

骨細胞のアポトーシスにおける Reactive oxygen species の関与

菊山愛一朗

近畿大学医学部整形外科学教室

抄 録

近年大腿骨頭壊死をはじめ様々な骨組織の病的状態における骨細胞のアポトーシスが報告されている。われわれは骨細胞のアポトーシスに低酸素・再酸素化により産生される Reactive oxygen species (ROS) が関与すると考え、ROS である過酸化水素 (H_2O_2) とパーオキシナイトライトがニワトリ由来分離骨細胞に及ぼす影響について検討した。骨細胞に H_2O_2 、パーオキシナイトライトを作用させると両処置によってアポトーシスが誘導された。カスパーゼ-3 阻害剤、細胞内カルシウムイオンキレーターで骨細胞を前処置すると H_2O_2 による骨細胞のアポトーシスは抑制され、アポトーシスの誘導過程にはカスパーゼ-3 の活性化と細胞内カルシウムイオン濃度の上昇が関与していることが明らかとなった。また骨細胞を低酸素・再酸素化状態におくとアポトーシスが誘導され、その際細胞内 H_2O_2 の産生を認めた。これらの所見は大腿骨頭壊死の発症の一つのメカニズムを示すものと思われ、骨頭壊死予防など臨床応用の可能性に道を開くと期待される。

Key words: osteocyte (骨細胞), apoptosis (アポトーシス), 低酸素・再酸素化 (hypoxia/reoxygenation)

緒 言

骨は石灰化した基質と細胞から成る結合組織であり、身体の支持組織として、外的及び内的な機械的負荷に対して内部構造を変化させ、骨量を増減させることによって環境変化に適応している。また、全身の細胞の要求に応じてミネラルを出入りさせ体液中のカルシウムバランスを維持している。骨を形成する細胞には骨芽細胞、骨細胞、破骨細胞などがあり、骨芽細胞、破骨細胞に関してはそれらの分離、細胞株の樹立などが比較的容易に行われ、近年の研究により細胞の機能及び骨代謝における役割等が解明されつつある。一方骨細胞は骨基質に埋もれて存在し、しかも分離や培養が困難であるというその特殊性から、機能、性質にはいまだに不明な点が多い。骨細胞は骨芽細胞由来の細胞で、骨芽細胞の約10倍、 1 mm^3 中に約26,000個存在する骨組織中最も多い細胞である。骨細胞は多数の突起を持ち、近傍の骨細胞及び骨芽細胞・破骨細胞と gap junction を介して結合している。近年の報告により骨細胞はこの突起により骨芽細胞・破骨細胞と情報伝達を行うこと

により、メカノレセプター、カルシウムレセプターとして骨のモデリング、リモデリングに関与し骨塩量を調整、結果的に骨強度を維持していると考えられている。

近年骨細胞のアポトーシスが骨粗鬆症骨組織、エストロゲン欠乏状態¹、ゴナドトロピンアナログが投与されたヒト腸骨²、あるいは大腿骨頭壊死組織などにおいて報告されている^{3,4}。また、大腿骨頭壊死と同様に壊死と思われていた心筋梗塞や脳梗塞組織においても心筋細胞^{5,6}、神経細胞^{7,8} のアポトーシスが報告され、その発生過程には低酸素・再酸素化及びそれらにより産生された Reactive oxygen species (ROS) の関与が示唆されている。そしてさらに大腿骨頭壊死においてもその発生過程に低酸素・再酸素化が関与するとの報告もある⁹。そこでわれわれは低酸素・再酸素化環境における単離骨細胞からの ROS の産生、そして過酸化水素 (H_2O_2) やパーオキシナイトライトが単離骨細胞に及ぼす影響について検討した。

材料及び方法

(1) 骨細胞の分離

骨細胞の分離方法としてはもっとも普遍的に用いられている Van Der Plas¹⁰, Matsuo¹¹ らの方法に従った。ニワトリ受精卵を16日間、室温38~40°C、湿度40~50%で孵卵器内にて飼育した。16日齢ニワトリ胚頭頂骨を切除し、10%仔牛血清 (fetal bovine serum; FBS: Hyclone Lab. Inc. Logan, USA), 1% ペニシリンを添加した α -MEM (GIBCO, BRL) 培地中で骨膜を除去し、頭頂骨の膜様の非石灰化部分及び骨髄形成部分を除去し、骨基質部分のみを骨細胞分離の材料とした。骨基質をおよそ1 mm×1 mm 大となるまで切碎し、コラゲナーゼ溶液 (1 mg/ml, Sigma, St. Louis, MO, USA) 中で37°C, 30分間, 120回/分で振盪したのち、PBS 中で骨片を攪拌し、骨膜を始め軟部組織を除去した。同様の操作を5回繰り返した後、次に EDTA 溶液 (5 mM) 中で37°C, 60分間, 80回/分で振盪、脱灰した。脱灰後の骨片を PBS 中で1500 rpm, 3分間遠心、洗浄した。同様に3度洗浄し、再度コラゲナーゼ溶液中で37°C, 20分間, 80回/分で振盪し骨片を攪拌することにより骨基質から骨細胞を分離し骨細胞浮遊液とした。骨細胞浮遊液を40 μ m の mesh で濾過し、 α -MEM 培地で3度洗浄した。骨細胞浮遊液は α -MEM 中で37°C, 30分間培養、骨細胞以外をシャーレに接着させ、接着していない上清の細胞を回収し、再度遠心、骨細胞の純度を高めた。得られた骨細胞はシャーレ当たり 5.0×10^4 個となるよう調整、播種し、実験に使用した。

(2) ROS が骨細胞の cell viability に及ぼす影響

(2)-1 アポトーシスの検出

アポトーシスの検出には annexin V-FITC Kit (Trevigen Inc, Gaithersburg, USA) を用いた。骨細胞の培地を除去し、4°C に冷却した PBS で洗浄後、annexin V Incubation Reagent (annexin V-Conjugate 1 mg/ml, propidium iodide 2.5 mg/ml, annexin V binding buffer (100 mM HEPES, 1.5 M NaCl, 50 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 18 mM CaCl₂), distilled H₂O) を15分間、室温、暗所で反応させた。10倍に希釈した annexin V binding buffer で2度洗浄し、出力250 mW で488 nm および525 nm の波長のアルゴンレーザーを装備した共焦点レーザー顕微鏡 (MRC 2400 LSX imaging system, Bio-Rad, Hertfordshire, England) で観察、annexin V 陽性、propidium iodide 陰性の細胞をアポトーシスとした。

(2)-2 ROS の負荷

最終濃度100 μ M, 300 μ M, 500 μ M の H₂O₂ (三菱化学, 東京) を含む α -MEM 培地中で骨細胞を15~60分間骨細胞を培養した。また最終濃度4 μ M, 40 μ M, 400 μ M のパーオキシナイトライト (同仁化学, 熊本) を含む α -MEM 培地中で15~60分間骨細胞を培養し、それぞれ annexin V 染色を行った。対照群は骨細胞を α -MEM 培地中で H₂O₂, パーオキシナイトライト処理群と同様の時間培養し、annexin V 染色を行った。

