

[別紙 1]

論文の内容の要旨

論文題目 : Involvement of Fas - Fas ligand system in apoptosis of osteoblasts and osteocytes in estrogen deficiency - induced bone loss

和 訳 : エストロゲン欠乏性骨量減少に伴う骨芽細胞および骨細胞のアポトーシスにおける Fas-Fas リガンドシステムの関与

指導教官 : 武谷 雄二教授

東京大学大学院医学系研究科

平成九年四月入学

医学博士課程

生殖・発達・加齢専攻

氏名 王 咏梅

【緒言】

高齢化社会を迎えた現代、骨粗鬆症は世界的に大きな社会問題となりつつある。骨粗鬆症の病態生理を基礎的に解明することは、この疾患の予防法・治療法の確立に大きく寄与すると考えられる。閉経あるいは卵巣摘除によりエストロゲンが減少すると、骨のリモデリング (bone remodeling) が活発化し、骨吸収および骨形成はいずれも亢進する。この場合、骨吸収の程度が骨形成と比較して相対的に大きく、骨リモデリングの imbalance が生じ急激な骨量減少が起きる。この高代謝回転型骨量減少は、エストロゲン投与により骨の代謝回転が正常に戻ることににより抑制できると考えられている。しかしながら、現在、分子レベルでのメカニズムの解明は十分ではなく、これを明らかにすることは骨粗鬆症の治療法の確立に際し重要な課題であり、閉経後女性に対するホルモン補充療法の新しい展開に示唆を与えるものである。

アポトーシス (apoptosis) は 1972 年に Kerr らにより定義された細胞死の一形態で、核の凝縮、DNA の断片化を伴い、多くの生命現象に関わっているが、現在、このアポトーシスと骨量減少との関係が注目されている。最近、グルココルチコイド剤により骨芽細胞に、また、エストロゲンにより破骨細胞にアポトーシスが誘導されることが報告された。これらの結果より、アポトーシスは骨リモデリングに重要な役割を果たすことが推測されている。Fas/APO-1/CD95 は 45-kDa の膜貫通型タンパクで、TNF レセプターファミリーに属し、interleukin-1 $\beta$  converting enzyme (ICE)/Ced-3-related protease を活性化させ、免疫組織 (リンパ細胞) においてアポトーシス誘導に関与する。そのリガンドである Fas リガンドは 31-kDa の膜貫通型タンパクで、活性化 T リンパ細胞の Fas と結

合してそのアポトーシスを誘導することが知られている。最近では、Fas-Fas リガンドシステムは多様な非免疫系組織（甲状腺、肝臓、腸管、精巣など）のアポトーシス誘導に関与すると考えられている。しかしながら、これまでのところ、骨組織における Fas および Fas リガンドの発現と局在、さらにはエストロゲン欠乏状態による Fas-Fas リガンドシステムの変動に関する報告はない。本研究では、エストロゲン欠乏により引き起こされる骨量減少に伴い、骨組織にアポトーシスが誘導されるか否かを調べるとともに、このアポトーシス誘導における Fas-Fas リガンドシステムの関与について検討した。

#### 【方法】

1. 実験プロトコール：3ヶ月齢の雌 Sprague-Dawley ラット（体重 250 g）を SHAM 手術群、卵巣摘除術群（OVX）、卵巣摘除術 4 週目にエストラジオール徐放剤（E2, 0.5 mg/錠, 60 日間徐放型）を皮下投与する群の三群（n=8）に分けた。手術 8 週間後に、体重を測定後、ラットを屠殺し子宮重量を測定した。採取した血液は遠心し、血清 E2 および骨代謝マーカーの osteocalcin レベルを RIA 法で測定した。もう一種類の骨代謝マーカーの alkaline phosphatase（ALP）のレベルは standard colorimetric method で測定した。大腿骨、腰椎の骨密度（BMD）は DXA 法で測定した。
2. 骨組織の処理：脛骨は 4%PFA/PBS で 12 時間固定し、10%EDTA で脱灰した後パラフィン包埋し、5  $\mu$ m の連続切片を作製した。骨組織はさらに 2%OsO<sub>4</sub>/PBS で固定して、Epon 812 で包埋した。75 nm の超薄切片を作製して、透過型電子顕微鏡（transmission electron microscope, TEM）で観察した。
3. TUNEL 法：組織切片上で DNA 断片化を示す terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labelling（TUNEL）染色を施行した。
4. 免疫組織化学法：Fas-Fas リガンドの局在を免疫染色法により蛋白レベルで解析した。免疫染色は、抗 Fas ポリクロナール抗体（P4）、抗 Fas リガンドポリクロナール抗体（P5）を用いて酵素抗体法にて施行した。さらに、細胞増殖、DNA 修復の指標となる proliferation cell nuclear antigen（PCNA）の局在も免疫組織化学法により調べた。
5. in situ hybridization 法：in situ hybridization 法により Fas、Fas リガンドの局在を mRNA レベルで解析した。紫外線照射による T-T dimer 化によって標識した Fas と Fas リガンド oligo-DNA probe を用いた非放射性 in situ hybridization 法にて施行した。

