

学位論文題名

低カルシウム環境下培養ラット胎児頭蓋冠由来骨形成細胞
のミトコンドリア内遊離カルシウムの動向

学位論文内容の要旨

緒言

歯周疾患あるいは骨粗鬆症などの硬組織代謝抑制を伴う病態を解明するためには、そのモデルとして *in vivo* では低カルシウム食飼育、*in vitro* では低カルシウム環境実験系を用いることは有用である。これまで低カルシウム環境下で培養したラット胎児頭蓋冠由来骨形成細胞（骨形成細胞）では、細胞内遊離カルシウム濃度あるいは蛋白質リン酸化酵素のプロテインキナーゼC活性の低下が生じ、細胞内情報伝達系に影響を与えること、また低カルシウム環境に陥り、石灰化抑制の生じたラットの脛骨骨端軟骨板では、その軟骨細胞における細胞内カルシウムの貯蔵所の一つであるミトコンドリアに形態学的変化の生じることが報告されている。しかし、低カルシウム環境において培養した骨形成細胞のミトコンドリアにおけるカルシウムならびに遊離カルシウムなどのカルシウム動態に及ぼす低カルシウム環境の影響について検討した報告はほとんど見当たらない。そこで、硬組織代謝抑制機構の一端を解明するために、ラット胎児頭蓋冠から骨形成細胞を分離し、低カルシウム環境下において、その全細胞内カルシウム量、全ミトコンドリア内カルシウム量を測定し、さらにミトコンドリア内遊離カルシウムに及ぼす低カルシウム環境の影響を、カフェイン、ライアノジン、ルテニウムレッド等を用いて調べ、ミトコンドリア内遊離カルシウムの動向について検索した。

材料と方法

胎生18～21日齢の Wistar 系ラットの頭蓋冠より酵素消化法を用い細胞を採取し、 α MEM を用い通法に従い6～7日間培養を行った。培養液のカルシウム濃度は、対照群では1.87mM、低カルシウム群では0.34mMとした。培養は、60mm径のディッシュを用い37℃、5% CO₂、95%

Airの気相下で、培養液は2日ごとに交換して行った。細胞は、培養6～7日目、コンフルエントの状態を確認後、ラバーポリスマンで採取した。全細胞内カルシウム量の測定のため、採取した細胞を、 $750 \times g$ 、5分間遠心し、正常ならびに低カルシウムの培養液を一定量加え、十分にピペットで均一化したのち、吸引法により、 $0.45 \mu m$ 、ミリポアフィルター上に集めた。一方、全ミトコンドリア内カルシウム量ならびにミトコンドリア内遊離カルシウム量の測定のため、ラバーポリスマンで採取した細胞を、 $0.25 M$ シュクロース中で段階的に処理を行い、ミトコンドリア分画を回収した。カルシウム濃度の測定は、フィルター上に集めた細胞を $0.1 N$ HCl、 $2 ml$ 中に浸漬し、またミトコンドリア分画には、 $0.1 N$ HClを $1 ml$ 加え、共に室温中に24時間放置することにより、カルシウムを溶出し、原子吸光分光光度計 (Varian, AA-1475型) にて測定した。蛋白質量はLowry法にて測定した。ミトコンドリア内遊離カルシウム濃度は、Fluo3-AMを用い、蛍光分光光度計 (日立F4010型) で測定した。またミトコンドリア内遊離カルシウムの放出機構は、カフェイン、ライアノジン、ルテニウムレッド等を用いて検討した。なおミトコンドリアの形態学的観察を透過型電子顕微鏡により行った。

結果

1. 全細胞内カルシウム量は、対照群の $272 \pm 32 nmol/mg$ protein ($n=6$) に対し、低カルシウム群では、 $145 \pm 39 nmol/mg$ protein ($n=6$) と低く、危険率 0.1% で有意な差が認められた。

2. ミトコンドリア分画の透過型電子顕微鏡による観察から、対照群ならびに低カルシウム群ともに、膜構造の損傷はほとんど認められず、また内部にはミトコンドリアの特徴であるクリステを有していることを確認した。

