HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	骨芽細胞の増殖，分化と石灰化におけるNa，K-ATPaseの役割［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	山田，淳一
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第11252号
Issue Date	2014-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/56150
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Junichi_Yamada_abstract.pdf，論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称　博士（歯学）　　氏　名　山田　淳一

学　位　論　文　題　名

骨芽細胞の増殖，分化と石灰化における Na,K-ATPase の役割

【目的】

Na,K-ATPase は動物細胞の形質膜に局在し，細胞内外の Na^+と K^+の濃度勾配の維持を行う膜タンパク質であり，細胞の体積や浸透圧の調節などの普遍的な機能を担っている．骨芽細胞による石灰化局所への Ca^{2+}の供給に Na/Ca 交換輸送体 (NCX) や Ca-ATPase などのイオントランスポーターの関与が知られているが, これらと関連の深い Na,K-ATPase の機能については解明されていない．本研究では，Na,K-ATPase の骨芽細胞の増殖，分化および石灰化における役割を明らかにすることを目的として行った．

【材料と方法】

細胞は MC3T3-E1 (E1) 細胞を用い，Na,K-ATPase 活性は ATP を基質として，遊離無機リン量の測定を，Chifflet らの方法に基づき検討した．次に，Na,K-ATPase の特異的阻害薬である ouabain (1~500 μM) を作用させ，細胞増殖試験は，96 ウェルプレートに 500 cells/well で播種し，WST-8 法に基づいた Cell Counting Kit 8 を用いて行った．アルカリフォスファターゼ (ALP) 活性は，*p*NPP を基質として測定し，石灰化結節の観察は Alizarin Red 染色，および von Kossa 染色にて観察した．また，Na,K-ATPase α_1 siRNA 導入によるノックダウンあるいは ouabain を作用させて Na,K-ATPase を阻害して，BMP-2 による石灰化，Runx2，ALP，オステオカルシン，Ⅰ型コラーゲン mRNA の発現誘導，さらに，Smad1/5/8 (Ser463/465)，Smad1 (Ser206)，MAP キナーゼ (MAPK) ならびに Src のリン酸化に対する影響について検討した．

【結果と考察】

E1 細胞の Na,K-ATPase 活性は，confluence 以前に最も高く，以降減少し，confluence 後 6 日目，および 18 日目に一過性に増加した．confluence 以前に ouabain を作用させると，その濃度依存的に細胞増殖の抑制が認められた．一方，500 μM ouabain においても細胞数の減少は認められず，細胞死は生じていないものと推測された．以上の結果から，Na,K-ATPase は E1 細胞の増殖制御に関与していることが示唆された．

次に，E1 細胞に confluence 時より ouabain を作用させ，ALP 活性の経時的変化を調べた．その結果, ALP 活性ならびに石灰化は, ouabain 濃度依存的に抑制された．また, confluence 後 18 日目に認められる Na,K-ATPase 活性の一過性の増加が，ALP 活性の上昇に関連するのではないかと推測し，confluence 後 16 日目から 22 日目に ouabain を作

用させ，ALP 活性の変化を検討した．その結果，ouabain を作用している間は，ALP 活性が濃度依存的に抑制された．一方，作用を中止すると ALP 活性の回復が認められた．このような可逆的な変化を示すことから，骨芽細胞の分化開始に，Na,K-ATPase が機能していることが示唆された．

次に，Na,K-ATPase がどのようなメカニズムで骨芽細胞分化に関与しているかを明らかにするため，BMP-2 を用いて検討することにした．

BMP-2 は，骨芽細胞における Runx2，ALP，オステオカルシン，および I 型コラーゲンの発現を強く促進し，強力な分化誘導作用や骨誘導能を有している．BMP-2 を細胞に作用させるとセリン/スレオニンキナーゼ活性を有する受容体が活性化し，細胞質に存在する Smad1/5/8 の C 末端側にあるセリン残基をリン酸化する．この部位がリン酸化された Smad1/5/8 はさらに Smad 4 と複合体を形成し，核内へ移行して標的遺伝子の転写調節領域に結合することで転写を誘導する．一方，MAPK などにより Smad 1 リンカー部位のセリンやスレオニン残基がリン酸化を受けると，核内移行が阻害される．

本研究において, ouabain あるいは Na,K-ATPase α_1 サブユニットノックダウンにより Na,K-ATPase を阻害すると，BMP-2 による骨芽細胞マーカー遺伝子 mRNA の発現誘導は抑制され，石灰化も抑制された．

さらに，BMP-2 で E1 細胞を刺激すると Smad1/5/8 の Ser463 ならびに Ser465 のリン酸化は促進されたが，ouabain 存在下でもリン酸化はほとんど変化しなかった．この結果は Na,K-ATPase を阻害すると Smad1/5/8 の標的遺伝子である Runx2 の発現が減少したことと矛盾している．一方，ouabain を作用させると，Smad 1 のリンカー部位に存在する Ser206 のリン酸化が誘導された．以上の結果から，ouabain によるこの部位のリン酸化が Smad1/5/8 と Smad 4 の複合体の核への移行を抑制し，Runx2 mRNA の発現が抑制されることが示唆された．

Na,K-ATPase が MAPK を制御し，Smad 1 の Ser206 のリン酸化を調節しているのではないかと推測し，ouabain 存在下で，E1 細胞に BMP-2 を作用させると，ERK, p38 のリン酸化誘導が増強された．一方, JNK のリン酸化は抑制された．これらの結果から，Na,K-ATPase 阻害により活性化した ERK あるいは p38 が Smad 1 の Ser206 のリン酸化に関与している可能性が示唆された．

Na,K-ATPase による MAPK の制御においては，非受容体型チロシンキナーゼである Src が関与しているという報告がある．さらに，低濃度の ouabain を作用させると，そのホルモン様作用により Src が活性化されることが知られている．本研究において，500 μM ouabain を作用させても Src のリン酸化は誘導されなかった．以上の結果から，Na,K-ATPase 阻害による ERK や p38 の活性化は, Src を介していないことが示された．

本研究における，E1 細胞の石灰化に際しての Na,K-ATPase 活性化時期と，既に報告されている NCX 発現時期がほぼ一致している．Na,K-ATPase は NCX と共役して細胞内の Na^+や Ca^{2+}の濃度調節を行っている．本研究において，Na,K-ATPase 阻害による細胞内 Na^+の蓄積に反応して，NCX 逆向輸送が生じ，細胞内 Ca^{2+}が増加し，セカンドメッセンジャーとして MAPK リン酸化に変化を及ぼした可能性も考えられた．

【結論】

骨芽細胞において，Na,K-ATPase は細胞増殖とともに，MAPK を介して石灰化の制御にも関与していることが示唆された.