氏　　名	植田修右（うえだしゅうすけ）
学位論文題目	Osteocytic cell necrosis is caused by a combination of glucocorticoid-induced Dickkopf-1 and hypoxia （ステロイドによる Dickkopf-1 誘発および低酸素環境が骨細胞壊死を引き起こす）

学位論文内容の要旨

研究目的

大腿骨頭壊死症は厚生労働省指定の難治性疾患であり，公費負担の対象疾患である。その危険因子としてステロイド性，アルコール性，そして明らかな危険因子のない狭義の特発性に分類されているが，年々増加の一途を辿っているのがステロイド性である。ステロイド剤の服用については，一日の平均投与量が発症に影響しやすいと報告されているが，実際にはどの程度の量以上で発症しやすいとか，使用後どのくらいの期間で発症するのかということは分かっていない。したがって，ステロイド剤によってどのようなメカニズムを介して大腿骨頭壊死症が発症するのかを解明することは，新たな治療手段の開発に繋がる。これまで，動物モデルにおいて最終的な原因は虚血-低酸素であるとの意見は一致しているが，酸化ストレスや血管内皮機能障害，血液凝固能亢進，脂質代謝異常，脂肪塞栓，骨細胞のアポトーシスなどの関与も指摘されている。つまり，本疾患発生に至る一義的原因としての十分な科学的根拠までは得られていないのが現状であり，未だ動物モデルを用いた基礎的研究が続けられている。そこで，本研究では虚血-低酸素を模倣するためマウス培養骨細胞を低酸素に曝すとともに，ステロイド剤添加の有無によって骨細胞壊死が誘導されるメカニズムを，骨形成を抑制するDickkopf（DKK-1）に着目して検討することを目的とした。

実験方法

対象　培養マウス骨細胞（MLO-Y4）

方法

1．MLO-Y4 細胞を，1）20％酸素環境下，2）1％酸素環境下，3）20％酸素環境下にデキサメサゾン 1μM 添加，4）1％酸素環境下にデキサメサゾン 1μM 添加，の 4 群に分け 24 時間培養した後，細胞死の割合を Apoptotic/Necrotic Cells Detection Kit を用いて蛍光染色を行い，1 視野あたりの総細胞数に対する apoptosis と necrosis の割合を測定した。

2．骨細胞から内在性に産生され，骨芽細胞前駆細胞に発現する Wnt シグナルを介して骨芽細胞の分化，活性化を阻害し，骨形成を抑制する Dickkopf（DKK-1）の発現を，1）20％酸素環境下，2）1％酸素環境下，3）20％酸素環境下にデキサメサゾン 1μM 添加の培養細胞において免疫蛍光染色法にて組織学的に検討した。さらに，１％低酸素下に

デキサメサゾンを添加した細胞に，siRNA DKK-1 をトランスフェクションして DKK-1 発現をノックダウンされた細胞と，スクランブル siRNA をトランスフェクションして DKK-1 発現がノックダウンされていない細胞において，DKK-1 発現をウエスタンブロット法にて確認した。その後，低酸素下における 1 視野あたりの総細胞数に対する apoptosis と necrosis の割合を，1）20%酸素環境下，2）1%酸素環境下，3）1%酸素環境下にデキサメサゾン 1μM 添加した培養細胞において検討した。

実験成績

１．20%酸素環境下にて培養した細胞と比較して，20%酸素環境下にデキサメサゾン添加および 1%酸素環境下にて培養した細胞において有意な apoptosis の増加はみられたが，necrosis はみられなかった。一方，1%酸素環境下にデキサメサゾンを添加した細胞においては，他の 3 群と比較して apoptosis と necrosis の割合が有意に増強されていた。

２．20%酸素環境下および 1%酸素環境下にて培養された細胞と比較して，20%酸素環境下にデキサメサゾンを添加して培養された細胞において DKK-1 発現が有意に増強した。

３． 20%酸素環境下にて培養された細胞と比較して，1%酸素環境下にデキサメサゾン添加した培養細胞においてみられた有意な apoptosis と necrosis の増強が，DKK-1 発現をノックダウンされた細胞においてのみ改善された。

総括および結論

低酸素下およびステロイド単独では apoptosis が主であり，necrosis に至る細胞は少なかった。しかし，ステロイド添加は，骨形成を抑制する DKK-1 の発現を増強した。さらに，in vivo を模倣する低酸素環境下においてステロイドを添加した細胞において necrosis の増強がみられたことから，虚血-低酸素に骨細胞の代謝障害が加わると骨壊死が生じることが明らかとなった。最後に，このような条件下の necrosis の増強が，骨形成を抑制する DKK-1 siRNA により抑制されるとの結果から，DKK-1 をターゲットとした新たな治療戦略が，大腿骨頭壊死症の予防に繋がる可能性が示唆された。