

Ki67、p53、caspase-3の有意な発現を認めた。

【結論】 Phx-1はY-79に対して抗腫瘍効果を示し、その作用機序としてapoptosisの関与が考えられた。Phx-1は網膜芽細胞腫に対して有効な薬剤と考えられた。

P-3.

増殖因子除去によるアポトーシス誘導における c-Jun N-terminal kinases 活性化の役割

(大学院四年・免疫学)

○寧 月宝

免疫系細胞の増殖は細胞分裂および細胞生存/細胞死のバランスによって調節されている。細胞生存/細胞死を解析するモデルとしてIL-3依存的に増殖するB前駆細胞Baf-3が用いられている。Baf-3細胞は10%牛胎児血清添加RPMI-1640培地にIL-3を含有しているWEHI-3細胞の培養上清(10%)を加えたものを用いて維持した。IL-3を除去すると、24時間以内にBaf-3細胞はミトコンドリア膜電位の低下、annexinV染色陽性、およびトリパン青色素試験陽性を示し、アポトーシスが誘導されていることがわかった。これらの変化に先き立って、c-Jun N-terminal Kinases (JNKs) 活性化が観察された。一方、extracellular signal-regulated kinases (ERKs) の活性化レベルは増殖因子除去前よりも低下していた。JNKおよびERK活性化はリン酸化JNKおよびリン酸化ERKに特異的に反応する抗体を用いたウェスタンブロット法によって評価した。アポトーシス誘導におけるJNK活性化の役割を明らかにするためにJNK抑制剤SP600125を用いて検討したところ、抑制剤処理によって増殖因子除去誘導性アポトーシスが部分的に阻害された。さらに、優性阻害型JNK (dnJNK) を高発現させたBaf-3細胞株は増殖因子除去によって誘導されるアポトーシスに対する抵抗性を示した。これらの結果は増殖因子除去によって誘導されるアポトーシスにはJNK活性化が関わっていることを示唆している。我々のグループはB細胞抗原受容体を介するアポトーシスにはJNK活性化、Baxのミトコンドリアへの移行が関わっていることを報告してきた。以上より、増殖因子除去によりアポトーシス誘導系は抗原受容体を介するアポトーシス誘導系とシグナル伝達因子を共有していることが明らかとなった。

P-4.

ラマン分光分析による臨床使用された人工股関節用 UHMWPE の評価

(大学院単位取得・整形外科学)

○熊倉 剛

(整形外科学)

立岩 俊之、山本 謙吾

(京都工芸繊維大学物質工学)

山田 清高、Leonardo Puppulin、

Giuseppe Pezzotti

【目的】 超高分子量ポリエチレン (以下 UHMWPE) は人工関節摺動面の主流となっており、これまでに様々な研究が行われてきた。UHMWPE は生体内で使用すると摩耗、酸化劣化などを引き起こす事がすでに知られておりこれらの現象を分析、評価することは longevity を追究する点で非常に重要であると思われる。今回我々は、UHMWPE の最表層部のみならず表層下における酸化劣化の評価を、非破壊下にて顕微ラマン分光分析法を用いて得たので報告する。

【方法】 対象は revision を施行した際に得られた計 5 cup であり、すべて γ 線照射量は 33 kGy である。これらの UHMWPE コンポーネントについて顕微ラマン分析を行った。励起源に 488 nmAr⁺ を用い、レーザー出力 70 mW、中心波長 1,300 cm⁻¹、レーザースポット径 1 μ m、積算回数 20 秒 3 回にて測定し結晶分率、非結晶分率、酸化度を求めた。

【結果】 UHMWPE の表面部に比べて内部 (50 μ m 付近) の結晶分率及び酸化度は、いずれのコンポーネントにおいても増加しており、特に長期使用例および wear zone において著明であった。逆に非結晶分率はすべてのコンポーネントで減少しており、特に長期使用例において著明であった。

【考察】 酸化度と結晶分率は正の相関、非結晶分率は負の相関を示すことより、酸化は非結晶層で起こり易く、結晶層では起こりにくいと考えられる。またこれまでの研究では、断面からでしか表層下の測定はできなかったが、今回の非破壊による最表層部から表層下における測定では表面部と比し内部の酸化は 10 μ m レベルからすでに起こってきていると考えられた。

【結論】 抜去された UHMWPE コンポーネントをラマン分光分析により酸化劣化、変性の程度を評価できた。将来的には、臨床的に抜去することなく劣化等の

評価を予測する事が可能になると期待される。

P-5.

