

主 論 文 要 旨

論文提出者氏名：染村 嵩

専攻分野：整形外科学

指導教授：仁木 久照

主論文の題目：

Physiologic Mechanical Stress Directly Induces Bone Formation by Activating Glucose Transporter 1 (Glut 1) in Osteoblasts, Inducing Signaling via NAD⁺ Dependent Deacetylase (Sirtuin 1) and Runt Related Transcription Factor 2 (Runx2).

(生理的力学的ストレスは、骨芽細胞においてグルコース輸送体1の活性化に誘導されるサーチュイン1および骨形成転写因子 Runt Related Transcription Factor 2 を介して骨形成能を促進する)

共著者：

Takanori Kumai, Kanaka Yatabe, Chizuko Sasaki, Hiroto Fujiya, Hisateru Niki, Kazuo Yudoh

緒言

骨・軟骨組織は力学的ストレスに応答して変化することが知られており、細胞内情報伝達路を経て、生理的・病理的な細胞活性変化を導く、力学的ストレス応答機序が解明されつつある。また、骨芽細胞のエネルギー代謝においては、細胞エネルギーセンサーsirtuin 1 (SIRT1) が力学的ストレス応答および細胞内グルコース取り込み・エネルギー代謝の主要調節因子として機能すること、さらに SIRT1 が骨形成転写因子 Runt related transcription factor 2 (Runx2) の活性を調節することが明らかにされている。

我々は、力学的ストレスの感知・応答機構と細胞エネルギー代謝機構との関連を明らかにするために、グルコース輸送体 1 (Glut1) を介したグルコース取り込みと SIRT1 の相互作用に注目し、コラーゲンスポンジを用いた 3 次元培養下における骨芽細胞と軟骨細胞の力学的ストレス応答機序を解析した。

方法・対象

実験には市販のヒト骨芽細胞株ならびに人工膝関節置換術時に採取した軟骨組織から分離培養した軟骨細胞を用いた。コラーゲンスポンジに各種細胞を播種して培養し、3次元培養組織を構築した。骨芽細胞または軟骨細胞の3次元培養組織に対して、重錘を用いて 25.5 gf/cm^2 の持続的荷重ストレスを負荷し、その後培養48時間目に培養上清を採取、かつ3次元培養組織をコラゲナーゼ処理して細胞蛋白を回収した。

i) 荷重ストレスの各種細胞活性への影響は、骨芽細胞についてはアルカリフォスファターゼとオステオカルシンを、軟骨細胞はII型コラーゲンとプロテオグリカンの培養上清中の濃度を測定することで評価した。さらにii) 荷重ストレス+/-条件下における骨芽細胞および軟骨細胞の走査型電子顕微鏡像解析を行い、Glut1、SIRT1 および Runx2 の発現度を western blot 法で分析した。また、Glut1 阻害剤存在下・非存在下における Glut1、SIRT1 および Runx2 の発現の変化を比較分析した。なお本研究は、聖マリアンナ医科大学生命倫理委員会の承認を得たものである(承認番号 1315)。統計学的解析には Bonferroni multiple comparison post hoc test を用いた。

結果

走査型電子顕微鏡像において、骨芽細胞および軟骨細胞ともに荷重ストレス(+)群ではストレス(-)対照群に比べて有意な分泌顆粒数の増強が観察された(各細胞: $P < 0.01$)。生理的荷重ストレス負荷により、骨芽細胞の細胞活性は増強し、かつ Glut1 発現の有意な増加、SIRT1 発現の有意な減少および Runx2 発現の有意な増加が認められた(各因子ともに荷重ストレス(-)対照群に比べて $P < 0.05$)。しかし、Glut1 阻害剤存在下では、生理的荷重ストレス負荷で誘導された Glut1、SIRT1 および Runx2 の発現変化はみられなかった。骨芽細胞とは対照的に、軟骨細胞では荷重ストレス負荷では細胞活性は影響を受けず、軟骨細胞における Glut 1、SIRT1 および Runx2 の発現についても影響を受けなかった。

考察

本研究の結果から、骨芽細胞の3次元培養-荷重負荷実験系の解析により、骨芽細胞では荷重ストレスに応答して細胞エネルギー代謝および細胞活性が増強し、骨基質成分産生とコラーゲン線維への沈着の増強が確認できた。骨芽細胞に対する生理的力学負荷は、細胞膜上のグルコース輸送体 Glut1 活性化を介して細胞内へのグルコース取り込みを増加させ、これに応答してエネルギーセンサーSIRT1 発現は低下し、その結

果 SIRT1 が抑制する Runx2 発現は増強すると考察した。こうした荷重ストレスに応答した Glut1-SIRT1-Runx2 シグナル伝達経路を介した骨形成因子 Runx2 の活性化が、オステオカルシンと ALP の産生を促進し、骨芽細胞の分化と骨形成につながると考えた。

本研究は、Glut1 が力学的ストレス負荷による骨芽細胞の分化と骨形成に重要な役割を担う応答因子であることを示し、これまで報告されてきた骨細胞-骨芽細胞の細胞間ネットワークを介さない骨芽細胞単独での力学的ストレス応答機序により骨芽細胞分化・骨形成能が誘導されることを示した。

一方、本研究で用いた生理学的レベルの力学的ストレス負荷は、軟骨細胞においては Glut1、SIRT1、Runx2 の有意な発現を誘導せず、さらに II 型コラーゲンおよびプロテオグリカンの産生に影響はみられなかった。このことから、骨芽細胞が反応する力学的ストレス負荷レベルでは、軟骨細胞活性は応答しないことが示唆されたが、さらに骨芽細胞と軟骨細胞の力学的ストレス応答の違いについて検討する必要があると考える。

結論

本研究は、骨芽細胞では Glut1-SIRT1-Runx2 経路を介し、力学的ストレスと細胞エネルギー代謝の相互作用によって骨形成能が調節されることを示した最初の報告である。