

学位論文題名

Effect of Selective Estrogen Receptor Modulator/Raloxifene Analogue on Proliferation and Collagen Metabolism of Tendon Fibroblast

(選択的エストロゲン受容体調節薬が腱由来線維芽細胞の
器質産生能および増殖活性に及ぼす影響に関する研究)

学位論文内容の要旨

【背景と目的】閉経後骨粗鬆症に対する治療薬である選択的エストロゲン受容体調節薬(SERM)は、ホルモン補充療法にて問題となるエストロゲンがもつ発がん性を解決するために開発された薬剤であり、組織特異性という特徴を有する。乳腺等に対しては抗エストロゲン様作用を有するのに対し、骨や皮膚、心血管に対してはエストロゲン様作用を有し、骨量増加作用、抗動脈硬化作用等を示すことが知られている。しかし腱線維芽細胞への SERM の影響は不明である。閉経によるエストロゲン欠乏は、全身の結合組織の代謝や組成に影響し、退行変性を引き起こす。腱や靱帯に対する影響については、議論のあるところであるが、腱・靱帯由来線維芽細胞にはエストロゲン受容体が発現しており、エストロゲンが腱・靱帯に対しなんらかの作用を有するとする意見も多い。

本研究の目的は、SERM/ raloxifene の腱・靱帯に対する作用を明らかにするために、腱由来線維芽細胞をエストロゲン、ラロキシフェン存在下で培養し、細胞増殖性ならびにコラーゲン代謝に与える影響を評価することである。

【材料と方法】SD ラット雌のアキレス腱より線維芽細胞を単離しこれを性ホルモンを除去した血清存在下で培養し、各種濃度の Estradiol、raloxifene analogue (LY117018) の影響を調査した。短期間での細胞増殖性の評価として、Estradiol (10^{-13} , 10^{-11} , 10^{-9} , 10^{-7} M) または LY117018 (10^{-11} , 10^{-9} , 10^{-7} M) 存在下で 24 時間腱由来線維芽細胞を培養し、ELISA kit を用いた DNA 合成量評価である BrdU incorporation assay を行った。長期での細胞増殖性は Estradiol (10^{-11} , 10^{-10} , 10^{-9} M) または LY117018 (10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} M) 存在下で 2 日間または 6 日間培養し、Tetrazolium 塩を用いた生細胞数の評価である WST-8 colorimetric assay を行い評価した。それぞれ estrogen receptor alpha blocker である ICI182,780 を添加し培養したものでも細胞増殖性の評価を行った。細胞外基質代謝は、Estradiol (10^{-11} , 10^{-10} , 10^{-9} M) または LY117018 (10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} M) 存在下で線維芽細胞を 16 時間培養し、腱の主要な細胞外基質である I 型 collagen、III 型 collagen、またその分解をつかさどる MMP-13 の mRNA の発現を quantitative RT-PCR 法で評価した。また腱の弾性に影響を与える Elastin の mRNA の発現も quantitative RT-PCR 法で同様に評価した。さらに 48 時間で I 型 collagen、III 型 collagen、tropoelastin に対する免疫細胞染色を行った。Estradiol または LY117018 存在下またはさらに ICI182,780 を添加した状態で線維芽細胞を培養し、培養上清中に分泌された総コラーゲン量の定量化を Sircol collagen assay にて 48、72 時間に行なった。さらに培養上清中 I 型 collagen、III 型 collagen、MMP-13 の半定量評価を western blotting にて行った。

【結果】WST-8 colorimetric assay、BrdU incorporation assay とともに Estradiol、raloxifene analogue は濃度によらず、細胞増殖性に有意な影響を与えなかった。細胞外基質代謝に関しては Estradiol、raloxifene analogue はともに I 型 collagen の mRNA 発現に有意な差を与えなかったが、III 型 collagen、MMP-13、Elastin の発現を有意に上昇させた。またその影響は ICI182,780 にて減弱される傾向を認めた。免疫細胞染色では Estradiol、raloxifene analogue は I 型 collagen の染色性に影響を与えなかったのに対し、III 型 collagen、tropoelastin の染色性を亢進させる傾向を認めた。培養上清中の総コラーゲン量は Estradiol、raloxifene analogue の影響を受けなかった。培養上清中 I 型 collagen 量は Estradiol、raloxifene analogue にて有意な変化を示さなかったが、III 型 collagen、MMP-13 は Estradiol、raloxifene analogue にて上昇し、ICI182,780 にてその効果が減弱される傾向を認めた。

