



Title	Inhibition of neuropeptide Y Y1 receptor induces osteoblastic differentiation in MC3T3-E1 cells [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	箭原, 元基
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第12609号
Issue Date	2017-03-23
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/66154
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Motoki_Yahara_abstract.pdf, 論文内容の要旨



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 箭原 元基

学 位 論 文 題 名

Inhibition of neuropeptide Y Y1 receptor induces osteoblastic differentiation
in MC3T3-E1 cells

(Neuropeptide Y Y1 受容体の阻害による MC3T3-E1 細胞における骨芽細胞分化
の誘導)

Neuropeptide Y は、36 アミノ酸残基よりなる生理活性ペプチドで、中枢神経系、特に視床下部、大脳皮質、海馬など中枢神経系に広く存在し、食欲、エネルギー消費、記憶や血圧調節など広範な生命現象に関与する。この Neuropeptide Y は末梢神経においても交感神経末端でカテコールアミンのコトランスミッターとして働く。また、末梢組織においても、副腎髄質、肝臓、心臓といった組織の細胞や骨芽細胞、骨細胞および脂肪細胞などが Neuropeptide Y を産生することが報告されている。この Neuropeptide Y の受容体は G タンパク質共役型で Y レセプターと呼ばれ、5 つのサブタイプ Y1, Y2, Y4, Y5 および y6 が知られている。それぞれ組織特異的に発現しており、Y1 レセプターは中枢神経系では視床下部の傍室核、末梢組織では副腎、膵臓、腎臓や胎盤などの広範な組織および骨芽細胞および脂肪細胞など種々の細胞における発現が報告されている。

近年、骨組織において骨芽細胞などが NPY を産生することと、その受容体である Y1 レセプターの存在が報告された。また、この Y レセプターや Neuropeptide Y のノックアウトマウスの作成がされ、骨量に影響が及ぶと報告された。全身における Neuropeptide Y、Y1 レセプターもしくは Y2 レセプターの欠失マウスでは、骨量の増大が報告された。一方、Y1 レセプターを視床下部で組織特異的に欠失させても骨量に変化はないが、骨芽細胞特異的に欠失させたところ、骨量は増大していた。これらの報告から、骨代謝において骨芽細胞の Y1 レセプターは重要な役割を果たしていることが推測される。すでに紅林らは、C2C12 細胞において骨芽細胞分化に伴い Y1 レセプターの発現が増加することを報告した。しかし、骨芽細胞における Y1 レセプターの機能の詳細については明らかではない。そこで、本研究では、MC3T3-E1 細胞において RNA 干渉を用いた Y1 レセプター発現のノックダウンを行いその影響を調べ、骨芽細胞における Y1 レセプターの役割を明らかにすることを目的とした。

MC3T3-E1 細胞培養系を用いて Y1 レセプター siRNA をリポフェクション法でトランスフェクトして培養し、これらの細胞の Y1 レセプターの発現をノックダウンさせた。骨芽細胞の分化の指標の一つとされるアルカリフォスファターゼ (ALP)

の活性を測定および染色したところ、Y1 レセプターの発現をノックダウンさせ6日後には ALP 活性は増加した。MC3T3-E1 細胞において、Y1 レセプターの発現をノックダウンさせ、アスコルビン酸および β グリセロフォスフェートを加え培養したところ、これらを加えなかった場合と比べて、細胞の ALP 活性は増加した。また、von Kossa 染色により Y1 レセプターの発現をノックダウンさせるとカルシウム沈着が増加した。

次に、細胞から RNA を回収して、種々の骨芽細胞分化関連 mRNA の発現量について Taqman プローブを用いリアルタイム PCR 法により測定した。Y1 レセプター siRNA を MC3T3-E1 細胞にトランスフェクトし Y1 レセプターの発現をノックダウンさせたところ、ALP、オステオカルシン、骨シアロタンパク質および I 型コラーゲン $\alpha 1$ 鎖の mRNA 量が増加した。これらの結果から、Y1 レセプターの発現をノックダウンすることによって、MC3T3-E1 細胞における骨芽細胞分化が促進されることが明らかになった。

Runx2 および osterix は、骨芽細胞分化に関わる重要な転写因子として知られている。そこで、Y1 レセプター発現のノックダウンによる骨芽細胞の分化誘導が、これらの転写因子を介するかどうか検討した。MC3T3-E1 細胞に Y1 レセプター siRNA をトランスフェクトして培養し2日後に RNA を回収しリアルタイム PCR 法を行って調べたところ、Runx2 および osterix の mRNA 発現量が増加した。これらより Y1 レセプター発現のノックダウンによる骨芽細胞の分化誘導には Runx2 および osterix の発現増加を介する可能性が考えられた。

さらに、Y1 レセプター発現のノックダウンによる細胞増殖およびアポトーシス誘導に対する影響を検討するために、生細胞数および caspase3/7 活性を測定した。MC3T3-E1 細胞に Y1 レセプター siRNA をトランスフェクトして培養し、コントロールとして用いた scramble siRNA を用いた場合の生細胞数および caspase3/7 活性を比べたが、両者の間に有意な差は認められなかった。これらより、Y1 レセプター発現のノックダウンは細胞増殖およびアポトーシス誘導に影響を与えないことが考えられた。

本研究により、MC3T3-E1 細胞において Y1 レセプターの発現をノックダウンすることによって、Runx2 および osterix の発現増加を介して骨芽細胞分化が誘導されることが明らかになった。また、骨芽細胞においてこの Neuropeptide Y と Y1 レセプターはオートクラインに作用して骨芽細胞の分化を負に制御している可能性が示唆された。今後のさらなる研究により、本研究で得られた知見が骨粗鬆症などの疾患治療へ応用されることが期待される。