

氏 名	熊 谷 康 佑
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	博 士 第 6 5 3 号
学 位 授 与 の 要 件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
学 位 授 与 年 月 日	平 成 2 4 年 3 月 9 日
学 位 論 文 題 目	17 $\beta$ -Estradiol inhibits the doxorubicin-induced apoptosis via block of volume-sensitive Cl <sup>-</sup> current in rabbit articular chondrocytes.  (17 $\beta$ -エストラジオールは家兎関節軟骨細胞において容積感受性Cl <sup>-</sup> 電流をブロックすることによりドキソルビシン誘発性アポトーシスを抑制する)
審 査 委 員	主 査 教 授 小 笠 原 一 誠 副 査 教 授 竹 内 義 博 副 査 教 授 堀 江 稔

## 論文内容要旨

*整理番号	658	(ふりがな) 氏名	くまがい こうすけ 熊谷 康佑
学位論文題目	<p>17<math>\beta</math>-Estradiol inhibits the doxorubicin-induced apoptosis via block of volume-sensitive Cl<sup>-</sup> current in rabbit articular chondrocytes.</p> <p>(17<math>\beta</math>-エストラジオールは家兎関節軟骨細胞において容積感受性 Cl<sup>-</sup>電流をブロックすることによりドキシソルビシン誘発性アポトーシスを抑制する)</p>		
<p><b>【目的】</b></p> <p>変形性関節症 (osteoarthritis, OA) は関節軟骨の変性・破壊により関節の変形と疼痛を引き起こす疾患群の総称であり、先進国において有病率の高い不可逆性の疾患である。加齢性変化を基盤とした過度の力学的負荷が主たる原因と考えられているが、いまだ発症メカニズムは明らかでない。そのため、軟骨組織自体の機能を解明することが、疾患の予防や治療に重要であると考えられる。さらには、OA が閉経後の女性に多く発症することから、女性ホルモンの分泌低下との因果関係が示唆されている。一方、OA 初期にみられる軟骨細胞の浮腫や細胞死 (アポトーシス) のような細胞容積調節の破綻は、細胞膜を介したイオン輸送機構の異常に起因する可能性がある。細胞容積の上昇を感知して活性化される容積感受性 Cl<sup>-</sup>電流 (<math>I_{Cl,vol}</math>) は、軟骨細胞の細胞容積の恒常性に最も重要なイオン輸送経路のひとつである。近年、<math>I_{Cl,vol}</math> の異常な活性化 (正常な細胞容積での活性化) がアポトーシス性細胞容積減少 (apoptotic volume decrease, AVD) の引き金となることがいくつかの細胞で示唆されてきているが、軟骨細胞のアポトーシスにおける <math>I_{Cl,vol}</math> の役割は未だ知られていない。そこで、本研究においては、家兎関節より単離した軟骨細胞において、アポトーシス誘発剤ドキシソルビシン (DOX: 別名アドリアマイシン (商品名アドリアシン)) による <math>I_{Cl,vol}</math> の活性化メカニズムならびにエストロゲンによる調節を調べることを目的とした。</p> <p><b>【方法】</b></p> <p>本研究では体重 2.5~3.0kg の日本白色家兎の肩・股・膝関節軟骨から酵素処理により軟骨細胞を単離して以下の項目について検討を行った。単離後 8 時間以内の細胞を実験に使用することで単層培養に伴う脱分化の影響を最小限にした。<math>I_{Cl,vol}</math> の測定には、ホールセルパッチクランプ法を用いた。倒立顕微鏡に設置した記録槽に細胞を静置し、37℃の細胞外液を持続的に灌流しながら細胞に対してガラスピペット電極を密着させ、膜電位固定下で電流を記録した。<math>I_{Cl,vol}</math> の同定は、その電気生理学的ならびに薬理的性質に基づき行った。また、細胞容積変化の計測は、CCD デジタル・カメラにより行い、細胞横断面積を解析した。軟骨細胞のアポトーシスの検出は、発光法によるカスパーゼ 3/7 活性の測定により行った。</p>			

- (備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2千字程度でタイプ等で印字すること。
2. ※印の欄には記入しないこと。

## 【結果】

単離軟骨細胞を DOX に暴露すると、数分内に外向き整流性を示す電流が活性化された。この電流は、Cl<sup>-</sup>に選択性を示し、高浸透圧刺激にともなう細胞縮小により抑制された。また、 $I_{Cl,vol}$  の選択的阻害剤であるアラキドン酸やエタクリン酸誘導体 4-[(1-オキソ-2-ブチル-2-シクロペンチル-6,7-ジクロロインダン-5-イル)オキシ]酪酸(DCPIB)に感受性を示すことから、DOX により活性化される電流は  $I_{Cl,vol}$  であると考えられた。さらに、活性酸素種 (ROS) のスカベンジャーである *N*-アセチルシステインや NADPH オキシダーゼ阻害剤であるジフェニレンヨードニウムで前処置した細胞においては Cl<sup>-</sup>電流の誘発が観察されないことから、DOX は ROS を介して  $I_{Cl,vol}$  を活性化すると考えられた。また DOX は細胞容積の減少やカスパーゼ 3/7 活性の上昇を誘発したが、パッチクランプ実験の結果と同様に DCPIB により抑制された。これらのことから DOX は軟骨細胞において  $I_{Cl,vol}$  の活性化を引き金に細胞アポトーシスを引き起こすことが明らかとなった。一方、17 $\beta$ -エストラジオール (1 nM) は、DOX による  $I_{Cl,vol}$  の活性化を 10 分以内に抑制し、AVD ならびにそれに引き続くカスパーゼ 3/7 活性の上昇も減弱させた。これらの 17 $\beta$ -エストラジオールの効果は、エストロゲンの細胞膜・もしくはその近傍の受容体の阻害剤である ICI182,780 存在下で完全に消失するとともに、PI3-キナーゼの阻害剤により有意に抑制された。これらの実験結果から、1) DOX によるアポトーシス誘導過程において ROS を介した  $I_{Cl,vol}$  の活性化が関与すること、また 2) エストロゲンは受容体、PI3-キナーゼを介して  $I_{Cl,vol}$  の活性化を抑制し、その急性作用 (非ゲノム作用) によって抗アポトーシス作用を発揮することが示唆された。

