

機関番号：33902

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21890276

研究課題名（和文） 交感神経による骨代謝制御における TRPC チャンネルの関与の検討

研究課題名（英文） Involvement of TRPC channels in sympathetically-regulated bone metabolism

研究代表者

兒玉 大介 (KODAMA DAISUKE)

愛知学院大学・歯学部・助教

研究者番号：40549979

研究成果の概要（和文）：

パッチクランプ法を用いて、ヒト正常骨芽細胞 SaM-1 を用いてノルアドレナリンがイオンチャンネルに与える影響を検討した。その結果、 $\alpha_{1B}$ -アドレナリン受容体を介して K チャンネルが抑制されることが明らかとなった。またこの作用はプロテインキナーゼ C および細胞内  $Ca^{2+}$  濃度に非依存的であり、 $G_q$  タンパク共役型以外の受容体を介することが示唆された。本研究により交感神経による骨代謝制御機構に新たな知見が得られた。

研究成果の概要（英文）：

By using patch clamp methods, effects of noradrenaline on ion channels were investigated in human osteoblast, SaM-1. The results in this study indicated that noradrenaline inhibited K channels via  $\alpha_{1B}$ -adrenergic receptors. The effect was independent of protein kinase C and intracellular  $Ca^{2+}$  concentration. This suggested that  $G_q$  protein-coupled receptor was not involved in the effect. This study will aid our understanding of the mechanism behind the regulation of bone metabolism by the sympathetic nervous system.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,020,000	306,000	1,326,000
2010 年度	820,000	246,000	1,066,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,840,000	552,000	2,392,000

研究分野：薬理学

科研費の分科・細目：機能系基礎歯科学

キーワード：交感神経、骨芽細胞、イオンチャンネル

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 神経系による骨代謝制御機構が明らかになってきていた。研究代表者の所属する研究室においては交感神経系による骨代謝制御機構について長年研究を行っており、骨芽細胞、破骨細胞いずれにもアドレナリン受容

体が発現していること、単離した交感神経細胞と骨芽細胞の共培養により神経細胞から骨芽細胞への連絡がなされること、また骨代謝に異常を来す様々な病態モデルに交感神経系が関わっていることを報告してきた。

(2) TRP チャネルファミリーは機械刺激や温度刺激、浸透圧刺激など様々な刺激によって開口する6回膜貫通型の非選択的陽イオンチャネルであり、その多くがCa透過性を示すことから細胞内情報伝達に非常に重要を果たしていると考えられ、近年、特に注目されているイオンチャネルの1つである。他の研究室より骨肉腫由来の骨芽細胞様細胞にも複数のTRPチャネルファミリーの発現が報告されているが、その生理機能は十分に解明されていない。本研究の予備実験においてヒト正常骨芽細胞SaM-1にTRPチャネルファミリーのmRNA発現を確認している。

(3) アドレナリン受容体は一般的にGタンパク共役型受容体として知られており、G<sub>q</sub>タンパクと共役し、ホスホリパーゼCの活性化を介した細胞内Ca濃度の上昇を起こすものと、G<sub>s</sub>またはG<sub>i</sub>タンパクと共役し、アデニル酸シクラーゼ活性の制御を介してcAMP量の調節をしているものが知られている。一方、これらのシグナル伝達経路の下流においてTRPチャネルを含む各種のイオンチャネルが関与していることが報告されており、細胞機能の発現に非常に重要な役割を果たしていることが多く報告されている。

(4) 骨芽細胞におけるアドレナリン受容体の生理機能としてはαアドレナリン受容体を介した細胞増殖活性の亢進、アルカリホスファターゼ活性の亢進、OPGの発現増加が報告されており、βアドレナリン受容体を介した細胞増殖活性の低下、RANKLの発現増加、IL-1βなどの炎症性サイトカインの発現増加などが報告されている。特にβアドレナリン受容体を介した骨形成機能の抑制と破骨細胞形成促進などによる骨吸収活性の増加は交感神経活性の亢進による骨粗鬆症の原因であることが示唆されている。

## 2. 研究の目的

(1) ヒト骨芽細胞SaM-1において交感神経における神経伝達物質であるノルアドレナリンによるイオンチャネル制御の有無を検討する。また関与する受容体や細胞内情報伝達経路およびイオンチャネルの同定を行うことで交感神経系による骨芽細胞への影響、すなわち骨代謝制御機構について新たな知見を得る。

