

学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	辻 宗啓
学位論文題目			
ストレス環境下における培養骨細胞の apoptosis 関連遺伝子の発現に関する検討 未公表			
研究目的			
<p>特発性大腿骨頭壊死症では、骨頭壊死が発生しても症状が現れなければその発生をとらえることが困難で、発症した時点ではその多くの症例で骨頭変形が進行しているため人工関節置換術などの外科的治療を余儀なくされることが多い。この病態の解明は早期診断法や新しい保存的治療法を開発していくためにも重要である。これまで <i>in vivo</i> での研究では壊死に陥った骨頭において osteocyte の apoptosis が報告されており、その過程でどのような遺伝子発現が見られるかも少しずつ解明され始めている。本研究ではマウス osteocyte の細胞株である MLO-Y4 を用いて、osteocyte に低酸素状態やステロイドによるストレスを加え、遺伝子発現にどのような影響を与えるかを、cDNA アレイシステムとリアルタイム定量 RT-PCR を用いて検討した。</p>			
材料と方法			
1. 培養細胞			
<p>マウス培養骨細胞には、dendritic phenotype を有し、オステオカルシンの発現が強いが 1 型コラーゲン mRNA の発現が弱く、ALP 活性が低いという典型的な mature osteocyte の形質を有している MLO-Y4 (murine long bone osteocyte Y4) を用いた。対照には 3T3 を用いている。</p>			
2. 細胞の培養環境と刺激条件			
<p>細胞をデキサメサゾンまたはβ-エストラジオールにて刺激し、1) normoxia (O₂ 20%) にて 12 時間培養、2) hypoxia (O₂ 1%) にて 12 時間培養、3) hypoxia にて 12 時間培養後 normoxia で 6 時間培養した。対照には同じ環境で培養した未刺激の細胞を用いた。</p>			
3. cDNA アレイ			
<p>未刺激の細胞より抽出した total RNA を用いて 434 遺伝子が搭載された cDNA Array Filter Mouse Cancer にて発現遺伝子の解析を行った。</p>			
4. リアルタイム定量 RT-PCR			
<p>Normoxia、hypoxia、hypoxia 後 normoxia の各環境下で培養し、デキサメサゾンまたはβ-エストラジオールによる刺激を加えた細胞と未刺激の細胞から用意したそれぞれの cDNA を用いリアルタイム PCR を行った。</p>			
結果			
1. cDNA アレイ解析			
<p>MLO-Y4 において、hypoxia 環境下で発現が増強する遺伝子は低下するものに比べて多い傾向にあった。hypoxia 環境にて発現が増強した遺伝子の中で、normoxia に戻すと発現が減少するものと、normoxia に戻しても発現が増強したままの遺伝子があった。また、hypoxia 環境で発現が低下する遺伝子の中にも、normoxia に戻すと再度発現が増強するものと、normoxia に戻しても発現が減少したままの遺伝子が存在した。一方、3T3 では MLO-Y4 での遺伝子の動きに比べて、より多くの遺伝子で発現の変化が見られたが、hypoxia 環境では MLO-Y4 の場合とは逆に発現低下を示すものが多かった。</p>			

2. リアルタイム定量 RT-PCR 解析

cDNA アレイで発現の増減が認められた遺伝子のうち、主に apoptosis に関連するものについてリアルタイム定量 RT-PCR を用いて検討した。MLO-Y4 では p53, Bcl-2, Bax, MDM2 の各遺伝子で hypoxia 環境となると発現の減少がみられた。Normoxia 環境ではデキサメサゾン、 β -エストラジオール刺激は、どちらも Bcl-2 と MDM2 の発現を増強させたが、3T3 ではいずれの遺伝子も不変もしくは減少していた。この MLO-Y4 における Bcl-2 と MDM2 の発現増加は hypoxia の環境では未刺激の hypoxia 環境と同じレベルまで強い発現抑制が見られた。ER α は未刺激の MLO-Y4 では十分発現しているが、 β -エストラジオールによる刺激では発現が減少するのに対して、デキサメサゾンによる刺激では発現が増強した。しかし、いずれの刺激も hypoxia 環境下では発現が減少していた。cDNA アレイに搭載されていなかった HIF-1 α のリアルタイム定量 RT-PCR による検討では MLO-Y4 においてデキサメサゾンによる刺激で著明な発現増強が見られた。

考察

一般的に hypoxia 環境では細胞は necrosis に陥るほか、ミトコンドリアの障害が強いと apoptosis に至ると言われている。実際、hypoxia 環境で培養された fibroblast や osteocyte が apoptosis に傾くことが報告されており apoptosis 関連遺伝子など様々な遺伝子が関与していることが解明され始めている。しかし、今回の検討では MLO-Y4, 3T3 ともに hypoxia 環境下では apoptosis 関連の遺伝子に発現低下を認め、これまでの報告と相反する結果となった。その要因としては今回が 12 時間の hypoxia 環境での検討であり、短時間の hypoxia では osteocyte においても apoptosis に対して抵抗性になると考えられる。さらに、cDNA アレイの結果では MLO-Y4 では発現の増強する遺伝子が多いのに比べて 3T3 では低下する遺伝子が多く見られたが、これは MLO-Y4 では apoptosis 抑制性遺伝子を中心に発現の増強がみられたためと思われた。

