

学位論文題名

エストロゲンによる異なった受容体を介するマクロファージ様細胞のNa,K-ATPase活性促進作用

学位論文内容の要旨

【緒言】

エストロゲンは骨代謝機能において重要な役割を演じているが、マクロファージにおいても炎症性サイトカイン産生に関与している。その受容体には核内受容体であるERとGタンパク質共役型のGPR30が存在する。前者は遺伝子転写を介したゲノム的な作用、後者は非ゲノム的な速い作用に関与するとされる。一方、Na,K-ATPaseは細胞の形質膜に存在して細胞の容積の維持など基本的な細胞機能を担う酵素である。最近、Na,K-ATPaseが破骨細胞形成において細胞融合に関与するという報告もなされている。RAW264.7細胞は、マクロファージ様細胞であり、RANKL作用により破骨細胞に分化する破骨細胞前駆細胞でもある。本研究は、RAW264.7細胞のNa,K-ATPase活性に対する 17β -estradiolの作用を明らかにすることを目的に行った。

【材料と方法】

1. 細胞の培養ならびに細胞回収

マクロファージ様 RAW 細胞あるいは J774 細胞を 10%牛胎仔血清を加えたフェノールレッド不含の DMEM (Dulbecco modified Eagle medium)を用いて培養し、fulvestrant, G15 あるいは genistein の存在下／非存在下で、 $10^{-11} \sim 10^{-5}$ M の 17β -estradiol 及び G1 を作用させたのちに細胞を回収した。

2. Na,K-ATPase 活性の測定

細胞は 0.25mM sucrose にて回収し、超音波破碎を行い、試料とした。Na,K-ATPase 活性は、ATP を基質として、酵素による加水分解の結果生成された無機リン量を Chifflet 法を用いて測定して、決定した。

3. ウェスタンブロッティング

細胞はLysis buffer(100mM KCl, 0.1% NP-40, 10mM HEPES-KOH, pH 7.5)にて回収し、試料とした。試料を通法に従い電気泳動し、electroblot法によりPVDF膜に転写した後に、特異的抗体を用いて反応させた。バンドの検出はECL (Enhanced chemiluminescence)法を用いた。

【結果と考察】

1. マクロファージ様細胞に対する 17β -estradiol 短時間作用による Na,K-ATPase の変化

マクロファージ様細胞の RAW264.7 細胞ならびに J774 細胞には GPR30 タンパク質の発現が認められた。これらの細胞に対して 17β -estradiol を 1 時間作用させると 10^{-9} M をピークとした Na,K-ATPase 活性の増加が認められた。さらに、RAW 細胞においては 17β -estradiol 作用により Na,K-ATPase α_1 ならびに β_1 サブユニットタンパク質の発現と α_1 サブユニットのチロシンリン酸化も同様に増加した。一方、これらの増加は GPR30 の antagonist である G15 を併用することにより濃度依存的に抑制され、 10^{-9} M G15 では対照群と同程度になった。さらに、RAW 細胞を GPR30 の agonist である G1 で刺激すると、 17β -estradiol の場合と同様に 10^{-9} M をピークとした Na,K-ATPase 活性、 α_1 ならびに β_1 サブユニットタンパク質の発現と α_1 サブユニットのチロシンリン酸化の増加が認められた。また、これらの増加は G15 により濃度依存的に抑制された。以上の結果から、マクロファージ様細胞に 17β -estradiol を 1 時間作用させると GPR30 を介して Na,K-ATPase 活性を増加することが明らかになった。続いて、 10^{-9} M 17β -estradiol とともにチロシンキナーゼ阻害薬である genistein を併用して、RAW 細胞に 1 時間作用させると、 17β -estradiol による Na,K-ATPase 活性の増加は genistein 濃度依存的に抑制され、Na,K-ATPase タンパク質のチロシンリン酸化が、酵素活性の増加に関与していることが明らかになった。さらに、 17β -estradiol 1 時間作用による Na,K-ATPase 活性の増加のメカニズムを明らかにするために、RAW 細胞を種々の濃度の 17β -estradiol で処理し、それらの Na,K-ATPase 活性に対する Na^+ 濃度依存性について検討した。その結果、Hill 係数ならびに 50% 活性化濃度は 17β -estradiol 濃度依存的に減少し、 10^{-9} M 17β -estradiol においてそれぞれ 0.24mM ならびに 2.11mM と最低となり、酵素の Na^+ 親和性が亢進することが明らかになり、 17β -estradiol 作用による Na^+ 親和性の亢進も Na,K-ATPase 活性増加に関与していることが示された。さらに、 10^{-9} M 17β -estradiol とともに genistein 併用すると、 17β -estradiol による Hill 係数ならびに 50% 活性化濃度の減少は、genistein 濃度依存的に抑制され、 Na^+ 親和性の亢進は回復傾向を示した。以上の結果から、 17β -estradiol は Na,K-ATPase タンパク質の発現を増加させるとともに、 α_1 サブユニットをチロシンリン酸化させることにより酵素に対する Na^+ 親和性が亢進して、酵素活性が増加することが明らかになった。

2. マクロファージ様細胞に対する 17β -estradiol 長時間作用による Na,K-ATPase の変化

RAW264.7 細胞に 17β -estradiol を 24 時間作用させると濃度依存的に Na,K-ATPase α_1 ならびに β_1 サブユニットタンパク質の発現および酵素活性が増加した。一方、 17β -estradiol 24 時間刺激により RAW 細胞の Na,K-ATPase α_1 サブユニットのチロシンリ

