

論文内容の要旨

氏名	うえだひろのぶ 上田 広伸
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	医第872号
学位授与の日付	平成18年3月22日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	骨芽細胞における周期的牽引負荷による活性酸素種産生とスーパーオキシドディスムターゼの誘導
論文審査委員(主査)	教授 濱西千秋
(副主査)	教授 伊木雅之
(副主査)	教授 重吉康史

【目的】

骨変化は骨芽細胞が機械的ストレスに応答し、その形態や代謝を変化させることが原因とされるが、その機構の詳細は不明であった。近年、骨芽細胞における骨変化に活性酸素種(reactive oxygen species, ROS)が重要な役割を果たすことが注目された。本研究の目的は、骨芽細胞における機械的ストレスによるROS発生、その消去を行うスーパーオキシドディスムターゼ(superoxide dismutase SOD)誘導の発生経路を解明することである。

【材料および方法】

骨芽細胞は当教室で樹立したHT-3細胞を使用した。骨芽細胞内でROSを産生させるためパラコート培養細胞に添加した。また細胞外ROSとして過酸化水素を培養細胞に添加した。細胞膜透過性のSODとしてMn-TBAPを使用し、細胞外SODとしてCu-ZnSODを使用、培養液に添加した。さらにフレクサーシステム(FX3000)を用い骨芽細胞に周期的牽引負荷を加えた。各薬剤や牽引付加を骨芽細胞に加えた後、その培養液や細胞を検体とし、各時点における経時的変化を観察した。ROS発生は細胞内ROSに反応する発光物質L-012を添加後、共焦点顕微鏡にて評価した。SOD活性はWST法でSOD発生量を測定し検討した。SOD遺伝子発現はRT-PCR法にて評価した。

【結果】

骨芽細胞にパラコートを反応させた結果、細胞内ROSは明らかに増加し、SOD活性も増加した。過酸化水素を骨芽細胞に反応させても細胞内ROS発生、SOD活性上昇は軽微であった。骨芽細胞におけるパラコート添加において、Mn-TBAPを加えるとROS発生増加は明らかに抑制され、Cu-ZnSODを加えてもROS発生抑制は軽微であった。さらにMn-TBAPはSOD活性の上昇も抑制した。一方、骨芽細胞に対する周期的牽引負荷は、ROS産生を誘導し、SOD活性を増加させた。さらにMn-TBAP存在下で機械的ストレスを加えると、SOD活性、SOD-mRNA遺伝子発現は抑制された。

【考察】

これらの結果より骨芽細胞におけるSOD誘導には細胞内のROS増加が重要であることが明らかにされた。また機械的ストレスが細胞内ROS産生を介しSODを誘導していることが示唆された。本研究は機械的負荷が正常の骨変化に及ぼす代謝メカニズムの一端を明らかにしたといえる。また臨床的には骨粗鬆症において血中ROSが増加、SODが減少し、ROSとその中和酵素SODのアンバランスが骨量低下を引き起こすとする報告があり、本研究は骨折治療や骨粗鬆症予防における適度の機械的負荷の重要性を裏付けると考察できる。

【結論】

周期的牽引負荷により骨芽細胞から活性酸素が産生された。活性酸素に反応して骨芽細胞からSODが誘導された。この代謝経路は骨変化に重要な働きをしていることが示唆された。

論文審査結果の要旨

骨は機械的負荷に適応して、骨の形態を変化させる。これは骨改変とよばれる生理的現象であるが、このとき骨の長軸方向に一定の機械的負荷が加わることが重要である。また骨における適度な機械的ストレスは正常な骨格の維持に必須である。しかし過剰なストレス、すなわち非生理的な機械的負荷は疲労骨折や骨量の減少の原因となり、明らかに骨代謝を障害する可能性がある。これらの現象の調節には骨芽細胞も関与し、タイプ I コラーゲンやオステオカルシンなどの有機質合成、ミネラルなどの無機質を沈着させるなどの働きが重要な役割を果たす。

しかし骨改変における骨芽細胞レベルでの調節機構はいまだ不明な点が多い。当教室ではその調節機構因子として活性酸素種 (ROS) に注目しており、骨芽細胞に周期的牽引負荷を加えた結果、活性酸素種および抗酸化酵素の一種であるスーパーオキシドディスムターゼ (SOD) が誘導されることを報告し、これが機械的ストレスに対する骨改変における細胞レベルでの調節機構の一つとして重要な役割を果たしている可能性を示唆している。