(2)-3 カスパーゼ-3 染色

カスパーゼ-3 染色には Immunocruz™ staining system (Santa Cruz Biotechnology, Inc, USA) を使用した。骨細胞を300 μ M の H₂O₂ を含む α -MEM 培地中で37°C, 45分間培養した後、PBS で洗浄し4°Cのアセトンで2分間固定した。0.1% の H₂O₂ で10分間処理し内因性ペルオキシダーゼを阻害した後 PBS で2回洗浄し、1.5% 正常ヤギ血清を加え1時間処理、非特異的反応を阻止した。次いで1次抗体として抗ヒト Caspase-3 p20 (N19) 抗体を4°Cで一晩反応させた。PBS で洗浄し、biotinylated secondary antibody を1時間、次に HRP-streptavidin complex を反応させた。最後に HRP substrate で処理しカスパーゼ-3 を diaminobenzidine (DAB) で発色させた。免疫染色法の特異性を確かめるために negative control として1次抗体の代わりに正常ヤギ血清を用い以下は同様の手技で免疫染色を行った。

(2)-4 カスパーゼ-3 阻害剤がアポトーシスに及ぼす影響

カスパーゼ-3 阻害剤である Ac-DEVD-cho (Ac-Asp-Glu-Val-Asp-cho, Alexis Biochemicals, Switzerland) を10 μ M または100 μ M 含む α -MEM 培地中で骨細胞を37°Cで60分間培養した後、同濃度の Ac-DEVD-cho と300 μ M の H₂O₂ を含む α -MEM 培地で骨細胞を37°Cで15~60分間培養した。次いで annexin V 染色を行い Ac-DEVD-cho が骨細胞のアポトーシスに及ぼす影響について検討した。

(2)-5 細胞内カルシウムイオン濃度の測定

Flexiperm-Disc (W.C. Heraeus) 上に単層培養した骨細胞を140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.2 mM MgCl₂, 1.0 mM CaCl₂, 10 mM glucose, 20 mM HEPES (pH 7.4), 0.3% bovine serum albumin (BSA) を含む HEPES-buffered balanced salt solution (HBSS) で3回洗浄後、細胞内カルシウムイオン濃度 ([Ca²⁺]_i) 測定用蛍光試薬である Fura-2 acetoxy methylester (Fura-2 AM, 同仁化学, 熊本) 5 μ M を含む HBSS 中で37°C, 30分間培養し

た。細胞を PBS で洗浄後、0.5 ml の HBSS を加えて $[Ca^{2+}]_i$ 測定に使用した。

$[Ca^{2+}]_i$ 測定用装置は倒立顕微鏡 (ニコン: TMP-EF 2, 東京), 電動フィルター切り替え装置 (Hamamatsu Photonics: C4312, 浜松), VIM カメラ (C2400-47: Hamamatsu Photonics), イメージプロセッサ (Argus-50: Hamamatsu Photonics) より構成されている。この顕微鏡を用いて、上述のように調整された細胞にキセノンランプより発射される 340 nm および 380 nm の 2 種類の波長の励起光を照射、それぞれの蛍光強度を測定し割り算し、 $[Ca^{2+}]_i$ により変化する各蛍光強度比 (レシオ値) を求めた¹²。このとき、Fura-2 AM とカルシウムイオンとの解離定数は 224 nM として計算し¹³, Calcium calibration buffer kit (Molecular Probes, Inc, Oregon, USA) を用いて検量線を作成した。

Flexiperm-Disc 上で培養した骨細胞に 300 μ M の H_2O_2 による刺激を加えてその際の $[Ca^{2+}]_i$ の変化を経時的に測定した。

(2)-6 細胞内カルシウムイオンキレーターがアポトーシスに及ぼす影響

細胞内カルシウムイオンのキレーターである BAPTA-AM (1,2-bis(2-aminophenoxy)-ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid acetoxymethyl ester, 和光純薬) 10 μ M を含む α -MEM 培地中で 37°C, 45 分間骨細胞を培養後、PBS で洗浄し 300 μ M の H_2O_2 を含む α -MEM 培地で骨細胞を 15~60 分間培養、annexin V 染色を行い細胞内カルシウムイオンのキレートが骨細胞のアポトーシスに及ぼす影響について検討した。

(2)-7 骨細胞の低酸素化・再酸素化

i) 低酸素化

まず骨細胞の培養液を除去し、あらかじめサンヨーマルチガスインキュベーター (MCO-175 M: 三洋メディカシステム, 大阪) 中で酸素 (O_2) 0.01%, 二酸化炭素 (CO_2) 4.99%, 窒素 (N_2) 95% 条件下で 24 時間留置しておいた α -MEM 培地 (FBS 無添加) を加えた。骨細胞を O_2 0.01%, CO_2 4.99%, N_2 95%, 37°C の条件下で 1 時間培養、低酸素状態とした。

ii) 再酸素化

培養液を除去し、10% FBS を含む α -MEM 培地を加え CO_2 5%, air 95%, 37°C のインキュベーターに移し 1~6 時間培養、再酸素化を行った。

(2)-8 骨細胞における ROS 産生

骨細胞内 ROS の検出には H_2O_2 の蛍光発色試薬である 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (2',7'-dichlorofluorescein diacetate; H_2DCFDA :

Molecular Probes, Inc, Oregon, USA) を用いた。 H_2DCFDA 5 μ M を含む α -MEM 培地 (FBS 無添加) を前述の低酸素状態の培養液として使用して低酸素化・再酸素化を行い、ROS 産生を共焦点レーザー顕微鏡で観察しその蛍光強度を測定した。

(2)-9 低酸素・再酸素化が骨細胞に及ぼす影響

骨細胞を前述の条件で低酸素・再酸素化し、annexin V 染色を行った。低酸素状態による影響を除外するため O_2 0.01%, CO_2 4.99%, N_2 95%, 37°C の条件下で 1~6 時間培養し、annexin V 染色を行った。

(3) 統計学的検討

各データは平均 \pm 標準偏差で表し、有意差検定には Student's t-test を用いた。

結 果

(1) 骨細胞に対する H_2O_2 , パーオキシナイトライドの作用

Annexin V 染色

骨細胞を 300 μ M の H_2O_2 を含む α -MEM 培地中で 30 分間培養し annexin V 染色を行ったところ、骨細胞は細胞膜に沿って annexin V-FITC により標識された (図 1-b)。一方 60 分間 H_2O_2 を含む培地中で培養すると annexin V 陽性細胞の propidium iodide (PI) の核への取り込みを認めた (図 1-c)。共焦点レーザー顕微鏡像 (200 倍) 5 視野中の全細胞に占めるアポトーシス陽性細胞の数をカウントし H_2O_2 の濃度・作用時間との関連を検討したところ、対照群ではおよそ 1~2% の細胞にアポトーシスを認めたのに対して、 H_2O_2 処理群ではアポトーシス細胞数は H_2O_2 の濃度・作用時間依存性に有意に増加した (図 2)。

