

氏 名	まつ さき たか し 松 崎 尚 志
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 3245 号
学位授与の日付	平 成 20 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	医 学 研 究 科 外 科 系 専 攻
学 位 論 文 題 目	Gene expression profile of macrophage-like U937 cells in response to polyethylene particles (マクロファージ様細胞 U937 がポリエチレン摩耗粉を貪食した際の遺伝子発現変化)
論文調査委員	(主 査) 教 授 清 水 章 教 授 鈴 木 茂 彦 教 授 堤 定 美

論 文 内 容 の 要 旨

序論

人工関節の長期成績を左右する因子の一つに骨融解現象があり、摩耗粉を貪食したマクロファージ (MΦ) が放出するサイトカインが骨吸収を促進するとされている。摺動面のポリエチレン (PE) が摩耗粉の主成分であるが、*in vitro* で効率的に貪食させるは困難である。また、末梢血中 MΦ を使った実験はドナーを要するという問題がある。摩耗粉の評価のためには、入手容易な培養細胞を利用し、様々な摩耗粉に対応可能な培養系の確立が望まれる。ヒト組織球性リンパ腫由来の細胞 U937 を MΦ 様に分化させ、PE を貪食させる実験系を開発した。その結果生じるサイトカイン遺伝子発現の変化を cDNA マイクロアレイで解析し、骨融解関連遺伝子の同定を試みた。

方法

工業的に直径 6.5-8.5μm に調製された PE (Ceridust 3615®; C-PE) と、人工関節周辺組織から抽出した PE (R-PE) を使用した。R-PE は組織を溶解した後、ショ糖・イソプロパノール濃度勾配を利用して抽出した。R-PE の長径は平均 2.58μm であった。U937 は PMA 添加培地で培養して分化誘導した。換気口付きのポリプロピレンチューブに培地を 10ml 入れ、U937 3×10⁶ 個を加えた。PE は 0.1 または 0.5mg/mL 添加した。チューブを緩やかに振盪混和しながら 6 時間培養した。その後、新鮮な培地に交換して静置し、培地中に放出されるサイトカインを経時的に定量し、PE の有無や種類による違いを検討した。また、培養後の細胞から RNA を抽出し、cDNA マイクロアレイで PE 貪食による遺伝子発現の変化を検討した。DNA チップは TaKaRa IntelliGene Human Cytokine CHIP を使用した。

結果

C-PE と培養した U937 の断面を透過電子顕微鏡で観察したところ、細胞質内に多数の PE が確認できた。培地中の IL-1β、IL-6、TNF-α を経時的に定量したところ、IL-1β、IL-6 が C-PE 群で有意に高値を示した。TNF-α は有意差を示さなかった。この培養法で U937 が PE を貪食すること及びサイトカイン放出が刺激されることが確認できたため、R-PE も使用して検討を加えた。cDNA マイクロアレイでは、R-PE と培養した場合に IL-8、CCL4、CXCR4 など 8 種類の遺伝子発現亢進が確認された。C-PE 群では有意とされる遺伝子発現変化が確認できなかった。C-PE、R-PE の量を変えて IL-1β、IL-6、IL-8、VEGF の濃度を測定したところ、いずれも濃度依存性を示した。同一濃度で比較すると IL-1β、IL-6、IL-8 は R-PE 群で C-PE 群より有意に高値であったが、VEGF は C-PE と R-PE が同等であった。

考察

本方法を採用することで MΦ 様細胞に PE 摩耗粉を効率的に貪食させることが可能となった。サイトカイン放出に関して C-PE と R-PE を比較すると R-PE のほうが強い反応を起こすこと、また容量依存性を示すことから、摩耗粉の量やサイズにより組織反応が異なることが予測される。mRNA レベルでも R-PE のほうが大きな変化を起こすことが確認できた。骨融解への直接の関与は明らかでないが、悪性腫瘍の骨病変との関係が知られる CCL4、CXCR4 遺伝子の発現亢進が確認でき

た。本方法は振盪混和しながら培養するため、PE だけでなく骨セメントや金属など他の摩耗粉にも適用可能と考えられる。PE 以外の摩耗粉との比較等についてさらなる研究が必要であるが、本方法は人工関節摩耗粉の評価に有用であると考えられた。

論文審査の結果の要旨

人工関節の成績を左右する因子に骨融解現象があり、摩耗粉を貪食したマクロファージ (MΦ) が放出するサイトカインが骨吸収を促進する。摩耗粉の評価のために、MΦ 様細胞に摩耗粉を貪食させる実験系を開発した。その結果生じる遺伝子発現の変化を解析し、骨融解関連遺伝子の同定を試みた。径 6.5-8.5μm に調製された PE (C-PE) と、人工関節周辺組織から抽出した PE (径平均 2.58μm; R-PE) を使用した。まず PMA 添加培地で分化誘導した U937 と C-PE をポリプロピレンチューブに入れ、振盪混和しながら 6 時間培養した。その結果、U937 は PE を貪食し、培地中の IL-1β、IL-6 濃度が上昇した。次いで C-PE、R-PE の違いや容量依存性を評価したところ、IL-1β、IL-6、IL-8、VEGF 濃度がいずれも容量依存性を示し、同一量で比較すると VEGF 以外 R-PE 群で高値であった。cDNA マイクロアレイで PE 貪食による遺伝子発現の変化を検討したところ、R-PE と培養した場合のみ IL-8、CCL4、CXCR4 など 8 種類の遺伝子発現亢進が認められた。本方法で培養細胞に PE を効率的に貪食させることが可能となり、サイトカイン放出・mRNA レベルで R-PE のほうが大きな反応を引き起こすことが判明した。以上の研究は摩耗粉評価法の標準化及び骨融解の分子機構の解明に寄与するところが多い。したがって、本論文は博士 (医学) の学位論文として価値あるものとみとめる。

なお、本学位授与申請者は、平成 20 年 2 月 19 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。