

令和元年6月17日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K20011

研究課題名(和文) H0-1を用いた細胞ストレス耐性の増強による特発性大腿骨頭壊死症予防法の開発

研究課題名(英文) Prevention of osteonecrosis of the femoral head by H0-1 inducing cell stress tolerance

研究代表者

齊藤 正純 (Saito, Masazumi)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：30614101

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：Heminにより誘導されるH0-1 (heme oxygenase-1)は、細胞保護効果を有する。ステロイド投与・低酸素環境では、骨細胞死が誘導されることが知られている。本研究では、マウス骨細胞にheminを添加しH0-1の発現を確認した。さらに、メチルプレドニゾロン(1 μ M)添加および低酸素(1%)環境下で、hemin投与によって細胞死が有意に減少することを確認した。H0-1阻害剤を投与すると細胞死は有意に増加した。ステロイド投与・低酸素環境下でのheminによる細胞死抑制効果は、H0-1の誘導を介することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ステロイドと低酸素によって、骨細胞のアポトーシスおよびネクローシスが誘導されることが知られており、ステロイド関連の骨粗鬆症や特発性大腿骨頭壊死症に関与している可能性がある。本研究ではすでに臨床で使用されている薬剤であるheminによって誘導されるH0-1 (heme oxygenase-1)により、ステロイドと低酸素による骨細胞死を抑制できることが明らかになった。骨組織におけるH0-1の誘導はステロイド関連の骨壊死症や骨粗鬆症の治療に応用できる可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Glucocorticoids and hypoxia is considered to promote glucocorticoid-associated osteonecrosis and osteoporosis. Heme oxygenase-1 (H0-1) induced by hemin is reported to have cytoprotective effects. The aim of this study was to evaluate the effect of H0-1 on osteocyte death by glucocorticoids and hypoxia. We confirmed that hemin induced H0-1 expression in MLO-Y4 mouse osteocytes. MLO-Y4 was cultured with dexamethasone (Dex) under hypoxia (DH group). Furthermore, these cells were cultured with hemin (DH-h group) or hemin and zinc protoporphyrin IX (an H0-1 inhibitor) (DH-h-PP group). The rates of osteocyte death were analyzed by flow cytometry and compared with cells under normal condition. Both apoptosis and necrosis increased in the DH group. Hemin administration significantly reduced cell death caused by glucocorticoids and hypoxia in the DH-h group, and its effect was attenuated in DH-h-PP group. This implied that the cell death inhibition effect due to hemin is mediated by H0-1.

研究分野：整形外科

キーワード：heme oxygenase-1 hemin osteonecrosis hypoxia osteoporosis femoral

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ステロイドと低酸素によって、骨細胞のアポトーシスおよびネクローシスが誘導されることが知られており、ステロイド関連の特発性大腿骨頭壊死症や骨粗鬆症の発生に関与している可能性がある。一方、ステロイド関連大腿骨頭壊死症や骨粗鬆症にはいまだ有効な予防法が確立されておらず、低侵襲で有効な予防法の開発は急務である。

hemin によって誘導される HO-1 (heme oxygenase-1) は、抗酸化および抗炎症作用を持ち、細胞保護効果を有する。そのため、HO-1 がステロイドと低酸素による骨細胞のアポトーシスとネクローシスを抑制する可能性があると考えた。HO-1 がステロイド関連大腿骨頭壊死症や骨粗鬆症の予防に応用できる可能性を検討するために本研究を立案した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ステロイド投与・低酸素環境において、HO-1 の骨細胞に対する細胞保護効果を評価することである。

3. 研究の方法

定常酸素(20%)でマウス骨細胞を培養した対照群と、hemin 10 μ M を投与し同環境で培養した hemin 群、HO-1 阻害剤を加えた hemin-PP 群に分けた。HO-1 遺伝子と蛋白発現を real time PCR と Western blot 法を用いて 3 群間で比較した。次に、control 群: 定常酸素, DH 群: デキサメサゾン(Dex)1 μ M と 1% 酸素で 24 時間培養, DH-h 群: hemin 10 μ M 添加後, Dex と 1% 酸素で培養, DH-h-PP 群: hemin および HO-1 阻害剤添加後に Dex と 1% 酸素で培養, の 4 群に分けた。各条件で培養後、細胞死の割合をフローサイトメトリーで測定し 4 群間で比較した。

4. 研究成果

hemin 投与群では、非投与群より HO-1 の遺伝子発現が有意に増加し、HO-1 の蛋白発現量が増加した。hemin-PP 群では、HO-1 遺伝子の発現が抑制された。

次に、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%)。本研究では HO-1 誘導剤である hemin 投与により、ステロイドと低酸素による骨細胞死の割合が減少した。HO-1 の細胞保護効果によって骨細胞死を抑制したと考えられる。Hemin によって誘導される HO-1 は骨細胞の細胞死を減少させることで、骨壊死予防に有効な可能性がある。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Yamamoto H, Saito M, Goto T, Ueshima K, Ishida M, Hayashi S, Ikoma K, Mazda O, Kubo T, Heme oxygenase-1 prevents glucocorticoid and hypoxia-induced apoptosis and necrosis of osteocyte-like cells. Med Mol Morphol 2019. doi: 10.1007/s00795-018-00215-0.

〔学会発表〕(計 6 件)

1. Yamamoto H, Saito M, Ueshima K, Goto T, Hayashi S, Ikoma K, Mazda O, Kubo T. Heme Oxygenase-1 Prevents Glucocorticoid and Hypoxia-induced Apoptosis and Necrosis of Osteocyte-like Cell, 65th Annual Meeting of Orthopedic Research Society, 2019
2. 山本浩基, 齋藤正純, 上島圭一郎, 後藤 毅, 石田雅史, 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, 2018
3. 山本浩基, 齋藤正純, 上島圭一郎, 石田雅史, 後藤 毅, 生駒和也, 松田修, 久保俊一 . ステロイド投与および低酸素環境により誘導される骨細胞死に対する heme oxygenase-1 の抑制効果 . 第 33 回日本整形外科学会基礎学術集会, 2018
4. Yamamoto H, Saito M, Ueshima K, Ishida M, Goto T, Ikoma K, Mazda O, Kubo T. Hemin Prevents Apoptosis and Necrosis of Osteocyte-like Cells induced by Glucocorticoid and Hypoxia. 64th Annual Meeting of Orthopedic Research Society, 2018
5. 山本浩基, 齋藤正純, 上島圭一郎, 石田雅史, 後藤 毅, 林 成樹, 池上 徹, 藤岡幹浩, 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アポトーシスおよびネクローシスに対する Heme-oxygenase-1 の抑制効果 . 第 44 回日本股関節学会学術集会, 2017
6. 山本浩基, 上島圭一郎, 石田雅史, 後藤 毅, 齋藤正純, 松田 修, 久保俊一 . ステロイドおよび低酸素環境において誘導される骨細胞のアポトーシスおよびネクローシスに対する 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, 2017

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年 :
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年 :
国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。