パーオキシナイトライド処理においても骨細胞にアポトーシスが誘導されが、パーオキシナイトライドでわずか 4 μ M と低濃度でもアポトーシスが認められたのに対して (図 3-a), 400 μ M の濃度ではアポトーシス細胞は認められず、annexin V は陰性で PI の核への取り込みのみ、すなわちネクローシス細胞を認めた (図 3-b)。アポトーシス細胞数をカウントすると H_2O_2 と同様作用時間依存性にアポトーシス細胞数の増加を認めたが、4 μ M と 40 μ M の濃度間での有意差を認めなかった (図 4)。

(2) カスパーゼ-3 染色

対照群および negative control として 1 次抗体の代わりに正常ヤギ血清を用いた群では骨細胞に染色性を認めなかったのに対して、300 μ M の H_2O_2 を 45 分間作用させて免疫染色を行った群では骨細胞の核および細胞質に DAB による染色性を認め、 H_2O_2

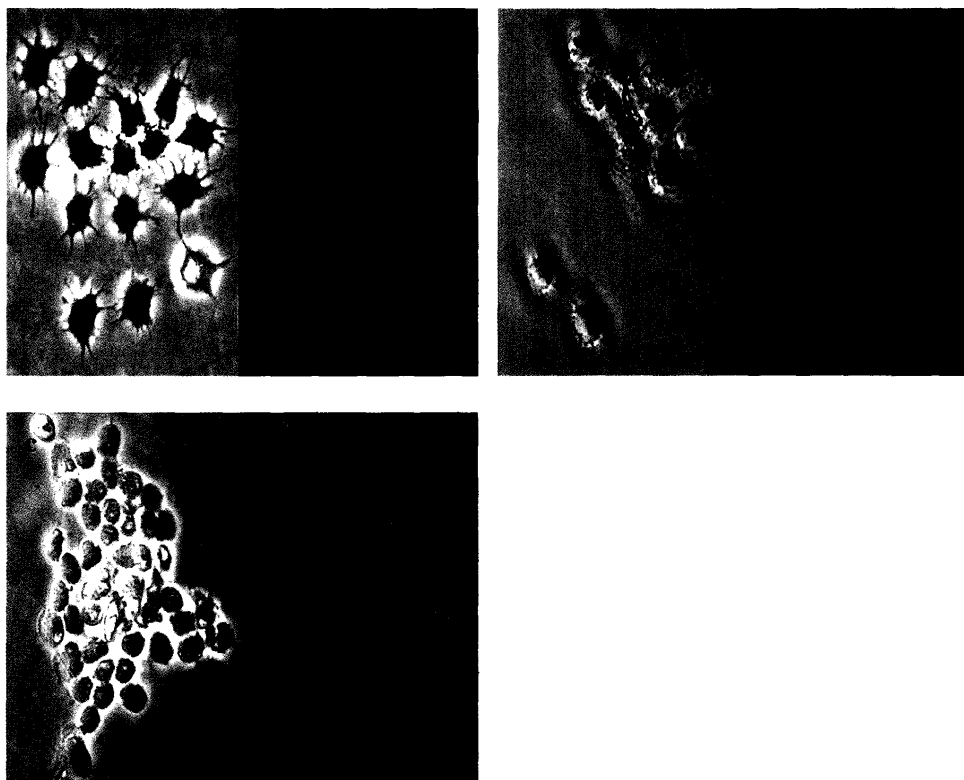


図1 H_2O_2 によるアポトーシスの誘導
骨細胞を $300 \mu M$ の H_2O_2 を含む培養液中で15~60分間インキュベートし annexin V 染色を行った。左に共焦点レーザー顕微鏡による透過像, 右に annexin V による蛍光染色を示す。(a)対照群, (b)30分間インキュベート群, (c)60分間インキュベート群 ($\times 200$)

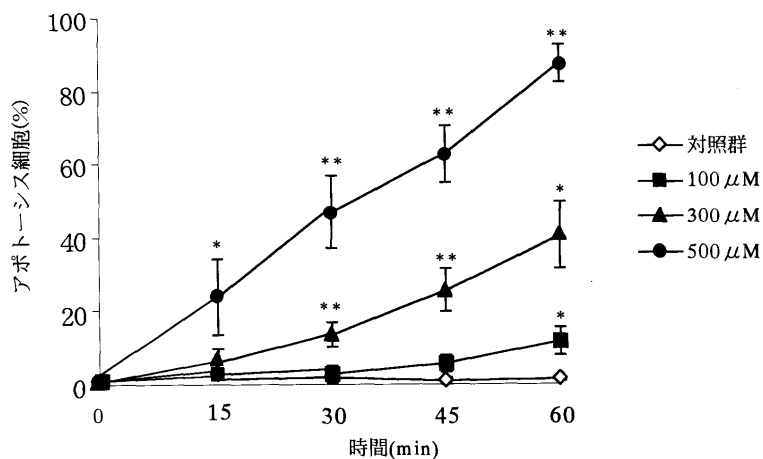


図2 H_2O_2 の濃度・作用時間が骨細胞のアポトーシスに及ぼす影響
各種濃度の H_2O_2 を含む培養液中で骨細胞インキュベートしたときのアポトーシス細胞数の経時的変化を示す。有意差の検定は100 μM 群は対照群, 300 μM 群は100 μM 群, 500 μM 群は300 μM 群と比較し行った。* $p < 0.05$, ** $p < 0.005$

によりカスパーゼ-3が活性化されたことが示された(図5)。

(3) カスパーゼ-3阻害剤のアポトーシスに及ぼす影響

カスパーゼ-3阻害剤である Ac-DEVD-cho で骨細胞を前処置した後 $300 \mu M$ の H_2O_2 を作用させると, H_2O_2 による骨細胞のアポトーシスは有意に抑

制されたが, Ac-DEVD-cho の2種類の濃度間での差は認められなかった(図6)。

(4) $[Ca^{2+}]_i$ の変化

骨細胞に $300 \mu M$ の H_2O_2 を作用させると, 刺激から数秒で $[Ca^{2+}]_i$ は急激に上昇し, ピーク値 390.2 ± 112.6 nM (平均 \pm 標準偏差) に達し, 約10秒間高値を示した後, 基礎値 (26.4 ± 9.3 nM) に低下



図3 パーオキシナイトライトによるアポトーシスの誘導
骨細胞をパーオキシナイトライトを含む培養液中で15分間インキュベートし annexin V 染色を行った。(a)パーオキシナイトライト 4 μM, (b)400 μM (×200)

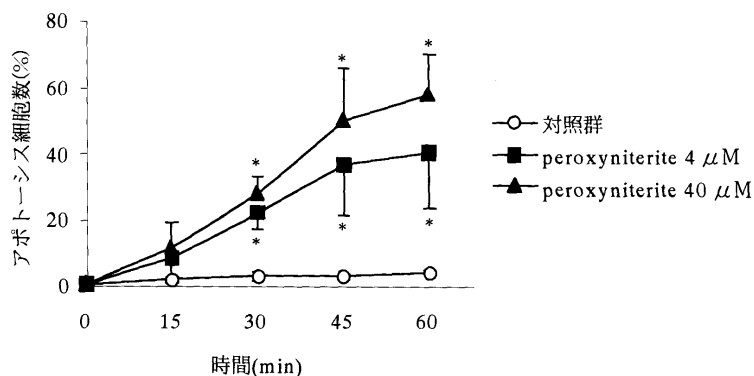


図4 パーオキシナイトライトの濃度・作用時間が骨細胞のアポトーシスに及ぼす影響
各種濃度の H₂O₂ を含む培養液中で骨細胞インキュベートしたときのアポトーシス細胞数の経時的変化を示す。有意差の検定は 4 μM 群, 40 μM 群ともそれぞれ対照群と比較し行った。*p<0.05

