

氏 名 (本籍)	あい 相	ざわ 澤	とし 俊	み 峰
学位の種類	博 士 (医 学)			
学位記番号	医 第 3 1 2 6 号			
学位授与年月日	平 成 10 年 9 月 9 日			
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 2 項該当			
最 終 学 歴	平 成 元 年 3 月 24 日 東北大学医学部医学科卒業			

学位論文題目 Apoptosis and Proliferation of Growth Plate Chondrocytes in Rabbits : Changes in the rates of DNA breaks and Expression of PCNA and Fas Receptor Protein with Age.
(ウサギ成長軟骨板におけるアポトーシスと細胞増殖 : 成長に伴う DNA 鎖断片化率と PCNA 及び Fas 受容体蛋白の発現率の変化)

(主 査)

論文審査委員 教授 国 分 正 一 教授 半 田 康 延
教授 伊 藤 恒 敏

論文内容要旨

【はじめに】

成長軟骨板はこれを構成する細胞の形態・機能から休止層，増殖層，肥大層に大別される。成長軟骨板と骨幹端の境界である軟骨・骨境界部では内軟骨骨化が営れ，長管骨が伸長する。成長軟骨板の軟骨細胞は休止細胞から増殖細胞を経て肥大細胞へと連続的に成熟し，最終的にプログラム細胞死の1つであるアポトーシスに陥ると考えられている。成長軟骨板は，ある年齢に達すると自然に閉鎖し，長管骨の伸長が止まる。組織の細胞数は細胞死と細胞分裂により規定される。この両者を比較することで，加齢に伴う成長軟骨板の軟骨細胞数の変化やその閉鎖機序を推測することが可能である。

アポトーシスに関係する様々なシグナル伝達系が明らかにされつつある。Fas 受容体蛋白 (FasR) は腫瘍壊死因子ファミリーに属し，Fas リガンドと結合するとその細胞に急速にアポトーシスを惹起する。様々な組織でこの蛋白の発現が認められているが，成長軟骨板では報告されていない。

本研究は，幼弱齢から閉鎖に至るまでの成長軟骨板軟骨細胞の細胞動態をアポトーシスと細胞増殖の観点から捉えること，このアポトーシスに FasR が関与する可能性を検討することを目的とした。

【方 法】

5, 10, 15, 20 週齢の日本白色家兎各 4 羽から成長軟骨板を含む大腿骨頭を摘出した。アポトーシス検出法には断片化した DNA 鎖を捉える TUNEL 法を用いた。細胞の増殖性の判定には増殖細胞核抗原 (PCNA) の免疫染色を行った。また FasR の局在を，抗 FasR 抗体を用い免疫組織学的に検出した。

TUNEL 法では DNase を使った陽性コントロールと同様に核が染まった細胞を陽性とした。PCNA では核が，FasR では細胞質が明瞭な染色性を示した細胞を陽性とした。各染色で陽性細胞の局在を観察した後，1 枚の切片の全視野中から最も陽性細胞数が多い 5 視野を，TUNEL 法は 400 倍，PCNA, Fas の免疫染色は 200 倍で選び，その視野中の陽性細胞及び陰性細胞を 3 回ずつ数えた。これらの平均から陽性細胞数と全細胞数を算出した。また，成長軟骨板の全細胞層と休止，増殖，肥大の 3 層に大別した各細胞層の陽性細胞率を求めた。得られた数値を累積 χ^2 検定を用い，有意差を検定した。p<0.05 を有意差ありとした。

FasR の成長軟骨板細胞のアポトーシスへの関与を確かめるために，TUNEL 法と FasR の二

重染色を行った。

【結 果】

TUNEL 陽性細胞は各週齢群の全ての細胞層で確認された。特に 15 週齢, 20 週齢の肥大層に多かった。全細胞層の陽性率は 5 週齢が 1.8%, 10 週齢が 6.1%, 15 週齢が 16.6%, 20 週齢が 22.0%と加齢に従い有意に増加した。肥大層で最も陽性率が高く, 増殖層・肥大層では陽性率の増加に統計学的有意差が認められた。

