

136 受精障害への精子核蛋白の関与 - in vitro脱凝縮モデルとhamster卵顕微注入による検討-

川崎市立川崎病院, 慶應大*

岩田壮吉, 末岡 浩*, 大澤淑子*, 谷垣礼子*, 吉村泰典*, 野澤志朗*

【目的】 精子を卵細胞質に直接注入しても受精に至らない精子があり,精子核脱凝縮機構における障害を明らかにする必要がある.精子核蛋白はdrasticに変化し,成熟過程にはprotamineに置換され核が強固に凝縮し,受精時には脱凝縮し核がhistoneにより再構築される.即ち核蛋白は密接に関連するため,核蛋白の抽出・分析により受精障害への関与を検討した.【方法】 0.05% lysolecithin-5mM dithiothreitol-1.0M NaCl液によるin vitro精子核脱凝縮系を作製し条件による脱凝縮を評価した.さらに形態別精子をhamster卵へ顕微注入して,in vivoの核膨化と比較検討した.また精子核蛋白の解析はSDS-PAGEとWestern blotting法で行った.densitometerにて分離蛋白を定量し,合成ペプチドから作製した抗 protamine 1 抗体と抗 histoneH2B抗体を用い転写蛋白を検出した.精子検体は患者の同意を得た上で用いた.【成績】 精液所見良好例の脱凝縮は迅速で90%以上の核が完全膨化に至った.所見不良例では脱凝縮が遅延し運動率不良例及び形態異常のうちtapering精子優位症例で顕著であった.顕微注入による核膨化でも正常形態精子で膨化率93.5%と高率であったのに対し重度 tapering 精子で13.3%と有意な低値を示した.核蛋白分析では protamine 1を12 kDに,histoneH2Bを60kDに認め,histone蛋白分画は約22%を占めヒストンの残存を認め,精子による核蛋白の差異が示された.【結論】 in vitro 脱凝縮系と顕微注入では共通して,運動率不良例と形態異常特に重度 tapering 精子で膨化不良が著明であった.この脱凝縮メカニズムとしてprotamineへの核蛋白置換により高度に凝縮すると考えられた精子核には相当量のhistoneが残存し,精子核蛋白の置換異常が脱凝縮異常と関連し受精障害を生じる可能性が示された.

137 骨芽細胞におけるレプチンレセプターの発現に関する検討

鹿児島大

岩元一朗, 村上雅人, 古謝将一郎, 野口慎一, 永田行博

【目的】 脂肪組織は骨塩量(BMD)に影響を及ぼすことが知られている.そのため脂肪組織より主に分泌されるレプチンがBMDに影響を及ぼしている可能性が十分予想される.そこでレプチンレセプターが骨芽細胞に直接発現しているか否かを検討した.【方法】 骨芽細胞は,人骨芽細胞様細胞 Saos-2 cellを用いた.レプチンレセプターのプライマーはlong formとshort form用の2種類を用いた.骨芽細胞を培養後,subconfluentな状態時に種々の濃度のレプチン(1~100 ng/ml),IL-1 α (1~100pg/ml)をそれぞれ加えて刺激後2, 6, 24時間後に骨芽細胞よりRNAを抽出しRT-PCRを施行した.【成績】 人骨芽細胞様細胞 Saos-2 cellは被刺激下でもレプチンレセプター(short form)を発現していた.しかし,レプチン,IL-1 α で刺激しても,また経時的な変化(刺激後2, 6, 12hr)に対しても,発現はあまり変化しなかった.long formは被刺激下でも,レプチン,IL-1 α で刺激しても発現しなかった.【結論】 骨芽細胞は,レプチンレセプターを直接発現していたがshort formのみであったことより,short form単独ではシグナル伝達JAK/STAT系にはあまり関与しないと考えられるため,レプチンの骨芽細胞への直接作用はあまり関係がないと思われる.

138 血管内皮増殖因子(VEGF)の破骨細胞形成能と閉経後骨粗鬆症との関連性

広島大

児玉一郎,真田光博,津田幹夫,大濱紘三

【目的】 エストロゲン欠乏による骨吸収性サイトカインの増加が破骨細胞形成因子であるmacrophage colony-stimulating factor (M-CSF)の産生を高め,破骨細胞の増加,骨吸収亢進を引き起こすと考えられている.しかしM-CSF活性を欠損する大理石骨病(op/op)マウスにも少数の破骨細胞が認められ,M-CSF以外の破骨細胞形成因子の存在が指摘されており,最近われわれはVEGFがその重要な因子であることを報告した.そこでop/opマウスの卵巣を摘出(OVX)すると骨髄中のVEGFが増加し,それにより破骨細胞の増殖が引き起こされるか否かを検討する目的で以下の実験を行った.【方法】 8週齢の雌op/opマウスにOVX,あるいは偽手術(Sham)を施し,それぞれ術後2,4,6,8,10週目に大腿骨を摘出した.骨梁の評価にはアザン染色法を,破骨細胞の検出には酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ(TRAP)染色法を用いた.また,抗VEGF抗体,抗Flt-1/VEGFR-1抗体,マクロファージ抗体(BM8,F4/80)を用いた免疫染色によりOVX後の変化を観察した.さらにOVX後にVEGFの中和抗体あるいはVEGFR-1/Fcキメラ蛋白を投与し,破骨細胞の増減を検討した.【成績】 Sham群の大腿骨における破骨細胞数は,術後僅かな増加傾向を示したものの,ほぼ横這い状態であった.OVX群の破骨細胞数は術後4週目でSham群の約2.5倍となり明らかな増加を示した.骨髄中マクロファージは両群間に有意差を認めなかった.またOVX-op/opマウスへのVEGF中和抗体投与実験では破骨細胞数の減少が認められた.【結論】 op/opマウスに対しOVXを施行すると,破骨細胞が多数出現し骨病変の改善が起こるが,この作用機序としてVEGFの産生増加が考えられる.