【考察】これまで腱・靱帯に対するエストロゲンの作用に関しては様々な報告があり一定の見解はいまだ得られていない。また、組織特異性という特徴を有する SERM の腱・靱帯に対する作用は不明であった。腱・靱帯の構造や力学的特性はコラーゲンの合成と分解のバランスによって保たれている。本研究においてラロキシフェンは、腱由来線維芽細胞の増殖性に影響を与えなかったが、ラット腱における主要なコラゲナーゼである MMP-13 産生や腱の弾性に関与する III 型コラーゲン、エラスチンの合成をエストロゲン存在下と同程度まで増加させた。またその効果は estrogen receptor alpha blocker である ICI182,780 で減弱された。このことから SERM ラロキシフェンは腱由来線維芽細胞に対しエストロゲン様作用を有し、その効果は estrogen receptor alpha を介して作用すると考えられた。本研究の結果から、腱におけるコラーゲン代謝回転や弾性線維の産生は閉経によるエストロゲン欠乏により低下し、SERM ラロキシフェンの投与によって閉経前に近い状態へと回復する可能性が示唆された。

【結論】本研究においてラロキシフェンは、腱由来線維芽細胞の増殖性に影響を与えなかったが、MMP-13、III 型コラーゲン、エラスチンの合成をエストロゲン存在下と同程度まで増加させた。腱におけるコラーゲン代謝回転や弾性線維の産生は閉経によるエストロゲン欠乏により低下し、SERM ラロキシフェンの投与によって閉経前に近い状態へと回復する可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 安 田 和 則

副 査 教 授 山 本 有 平

副 査 教 授 三 浪 明 男

学 位 論 文 題 名

Effect of Selective Estrogen Receptor Modulator/Raloxifene Analogue on Proliferation and Collagen Metabolism of Tendon Fibroblast

(選択的エストロゲン受容体調節薬が腱由来線維芽細胞の
器質産生能および増殖活性に及ぼす影響に関する研究)

本研究の目的は、組織特異性という特徴を有する選択的エストロゲン受容体調節薬(SERM)の腱・靱帯に対する作用を明らかにするために、腱由来線維芽細胞をエストロゲン、ラロキシフェン存在下にて培養し、細胞増殖性ならびにコラーゲン代謝に与える影響を評価することである。SD ラット雌のアキレス腱由来線維芽細胞を性ホルモンを除去した血清存在下で培養し、各種濃度の Estradiol (E2)、raloxifene analogue (Rlx) の影響を調査した。細胞増殖性試験は BrdU incorporation assay を 24 時間で、WST-8 colorimetric assay を 6 日間で行い、E2、Rlx はともに線維芽細胞の増殖性に有意な影響を与えないことが示された。I 型 collagen の mRNA 発現量は各群間で有意差を認めなかったが、III 型 collagen、MMP-13、Elastin は E2、Rlx 存在下で有意に増加し、ICI によりこの効果が減弱されることが Real-time RT-PCR によって示された。培養上清中に分泌された総コラーゲン量の定量化を Sircol collagen assay にて 48、72 時間にて行い、各群間で有意差を認めなかった。また、免疫細胞染色では E2、Rlx は I 型 collagen の染色性に影響を与えなかったのに対し、III 型 collagen、tropoelastin の染色性を亢進させる傾向を認めた。培養上清中の I 型 collagen 量は変化を認めなかったが、III 型 collagen、MMP-13 は E2、Rlx により増加し、ICI によりその効果が減弱する傾向が western blotting にて認められた。

本研究においてラロキシフェンは、腱由来線維芽細胞の増殖性に影響を与えなかったが、ラット腱における主要なコラーゲナーゼである MMP-13 産生や腱の弾性に関与する III 型コラーゲン、エラスチンの合成をエストロゲン存在下と同程度まで増加させた。またその効果は estrogen receptor alpha blocker で減弱された。このことから SERM ラロキシフェンは腱由来線維芽細胞に対しエストロゲン様作用を有し、その効果は estrogen receptor alpha を介して作用すると考えられた。本研究の結果から、腱におけるコラーゲン代謝回転や弾性線維の産生は閉経によるエストロゲン欠乏により低下し、SERM ラロキシフェンの投与によって閉経前に近い状態へと回復す

る可能性が示唆された。

審査にあたり副査山本教授から皮膚の線維芽細胞に対する影響、外傷治療に対する有効性の可能性についての質問があった。申請者は皮膚線維芽細胞への影響を文献的報告を引用して回答し、SERMの組織特異性より本研究の結果と矛盾しないことを回答した。また、本薬品の性質上、外傷治療目的の使用は考えにくいが腱の退行性変化の進行予防効果は期待しうることを回答した。次いで主査安田教授から、健常人への影響、高齢動物等の使用の可能性に関する質問があった。申請者はラロキシフェンが腱のコラーゲン代謝に与える影響はエストロゲンとほぼ同様のものであり、閉経後女性の腱の状態を閉経前の状態に近づける可能性があることを回答し、卵巣摘出高齢ラットにて予備実験を行っていることを報告した。最後に副査三浪教授より E2 と Rlx ではほぼ同様な影響であったことに対する質問があった。申請者は Rlx が腱線維芽細胞に対し agonistic に作用するのか antagonistic に作用するのかが不明であったのに対し、agonistic に作用することを明らかにできたことに本研究の新規性があり意義があることを回答した。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。