

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 北見 恩美
学位 博士 (歯学)
学位記番号 新大院博 (歯) 第291号
学位授与の日付 平成26年3月24日
学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当
博士論文名 **Transient Over Expression of Heat Shock Protein 27 Reduces Apoptotic Reaction of Osteoblasts without Affecting the Differentiation Capacity**
(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)

論文審査委員 主査 教授 織田 公光
副査 教授 魚島 勝美
副査 教授 佐伯 万騎男

博士論文の要旨

【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) を産生することが知られ、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に形成した欠損部に移植し、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 発現ベクター、pCMV-SPORT6-mHSP27 を一過性に導入し、HSP27 の過剰発現を行った。HSP27 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解析は *realtime* PCR にて解析した。アポトーシスは TNF- α 及び H₂O₂ にて誘導した。アポトーシスの検出には TUNEL 染色を用い、総細胞数あたりの TUNEL 陽性細胞率を算出した。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、トレファンバーにて頭蓋骨に直径 4.3mm の骨欠損を作成した。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、28 および 42 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】

一過性発現ベクターを用いた HSP27 の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、HSP27 発現により Runx2/Cbfa1 遺伝子の発現量は増加したものの、Alpl 遺伝子は減少していた。ALP 活性および石灰化能に影響は認められなかった。また HSP27 の発現は 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。

さらに、HSP27 発現骨芽細胞のラット頭蓋骨欠損部への移植により、移植 7 日後には、移植野への血管新生と活発な骨形成が認められた。移植野におけるアポトーシスを TUNEL 染色にて検出したところ、3 および 7 日後においては HSP27 発現により TUNEL 陽性細胞率が有意に減少していた。細胞増殖能を示す PCNA 陽性細胞率は移植 7 日後において HSP27 発現細胞が有意に高値を示した。移植 4、6 週後の移植野における新生骨量を μ CT にて解析したところ、両群間において有意差は認められなかった。

【考察及び結論】

本研究では、HSP27の一過性の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。一過性のHSP27の発現は骨芽細胞の石灰化能に影響を及ぼさなかったが、石灰化に要する期間に対して発現ベクターの効果は7日程度しか持続しないこと、骨芽細胞の分化過程でHSP27上昇が認められることを考慮すると、HSP27による骨分化能への影響が無いとは断定出来ない。さらに我々はアポトーシスの誘導に H_2O_2 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 H_2O_2 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り、HSP27が抑制するのはCytochrome Cに関連する経路のみであるとの報告があることから、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、最終的な新生骨量に変化は見られなかった。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、その効果については依然として議論が分かれるところである。移植細胞の生存率を改善することによる効果的な骨増成を今後臨床応用に直接結び付けるためには、より長期的な解析と、骨形成の場における移植細胞の直接的な寄与についても検討することが必要であろう。

審査結果の要旨

細胞療法を併用した骨再生法は多数の施設で臨床試験が行われており、新潟大学医歯学総合病院においても培養骨膜シートを用いた骨増生法の臨床試験が進められ、一定の成果を得ている。しかしながら、移植細胞の挙動についての基礎的背景は乏しいのが現状であり、移植時のストレスによる移植細胞の減少が細胞移植の効果を制限している可能性は否定できない。

申請者は本研究において、Preconditioningによって移植細胞にストレス耐性を獲得させ、移植細胞の生着率を向上させるという着想の元、Preconditioningによって発現が上昇する防御因子の1つであるHSP27の骨芽細胞における機能解析と移植細胞への影響を明らかにすることを試みている。

マウス頭蓋冠由来骨芽細胞様細胞MC3T3-E1にHSP27一過性発現ベクターを遺伝子導入し、骨芽細胞における細胞増殖能、骨芽細胞分化能さらに抗アポトーシス作用への影響を検証している。培養系における解析の結果、HSP27一過性発現は骨芽細胞の細胞増殖能に影響を与えず、ALP活性、石灰化ノジュールの形成にも影響を与えなかった。一方で、 H_2O_2 の添加によって誘導したアポトーシスはHSP27の発現により抑制が認められた。

さらに移植細胞におけるPreconditioningの効果を評価するために細胞移植実験を行っている。HSP27を発現させたMC3T3-E1細胞を免疫不全ラット頭蓋骨欠損に移植し、移植初期における細胞の挙動を組織学的に評価し、さらに長期的な骨再生への影響を μ CTを用いて解析している。移植細胞の増殖能をPCNA抗体を用いて評価したところ、1、3日目では有意差は認められなかったが、7日目ではHSP27発現群において有意に高い値を示している。さらにアポトーシスをTUNEL染色で検出し、移植後3、7日後でHSP27発現群では抑制が認められている。しかしながら、 μ CTによる観察から骨欠損の治癒においてはHSP27の過剰発現は影響を及ぼさなかった。

本研究では①HSP27の骨芽細胞における機能解析、および②細胞移植の際のPreconditioningのターゲットとしてのHSP27の可能性について解析評価を行っている。①の骨芽細胞における機能解析についてはいくつかの既報があるもの、その機能については未だ不明な点が多い。本研究では骨芽細胞分化過程におけるHSP27の発現、および一過性発現による骨芽細胞分化への影響を明らかにしているが、HSP27は細胞周期やタンパクの生成に対して直接的に影響を及ぼす分子であり、リン酸化等の修飾によっても活性が変化することから、より詳細な解析が必要であろう。②の細胞移植実験については移植初期の細胞活性、TUNEL陽性細胞に変化が見られたものの、最終的な骨再生能への影響は認められていない。PreconditioningのターゲットとしてのHSP27の可能性についてはさらに検討を加える必要があると思われるが、生理的な刺激により細胞のストレス耐性を向上させる試みは有効であろう。本研究では移植細胞の長期追跡には成功していないが、細胞標識についても今後の改善に期待したい。本研究は、HSP27の一過性発現が骨芽細胞の分化と抗アポトーシス能に与える影響を解析し、移植細胞のPreconditioningとして用いる試みであり、その学術的意義は高く、学位論文としての価値を認める。