3. 全ミトコンドリア内カルシウム量は、対照群の $12.20 \pm 2.81 nmol/mg$ protein ($n=9$) に対し、低カルシウム群では、 $6.55 \pm 2.55 nmol/mg$ protein ($n=9$) と低く、危険率 0.1% で有意な差が認められた。

4. ミトコンドリア内遊離カルシウム量は、対照群では $116 \pm 28 nM$ ($n=8$)、低カルシウム群では $118 \pm 30 nM$ ($n=8$) であり、両群間に有意な差は認められなかった。

5. ミトコンドリア内遊離カルシウムは、両群においてカフェイン、ラ

リアノジン，ルテニウムレッド投与により減少し，それぞれの最大変化の1/2の変化を与える濃度（ $K_{0.5}$ ）は，低カルシウム群において高く，低カルシウム環境下で培養した骨形成細胞のミトコンドリアのこれら化学物質によるカルシウム放出に抑制が認められた。特に，その変化はリアノジンにおいて著明であり，低カルシウム群の $K_{0.5}$ は，対照群に比較し100倍高かった。

6. カフェインによるミトコンドリア内遊離カルシウムの減少は，両群においてリアノジン投与により抑制された。その減少の程度は，対照群において大きかった。またその減少は，ルテニウムレッド投与により対照群では抑制されたが，低カルシウム群では抑制が生じなかった。

考察

低カルシウム環境下で培養した骨形成細胞の全細胞内カルシウム量および全ミトコンドリア内カルシウム量が，正常環境に比較し，有意に低下した。これは，外部カルシウム環境の低下に伴い，細胞内カルシウム貯蔵庫の一つであるミトコンドリアから正常な細胞機能維持に不足したカルシウムを補償するため，カルシウムを放出したことに基因すると考えられる。

ミトコンドリア内遊離カルシウムは，カフェイン投与により濃度依存性に減少した。リアノジンおよびルテニウムレッドで前処理するとカフェイン投与による相対蛍光強度の変化の程度は減少し， $K_{0.5}$ は増加した。一般に Calcium induced calcium release (CICR) が興奮性細胞の筋小胞体に存在することは知られているが，非興奮性細胞においてはその存在はまだ不明である。しかし，本研究において CICR を促進するカフェインの効果が，CICR を抑制するリアノジンおよびルテニウムレッドにより抑制されたことから，非興奮性細胞である骨形成細胞のミトコンドリアに CICR の存在する可能性が考えられた。

低カルシウム環境下で培養した骨形成細胞では，細胞内情報伝達系の一部の抑制により細胞機能に抑制などの生じることが報告されている。この低カルシウム環境の影響により，ミトコンドリアのCICRと考えられる機構に対しカフェイン及びリアノジンの反応性の低下が生じたことから，低カルシウム環境がミトコンドリアのカルシウム調節機構に影響を与えることが示唆された。

結論

低カルシウム環境下培養骨形成細胞では、全細胞内カルシウム量、全ミトコンドリア内カルシウム量が減少しミトコンドリアのCICRにおけるカルシウム放出機構に抑制が発生し、これらが要因となって細胞の機能に抑制の生じることが推測された。したがって、生体が低カルシウム環境に陥ると骨の改造に関与する細胞機能に影響し、細胞内情報伝達系に異常が生じることが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 下河辺 宏 功

副 査 教 授 松 本 昭

副 査 教 授 久保木 芳 徳

学位論文題名

低カルシウム環境下培養ラット胎児頭蓋冠由来骨形成細胞 のミトコンドリア内遊離カルシウムの動向

審査は主査，副査全員が一堂に会し口頭でなされた。始めに申請者に対し本論文の要旨の説明を求めたところ，以下の内容について論述した。

緒言

歯周疾患あるいは骨粗鬆症等の硬組織代謝抑制を伴う病態を解明するためには，そのモデルとして*in vivo*では低カルシウム(Ca)食飼育，*in vitro*では低Ca環境実験系を用いることは有用である。これまで低Ca環境下で培養したラット胎児頭蓋冠由来骨形成細胞では，細胞内遊離Ca濃度あるいはプロテインキナーゼC活性等の低下，またラット脛骨骨端軟骨板では，軟骨細胞ミトコンドリア(Mt)の形態学的変化が報告されている。しかし，低Ca環境下における骨形成細胞MtのCa並びに遊離Ca等の動態は不明である。そこで，ラット胎児頭蓋冠から骨形成細胞を分離し，低Ca環境下において，全細胞内Ca量，全Mt内Ca量を測定し，さらにMt内遊離Caに及ぼす低Ca環境の影響を，カフェイン(Caf)，ライアノジン(Rya)，ルテニウムレッド(Rut)等を用いて調べ，Mt内遊離Caの動向を検索した。

