

ステロイド投与および低酸素環境において誘導される骨細胞の apoptosis および necrosis に対する heme oxygenase-1 の抑制効果

山本 浩基、齊藤 正純、上島 圭一郎、石田 雅史、後藤 毅、林 成樹、池上 徹、久保 俊一
(京都府立医科大学大学院医学系研究科 運動器機能再生外科学)

ステロイドと低酸素は骨細胞死を誘導することが知られている。Hemin により誘導される HO-1 (heme oxygenase-1)は、細胞保護効果を有する。本研究では、培養マウス骨細胞に hemin を添加し HO-1 の遺伝子と蛋白の発現を確認した。さらに、メチルプレドニゾン (1 μ M) と低酸素 (1%) により誘導される細胞死が、hemin 投与によって有意に減少することを確認した。ステロイドと低酸素による骨細胞死に対する hemin の抑制効果は、HO-1 を介することが示唆された。

1. 研究目的

過去の研究では、ステロイドと低酸素によって骨細胞の apoptosis と necrosis が促進されることが報告されている¹⁾。これらの細胞死がステロイド関連大腿骨頭壊死症の発生に關与している可能性がある。Hemin によって誘導される HO-1 (heme oxygenase-1) は低酸素下で誘導されるストレス応答蛋白の一つであり、抗酸化抗炎症作用をもち細胞保護効果を有する^{2, 3, 4)}。本研究では、ステロイド投与と低酸素による骨細胞死に対する HO-1 の抑制効果を評価した。

2. 研究方法

細胞は培養マウス骨細胞(MLO-Y4)を用いた。HO-1 誘導剤として hemin を、HO-1 阻害剤として亜鉛プロトポルフィリン IV を用いた。

MLO-Y4 を、1)20%酸素環境下、2-6)20%酸素環境下で hemin 1,5,10,20,30 μ M 添加、の 6 群に分けた。6 群を各条件で 18 時間培養した後、HO-1 の遺伝子発現を real time RT-PCR で、蛋白発現を Western blotting 法を用いて 2 群間で比較した。統計学的には Student T 検定を用い危険率 5 %未滿を有意差ありとした。

MLO-Y4 を、1)control 群: 20%酸素環境下、2)DH

群: 1%酸素環境下でデキサメサゾン 1 μ M 添加、3)DH-h 群: hemin 10 μ M 添加後、1%酸素環境下でデキサメサゾン 1 μ M 添加、4)DH-h-PP 群: hemin および HO-1 阻害剤添加後、1%酸素環境下でデキサメサゾン 1 μ M 添加、の 4 群に分けた。4 群を各条件で 24 時間培養した後、Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit を用いてフローサイトメトリーを行い、1well あたりの総細胞数に対する apoptosis と necrosis の割合を測定し 4 群間で比較した。統計学的には Tukey-Kramer 多重比較検定を用い危険率 5 %未滿を有意差ありとした。

MLO-Y4 の caspase-3 の活性を control 群、DH 群、DH-h 群間で経時的に比較した。Dex (1 μ M) 投与と低酸素環境 (1% O₂) で各時間 (0, 6, 12, 24 時間後) において caspase-3 活性を計測し、control 群、DH 群、DH-h 群間で比較した。

3. 研究結果

10, 20, 30 μ M hemin 投与群では、非投与群よりも HO-1 の遺伝子発現が有意に増加した ($p < 0.01$) (図 1 a)。10, 20, 30 μ M hemin 投与群では、非投与群よりも HO-1 の蛋白発現量が増加した (図 1 b)。

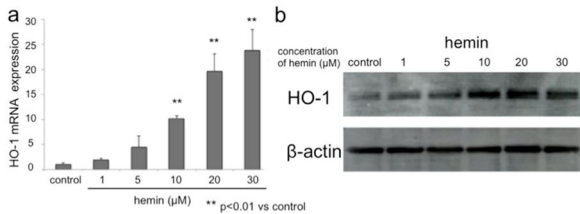


図1 hemin 添加による HO-1 の遺伝子・蛋白発現

control 群 (control 群; apoptosis: 4.63%, necrosis: 4.28%) と比べ、ステロイドと低酸素による骨細胞死(DH 群; apoptosis: 14.94%, necrosis: 7.56%)は有意に増加した。hemin 投与によって細胞死が DH 群と比べて有意に減少した(DH-h 群; apoptosis: 11.93%, necrosis: 3.02%)。HO-1 阻害剤によって、細胞死抑制効果が減弱し DH 群と有意差が無くなった(DH-h-PP 群; apoptosis: 15.08%, necrosis: 5.90%)。(図2)

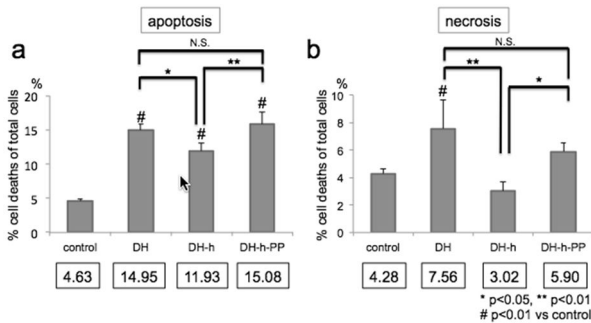


図2 ステロイド投与と低酸素による MLO-Y4 の apoptosis と necrosis に対する HO-1 の効果の検討

12 時間後に DH 群で、control 群および DH-h 群と比較して caspase-3 活性が有意に増加した。24 時間後に DH-h 群で、control 群および DH 群と比較して caspase-3 活性が有意に減少した。

