

学位研究紹介

骨芽細胞における Heat Shock Protein 27 の一過性過剰発現は分化能に影響を及ぼさずにアポトーシスを抑制する Transient Over Expression of Heat Shock Protein 27 Inhibit Apoptosis without Affecting the Differentiation Capacity in Osteoblast

新潟大学大学院医歯学総合研究科生体歯科補綴学分野

北見恩美

Division of Bio-Prosthetic, Niigata University Graduate
School of Medical and Dental Sciences

Megumi Kitami

【緒言】

インプラント前処置として行われる骨増成法では、増殖因子やスキャホールドと共に、細胞を用いる方法が有効であるとされている。しかしながら、移植時の種々のストレスにより、移植細胞の生着は抑制され、その効果が制限されていると考えられている。細胞はストレスにさらされると、細胞内にストレスタンパク質である Heat shock proteins (HSPs) を産生し、この中でも分子量 27 kDa の HSP27 は、抗アポトーシス作用を示すことが知られている。そこで、我々は移植細胞において HSP27 を過剰発現させてストレスへの耐性を向上し、細胞の生着を促進することによって、より効果的な骨増成が期待できるのではないかとこの着想に至った。本研究の目的は、骨芽細胞における HSP27 の一過性過剰発現が骨芽細胞の生存と分化に与える影響を解析することである。さらに、HSP27 過剰発現骨芽細胞を頭蓋骨欠損部に移植し、移植細胞の生存と骨形成能について評価した。

【方法】

骨芽細胞株 MC3T3-E1 に HSP27 一過性発現ベクターを導入し、HSP27 の過剰発現を行った。HSP27 過剰発現骨芽細胞における細胞増殖能の評価は MTS 法にて行い、骨芽細胞分化の評価には Alkaline Phosphatase (ALP) 活性染色を、石灰化能の評価には Alizarin Red 染色を用いた。各種骨芽細胞分化マーカーの発現は *realtime* PCR にて解析した。アポトーシスは TNF- α 及

び H₂O₂ にて誘導し、検出には TUNEL 染色を用いた。細胞移植実験には、雄性 9 週齢免疫不全ラット (F344/NJcl-rnu) を使用し、頭蓋骨に直径 4.3mm の骨欠損を作成した。移植細胞追跡のため蛍光色素にて染色した HSP27 過剰発現骨芽細胞をコラーゲンに混和したものを移植体とし、欠損部に移植した。1, 3, 7, 14 および 28 日目に屠殺し、骨形成を μ -CT および組織学的手法により評価した。

【結果】

一過性の HSP27 過剰発現は骨芽細胞増殖能に影響を及ぼさなかった。骨芽細胞分化については骨芽細胞関連遺伝子の発現量に変化は見られず、ALP 活性および石灰化能にも影響は認められなかった。さらに、HSP27 の過剰発現は H₂O₂ に誘導されるアポトーシスを有意に抑制したものの、TNF- α に誘導されるアポトーシスの抑制について統計的有意差は認められなかった。

HSP27 過剰発現の移植骨芽細胞への影響を明らかにするために行った移植実験の結果、移植後 3 および 7 日後にて HSP27 過剰発現により TUNEL 陽性細胞率が有意に減少した (図 1-A)。さらに、移植野における新生骨量をマイクロ CT にて解析したところ、細胞を含まない移植体と比較し、細胞移植群は骨治療が促進されたが、HSP27 の過剰発現の有無による骨欠損治療に有意差は認められなかった (図 1-B)。そこで、蛍光色素にて移植細胞の挙動を追跡したところ、本研究で用いた移植骨芽細胞の骨芽細胞、骨質細胞への分化は確認できなかった。

【考察及び結論】

本研究では、HSP27 の一過性過剰発現が移植骨芽細胞の生存および骨形成に及ぼす影響を評価した。細胞培養系において一過性の HSP27 過剰発現は一部の骨芽細胞関連遺伝子の発現低下を惹起したものの、骨芽細胞の石灰化には影響を及ぼさなかった。さらに、我々はアポトーシスの誘導に H₂O₂ と TNF- α の二種の誘導因子を用いたが、HSP27 によるアポトーシスの抑制は H₂O₂ に誘導されるものに限定されていた。過去の研究からもアポトーシスの誘導経路は複数あることから、今後、その抑制経路についてもより詳細な解析が必要であろう。本研究では、抗アポトーシス遺伝子である HSP27 を移植骨芽細胞に導入して、より効果的な骨増成を期する試みを行ったが、細胞の生存率は向上したものの、最終的な

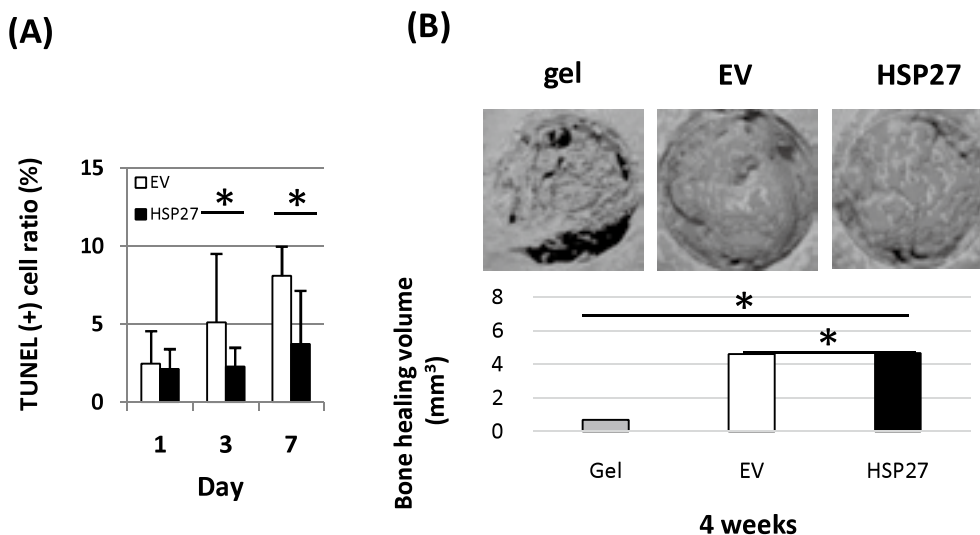


図1. HSP27の移植骨芽細胞および頭蓋骨欠損治癒への影響

(A) HSP27 過剰発現骨芽細胞の TUNEL 陽性細胞率は、移植後3日および7日において有意に減少した。(B) HSP27 過剰発現骨芽細胞の骨欠損治癒への影響をマイクロCTにて解析した。移植後4週において細胞移植群は細胞を含まない移植体と比較し骨治癒を促進したが、HSP27 過剰発現は新生骨量に影響を及ぼさなかった。

新生骨量に変化は見られず、移植細胞の骨細胞への分化は観察されなかった。骨形成能を有する細胞の移植は盛んに試みられているものの、本研究結果でも見られるように、その効果と働きについては依然として議論が分かれるところである。本研究の結果より、細胞移植は骨欠損治癒に有効な手段であるが、移植細胞は骨再生のため

の骨芽細胞の細胞源としてではなく、宿主細胞へ何らかの影響を与えることで骨治癒を促進している可能性が示唆された。移植細胞を用いた効率的な骨増成には、より詳細な移植細胞の働きを明らかにする必要があると考えている。