(2) TRPチャネルの骨芽細胞における機能を、特に他の臓器において報告されるアドレナリン受容体との関連に注目して、検討する。

## 3. 研究の方法

(1) 標本はヒト尺骨骨膜由来の正常骨芽細胞SaM-1を用いた。10%FBSおよびカナマイシン60 μg/mlを含むαMEMによって、37°C、CO<sub>2</sub> 5%を含む95%湿空气中で培養を行った。実験前日にカバーガラス上に播種し、実験に用いた。

(2) ホールセルパッチクランプ法による膜電流の測定を行った。電位固定法によって-100 mVから+40 mVのランプ電位による電流応答より、電位電流曲線の記録を行う。薬物の投与前後における電位電流曲線の変化からイオンチャネル活性の変化を測定した。また電位電流曲線の各種パラメーターより、骨芽細胞におけるイオンチャネルの性質を検討した。

(2) ヒト骨芽細胞において共焦点レーザー顕微鏡およびCa感受性蛍光色素fluo-3AMを用いた細胞内Caイメージング法によって、ノルアドレナリンによる細胞内Ca動態変化を測定した。

## 4. 研究成果

(1) ヒト骨芽細胞において灌流適用したノルアドレナリンによって用量依存的にホールセル電流の抑制が見られた。抑制作用は適用直後から速やかに現れ、薬物適用終了後もしばらく持続した。またこの時、静止膜電位を示す、電位電流曲線の逆転電位の脱分極側へのシフトが見られた。これは電流の抑制がKチャネルの抑制による可能性を示すものである(図1)。

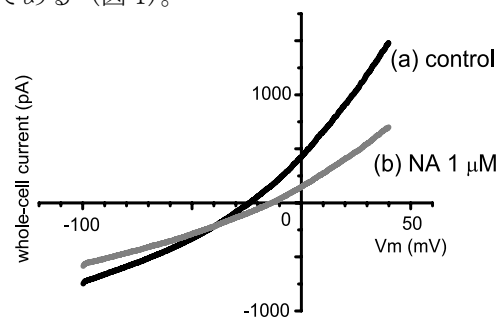


図1A ノルアドレナリン(NA)による電流抑制作用

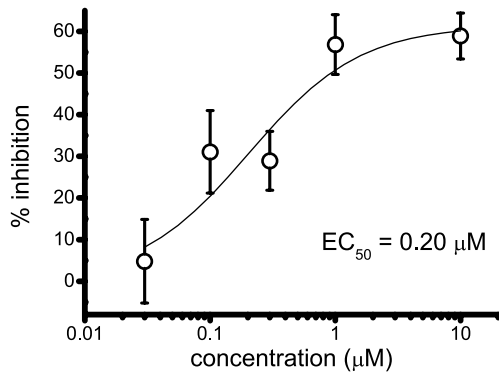


図 1B NA による電流抑制の用量作用曲線

(2) ノルアドレナリンによるホールセル電流抑制作用は $\alpha_{1B}$ -アドレナリン受容体選択的阻害薬 chloroethylclonidine (CEC) の前適用によって完全に見られなくなった。(図 2)。この結果よりノルアドレナリンの電流抑制作用は $\alpha_{1B}$ -アドレナリン受容体を介していることが示された。

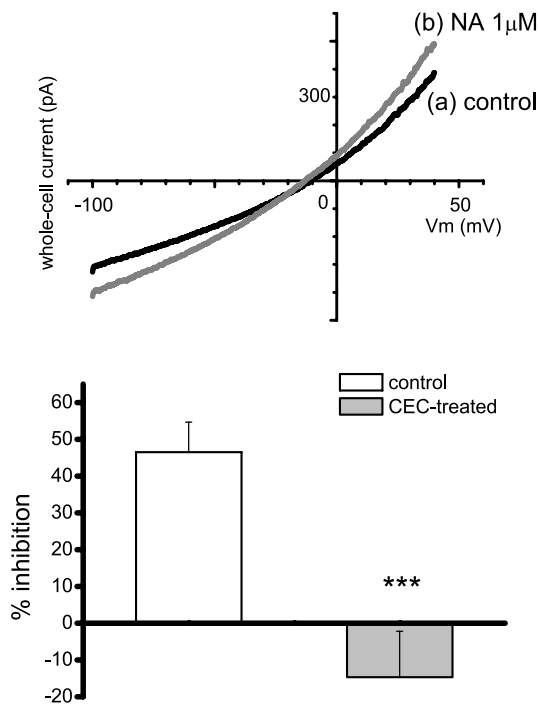


図 2 CEC による NA の電流抑制作用の阻害。  
(上) 電位電流曲線 (下) 抑制率 (n = 5)