## 【考察】

アポトーシス性細胞容積減少 (AVD) は、アポトーシス誘発過程にみられる普遍的な細胞現象であるにもかかわらず、その膜輸送メカニズムについては未だ明らかではない。本研究は、軟骨細胞においてアポトーシス誘導剤 DOX による  $I_{Cl,vol}$  の活性化が細胞内 Cl<sup>-</sup>や有機アニオンの流出を促し、AVD ならびにそれに引き続くカスパーゼ活性の上昇に重要な役割を担うことを示唆した。DOX は H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> などの ROS の産生を促すことが知られており、DOX による  $I_{Cl,vol}$  の活性化には ROS を介した  $I_{Cl,vol}$  チャネルの活性化容積閾値 (volume set point) の減少が関与していると考えられた。

エストロゲンは核内作用により種々の細胞の遺伝子発現を制御する一方、細胞膜近辺のエストロゲン受容体に結合して急性作用 (非ゲノム作用) を発揮することが近年報告されている。本研究では、17 $\beta$ -エストラジオールは DOX による  $I_{Cl,vol}$  の活性化を非ゲノム作用により抑制し、AVD やカスパーゼ活性の上昇などの軟骨細胞のアポトーシス反応の進行を抑制することを明らかにした。また、この 17 $\beta$ -エストラジオールの抗アポトーシス効果は、エストロゲン受容体を介した PI3-キナーゼの活性化にともなう ROS 産生の抑制が関与すると考えられた。

アポトーシスにともなう軟骨細胞数の減少は関節軟骨における基質産生の低下をもたらし、OA 発症ならびに病態の進行の一因であると考えられている。本研究は、軟骨細胞における AVD の分子機構の一端を解明するとともに、エストロゲンによる抗アポトーシス作用が閉経以前の女性において OA の進行を妨げる防御機構に関連する可能性を示唆した。

## 【結論】

家兔関節軟骨細胞において、エストロゲンは細胞膜レセプターを介した非ゲノム作用により  $I_{Cl,vol}$  の活性化を防ぎ、AVD を引き金とするアポトーシスを抑制することを明らかにした。

## 学位論文審査の結果の要旨

整理番号	658	氏名	熊谷 康佑
論文審査委員			
<p>(学位論文審査の結果の要旨) (明朝体 11ポイント、600字以内で作成のこと。)</p> <p>変形性関節症は軟骨細胞のアポトーシスに起因している。細胞の浮腫やアポトーシスのような細胞容積調節の破綻は、イオン輸送機構異常に起因する可能性がある。容積感受性 Cl<sup>-</sup>電流 (<math>I_{Cl,vol}</math>) は、軟骨細胞の細胞容積の恒常性維持に最も重要なイオン輸送経路のひとつである。近年、<math>I_{Cl,vol}</math> の異常な活性化がアポトーシス性細胞容積減少 (AVD) の引き金となることがいくつかの細胞で示唆されてきているが、軟骨細胞のアポトーシスにおける <math>I_{Cl,vol}</math> の役割は未だ知られていない。そこで、本研究では、家兔関節軟骨細胞において、アポトーシス誘発剤ドキシソルピシンによる <math>I_{Cl,vol}</math> の活性化機構ならびにエストロゲンによる調節について検討を行い、以下の点を明らかにした。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) ドキシソルピシンは活性酸素種 (ROS) の産生を介して軟骨細胞の <math>I_{Cl,vol}</math> を活性化し、それにより AVD やカスパーゼ 3/7 活性の上昇等のアポトーシス反応を誘導する。</li> <li>2) エストロゲンは細胞膜受容体を介して ROS の産生を阻害することでドキシソルピシンによる <math>I_{Cl,vol}</math> の活性化を阻止し、抗アポトーシス作用を示す。</li> </ol> <p>本論文はエストロゲンによる <math>I_{Cl,vol}</math> の調節機構が変形性関節症の新たな治療標的となる可能性について新しい知見を与えたものであり、最終試験として論文内容に関連した試問を受け合格したので、博士 (医学) の学位論文に値するものと認められた。</p> <p style="text-align: right;">(総字数 597 字)</p> <p style="text-align: right;">(平成 24 年 1 月 23 日 )</p>			