

一 般 演 題 抄 録

17. E2 刺激による破骨細胞の OPN 遺伝子発現と骨吸収窩形成への影響

山口博史 宮崎 浩 岡田正道 菊山愛一朗 森 成志 瀨西千秋
近畿大学医学部整形外科学教室

目 的

オステオポンチン (OPN) は骨芽細胞が産生する細胞接着性シアロ・タンパク質である。近年になり骨吸収部位の単核、多核の破骨細胞にも OPN 遺伝子発現が認められ、またエストロゲンレセプターの存在も報告されている。エストロゲン (E2) の破骨細胞への作用や破骨細胞の OPN の働きの詳細は不明な点が多い。今回、破骨細胞に E2 刺激を加え OPN 遺伝子発現と骨吸収抑制への影響を検討した。

材料と方法

10日齢仔ウサギの四肢長管骨より単離した破骨細胞に E2 刺激を加え、tRNA を調整し RT-PCR 法で OPNmRNA 発現への影響を調べた。また破骨細胞を象牙片に播き E2, 抗 OPN 抗体, E2+抗 OPN 抗体の刺激を加え形成させた骨吸収窩の面積を測定し骨吸収抑制への影響を調べた。

結 果

RT-PCR 法の結果、E2 刺激により破骨細胞の OPN 合成は転写レベルで抑制されるのが認められた。骨吸収窩の形成は E2, 抗 OPN 抗体, E2+抗 OPN 抗体の順でいずれも有意に抑制された。

考 察

OPN は破骨細胞が骨吸収する際に骨基質と接着する明帯の形成に不可欠であり、また OPN の結合が破骨細胞内の Ca イオンレベルを変化させ骨吸収を開始させると言われている。本研究の結果、エストロゲンによる骨吸収抑制の作用には、これまで報告されたアポトーシス惹起作用の他に、破骨細胞の OPNmRNA の発現が抑制され細胞内の OPN 量が減少し明帯を介しての細胞接着能力が低下して、結果的に骨吸収が抑制される径路の存在が示唆された。

18. 関節軟骨に関する Hydrogen Peroxide (H₂O₂) の作用

朝田滋貴 福田寛二 原文彦 王 正道 瀨西千秋
近畿大学医学部整形外科学教室

目的 IL-1 は関節軟骨破壊を最も強力に引き起こすサイトカインとして知られている。IL-1 による関節軟骨に対する作用は、軟骨基質破壊の亢進と軟骨基質合成の抑制の二つに分けて考えることができる。当教室では、軟骨基質破壊には Superoxide がまた軟骨基質合成抑制には NO が関与することを証明した。さらに最近では、Superoxide と NO が反応することで生成される Peroxyniterite が軟骨基質合成抑制をきたす本質的分子であることを報告してきた。しかし、IL-1 による軟骨基質合成抑制が Peroxyniterite の消去剤である ebselen で完全に回復されなかった。このことから、Peroxyniterite 以外の影響をも考慮しなければならないことがわかった。一方、Hydrogen peroxide (H₂O₂) も以前より軟骨破壊を引き起こすことが報告されてきたが、その軟骨代謝に及ぼす影響については不明であった。そこで今回 H₂O₂ に注目し、アポトーシスを含め、その関節軟骨細胞代謝に与える影響について検討した。

方法 ウシ関節軟骨を無菌的に採取し、酵素処理を行い単層培養とした。プロテオグリカン合成能は[35

S] 硫酸の取り込みで測定した。アポトーシスは TUNEL 法と Annexin V 法を使用した。この Annexin V は近年アポトーシスの検出に注目されている。アポトーシスの初期段階において細胞膜成分の Phosphatidylserine は細胞膜内面から細胞膜外面へトランスロケートする。Annexin V はこの Phosphatidylserine に特異的に接着する。今回染色には Annexin V kit を使用したが、この kit は Annexin V を FITC 標識してあり、染色後共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

結果および考察 H₂O₂ は濃度依存性にプロテオグリカン合成能を抑制した。また H₂O₂ を添加することにより、軟骨細胞は TUNEL 法で核が染色され、また Annexin V では細胞膜周辺が染色され、さらに濃度依存性にアポトーシスが誘導されることが確認された。これらの結果は、H₂O₂ が軟骨変性に関与していることを示唆している。

結論 H₂O₂ は軟骨代謝の調節に重要な働きをすることが明らかにされた。