(3) ノルアドレナリンによるホールセル電流抑制作用は電極内液を K チャンネル阻害薬である CsCl を含むものにするで見られなくなった。一方、同じく K チャンネル阻害薬であるテトラエチルアンモニウム (TEA) はノルアドレナリンと同様にホールセル電流

を抑制したが、その後に投与したノルアドレナリンの作用には影響を与えなかった (図 3)。これらの結果はノルアドレナリンによって Cs 感受性で TEA 非感受性の K チャンネルが抑制されることを示している。

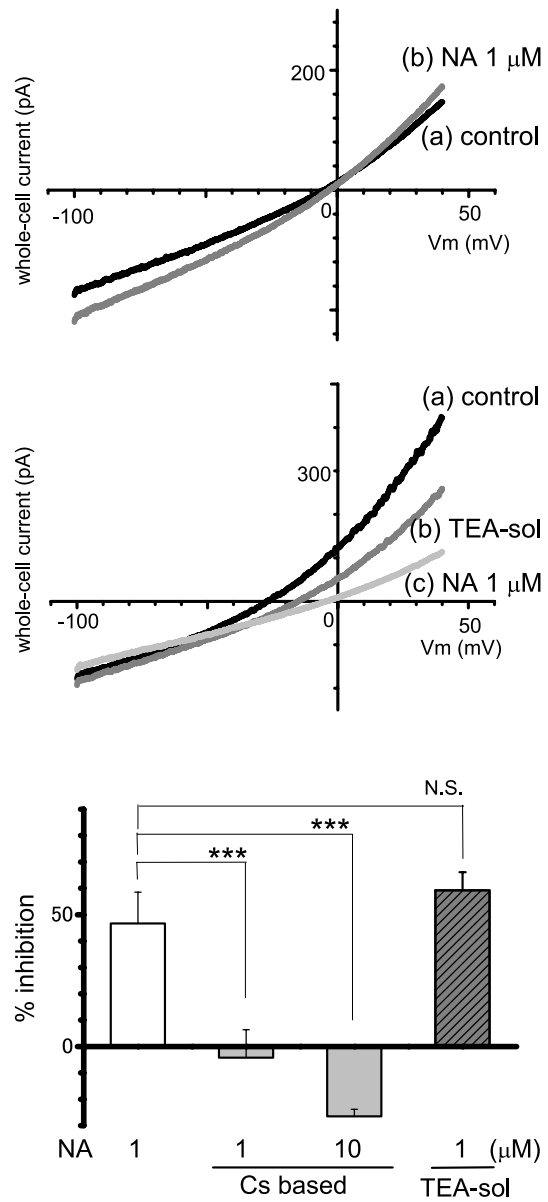


図 3 NA による電流抑制に対する K チャンネル阻害薬の影響。(上) CsCl による影響 (中) TEA による電流抑制および TEA 適用後の NA による電流抑制 (下) 抑制率 (n = 5)

(4) 一般に、 $\alpha_{1B}$ -アドレナリン受容体の活性化によってホスホリパーゼ C の活性化を介した細胞内 Ca 濃度の上昇が起こることが知られている。ヒト骨芽細胞 SaM-1 においてもノルアドレナリンの適用によって細胞

内 Ca 濃度の上昇が認められ、その作用はホスホリパーゼ C 阻害薬 U73122 の適用によって完全に消失した。一方、U73122 の前適用によってノルアドレナリンのホールセル電流抑制作用は影響を受けなかった。また電極内液に Ca キレート剤である EDTA 5 mM を加えた場合もノルアドレナリンのホールセル電流抑制作用は影響を受けなかった (図 4)。

