

論文内容の要旨

論文提出者氏名 井辻 智典

論文題目

Hepatocyte growth factor regulates HIF-1 α -induced nucleus pulposus cell proliferation through MAPK-, PI3K/Akt-, and STAT3- mediated signaling

論文内容の要旨

椎間板は中心部の髄核と外層の線維輪から構成され、体幹の支持性に関与する。椎間板変性は、加齢やさまざまな外的ストレスが原因で起こる髄核細胞の減少や基質産生の低下によって生じ、腰痛や脊椎由来の神経症状を引き起こす。椎間板は無血管組織で生理的に低酸素環境にあり、髄核細胞の増殖能が低く再生しにくいいため、変性予防が重要となる。髄核細胞において肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor :HGF と略) の特異的受容体である c-Met が発現し、HGF/c-Met シグナルが髄核細胞の細胞増殖を促進し、アポトーシスや基質分解を抑制することが明らかにされているが、その詳細な機序は不明である。一方、細胞の低酸素応答で中心的な役割を担う転写因子である低酸素誘導因子 (hypoxia inducible factor :HIF と略) -1 α は、髄核細胞の細胞増殖や基質代謝を調節し、椎間板変性に関与する。本研究の目的は HGF が髄核細胞の細胞増殖を促進する機序を HIF-1 α 産生の観点から明らかにすることである。

日本白色家兎の腰椎椎間板より採取した髄核組織から髄核細胞を単離した。低酸素環境における HGF の細胞増殖能を検討するため、低酸素下 (2% O₂) HGF (100ng/ml) 投与群、定常酸素下 (20% O₂) HGF 投与群、低酸素下 HGF 非投与群および対照群の 4 群に分け髄核細胞を 7 日間培養した。低酸素下 HGF 投与群の培養髄核細胞に HIF-1 α を標的とする siRNA (si-HIF-1 α と略) または negative control siRNA を導入した。また、mitogen-activated protein kinase (MAPK と略) 阻害剤である PD98059, phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K と略) /Akt 阻害剤である LY294002 および signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3 と略) 阻害剤である cucurbitacin 1 を添加した。細胞増殖能の評価には water soluble tetrazolium salts (WST と略) -8 法と lactate dehydrogenase (LDH と略) 法を用い、HIF-1 α の蛋白産生を western blotting 法で解析した。

低酸素下 HGF 投与群の髄核細胞では、定常酸素下 HGF 投与群、低酸素下 HGF 非投与群および対照群と比較して培養 5, 7 日目まで有意に細胞増殖が促進された。いずれの群においても培養 7 日目の LDH 放出量に有意差を認めず、低酸素刺激と HGF による細胞毒性はなかった。髄核細胞の HIF-1 α 産生は低酸素刺激で誘導され、HGF 投与により有意に増大した。HIF-1 α 産生は si-HIF-1 α 導入によって抑制され、低酸素刺激と HGF 投与で促進した細胞増殖は si-HIF-1 α

導入により抑制された。また、PD98059, LY294002 および cucurbitacin 1 の投与は濃度依存的に髄核細胞の HIF-1 α 産生を低下させ細胞増殖を抑制した。

低酸素環境の培養髄核細胞において HGF が HIF-1 α 産生を介して細胞増殖を促進することが明らかとなった。さまざまな細胞において、HGF/c-Met シグナルと HIF-1 α 産生についてのシグナル伝達経路の解析が行われ、HGF と HIF-1 α のクロストークが存在することが報告されている。本研究では、HGF が髄核細胞の HIF-1 α 産生を MAPK, PI3K/Akt および STAT3 経路で促進することが示された。生理的に低酸素環境にある髄核細胞では、独自の HIF-1 α 産生調節機構によって恒常性を維持しており、この調節機構の破綻が髄核細胞の減少や基質産生の低下をもたらし、椎間板変性を引き起こす一因と考えられている。近年、ヒストン脱アセチル化酵素、熱ストレス蛋白質や結合組織成長因子などの低酸素以外の因子による髄核細胞の HIF-1 α 産生調節が明らかにされている。本研究の結果から、HGF/c-Met シグナルも髄核細胞の HIF-1 α 産生を調節して椎間板変性を制御している可能性があると考えた。

本研究で、HGF が髄核細胞の細胞増殖を促進する機序には HIF-1 α 産生の増大が重要であることを示した。HGF/c-Met シグナルによる髄核細胞の HIF-1 α 産生調節機構の解明により、椎間板変性の病態解析や治療法への応用が可能である。