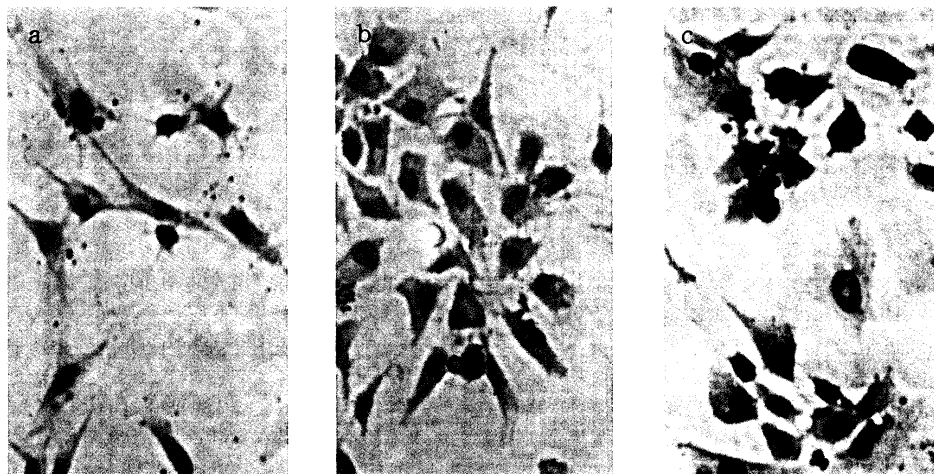


図5 カスパーゼ-3 染色
骨細胞を H₂O₂ を含む培養液中で培養後、抗カスパーゼ-3 抗体を用いて免疫染色を行った。(a)対照群, (b)1次抗体を用いず免疫染色を施行, (c) H₂O₂ 処理群 (×200)

した (図7)。

(5) BAPTA-AM の作用

BAPTA-AM 10 μM により骨細胞を前処置し、細胞内カルシウムイオンをキレートした後に300 μ

M の H₂O₂ を骨細胞に作用させると、骨細胞のアポトーシスは有意に抑制された (図8)。

(6) 低酸素・再酸素化による ROS 産生

骨細胞を低酸素・再酸素化状態にすることにより

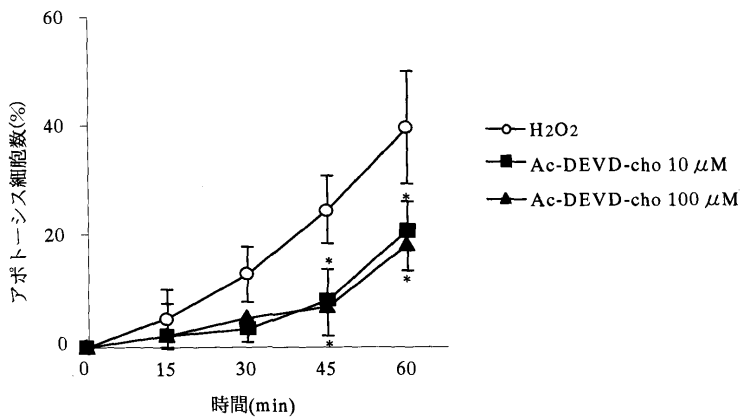


図6 カスパーゼ-3阻害剤がアポトーシスに及ぼす影響
骨細胞を各種濃度のAc-DEVD-choで前処置後、H₂O₂を含む培養液中でインキュベートした時のアポトーシス細胞の経時的変化を示す。p<0.05

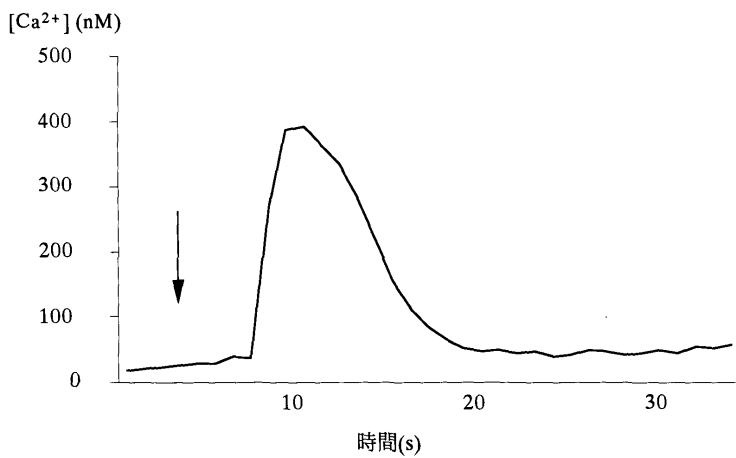


図7 H₂O₂による骨細胞[Ca²⁺]_iの変化
[Ca²⁺]_i測定用蛍光試薬であるFura-2/AMで骨細胞を前処置後H₂O₂を培養液中に添加した(矢印).

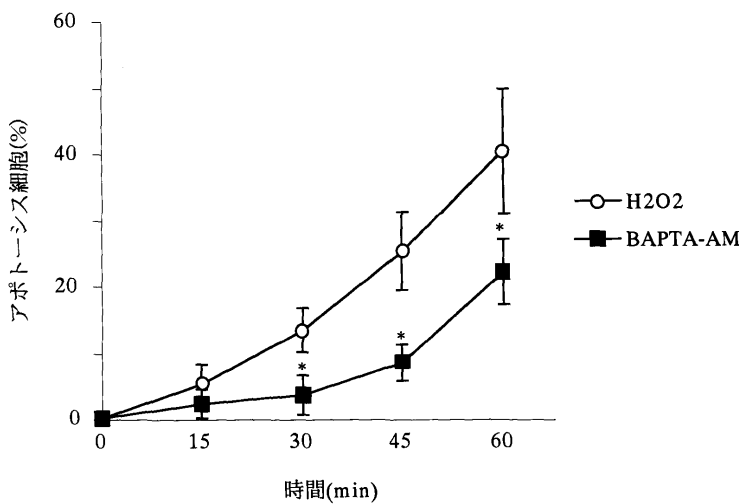


図8 細胞内カルシウムイオンキレーターがアポトーシスにおよぼす影響
骨細胞をBAPTA-AMで前処置後、H₂O₂を含む培養液中でインキュベートしたときのアポトーシス細胞数の経時的変化を示す。* p<0.05

H₂DCFDAによる蛍光発色を認めた(図9)。その際の蛍光強度を対照群を基準値として測定すると、骨細胞は低酸素のみでは基準値に比して蛍光強度は変化しないのに対して再酸素化により蛍光強度は約10倍に増加し、約10分で基準値まで低下していた(図