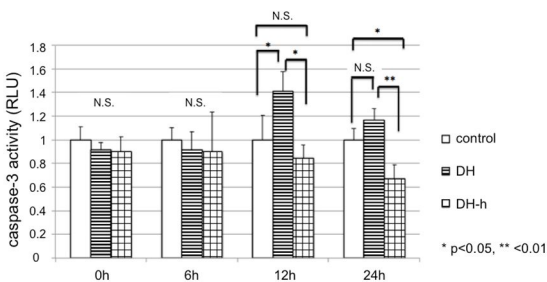


図3 ステロイド投与・低酸素環境で caspase-3 の活性に対する hemin の抑制効果の検討

4. 考察

本研究では、hemin によって MLO-Y4 で HO-1 が誘導されることを確認した。ステロイドと低酸素による細胞死が hemin 投与によって有意に減少し、HO-1 阻害剤によって、その効果が減弱した。このことから、

hemin による細胞死抑制効果は HO-1 を介していることが示唆された。

hemin による HO-1 誘導によって caspase-3 の活性が抑制されることで、ステロイドと低酸素環境における骨細胞死を減少させた考察した。

ステロイドは、ROS (Reactive Oxygen Species) 産生を促進し、caspase を活性化して細胞死を誘導することが報告されている⁵⁾。低酸素環境では、細胞内の ATP 産生の低下、ROS 産生の増加、DNA・RNA の損傷、caspase の活性化によって細胞死が生じることが知られている⁶⁾。HO-1 は、鉄イオン²⁾、ビリルビン³⁾と CO⁴⁾の産生を促進することで、抗酸化・抗炎症作用を発揮し細胞保護効果をもたらす。Hemin 投与によって虚血性心疾患などの組織障害が軽減することが知られており⁷⁾、本研究結果からも hemin が骨の阻血病変であるステロイド関連大腿骨頭壊死症の予防に繋がる可能性があると考えた。

5. 結論

本研究では、ステロイド投与と低酸素により誘導される骨細胞死に対し、hemin によって誘導される HO-1 の細胞死抑制効果を評価した。Hemin の細胞死抑制効果は HO-1 の誘導を介することが示唆された。HO-1 の細胞死抑制の機序の一つとして、caspase-3 の活性の抑制が関与していると考えた。HO-1 の誘導が阻血性疾患であるステロイド関連大腿骨頭壊死症の予防に応用できる可能性があると考えた。

6. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 山本浩基、齊藤正純、上島圭一郎、石田雅史、後藤 毅、林 成樹、池上 徹、久保俊一:ステロイド投与および低酸素環境において誘導される骨細胞の apoptosis および necrosis に対する Heme oxygenase-1 の抑制効果、第44回日本股関節学会学術集会、東京、2017.10.20
- 2) 山本浩基、齊藤正純、上島圭一郎、石田雅史、後藤 毅、林 成樹、池上 徹、久保俊一:ステロイド投与および低酸素環境において誘導される骨細胞の apoptosis および necrosis に対する heme oxygenase-1 の抑制効果、第32回日本整

形外科学会基礎学術集会.沖繩、2017.10.26

- 3) 山本浩基、齊藤正純、上島圭一郎、石田雅史、後藤 毅、林 成樹、池上 徹、久保俊一:Heme Oxygenase-1 のステロイドと低酸素による骨細胞死の抑制効果の評価、第33回日本整形外科学会基礎学術集会.奈良、2018.10.11
- 4) 山本浩基、齊藤正純、上島圭一郎、石田雅史、後藤 毅、林 成樹、池上 徹、久保俊一:Heme Oxygenase-1 のステロイドと低酸素による骨細胞死の抑制効果の評価、第45回日本股関節学会学術集会.愛知、2018.10.26

promotes dexamethasone-induced apoptosis in osteoblastic MC3T3-E1 cells by inhibiting the Nrf2/HO-1 pathway. Arch Toxicol. 2017 Sep 22.

- 6) Sendoel A, Hengartner MO. Apoptotic cell death under hypoxia. Physiology (Bethesda). 2014 May;29(3):168-176
- 7) Hangaishi M, Ishizaka N, Aizawa T, Kurihara Y, Taguchi J, Nagai R, Kimura S, Ohno M. Induction of heme oxygenase-1 can act protectively against cardiac ischemia/reperfusion in vivo. Biochem Biophys Res Commun. 2000 Dec 20;279(2):582-588

7. 知的所有権の取得状況

1. 特許の取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

8. 参考文献

- 1) Ueda S, Ichiseki T, Yoshitomi Y, Yonekura H, Ueda Y, Kaneuji A, Matsumoto T. Osteocytic cell necrosis is caused by a combination of glucocorticoid-induced Dickkopf-1 and hypoxia. Med Mol Morphol 2015;48:69-75.
- 2) Balla G, Jacob HS, Balla J, Rosenberg M, Nath K, Apple F, Eaton JW, Vercellotti GM. Ferritin: a cytoprotective antioxidant stratagem of endothelium. J Biol Chem 1992;267:18148-18153
- 3) Idelman G, Smith DL, Zucker SD. Bilirubin inhibits the up-regulation of inducible nitric oxide synthase by scavenging reactive oxygen species generated by the toll-like receptor 4-dependent activation of NADPH oxidase. Redox Biol.2015 Aug;5:398-408
- 4) Ryter SW, Choi AM. Targeting heme oxygenase-1 and carbon monoxide for therapeutic modulation of inflammation. Transl Res. 2016 Jan;167(1):7-34
- 5) Han D, Gao J, Gu X, Hengstler JG, Zhang L, Shahid M, Ali T, Han B.P21Waf1/Cip1 depletion