#### 【結果】

1. 卵巣摘除術により血清 E2 レベル、子宮重量、大腿骨と腰椎の BMD は減少し、体重と骨代謝マーカーは増加した。これらの変化は E2 の併用によりいずれも SHAM 群と同じレベルまで回復した。
2. アポトーシスの確認：TUNEL 陽性細胞は、骨芽細胞と骨細胞に認められた。また、透過型電子顕微鏡の観察により、OVX 群の骨芽細胞核にクロ

マチンの凝縮を認めた。骨芽細胞と骨細胞の TUNEL 陽性率は、SHAM 群ではそれぞれ 14.6%、15.2%であり、OVX 群ではそれぞれ 53.8%、59.5%と SHAM 群に比べて有意に増加した。この変化は、E2 併用によりそれぞれ 26.5%、33.8%まで有意に抑制された。一方、破骨細胞のアポトーシスは認められなかった。

3. Fas-Fas リガンドの局在：免疫組織化学法により Fas および Fas リガンドは骨芽細胞と骨細胞に局在することが確認された。骨芽細胞と骨細胞の Fas 陽性率は、SHAM 群ではそれぞれ 12.1%、14.4%であり、OVX 群ではそれぞれ 51.0%、53.8%と SHAM 群に比べて有意に増加した。この変化は、E2 併用によりそれぞれ 26.2%、29.2%まで有意に抑制された。骨芽細胞と骨細胞の Fas リガンド陽性率は、SHAM 群ではそれぞれ 11.8%、15.1%であり、OVX 群ではそれぞれ 52.4%、53.3%と SHAM 群に比べて有意に増加した。この変化は、E2 併用によりそれぞれ 25.5%、28.9%まで有意に抑制された。破骨細胞を同定する TRAP 染色と Fas-Fas リガンドの免疫染色とによる二重染色法では、破骨細胞に Fas-Fas リガンドの局在は認めなかった。OVX 群において、Fas-Fas リガンドの mRNA は骨芽細胞と骨細胞に局在することが *in situ hybridization* 法により確認された。
4. 免疫組織化学法により、PCNA は SHAM 群と OVX 群では認められず、E2 併用群の骨芽細胞にのみ認められた。

#### 【考察】

SHAM 群における骨芽細胞、骨細胞の TUNEL 陽性率は、それぞれ 14.6%、15.2%であった。この結果より、アポトーシスは、少なくとも一部の骨芽細胞と骨細胞では常に生理的に起きており、通常の骨代謝において骨組織の恒常性の維持に重要な役割りを果たすことが示唆された。また、卵巣摘除により骨芽細胞、骨細胞の TUNEL 陽性率は SHAM 群に比べて有意に上昇したが、エストロゲン欠乏状態では骨芽細胞と骨細胞のアポトーシスが促進されると考えられた。一方、エストロゲン補充により骨芽細胞と骨細胞の TUNEL 陽性率は SHAM 群と同レベルまで回復し、エストロゲンは骨芽細胞と骨細胞のアポトーシスを抑制することが証明された。免疫組織化学法により、Fas と Fas リガンドは SHAM 群の骨芽細胞と骨細胞に局在することが認められた。エストロゲン欠乏およびエストロゲン補充による Fas-Fas リガンドの陽性率の変動は、TUNEL 陽性率のそれと類似していた。さらに、*in situ hybridization* 法により、Fas-Fas リガンドシステムが遺伝子レベルでも骨芽細胞と骨細胞に局在することが証明された。E2 投与群の骨芽細胞にのみ PCNA 陽性が認められたが、これは、エストロゲンが骨芽細胞においてアポトーシスを抑制すると同時に DNA を修復するためと考えられた。

最近、エストロゲンは破骨細胞のアポトーシスを誘導すると報告されたが、本研究では、E2 投与群において TUNEL 陽性あるいは Fas-Fas リガンド陽性の破骨細胞は検出されなかった。これを説明するものとして、最近同定された破骨細胞形成抑制因子 OPG /OCIF と破骨細胞分化因子 OPG-L/ODF の関与が考えら

れる。エストロゲン投与により骨芽細胞の OPG 産生は促進され、一方、OPG-L の産生が抑制されることにより前破骨細胞から成熟破骨細胞への分化が抑制され、その結果、骨表面の成熟破骨細胞数が実質的に減少したからではないかと推測される。

【まとめ】

エストロゲン欠乏性骨量減少に伴い、骨芽細胞、骨細胞においてアポトーシスが誘導され、これに Fas-Fas リガンドシステムが関与することが示唆された。さらに、エストロゲンはこのアポトーシスを抑制すると同時に、骨芽細胞の DNA を修復することが示された。