MLO-Y4 において、normoxia 環境でのデキサメサゾン刺激による apoptosis 関連遺伝子の発現を見ると、p53 や Bax など apoptosis 促進に関わる遺伝子がほとんど変化しないのに対して、Bcl-2 や MDM2 など apoptosis 抑制に関わる遺伝子の発現増強が認められた。しかし hypoxia 環境では発現亢進していた apoptosis 抑制性遺伝子は未刺激の hypoxia 環境と同程度まで低下していた。これは、ステロイド刺激状態での MLO-Y4 における hypoxia がより急激な apoptosis 抑制性遺伝子の発現減少をもたらし、相対的に apoptosis 促進へと傾く可能性を示唆している。HIF-1 α 遺伝子は、apoptosis 関連遺伝子と同様に hypoxia 環境では発現の低下が見られ、デキサメサゾン刺激によって発現が増強していた。MLO-Y4 ではデキサメサゾン刺激が HIF-1 α を介して apoptosis を促進している可能性がある。

結論

1. 培養骨細胞 MLO-Y4 は、短時間の hypoxia 環境では apoptosis 促進関連遺伝子の多くで発現低下を認めた。
2. Normoxia 環境でのデキサメサゾン刺激は osteocyte の p53 や Bax など apoptosis 促進に関わる遺伝子にほとんど影響しないのに対して、Bcl-2 や MDM2 など apoptosis 抑制に関わる遺伝子には発現の増強を誘導していた。一方、hypoxia 環境になると未刺激 hypoxia とほぼ同じ程度にまで発現が低下した。
3. デキサメサゾン刺激は osteocyte の HIF-1 α 発現を亢進させ、apoptosis を促進する可能性も示された。
4. MLO-Y4, 3T3 共にデキサメサゾン刺激に比べて、 β -エストラジオール刺激では apoptosis 関連遺伝子の発現変化は軽度であった。





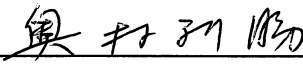

引用文献

1. Kato Y, Windle JJ, Koop BA, Mundy GR, Bonewald LF. Establishment of an osteocyte-like cell line, MLO-Y4. *J Bone Miner Res* 1997;12(12):2014-23.
2. Ahuja SS, Zhao S, Bellido T, Plotkin LI, Jimenez F, Bonewald LF. CD40 ligand blocks apoptosis induced by tumor necrosis factor alpha, glucocorticoids, and etoposide in osteoblasts and the osteocyte-like cell line murine long bone osteocyte-Y4. *Endocrinology* 2003;144(5):1761-9.
3. Sato M, Sugano N, Ohzono K, Nomura S, Kitamura Y, Tsukamoto Y, et al. Apoptosis and expression of stress protein (ORP150, HO1) during development of ischaemic osteonecrosis in the rat. *J Bone Joint Surg Br* 2001;83(5):751-9.

参考文献

1. 辻 宗啓, 石津明洋, 池田 仁, 吉木 敬 ; モデル動物から見たリウマチ性疾患, リウマチ科, 2002,27[suppl.1]:101-106
2. 辻 宗啓, 保田雅憲, 宮津 誠, 加茂裕樹, 前田龍智, 小野沢司 ; 寛骨臼後壁骨折の手術治療成績, 旭赤医誌, 1997,11:24-28
3. 辻 宗啓, 安藤御史, 後藤英司, 稲尾茂則, 能地 仁 ; Bateman 型人工骨頭の bearing insert に破損を生じた 2 例, 北整災誌, 1995,38:53-57

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士 (医学)	氏 名	辻 宗 啓
<p>審査委員長 <u> </u>  </p> <p>審査委員 <u> </u>  </p> <p>審査委員 <u> </u>  </p>			
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p style="margin-top: 20px;">ストレス環境下における培養骨細胞の apoptosis 関連遺伝子の発現に関する検討</p>			
<p>特発性大腿骨頭壊死症は、その発生初期における病態には不明な部分が多く、発症した段階では外科的治療を余儀なくされるケースが少なくない。よって、その病態の解明が早期診断や治療法の確立には重要である。本研究では、骨組織の中で特に骨細胞に着目し、低酸素状態やステロイド刺激などのストレスが骨細胞の遺伝子発現にどのような影響を及ぼすかを検討した。</p> <p>マウス培養骨細胞 (ML0-Y4) およびコントロールとしてマウス線維芽細胞 (3T3) を用い、低酸素環境 (O₂ 1%) で培養後 cDNA ArraySystem およびリアルタイム定量 PCR にて apoptosis 関連の遺伝子を中心に発現の差を検討したところ、cDNA Array では、低酸素環境下の ML0-Y4 は 3T3 の同条件と比べて発現が増強する遺伝子が多く見られた。そのうちの 10 種類の遺伝子についてリアルタイム定量 PCR を行ったと</p>			

ころ、低酸素下の MLO-Y4 では、Bcl-2 や MDM2 といった apoptosis 抑制遺伝子の発現に影響は見られなかったが、デキサメサゾン(DEX)で刺激すると発現が増強していた。しかし、DEX 刺激下で低酸素状態にするとこれらの遺伝子の発現は強く抑制された。この様な減少は 3T3 では認められなかった。よって、MLO-Y4 では DEX 刺激状態に低酸素環境が加わると apoptosis 抑制遺伝子の急激な発現低下を招き、apoptosis が促進される可能性が示唆された。

本研究の成果は、臨床における大腿骨頭壊死症の病態解明に大きく貢献しうると考えられる。なお、各審査員より、本論文ならびに関連分野に関する試問の結果からも適切な解答が得られた。よって、審査委員会は、本論文が学位論文に十分値するものと判定した。