

O4-02

破骨細胞形成における PKR

羽地 達次, 寺町 順平

徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部口腔組織学分野

【目的】 Double-stranded RNA dependent protein kinase (PKR) はウイルス・細菌感染、INF、LPS などに応答し、細胞の防御機構やアポトーシスに関与する蛋白質リン酸化酵素である。我々は PKR が骨芽細胞の分化と石灰化に必須であることを報告してきた。ところが、破骨細胞形成における PKR の役割についての研究は始まったばかりであり、破骨細胞と PKR についての報告もほとんど無く、その機構については全く不明である。今回、我々は破骨細胞形成における PKR の影響を PKR 変異細胞と PKR 活性化阻害剤を用いて調べた。

【材料と方法】 PKR 変異遺伝子 (K296R) をマウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 (RAW 細胞) に導入し、選択培地にて定常に発現する細胞をクローニングした。対照として野生型の RAW 細胞と pcDNA 導入細胞を用いた。破骨細胞誘導は RANKL 刺激により行い、TRAP 染色により成績を評価した。蛋白質の発現はウェスタンブロッティング法にて、mRNA の発現は RT-PCR および Real time PCR 法にて行った。また PKR 活性化阻害剤である 2-アミノプリン (2-AP) で RAW 細胞を前処理した後、RANKL 刺激後、TRAP 染色により破骨細胞形成を評価した。

【結果と考察】 PKR 変異細胞を RANKL で刺激すると単核の TRAP 陽性細胞は認められたが、TRAP 陽性の大型の多核細胞はほとんど認められなかった。一方 RANKL は野生型細胞と pcDNA 導入細胞において大型の TRAP 陽性多核細胞の形成を促進した。2-AP で前処理した RAW 細胞を RANKL で刺激すると TRAP 陽性破骨細胞形成は対照群に比較して減少した。前破骨細胞融合関連分子 (MFR、DC-STAMP、CTR、Cathepsin K) の遺伝子発現は PKR 変異細胞と 2-AP 処理細胞で抑制されていた。NF- κ B と NFATc1 の発現は PKR 変異細胞と 2-AP 処理細胞で抑制されていたが、STAT1 の発現は上昇していた。以上の結果から PKR は破骨細胞の形成に関与し、NF- κ B や STAT1 の発現を介してその調節をしていると考えられる。

O4-03

極性制御因子の機能変化を基盤とした酸化ストレス細胞傷害の分子機構の解明

堀越 洋輔, 鳥海 健太郎, 中村 直哉, 竹腰 進

東海大学・医学部・基盤診療学系・病理診断学

【目的】 炎症反応などによる酸化ストレスは、細胞、組織の傷害に関与すると考えられているが、酸化ストレスの細胞極性に対する作用についての詳細は不明である。本研究では、酸化ストレスの細胞極性への作用と組織形態に対する作用について検討を行った。

【方法】 哺乳類培養上皮細胞である MDCK 細胞に酸化ストレス刺激を加え、細胞間接着構造であるタイトジャンクション (TJ) および小胞輸送に関わるゴルジ体の局在への作用を検討し細胞極性に与える酸化ストレスの影響を検証した。また、極性制御因子である aPKC、Par3 の局在およびそれら分子かなる aPKC-Par 複合体の形成に対する作用を四塩化炭素による酸化ストレス傷害モデルラットの肝組織形態に対する作用を検証した。

【結果】 極性化した MDCK 細胞に AAPH、Menadione、AMVN により酸化ストレスを与えた結果、TJ マーカーである ZO-1 の局在が異常になる事が明らかとなった。また、ゴルジ体の核とアピカルドメインの間への局在化が阻害された。一方、酸化ストレス傷害モデルラット肝臓においても ZO-1 および GM130 の局在異常が観察された。さらに、aPKC、Par3 の TJ への局在化が阻害され細胞極性の異常が確認された。重要な事に、免疫共沈降法を用いた解析から Par3 と共沈降される aPKC の量が減少し aPKC-Par 複合体の形成が抑制される事が明らかとなった。この時、Par3 のリン酸化および aPKC 活性化に働く PI3 キナーゼシグナルの活性化が確認され aPKC の異常な活性化が誘導されていた。【考察】 Par3-aPKC 複合体の形成は細胞極性の制御に必須である。今回の解析から「酸化ストレス→aPKC の異常活性化→aPKC-Par 複合体形成の阻害→極性異常→細胞傷害」のカスケードを経て引き起こされる新しい酸化ストレス傷害の分子機構が明らかとなった。