しかしながら ROS にはスーパーオキシドラジカル (O_2^-)、過酸化水素 (H_2O_2)、パーオキシニトライト (ONNO $^-$)、そしてヒドロキシラジカル (OH $^-$) などがあり、骨芽細胞のどの部分で、いずれの ROS を介して SOD が誘導されているかは不明であった。

本論文は機械的負荷によるそれらの詳細を証明しようとするものである。

材料には当教室で樹立された HT-3 細胞を使用している。この細胞は当教室で樹立された実験的骨肉腫細胞 (骨芽細胞様細胞) であり、Alkaline phosphatase 活性陽性、副甲状腺ホルモンに対する細胞内 cAMP 増加、培養にてカルシウム沈着、タイプ I コラーゲン産生など、悪性腫瘍細胞としての形質と骨芽細胞としての形質を保有している。

本論文ではまず細胞内 ROS である O_2^- 発生薬剤としてパラコートを使用した。これは除草剤として知られ、その生化学的機構は一電子の酸化還元サイクル中に O_2^- を生成し細胞を障害するものである。対象に細胞外 ROS 誘導物質である過酸化水素を使用し、これらを HT-3 細胞に反応させ、 O_2^- の発生を L-012 によって蛍光染色し、共焦点顕微鏡にて観察した。その結果、パラコートは O_2^- を発生させたが、過酸化水素ではほとんどその発生を認めなかった。

ついで細胞内透過性 SOD 様物質である Mn (III) tetrakis (4-benzoic acid) porphyrin (MnTBAP)、そして細胞外 SOD である Cu-ZnSOD を細胞に添加しパラコー

博士論文の印刷公表	公 表 年 月 日	出版物の種類及び名称
	平成 17 年 月 日 公表予定	出版物名 近畿大学医学雑誌 第 30 巻 第 3 号 平成 17 年 月 日 発行予定
	公 表 内 容	
	全 文	

トを反応させ、細胞内 O_2^- の発生、SOD 誘導を検討したところ、MnTBAP は細胞内 ROS 発生を抑制し、それに続く SOD 誘導をも抑制する結果を見た。分子量 35000Da の Cu-ZnSOD は細胞膜を通過できないため、パラコートによる細胞内 ROS 発生抑制は見られなかった。すなわち骨芽細胞内に O_2^- が発生した場合には、その消去酵素として細胞内 SOD である Mn-SOD が誘導されることが証明された。

ついで本論文では HT-3 細胞に機械的牽引付加を加え、L-012 にて蛍光染色、共焦点顕微鏡にて O_2^- 発生を観察した。その結果牽引負荷にて O_2^- 発生がみられた。しかし MnTBAP を添加すると牽引負荷による O_2^- 発生は抑制されていた。次に牽引負荷による SOD 誘導を検討したところ、SOD の誘導を認め、やはり MnTBAP を添加することで SOD の誘導抑制を認めた。さらに RT-PCR 法にて牽引負荷による Mn-SOD の遺伝子発現を検討したところ、同様の結果を得た。

これらの結果を考察すると、パラコートによる ROS 発生と SOD による代謝経路は、機械的ストレスによる ROS 発生と SOD 誘導経路と同様であった。すなわち牽引負荷による ROS 発生と SOD 誘導経路は細胞内レベルで起こっていることが示唆された。

骨芽細胞にパラコートを反応させ、ROS 発生、SOD 誘導を検討した実験は他に類がなく、再現性のあるモデルとして評価できる。また本論文は機械的負荷が正常の骨改変に及ぼす代謝メカニズムの一端を明らかにし、この代謝経路は骨改変に重要な働きをしていることを示唆した。さらに骨折治癒や骨粗鬆症予防における適度の機械的負荷の重要性を今までにない観点から提言したといえる。また MnSOD 様物質が臨床で実用化された場合の、上記疾患のみならず医療全般における貢献が期待できることも示唆した。

以上をふまえ、主査と副主査は規定の各種審査試験、ならびに博士学位論文公聴会（平成 18 年 1 月 31 日）を実施し、慎重に審査した結果、本論文は博士（医学）学位論文に十分値すると判断された。

氏 名	金 田 宗 也
学位の種類	博 士 (医学)
学位記番号	医 第 8 7 3 号
学位授与の日付	平成 18 年 3 月 22 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	牛培養軟骨細胞における血管内皮増殖因子 (VEGF) の発現亢進とペロキシソーム増殖因子応答性受容体 (PPAR- γ) の活性化：酸化低比重リポ蛋白 (LDL) とレクチン様酸化 LDL 受容体-1 (LOX-1) の関与について
論文審査委員 (主 査)	教 授 濱 西 千 秋
(副主査)	教 授 金 政 健
(副主査)	教 授 宗 像 浩