10)。

(7) 低酸素・再酸素化が骨細胞に及ぼす影響

骨細胞を1時間低酸素状態とした後、再酸素化を行うと再酸素化1時間後から annexin V陽性細胞の出現を認め、アポトーシス細胞数は経時的に増加



図9 低酸素・再酸素化による細胞内 ROS 産生
骨細胞を H₂DCFDA を含む培養液中で低酸素・再酸素化状態とし、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。(a)対照群、(b)低酸素・再酸素化群（低酸素60分、再酸素化6分）(×200)

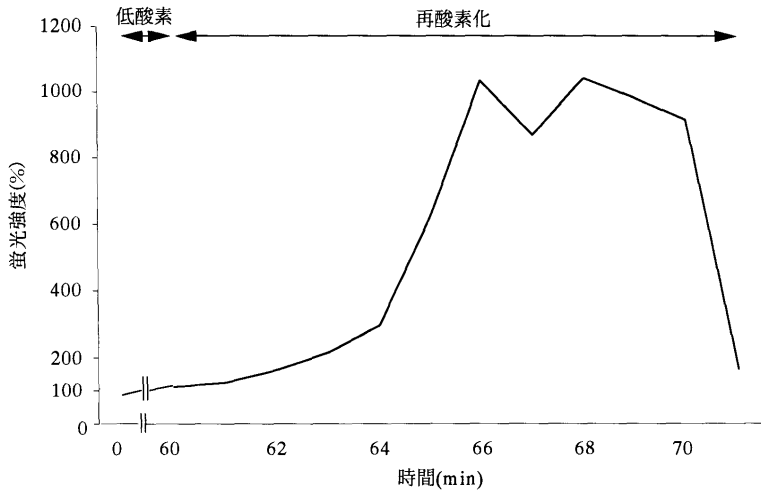


図10 細胞内 ROS 産生による蛍光強度の経時的変化
骨細胞を H₂DCFDA を含む培養液中で低酸素・再酸素化状態とし、その際の蛍光強度の変化を低酸素化前の蛍光強度を基準として示した。

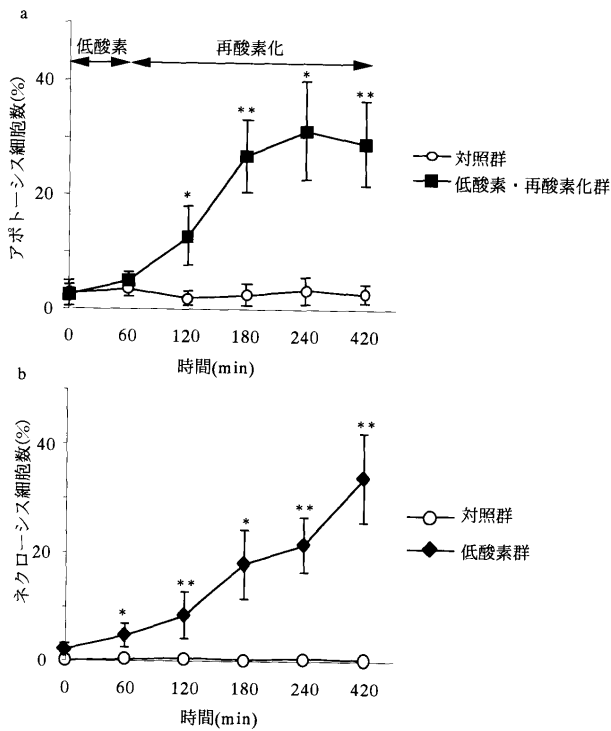


図11 低酸素・再酸素化が骨細胞におよぼす影響
骨細胞を低酸素状態においた後再酸素化した時のアポトーシス、ネクローシス細胞数の経時的変化を示す。(a)低酸素・再酸素化群、(b)低酸素群

した(図11-a)。これに対し低酸素状態のみで培養した骨細胞は annexin V 陽性細胞は認められず, propidium iodide の核への取り込み, すなわちネクローシス細胞のみを認めた(図11-b)。

考 察

骨細胞のアポトーシスは Tomkinson らがゴナドトロピンアナログ投与により偽閉経状態となった子宮内膜症患者の腸骨骨生検組織でその存在を報告し², 卵巣摘出によるラット脛骨骨細胞のアポトーシスの増加がエストロゲン投与により抑制された¹ ことなどにより, エストロゲンがその発生に重要な役割を担っていることを明らかとした。近年, ヒト大腿骨頭壊死組織¹⁴のほか, 高血圧自然発症ラット⁴やグルココルチコイド投与ラット³など大腿骨頭壊死の *in vivo* のモデルでの骨細胞のアポトーシスが報告され, 大腿骨頭壊死の発生へのアポトーシスの関与が注目されている。

大腿骨頭壊死は比較的まれな疾患であるが, 大腿骨頭骨細胞の広範な壊死を主病変とし, 力学的強度の減弱から大腿骨頭の圧潰をきたし日常生活に大きな障害をもたらすに至る疾患である。その原因としてはアルコールの多飲や喫煙, 副腎皮質ステロイド投与, 臓器移植などとの関連の他, 脂肪塞栓, 骨内圧上昇, 凝固能異常による血栓などの報告があるが未だ不明な点が多い¹⁵⁻¹⁹。しかし原因については何らかの因子が大腿骨頭栄養血管の循環障害をきたし大腿骨頭の虚血性壊死に至るとというのが一致した見解である。一方, Iio らは虚血(低酸素)とその後に続く再灌流(再酸素化)により惹起される脂質の代謝異常が大腿骨頭壊死の発生に関与する可能性を報告している⁹。ちなみに低酸素および再酸素化による障害としては, 臓器移植後^{20,21}や Crush 症候群^{22,23}などのほか, 大腿骨頭壊死と同様, 従来壊死と思われていた心筋梗塞や脳梗塞において心筋細胞や神経細胞のアポトーシスが報告されており, 特に低酸素・再酸素化により産生された ROS がアポトーシスを誘導するのではないかと考えられている。

われわれは骨細胞のアポトーシスに着目し, 大腿骨頭壊死の発生に低酸素・再酸素化が関与するとの仮定の下, ROS 代表的物質である H_2O_2 とパーオキシナイトライトが分離骨細胞に及ぼす影響について検討した。

まずこれらの物質を含む培養液中で骨細胞をインキュベートし annexin V 染色を行った。annexin V はアポトーシス早期に生ずる細胞膜リン脂質の構成成分 phosphatidylserine の細胞膜内面から外面への翻転を標識するタンパク質であり, annexin V 陽

