

■研究・実践の課題（テーマ）

肝疾患患者の骨病変合併に影響する因子の解明

■主任研究者 藤木理代

■共同研究者 小川紗友梨

■研究・実践の目的、方法、結果、考察や提案等の概要

【背景と目的】

加齢に伴い肝機能の低下や骨密度の減少が起きる。肝疾患患者における骨病変の合併 (Hepatic Osteodystrophy) にはこれら臓器間に相互作用があると考えられている。骨は運動刺激(圧刺激)により様々な液性因子を分泌する。そこで本研究では、骨芽細胞に圧刺激を加え、かつ肝癌細胞株と共培養することにより、骨分化マーカーである Alkaline Phosphatase (ALP)、Integrin Binding Sialoprotein (IBSP)、Osteocalcin (OC) 発現量にどのような影響があるか、また、肝癌細胞株における Fibrinogen alpha chain (FGA) 発現量にどのような影響があるかを RNA レベルで検討した。

【方法】

ヒト骨芽細胞 (HOB: Human Osteoblasts) を、E-MEM (イーグル最小必須培地、10% FBS: Fetal Bovine Serum, 1% Penicillin-Streptomycin) 培地で 1 週間 Pre 培養した後、 1×10^5 個/ml になるように調整し、3 群に分けた。遠心機にて、それぞれ 0G、50G、190G の負荷を 5 分間かけた。その後、12well プレートに直径 $0.4 \mu\text{m}$ の細孔を持つ膜で仕切られた Transwell を取り付け、上部 well にはそれぞれの HOB を、下部 well にはヒト肝癌細胞 (HepG2: Human cell line) を、それぞれ 1×10^5 個/well 播種し、E-MEM 培地で 4 日間共培養した。対照として上部 well に HOB、下部 well に HepG2 のみ単独培養したものを作成した。

各群の HOB から RNA を抽出し、RT-qPCR 法で 18s リボゾーム RNA 遺伝子を内因性コントロールに、Alkaline Phosphatase (ALP)、Integrin Binding Sialoprotein (IBSP)、Osteocalcin (OC) 遺伝子の発現量を定量した。HepG2 については Fibrinogen alpha chain (FGA) 遺伝子の発現量を定量した。実験は 1 回実施し ($n=1$)、各群 3well ずつ培養したサンプルを用いて、1 サンプルにつき Triplicate で定量した。

【結果】

HOB の単独培養を 1 とした場合、ALP 量は、共培養の 0G で 0.7、50G で 0.9、190G で 0.6、IBSP 量は、共培養の 0G で 0.6、50G で 0.5、190G で 0.5、OC 量は、共培養の 0G で 0.8、50G で 0.6、190G で 0.3 となり、いずれも共培養でかつ重力負荷をかけたもので低値を示した。

HepG2 の単独培養を 1 とした場合、FGA 量は、共培養の 0G で 2.0、50G で 2.3、190G で 1.9 となり、共培養でかつ重力負荷をかけたもので高値を示した。

【考察】

本研究で、骨芽細胞由来の HOB に重力負荷をかけ、かつ肝癌細胞由来の HepG2 と共培養することで、骨分化マーカーである ALP、IBSP、OC の発現量はいずれも減少した。骨の形成は、未熟な骨芽細胞が分裂増殖、分化、成熟して進行する。本研究では骨形成の初期の段階のみを観察しているため、今後、長い時間軸で観察していく必要がある。

本研究で、HOB に重力負荷をかけ、かつ HepG2 と共培養することで、FGA の発現量は増加した。FGA は血液凝固因子の Fibrinogen を構成するポリペプチド鎖をコードする遺伝子である。骨代謝と血液凝固系にはクロストークがあると報告されており、トロンビンが Protease activated receptor 1 (PAR-1) を活性化して骨芽細胞の増殖を促進し、骨芽細胞のアポトーシスを阻害することが報告されている。また、骨の修復のため、フィブリンナノファイバーを構成要素として含む多血小板製剤を利用した研究が盛んにおこなわれている。今後再現性を含め、さらに検討していく必要である。