筋分化抑制因子 Myostatin に対する E3 ユビキチンリガーゼ Arkadia の役割

(大学院単位取得・整形外科学)

○湯澤 久徳

(整形外科学)

山本 謙吾

(財団法人癌研究会癌研究所生化学)

鯉沼 代造、今村 健志

Myostatin は Transforming growth factor- β (TGF- β) スーパーファミリーに属するサイトカインで細胞の分化や増殖に対して抑制的な役割を持っている。Myostatin ノックアウトマウスや Myostatin に変異を持ったウシでは骨格筋の肥大、過形成を来たすことから、Myostatin は生理的に重要な筋分化抑制作用を有している。Myostatin シグナルの細胞内伝達機構については Smad pathway や p38 MAPK, Erk1/2 MAPK pathway を介した経路が報告されている。一方で抑制型 Smad である Smad7 が Myostatin により誘導されシグナルを調節するという報告がなされている。

我々は E3 ユビキチンリガーゼである Arkadia が Smad7 のユビキチン化、分解を介して TGF- β シグナルを増強することから、今回 Arkadia の Myostatin シグナルへの関与を想定しその機能を解析した。C2C12 筋芽細胞の Myostatin による筋分化抑制に対しアデノウイルスによる Arkadia 過剰発現の影響を筋特異的遺伝子発現および蛋白発現、免疫組織染色で比較すると、外因性 Arkadia によって筋分化抑制効果が増強された。また shRNA 発現レンチウイルスを用いた内因性 Arkadia のノックダウンによる効果は Myostatin の筋分化抑制効果を減弱させた。さらに Arkadia の Myostatin シグナルへの作用メカニズムを解析するため、Myostatin による Smad のリン酸化および Smad7 のユビキチン化を比較した。その結果、内因性 Arkadia のノックダウンによってリン酸化、ユビキチン化ともに減弱した。以上より Arkadia は Smad7 のユビキチン化を介して Myostatin の下流で Smad pathway を増強し、筋分化抑制もたらすことが示唆された。

P-6.

ラット骨髄由来間葉系幹細胞および骨芽細胞様株 (MC3T3-E1) を用いたヒアルロン酸産生についての検討

(大学院三年・整形外科学)

○小島 理

(整形外科学)

正岡 利紀、岩崎 剛、山本 謙吾

(八王子・整形外科)

朝日 盛也

【目的】 ラット骨髄由来間葉系幹細胞および骨芽細胞様株 (MC3T3-E1) に対し、低出力超音波 (LIPUS) の照射および FGF-2 を作用させ、ヒアルロン酸産生 (HA) に及ぼす影響を検討することを目的とした。

【方法】 ラット骨髄由来間葉系幹細胞を 1×10^4 cells/well にて播種した。非刺激群を (C) 群、FGF-2 添加群を (F) 群 (添加濃度を 2, 10, 50 ng/mL とし、それぞれ (F-2), (F-10), (F-50) 群) とした。LIPUS 照射群を (L) 群、FGF-2 添加+LIPUS 照射群を (FL) 群とし、FGF-2 の濃度別にそれぞれ (FL-2), (FL-10), (FL-50) 群とした。一方、骨芽細胞様株 (MC3T3-E1) を 2.5×10^5 cells/10 cm dish にて播種。非刺激群を (MC) 群、FGF-2 添加群を (MF) 群 (添加濃度を 2, 10, 50 ng/mL とし、それぞれ (MF-2), (MF-10), (MF-50) 群) とした。LIPUS 照射群を (ML) 群、FGF-2 添加+LIPUS 照射群を (MFL) 群とし、FGF-2 の濃度別にそれぞれ (MFL-2), (MFL-10), (MFL-50) 群とした。4 日目に HA の定量を行い、各群間の比較検討を行った。

【結果】 HA 量 (treatment/control) は F-2 群では 1.54 倍、F-10 群では 1.58 倍、F-50 群では 1.69 倍、L 群では 1.17 倍、FL-2 群では 1.55 倍、FL-10 群では 1.89 倍、FL-50 群では 2.09 倍と増加を示し、F-10、F-50 群および FL-10、FL-50 群で有意差を認めた。F 群—FL 群間には有意差を認めなかった。一方、MF、ML、MFL 群においては各群とも有意な HA 量の変化を認めなかった。

【考察】 骨形成に対して、より未分化な細胞段階においてヒアルロン酸が関与することが示唆された。