性細胞はアポトーシスの早期像を捉えていると考えられている²⁴。300 μM の H_2O_2 を30分間作用させると annexin V 陽性骨細胞を認め, アポトーシスが誘導されたことを示した。一方, 同濃度の H_2O_2 を60分間骨細胞に作用させると, annexin V により細胞膜が染色されるとともに propidium iodide が核と結合して標識された。これはアポトーシス初期の細胞膜の翻転に引き続き生じた細胞膜の連続性の破綻により propidium iodide が細胞膜を透過したために認められる所見であり, よりアポトーシスが進行したことを示している。 H_2O_2 の濃度・作用時間と骨細胞のアポトーシスの関連については, アポトーシス細胞数は H_2O_2 の濃度・作用時間依存性に増加した。結果には示していないが500 μM 以上の濃度の H_2O_2 を作用させると骨細胞は短時間でアポトーシスではなくネクローシスに陥り, 逆に100 μM 以下の濃度では H_2O_2 は骨細胞の cell viability に影響を及ぼさないことが分かっており(未発表), H_2O_2 による骨細胞のアポトーシスは比較的狭い範囲の濃度でのみ発生すると考えられた。

パーオキシナイトライトは活性酸素(SO)と一酸化窒素(NO)が反応して生成される物質であり, その代謝生成物とともに強い酸化力を示し, 酵素の不活性化や脂質過酸化を起こす。パーオキシナイトライトはパーキンソン病, アルツハイマー病や成人呼吸促進症候群への関与が報告され²⁵⁻²⁷, アポトーシス誘導作用の報告も散見される^{28,29}。本実験の結果も同様の機序による可能性を示唆した。

カスパーゼファミリーはシステインプロテアーゼの一種で, アポトーシスに深く関与していることが知られており^{30,31}, 中でもカスパーゼ-3がその中核であると考えられている。すなわち, poly (ADP-ribose) polymerase (PARP)^{32,33}, U1 70 K small nuclear ribonucleoprotein³⁴, DNA-dependent protein kinase (PK)^{35,36}を基質とし, アポトーシスのメカニズムの最下流に存在し effector として働くと考えられている。カスパーゼファミリーは非活性の前駆体として合成され proteolysis により活性を持った subunit となる。カスパーゼ-3の特異的阻害剤である Ac-DEVD-cho はカスパーゼ-3活性化の過程で生じる中間産物 p20 subunit の活性体 p17 subunit への proteolysis を阻害すると考えられている³⁷。本実験での Ac-DEVD-cho の前処置は骨細胞の H_2O_2 によるアポトーシスを有意に抑制した。また, p20 subunit に対する抗ヒト Caspase-3 p20 (N19) 抗体を用いた免疫染色では骨細胞の核および細胞質が染色され, カスパーゼ-3が活性化されたことを示した。このことから H_2O_2 による骨細胞

のアポトーシスにはカスパーゼカスケード、中でもカスパーゼ-3 が深く関与していることが明らかとなった。

細胞内カルシウムイオンは細胞内の重要な情報伝達物質として働くことが知られており、骨細胞においてもメカニカルストレスに対する情報伝達物質の一つとして働くことが報告されている³⁸。また $[Ca^{2+}]_i$ は種々の細胞のアポトーシスやネクローシスにも関与すると報告されている^{39,40}。骨細胞においても H_2O_2 を作用させると $[Ca^{2+}]_i$ の急激な一過性上昇が認められ、細胞内カルシウムイオンのキレーターである BAPTA-AM で骨細胞を前処置すると、 H_2O_2 による骨細胞のアポトーシスは有意に抑制されたことから骨細胞のアポトーシスは $[Ca^{2+}]_i$ の上昇が関与していることが示された。

これまでに低酸素・再酸素化による組織の障害とアポトーシスに、 SO や H_2O_2 をはじめとする ROS の産生⁴¹、カスパーゼの活性化⁴²、c-fos、c-jun などの前初期遺伝子の発現⁴³、カルシウムイオン逆説⁴⁴などが論ぜられている。本実験では骨細胞においても低酸素・再酸素化によりアポトーシスが誘導され、その際 H_2O_2 の産生が認められた。そしてこれらアポトーシスの誘導、 H_2O_2 の産生には低酸素のみではなく再酸素化が必要であることが明らかとなった。 H_2O_2 は図12の反応式に示すようにスーパーオキシドから superoxide dismutase (SOD) 存在下に産生され、さらに2価の鉄イオン存在下に強力な抗酸化作用を有するヒドロキシラジカルを生じる。これらのスーパーオキシドを最上流とする一連の反応が虚血再灌流により生じる機序は次のように考えられている。すなわち虚血時に酸素の供給が絶たれるとアデノシン三リン酸がヒポキサンチンにまで分解、蓄積され、また一方では虚血によって細胞内のキサンチン脱水素酵素がキサンチンオキシダーゼに転換される。引き続いて再灌流が起こると多量の酸素が供給され、ヒポキサンチンがキサンチンオキシダーゼによりキサンチンに分解され、その際にスーパーオキシドが産生されるというものである^{45,46}。一方で生体内にはスーパーオキシドを除去する SOD をはじめ、過酸化水素を除去するカタラーゼ、グルタチオンペルオキシダーゼといった防

御系が存在するが⁴⁷、SOD 過剰発現マウスで虚血再灌流障害が完全に抑制されなかったことから、SOD が消去しきれないくらいの活性酸素が産生されると予想され⁴⁸、消去しきれなかったスーパーオキシドから過酸化水素が生じると SOD が不活化される⁴⁹。また、スーパーオキシドは一酸化窒素とほとんど拡散律速で反応し、パーオキシナイトライトを生成するが、その反応速度定数は $3.4\sim 6.7 \times 10^9 M^{-1} sec^{-1}$ で^{50,51}、SOD がスーパーオキシドを消去する反応速度定数 ($2 \times 10^9 M^{-1} sec^{-1}$)⁵² より速く、産生されたパーオキシナイトライトはグルタチオンペルオキシダーゼを不活化することによって過酸化水素の産生を促進すると考えられる⁵³。以上のようにひとたび防御系のどの一因にでも変化があれば防御系の各因子間の不均衡が生じ防御系全体の機能低下が生じることが容易に想像される。

また心筋梗塞や脳梗塞後の虚血（低酸素）・再灌流（再酸素化）障害における ROS 産生の主座は血管内皮細胞と血管床に集積し血管内皮細胞に接着して活性化された好中球などの白血球と考えられているが、今回の実験結果から骨細胞自身が H_2O_2 を産生しうることも明らかとなった。

本実験から骨細胞が低酸素・再酸素化状態になるとまず数分で細胞内に H_2O_2 が産生され、引き続き数秒以内に $[Ca^{2+}]_i$ が上昇、そして Ca^{2+} 依存性にカスパーゼカスケードが活性化され、その最下流に位置するカスパーゼ-3 が effector となって骨細胞にアポトーシスが誘導されることが推測される。大腿骨頭壊死は大腿骨頭栄養血管の循環障害による骨細胞の虚血性壊死を主体とする疾患であると考えられているが、大腿骨頭壊死組織における骨細胞のアポトーシスの発生に再灌流（再酸素化）が関与することが予想される。心筋梗塞などでは虚血単独よりも再灌流が加わることで壊死範囲が拡大すると考えられており、大腿骨頭壊死においても再灌流により組織障害が拡大している可能性があると思われる。そして骨細胞の死はメカノセンサーネットワークの破綻につながり、これにより大腿骨頭の圧潰を生じると考えられる。