ン酸化は変化しなかった。さらに、17 β -estradiol とともに ER の antagonist である fulvestrant を作用させると濃度依存的にこれらの増加が抑制された。一方、17 β -estradiol とともに G15 を併用してもこれらの増加は抑制されなかった。以上の結果から RAW 細胞に 17 β -estradiol を 24 時間作用させると ER を介した Na,K-ATPase タンパク質発現の増加により、酵素活性が増加することが示された。

【結 論】

RAW 細胞において 17 β -estradiol はその作用時間により GPR30 ならびに ER という異なった受容体を介して Na,K-ATPase 活性を増加させることが明らかになった。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 鈴 木 邦 明
副 査 特任准教授 野 谷 健 治
副 査 教 授 田 村 正 人

学 位 論 文 題 名

エストロゲンによる異なった受容体を介するマクロファージ 様細胞のNa,K-ATPase活性促進作用

審査は審査担当者が一同に会して約 1 時間半をかけて行った。まず申請者に本論文の概要の説明を求め、口頭試問形式で提出論文の内容及び関連分野について試問した。申請者は論文の概要を以下のように説明した。

【緒言】エストロゲンは骨代謝機能において重要な役割を演じているが、マクロファージにおいても炎症性サイトカイン産生に関与している。その受容体には核内受容体である ER と G タンパク質共役型の GPR30 が存在する。前者は遺伝子転写を介したゲノム的な作用、後者は非ゲノム的な速い作用に関与するとされる。一方、Na, K-ATPase は動物細胞の形質膜に存在して細胞の基本的な機能を担う酵素であり、破骨細胞形成において細胞融合に関与すると報告されている。本研究は、マクロファージ様細胞である RAW264.7 細胞の Na, K-ATPase 活性に対する 17β -エストラジオール (E2) の作用を明らかにすることを目的に行った。

【材料と方法】RAW264.7 細胞を通法に従って培養し、ER のアンタゴニストである fulvestrant, GPR30 のアンタゴニストである G15, チロシンキナーゼ阻害薬である genistein の存在下あるいは非存在下で、 $10^{-11}\sim 10^{-5}$ M の E2 及び GPR30 のアゴニストである G1 を作用させたのちに細胞を回収し、Na, K-ATPase 活性と α_1 及び β_1 サブユニットの発現ならびに α_1 サブユニットのチロシンリン酸化レベルを検討した。

【結果及び考察】E2 作用 1 時間においては、 10^{-9} M をピークとした濃度依存的な Na, K-ATPase 活性の増加が認められ、 α_1 及び β_1 サブユニットの発現と α_1 サブユニットのチロシンリン酸化も同様に増加した。G1 を用いた場合も同様の結果が得られた。これらの増加は G15 存在下では濃度依存的に抑制された。また、E2 の濃度に依存した作用により、Na, K-ATPase 活性は対照群と比較して低濃度の Na^+ 存在下で最大活性を示し Na^+ に対する親和性の増加が観察された。しかし、

genistein 存在下で E2 を作用させた場合は Na^+ に対する親和性の増加は消失した。一方、24 時間 E2 を作用させると、Na, K-ATPase 活性ならびに α_1 及び β_1 サブユニットの発現は E2 濃度依存的に増加し 10^{-6} M で最大となったが、 α_1 サブユニットのチロシンリン酸化レベルの変化は観察されなかった。また、活性及びタンパク質発現の増加は fulvestrant により抑制された。以上の結果から、1 時間の E2 作用においては、GPR30 を介した Na, K-ATPase タンパク質発現の増加と α_1 サブユニットのチロシンリン酸化による酵素の Na^+ 親和性の増加により酵素活性が増加することが示された。また、24 時間の E2 作用においては、ER を介した Na, K-ATPase タンパク質発現の増加により酵素活性が増加することが示された。E2 はその作用時間により GPR30 ならびに ER という異なった受容体を介して Na, K-ATPase 活性を増加することが明らかになった。

以上の説明に対して、各審査委員が行った主な質問は、以下の通りである。

- 1) 受容体の検出方法
- 2) アゴニスト及びアンタゴニストの臨床応用の可能性について、
- 3) J774 細胞も破骨細胞に誘導されうるのか、
- 4) GPR 経由なのにタンパク質量が 1 時間で増加する機構をどのように考えるか、
- 5) Na, K-ATPase のリン酸化によって Na^+ に対する親和性は増加するのか、
- 6) genistein 以外の kinase の阻害剤の効果を確認したか、
- 7) 24 時間経過すると 1 時間でのチロシンリン酸化レベルは低下するのか、
- 8) エストロゲンと Na, K-ATPase が関連する疾患はあるのか、

これらの質問に対して、学位申請者から適切かつ明確な回答および説明が得られ、申請者が本研究の一連の実験および分析を主体的に遂行し、得られた結果について科学的考察を行い、それらを論理的に表現し他者に伝達する能力を有することが確認された。

本論文は、エストロゲンがマクロファージ様細胞に対して作用時間によって異なった受容体を介して作用を発揮し、その際の濃度依存性も異なることを明らかにした論文である。研究成果には新規性があり、得られた結果はこの分野の今後の研究と発展に大いに貢献するものであることについて、審査委員全員の賛同が得られた。以上より、申請者の学位論文について、北海道大学の博士（歯学）の学位授与に値するものと認めた。