺激による  $Ca^{2+}$ シグナルへのグルタミン酸の関与、日本口腔組織培養学会設立 50 周年記念大会、2013.11.23-24 日本歯科大学(東京都・千代田区)

土屋 範果、兒玉 大介、後藤 滋巳、戸蒔 彰史、骨芽細胞様細胞における機械刺激による細胞内カルシウム濃度の上昇にグルタミン酸が関与する、第 72 回日本矯正歯科学会大会、2013.10.7-9、キッセイ文化ホール(長野県・松本市)

土屋 範果、兒玉 大介、後藤 滋巳、戸蒔 彰史、骨芽細胞様細胞における張り応力による細胞内カルシウム濃度の上昇にグルタミン酸が関与する、第 55 回歯科基礎医学会、2013.9.21-22、岡山コンベンションセンター(岡山県・岡山市)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

友寄大介(兒玉大介)

(KODAMA, Daisuke)

愛知学院大学・歯学部・講師

研究者番号: 40549979