PCNA 陽性細胞も各週齢群で確認された。陽性細胞は主に下位増殖層と上位肥大層に分布していた。成長とともに陽性率が有意に減少し, 全細胞層の陽性率は 5 週齢が 31.7%, 10 週齢が 19.4%, 15 週齢が 14.0%, 20 週齢が 9.3%であった。細胞層別の陽性率では肥大層で最も高い陽性率を示した。各細胞層とも陽性率が成長に従い減少する傾向にあり, 増殖層では有意差が認められた。

FasR 陽性細胞は肥大層を中心に各週齢群で認められた。全細胞層の陽性率は 5 週齢が 4.4%, 10 週齢が 6.4%, 15 週齢が 17.6%, 20 週齢が 19.9%と有意に増加していた。いずれの細胞層でも週齢の増加とともに陽性率が上がっており, 肥大層の陽性率の増加には統計学的有意差が認められた。

TUNEL 法と FasR の二重染色では, TUNEL と FasR の両方に染色させる肥大軟骨細胞が認められた。

【結 語】

本研究から, 成長軟骨板では成長とともにアポトーシスにより細胞死に陥る軟骨細胞が増加し, 一方で細胞の増殖性が低下することが明らかになった。このため軟骨細胞数が減少し, やがて成長軟骨板が閉鎖すると考えられる。加えて, 成長軟骨板細胞のアポトーシスに FasR が重要な働きを担う可能性がある。本研究は, 成長軟骨板の閉鎖機序を解明する上で, 新たな知見を提供した。

審査結果の要旨

成長軟骨板はこれを構成する細胞の形態・機能から休止層、増殖層、肥大層に大別される。成長軟骨板と骨幹端の境界である軟骨・骨境界部では内軟骨骨化が営れ、長管骨が伸長する。成長軟骨板の軟骨細胞は休止細胞から増殖細胞を経て肥大細胞へと連続的に成熟し、最終的にプログラム細胞死の1つであるアポトーシスに陥ると考えられている。成長軟骨板は、ある年齢に達すると自然に閉鎖し、長管骨の伸長が止まる。組織の細胞数は細胞死と細胞分裂により規定される。この両者を比較することで、加齢に伴う成長軟骨板の軟骨細胞数の変化やその閉鎖機序を推測することが可能である。

アポトーシスに関係する様々なシグナル伝達系が明らかにされつつある。Fas 受容体蛋白 (FasR) は腫瘍壊死因子ファミリーに属し、Fas リガンドと結合するとその細胞に急速にアポトーシスを惹起する。様々な組織でこの蛋白の発現が認められているが、成長軟骨板では報告されていない。

筆者は、そこで、幼弱齢から閉鎖に至るまで (5, 10, 15, 20 週齢) の日本白色家兎各 4 羽から大腿骨頭の成長軟骨板を摘出し、軟骨細胞の細胞動態を TUNEL 法によるアポトーシスと PCNA 免疫染色による細胞増殖の観点から検討した。加えて、二重染色法を用いて、アポトーシスに FasR が関与するか否かを検討した。

その結果、次の所見が得られた。1) TUNEL 陽性細胞は各週齢群の全ての細胞層で確認され、全細胞層の陽性率は成長に従い有意に増加した。肥大層で最も陽性率が高く、陽性率の増加は増殖層との間に有意差が認められた。2) PCNA 陽性細胞は各週齢群の主に下位増殖層と上位肥大層に分布し、全細胞層の陽性率は成長に従い有意に減少した。増殖層の陽性率の減少が他の層と比べて有意に大きかった。3) FasR 陽性細胞は各週齢群で肥大層を中心に認められ、全細胞層の陽性率は成長に従い有意に増加した。肥大層の陽性率の増加が他の層と比べて有意に大きかった。4) TUNEL 法と FasR の二重染色で、両者が陽性の肥大軟骨細胞が認められた。

以上、本研究は、成長軟骨板では成長に従ってアポトーシスにより細胞死に陥る軟骨細胞が増加し、一方で細胞の増殖性が低下することを明らかにした。即ちそれにより軟骨細胞数が減少し、やがて成長軟骨板が閉鎖する機序が説明できる。加えて、成長軟骨板細胞のアポトーシスに FasR が重要な働きを担う可能性を指摘した。成長軟骨板の閉鎖機序を解明する上で新たな知見を提供したものであり、学位授与に十分値する。