材料と方法

胎生18～21日齢のWistar系ラット頭蓋冠より酵素消化法を用い細胞を

採取し、 α MEMを用い通法に従い6~7日間培養を行った。培養液のCa濃度は、対照群では1.87mM、低Ca群では0.34mMとした。培養は、60mm径のディッシュを用い37°C、5%CO₂、95% Airの気相下で、培養液は2日ごとに交換した。細胞は、培養6~7日目、コンフルエンスの状態を確認後、ラバーポリスマンで採取した。採取した細胞を吸引法により、0.45 μ mミリポアフィルター上に集め、全細胞内Ca量の測定に供した。また、分画遠心によりMtを回収し、全Mt内Ca量並びにMt内遊離Caを測定した。Ca濃度は、原子吸光分光光度計 (Varian, AA-1475型)で測定した。蛋白質量はLowry法で測定した。Mt内遊離Ca濃度は、Fluo3-AMを用い蛍光分光光度計(日立 F4010型)で測定した。またMt内遊離Caの放出機構は、Caf, Rya, Rut等を用い検討した。なお、透過型電子顕微鏡でMtの形態学的観察を行った。

結果と考察

低Ca環境下で培養した骨形成細胞の全細胞内Ca量及び全Mt内Ca量が、正常環境に比較し有意に低下した。これは、外部Ca環境の低下に伴い、細胞内Ca貯蔵庫の一つであるMtから正常な細胞機能維持に不足したCaを補償することに基因すると考えられる。

Mt内遊離Caは、両群においてCaf, Rya, Rut投与により減少した。それぞれの最大変化の1/2の変化を与える濃度 ($K_{0.5}$) は、低Ca群において高く、低Ca環境下で培養した骨形成細胞のMtのこれら化学物質によるCa放出に抑制が認められた。特に、その変化はRyaにおいて著明であり、低Ca群の $K_{0.5}$ は、対照群に比較し100倍高かった。

CafによるMt内遊離Caの減少は、両群においてRya投与により抑制された。その減少の程度は、対照群において大きかった。またその減少は、Rut投与により対照群では抑制されたが、低Ca群では抑制が生じなかった。

一般にcalcium-induced calcium release(CICR)が興奮性細胞の筋小胞体に存在することは知られているが、非興奮性細胞においてはその存在はまだ不明である。しかし、本研究においてCICRを促進するCafの効果が、CICRを抑制するRya及びRutにより抑制されたことから、非興奮性細胞である骨形成細胞のMtにCICRの存在する可能性が考えられた。

低Ca環境下で培養した骨形成細胞では、細胞内情報伝達系の一部の抑制により細胞機能に抑制等の生じることが報告されている。この低Ca環境の影響により、MtのCICRと考えられる機構に対しCaf及びRyaの反応性の低下が生じたことから、低Ca環境がMtのCa調節機構に影響を与えることが示唆された。

結論

低Ca環境下培養骨形成細胞は、全細胞内Ca量、全Mt内Ca量が減少し、MtのCICRにおけるCa放出機構に抑制の生じることが推測された。従って、低Ca環境に陥ると細胞内情報伝達系に異常が生じ、硬組織代謝抑制を引き起こすことが示唆された。

ひきつづき各審査員と申請者のあいだで、本論文の内容とその関連項目について質疑応答がなされた。これらに対して、申請者は本研究から得た知見と文献を引用して明快かつ適切な回答を行った。その結果、本研究において低Ca環境下培養骨形成細胞のMtのCa放出機構に抑制が生じることを見いだしたことは、今後の硬組織代謝抑制の機構解明に対し極めて有意義な研究であることが認められた。

以上より、審査委員は全員、本研究が学位論文として十分値し、申請者が歯学博士の学位授与にふさわしいと認定した。