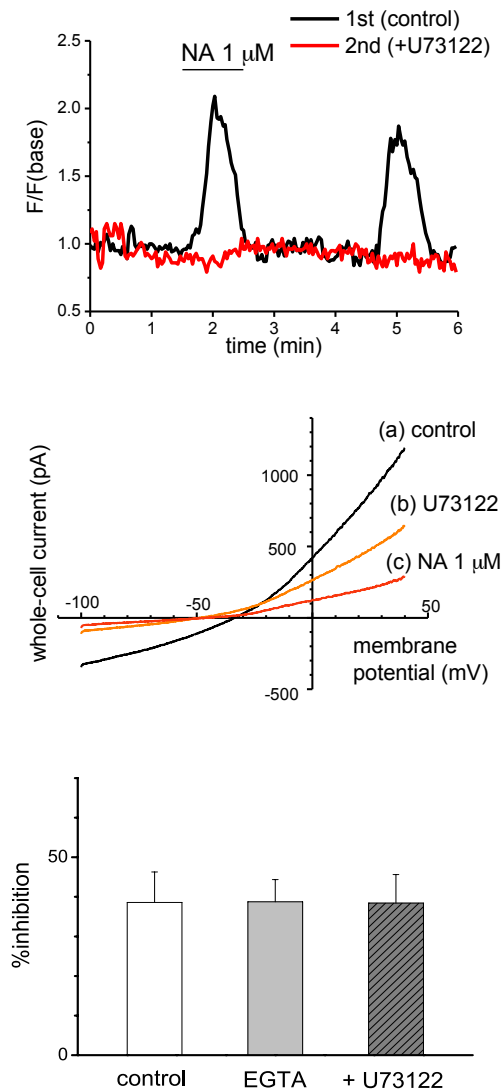


図 4 NA による電流抑制に対するホスホリパーゼ C 阻害薬の影響。(上) NA による細胞内 Ca 濃度の上昇とホスホリパーゼ C 阻害薬 U73122 による阻害 (中) NA の電流抑制に対する U73122 の影響 (下) 抑制率 (n = 5 - 6)

以上の結果より、ノルアドレナリンはヒト骨芽細胞において $\alpha_{1B}$ -アドレナリン受容体を介して Cs 感受性で TEA 非感受性の K チャネルを抑制することが示された。 $\alpha_{1B}$ -アドレ

ナリン受容体は  $G_q$  タンパクと共役し、細胞内 Ca 濃度を上昇させることが知られているが、組織によって  $G_i$  タンパクと共役するものが存在することが報告されている。本研究により明らかとなったノルアドレナリンによる K チャネル抑制作用はホスホリパーゼ C 阻害薬によって影響を受けなかったことから、 $G_q$  タンパク以外の G タンパクと共役する $\alpha_{1B}$ -アドレナリン受容体が関与している可能性が示唆された。一般に K チャネルは静止膜電位の形成に関わっており、細胞増殖活性を制御していると考えられている。ノルアドレナリンによる K チャネルの抑制が骨芽細胞の生理機能に与える影響の検討が今後望まれる。

また本研究においてはノルアドレナリンを介した TRP チャネル活性化については観測されなかったが、ヒト骨芽細胞において TRP チャネルが発現していることは明らかとなっており、その生理機能についても今後の研究が望まれる。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

①Daisuke Kodama, Akifumi Togari, Modulation of potassium channels via the  $\alpha_{1B}$ -adrenergic receptor in human osteoblast. Neuroscience letters, 2010, 485, 102-106, 査読有

〔学会発表〕(計 3 件)

①兒玉大介, 戸苅彰史, Modulation of potassium channels via the  $\alpha_{1B}$ -adrenergic receptor in human osteoblasts. 2011.3.22. 第 8 4 回日本薬理学会年会 (横浜)

②兒玉大介, 戸苅彰史, ヒト骨芽細胞 SaM-1 における $\alpha_{1B}$ -アドレナリン受容体刺激のシグナル伝達経路について. 2010.11.13. 第 4 7 回日本口腔組織培養学会学術大会 (高知)

③兒玉大介, 戸苅彰史, ヒト骨芽細胞における $\alpha_{1B}$ -アドレナリン受容体を介した K チャネルの抑制. 2010.9.21. 第 5 2 回歯科基礎医学会学術大会 (東京)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

兒玉 大介 (Daisuke Kodama)

愛知学院大学・歯学部・助教

研究者番号：40549979