近年高脂血症の治療薬である HMG-Co A reductase 阻害薬スタチンが大腿骨頭壊死の発生を予防する^{54,55}との報告がある。スタチンは ROS の産生を抑制する作用もある⁵⁶ことから、本研究の結果はその作用機序の一つを解明するとともに、大腿骨頭壊死の発症のメカニズムに関する一つの可能性を明らかにするものである。また、心筋梗塞や脳梗塞では既に ROS の scavenger が臨床応用されていることも考えると、本研究の結果は大腿骨頭壊死の治

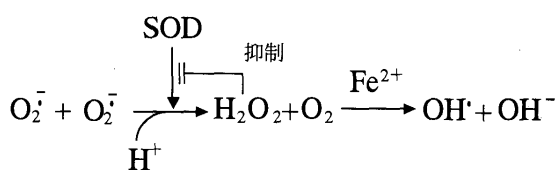


図12 H_2O_2 の産生経路

療にも応用, 適用できる可能性のある知見と考えられる。

謝 辞

稿を終えるにあたり, 御指導, 御高閲を賜りました浜西千秋教授に深謝致します。また, 本研究にご協力いただいた教室の方々に心から感謝いたします。

本論文の要旨は第19回日本骨代謝学会(平成13年8月, 名古屋)において発表した。

文 献

- Tomkinson A, Gevers EF, Wit JM, Reeve J, Noble BS (1998) The role of estrogen in the control of rat osteocyte apoptosis. *J Bone Mineral Res* 13: 1243-1250
- Tomkinson A, Reeve J, Shaw RW, Noble BS (1997) The death of osteocyte via apoptosis accompanies estrogen withdrawal in human bone. *J Clin Endocrinol Metab* 82: 3128-3135
- Weinstein RS, Jilka RL, Parfitt AM, Manolagas SC (1998) Inhibition of osteoblastogenesis and promotion of apoptosis of osteoblasts and osteocytes by glucocorticoids. Potential mechanism of their deleterious effect of bone. *J Clin Invest* 102: 274-282
- Shibahara M, Nishida K, Asahara H, Yoshikawa T, Mitani S, Kondo Y, Inoue H (2000) Increased osteocyte apoptosis during the development of femoral head osteonecrosis in spontaneously hypertensive rats. *Acta Med Okayama* 54: 67-74
- Zhao ZQ, Nakamura M, Wang NP, Wilcox JN, Shearer S, Ronson RS, Guyton RA, Vinten-Johansen J (2000) Reperfusion induces myocardial apoptotic cell death. *Cardiovasc Res* 45: 651-660
- Freude B, Masters TN, Robicsek F, Fokin A, Kostin S, Zimmermann R, Ullmann C, Lorenz-Meyer S, Schapter J (2000) Apoptosis is initiated by myocardial ischemia and executed during reperfusion. *J Mol Cell Cardiol* 32: 197-208
- Murakami K, Kondo T, Chan PH (1997) Reperfusion following focal cerebral ischemia alters distribution of neuronal cells with DNA fragmentation in mice. *Brain Res* 751: 160-164
- 北川一夫, 松本昌泰, 堀 正二, 柳原武彦(1999)脳虚血, 再灌流障害における微小循環障害とアポトーシスの関与の様式について *臨神経* 39: 1291-1294
- Iio H, Ake Y, Saegusa Y, Mizuno K (1996) The effect of lipid peroxide on osteoblasts and vascular endothelial cells. The possible role of ischemia-reperfusion in the progression of avascular necrosis of the femoral head. *Kobe J Med Sci* 42: 361-373
- Van Der Plas A, Nijweide PJ (1992) Isolation and purification of osteocyte. *J Bone Miner Res* 7: 389-396
- Matsuo T (1996) Isolation of osteocytes and probability of cell proliferation. *J Meikai Univ Sch Dent* 25: 167-175
- Katayama S, Shuntoh H, Matsuyama S, Tanaka C (1994) Effect of heat shock on intracellular calcium mobilization in neuroblastoma×grioma hybrid cells. *J Neurochem* 62: 2292-2299
- Grykiewicz G, Poenie M, Tsien RY (1985) A new generation of Ca²⁺ indicator with greath improved fluorescenceproperties. *J Biol Chem* 260: 3440-3450
- Weinstein RS, Nicholas RW, Manolagas SC (2000) Apoptosis of osteocytes in glucocorticoid-induced osteonecrosis of the hip. *J Clin Endocrinol Metab* 85: 2907-2912
- Hirota Y, Hirohata T, Fukuda K, Mori M, Yanagawa H, Ohno Y, Sugioka Y (1993) Association with alcohol intake, cigarette smoking, and occupational status with the risk of idiopathic osteonecrosis of the femoral head. *Am J Epidemiol* 137: 530-538
- Landmann J, Renner N, Gatchter A, Thiel G, Harder F (1987) Cyclosporin A and osteonecrosis of the femoral head. *J Bone J Surg Am* 69: 1226-1228
- Bradbury G, Benjamin J, Thompson J, Klees E, Copeland J (1994) Avascular necrosis of bone after cardiac transplantation. Prevalence and relationship to administration and dosage of steroids. *J Bone J Surg Am* 76: 1385-1388
- Wang GJ, Lennox DW, Reger SI, Stamp WG, Hubbard SL (1981) Cortisone-induced intrafemoral head pressure change and its rsnponse to a drilling compression method. *Clin Orthop Relat Rea* 159: 274-278
- Jones JP Jr (1994) Concepts of etiology and early pathogenesis of osteonecrosis. *Instructional Course Lectures* 43: 499-512
- Stammberger U, Gaspert A, Hillinger S, Vogt P, Odermatt B, Weder W, Schmid RA (2000) Apoptosis induced by ischemia and reperfusion in experimental lung transplantation. *Ann Thorac Surg* 69: 1532-1536
- Formigli L, Ibba-Manneschi L, Perna AM, Nediani C, Liguori P, Tani A, Zecchi-Orlandini S (1998) Ischemia-reperfusion-induced apoptosis and p53 expression in the course of rat heterotopic heart transplantation. *Microvasc Res* 56: 277-281
- Odeh M (1991) The role of reperfusion-induced injury in the pathogenesis of the crush syndrome. *N Engl J Med* 324: 1417-1422
- Hsieh AS, Winet H, Bao JY, Glas H, Plenk H Jr. (2001) Evidence for reperfusion injury in cortical bone as a function of crush injury ischemia duration: a rabbit chamber study. *Bone* 28: 94-103
- van Engeland M, Nieland LJ, Ramaekers FC, Schutte B, Reutelingsperger CP (1998) Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry* 31: 1-9
- Johnson S (2000) Iron catalyzed oxidative damage, in spite of normal ferritin and transferrin saturation levels and its possible role in Werner's syndrome, Parkinson's disease, cancer, gout, rheumatoid arthritis, etc. *Med Hypotheses* 55: 242-244
- Anderson I, Adinolfi C, Doctrow S, Huffman K, Joy KA, Malfroy B, Soden P, Rupniak HT, Barnes JC (2001)

