

氏名	さいとう ひでお 齊藤 秀雄
学位の種類	博士 (医学)
学位授与年月日	平成25年3月27日
学位授与の条件	学位規則第4条第1項
研究科専攻	東北大学大学院医学系研究科 (博士課程) 医科学専攻
学位論文題目	エルデカルシトール(ED-71)が C2C12 筋芽細胞に及ぼす影響
論文審査委員	主査 教授 井樋 栄二 教授 出江 紳一 教授 青木 正志

論文内容要旨

目的

ビタミンDが骨格筋に対して同化作用を示す事が言われており、転倒の予防に効果があるとされる。活性型ビタミンD3の誘導体であるエルデカルシトールは、活性型ビタミンD3と比較して骨密度を上昇させる事や骨折、特に前腕骨の骨折に対しては著しく減少させたという報告もある。これらのことより、エルデカルシトールは筋肉に作用して転倒予防に効果を発揮している可能性を考えた。本研究の目標は、生体外で培養して筋管細胞に分化させたC2C12筋芽細胞株へのエルデカルシトールの効果を調べる事である。

方法

C2C12細胞を12穴プレートに播種して37℃、5%CO₂の気相下で培養した。コンフルエントにして2%ウマ血清を含む低グルコースDMEMの分化培地で培養した。8日間、隔日で分化培地を交換しながら培養したものを使用した。分化培地にエルデカルシトールを1, 10, 100 nMとなるように加えて、溶媒として使用したエタノールを加えた群をVehicle群とした。隔日で培地を交換して4日間培養したものからサンプルを作成した。ビタミンDレセプター(VDR)、MyoD、IGF-1、新生ミオシン重鎖(MHC)とそのサブタイプであるMHC I, IIa, IIb, II d/xについての遺伝子発現を定量的RT-PCRにて評価を行った。更にMHCと速筋型MHC(II型)の蛋白発現をウエスタンブロッティング法と免疫染色によって評価した。

結果

分化後期のC2C12細胞にエルデカルシトールを加える事で、VDR、MyoD、IGF-1の遺伝子発現は容量依存的に増加した。当初は分化培地にエルデカルシトールを加えて培養を行っていた(one step法)が、ビタミンD結合蛋白との結合能が高いというエルデカルシトールの特徴を考慮して、血清を含まないDMEMにエルデカルシトールを加えて1時間培養した後に同量の4%ウマ血清を含む分化培地を加えて血清の濃度を2%として培養した(two step法)ものを比較検討した。これらにおける遺伝子発現はone step法に比べてtwo step法の方が著しいものであった。以降はtwo

step 法で培養したものを実験の対象とした。MHC II a, II b, II d/x の遺伝子発現は、エルデカルシトールを投与したものが明らかに増加した。ウエスタンブローディング法においては、速筋型 MHC の蛋白発現もまたエルデカルシトールの濃度が 1 nM と 10 nM の場合に明らかな増加を示した。

考察

エルデカルシトールは、活性型ビタミン D に似た速筋型 MHC に対する効果を示した。エルデカルシトールも VDR を介して作用しているものと考えられた。活性型ビタミン D3 は IGF-1 を減少させたという報告もあるが、本研究においては増加した。このことは、活性型ビタミン D3 とエルデカルシトールの作用の違いとも考えられる。RT-PCR において MHC II b 遺伝子の増加が認められた速筋型の II 型線維のなかで最も収縮速度が速い線維が II b 線維である。エルデカルシトールは活性型ビタミン D3 と比べて血中半減期が長い。これらの事を考慮すると、年配のエルデカルシトール服用者の骨格筋の維持と向上に有益な効果を持つものと期待される。

しかし、本研究の限界はマウスの骨格筋由来の細胞を使用した細胞実験である

審査結果の要旨

博士論文題目 エルデカルシトール（ED-71）がC2C12筋芽細胞に及ぼす影響

所属専攻・分野名 医科学専攻 ・ 整形外科学分野

学籍番号 氏名 齊藤秀雄

研究の要旨：本研究の目的は、分化させた C2C12 筋芽細胞株にエルデカルシトールを添加して培養する事で、エルデカルシトールの筋への直接的な作用を評価する事である。まず、one step 法と two step 法という 2 種類の培養法を行い筋細胞の増殖、分化への影響を評価した。結果は two step 法の遺伝子発現が著明であった。ミオシン重鎖アイソフォームの遺伝子発現は、添加したもので速筋型の遺伝子発現が有意に増加していた。高濃度の条件下では細胞の増殖と分化が抑制された事も免疫染色で示された。ウェスタンブロッティングにおいて、ミオシン重鎖は 1 nM と 10 nM において増加傾向を示し、速筋型ミオシン重鎖は 1 nM と 10 nM で有意な増加を示した。

斬新さ：活性型ビタミン D3 を筋細胞に添加する事で速筋の合成が増加する事が示されている。骨への効果を高めた活性型ビタミン D3 の誘導体であるエルデカルシトールは、活性型ビタミン D3 と比較した臨床試験において転倒に関係する前腕骨折の発生リスクを大幅に減少させている。転倒には様々な要因が関係するが、筋との関係も大きいと考えられる。しかし、エルデカルシトールの筋細胞への直接的効果を報告したものは認められない。本研究が、エルデカルシトールの筋細胞への直接的な効果を評価した最初の研究である。

重要性：高齢者の転倒と骨折には大きな関連がある。転倒には様々な要因が関連するが、筋も大きく関わっている。筋の速筋線維は瞬時の身体バランスを保ち、転倒を防止に関与すると言われている。本研究において、エルデカルシトールを添加することで速筋型の蛋白合成が増加する事が示された。この事は、エルデカルシトールによって速筋線維量が増加して、転倒が防止されることで骨折予防につながる可能性を示唆している。

実験方法の正確性：実験は周到に練られた計画のもとに行われ、再現性、正確性が高いと考えられる。また、得られたデータの統計処理も適切になされており、信頼性の高い研究である。

表現の明瞭さ：これまでの問題点を明確に指摘し、研究目的、方法、実験結果、考察を簡潔、明瞭に記載していると考えられる。

よって、本論文は博士（医学）の学位論文として合格と認める。