- Oxidative signalling and inflammatory pathways in Alzheimer's disease. *Biochem Soc Symp* 67: 141-149
27. Lamb NJ, Quinlan GJ, Westerman ST, Gutteridge JM, Evans TW (1999) Nitration of proteins in bronchoalveolar lavage fluid from patients with acute respiratory distress syndrome receiving inhaled nitric oxide. *Am J Respir Crit Care Med* 160: 1031-1034
28. Schimmel M, Bauer G (2001) Selective apoptosis induction in transformed fibroblasts by B cell lines: involvement of reactive oxygen and nitrogen species. *Int J Oncol* 19: 299-304
29. Szabo E, Virag L, Bakondi E, Gyure L, Hasko G, Bai P, Hunyadi J, Gergely P, Szabo C (2001) Peroxynitrite production, DNA breakage, and poly (ADP-ribose) polymerase activation in a mouse model of oxazolone-induced contact hypersensitivity. *J Invest Dermatol* 117: 74-80
30. Koizumi H, Ohkawa I, Tsukahara T, Momoi T, Nakada K, Uchikoshi T (1999) Apoptosis in favourable neuroblastoma is not depend on Fas (CD95/apo1) expression but on activated caspase 3 (CPP32) *J Pathol* 189: 410-41
31. Nuttal ME, Nadeau DP, Fisher PW, Wang F, Keller PM, Dewolf Jr. WE, Goldring MB, Badger AM, Lee D, Levy MA, Gowen M, Lark MW (2000) Inhibition of caspase-3-like activity prevents apoptosis while retaining functionality of human chondrocytes in vitro. *J Orthop Res* 18: 353-363
32. Nicholson DW, Ali A, Thornberry NA, Vaillancourt JP, Ding CK, Gallant M, Gareau Y, Griffin PR, Labelle M, Lazebnik YA, Munday NA, Raju SM, Smulson ME, Yamin TT, Yu VL, Miller DK (1995) Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature* 376: 37-43
33. Lazebnik YA, Kaufmann SH, Desnoyers S, Poirier GG, Earnshaw WC (1994) Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature* 371: 346-347
34. Casciola-Rosen L, Miller DK, Anhalt GJ, Rosen A (1994) Specific cleavage of the 70-kDa protein component of the U1 small nuclear ribonucleoprotein is a characteristic biochemical feature of apoptotic cell death. *J Biol Chem* 269: 30757-30760
35. Han Z, Malik N, Carter T, Reeves WH, Wyche WH, Hendrickson EA (1996) DNA-dependent protein kinase is a target for a CPP32-like apoptotic protease. *J Biol Chem* 271: 25035-25040
36. Song Q, Lees-Miller SP, Kumar S, Zhang N, Chan DW, Smith GCM, Jackson SP, Alnemri ES, Litwack G, Khanna KK, Lavin MF (1996) DNA-dependent protein kinase catalytic subunit: a target for an ICE-like protease in apoptosis. *EMBO J* 15: 3238-3246
37. Han Z, Hendrickson EA, Bremmer TA, Wyche JH (1997) A sequential two-step mechanism for the production of the mature p17: p12 form of caspase-3 in vitro. *J Biol Chem* 272: 13432-13436
38. Mikuni-Takagaki Y (1999) Mechanical response and signal transduction pathways in stretched osteocytes. *J Bone Miner Metab* 17: 57-60
39. Kruman II, Mattson MP (1999) Pivotal role of mitochondrial calcium uptake in neuronal cell apoptosis and necrosis. *J Neurochem* 72: 529-540
40. Orrenius S, Mconkey D, Bellomo G, Nicotera P (1989) Role of Ca²⁺ in toxic cell killing. *Trends Pharmacol Sci* 10: 281-285
41. Chien CT, Lee PH, Chen CF, Ma MC, Lai MK, Hsu SM (2001) De novo demonstration and co-localization of free-radical production and apoptosis formation in rat kidney subjected to ischemia/reperfusion. *J Am Soc Nephrol* 12: 973-982
42. Virag L, Szabo C (2001) Purines inhibit poly (ADP-ribose) polymerase activation and modulate oxidant-induced cell death. *FASEB J* 15: 99-107
43. Itoh H, Yagi M, Fushida S, Tani T, Hashimoto T, Shimizu K, Miwa K (2000) Activation of immediate early gene, c-fos, and c-jun in the rat small intestine after ischemia/reperfusion. *Transplantation* 69: 598-604
44. Takuma K, Lee E, Kidawara M, Mori K, Kimura Y, Baba A, Matsuda T (1999) Apoptosis in Ca²⁺ reperfusion injury of cultured astrocytes: role of reactive oxygen species and NF- κ B activation. *Eur J Neurosci* 11: 4204-4212
45. Weinberg JM, Venkatachalam MA (1992) Relationship between oxidant and non-oxidant mechanisms in the pathogenesis of acute renal failure. *Miner Electrolyte Metab* 18: 123-132
46. McCord JM (1985) Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med* 312: 159-163
47. 丹羽鞠負 (1999) 活性酸素と生体の防御機構 *臨床病理* 47: 189-209
48. 竹内丙午, 鈴木正徳, 福原賢治, 海野倫明, 八巻孝之, 松野正紀 (1999) 肝虚血再灌流障害発生における細胞内 superoxide 産生系の関与—CuZn-SOD 過剰発現トランスジェニックマウスを用いた検討— *肝臓* 40: 13-19
49. Sampson JB, Beckman JS (2001) Hydrogen peroxide damages the zinc-binding site of zinc-deficient Cu, Zn superoxide dismutase. *Arch Biochem Biophys* 392: 8-13
50. Goldstein S, Czapski G (1995) The reaction of NO with O₂⁻ and HO₂[·]: a pulse radiolysis study. *Free Radic Biol Med* 19: 505-510
51. Huie RE, Padmaja S (1993) The reaction of no with superoxide. *Free Radic Res Commun* 18: 195-199
52. Cudd A, Fridovich I (1982) Electrostatic interactions in the reaction mechanism of bovine erythrocyte superoxide dismutase. *J Biol Chem* 257: 11443-11447
53. Asahi M, Fujii J, Takao T, Kuzuya T, Hori M, Shimonishi Y, Taniguchi N (1997) The Oxidation of Selenocysteine Is Involved in the Inactivation of Glutathione Peroxidase by Nitric Oxide Donor *J Biol Chem* 272: 19152-19157

54. Pritchett JW (2001) Statin therapy decreases the risk of osteonecrosis in patients receiving steroids. *Clin Orthop* 386 : 173-178
55. Chui Q, Wang GJ, Su CC, Balian G (1997) The Otto Aufranc Award. Lovastatin prevents steroid induced adipogenesis and osteonecrosis. *Clin Orthop* 344 : 8-19
56. Wasserman S, Laufs U, Bumer AT, Mller K, Ahlbory K, Linz W, Itter G, Rsen R, Bhm M, Nickenig G (2001) HMG-Co A reductase inhibitors improve endothelial dysfunction in normocholesterolemic hypertension via reduced production of reactive oxygen species. *Hypertension* 37 : 1450-1457