

論文の内容の要旨

論文題目：骨芽細胞に対する抗 HIV 薬の影響の解明

氏名：若林 義賢

・背景および目的

1981 年に後天性免疫不全症候群(Adult Immune Deficiency Syndrome:AIDS)患者が報告された。1983 年には新たなレトロウイルスとして Human immunodeficiency virus(HIV)が発見され、その後 HIV が AIDS の原因として確定した。日本では、「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律（感染症法）」により、HIV 感染者と AIDS 患者が届出の対象となっている。近年、一年に約 1,000 件の HIV 感染者と約 500 件の AIDS 患者が新規に報告されており、平成 25 年までの累計報告は、全国で HIV 感染者 15,812 件、AIDS 患者 7,203 件である。HIV 感染症が出現した当初は、有効な治療法がなく「死の病」として恐れられていたが、cART(combination antiretroviral therapy)が本格的に導入された 1996 年以降、先進工業国では HIV 感染者の平均余命が次第に延長しており、20～25 歳で感染した人の平均余命は約 40 年で、次第に非感染者に近づいている。それとともに、非 AIDS 合併症の問題が注目されるようになってきている。これらは HIV 自体の直接作用、HIV 感染により惹起される慢性炎症、加齢による変化、および抗 HIV 薬の副作用等による複合的要因で引き起こされており、健常人より若年で発症することが報告されている。長期 cART における非 AIDS 合併症は心血管系疾患・悪性腫瘍・糖尿病・脂質代謝異常症・骨粗鬆症・神経認知機能症・肝、腎疾患など多岐にわたる。今回の私の研究では、この中で骨粗鬆症について注目した。骨粗鬆症は、低骨量と骨組織の微細構造の異常を特徴とし、骨の脆弱性が増大し、骨折の危険性が増大する疾患と定義されている。骨粗鬆症の問題点は、脆弱性骨折や、骨折による Activities of daily living(ADL)の低下、寝たきり患者の増加のみにとどまらない。脆弱性骨折や骨密度低下は死亡率を有意に上昇させるという報告はいくつも認められており、骨粗鬆症による骨折は生命予後に密接に関わっている。近年、HIV 感染者における骨密度の低下や、骨折のリスクが健常者と比較し有意に高いという多数の報告がある。これら報告のメタアナリシスでは HIV 感染者の骨粗鬆症の有病率は 15%であり、HIV 非感染者集団の 3.7 倍であった。したがって、HIV 感染者の平均余命の延長を目指すにあたり、骨粗鬆症の管理は重要な課題となってきている。骨粗鬆症は破骨細胞による骨吸収の亢進、骨芽細胞による骨形成の低下によって均衡が失われ引き起こされる。現在、抗 HIV 薬が骨芽細胞もしくは破骨細胞に対し影響することによって骨粗鬆症が誘発されている可能性が指摘されている。そこで今回私は骨芽細胞を用い、抗 HIV 薬と骨粗鬆症の関係についてさらに詳細に研究を行った。

・方法と結果

マウス骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 subclone14 を使用し、10%FBS, 2mM L-glutamine,

penicillin100U/ml,streptomycin100 µl/ml を含有した Dulbecco's Modified Eagle's medium(DMEM, sigma-aldrich)で気温 37℃、二酸化炭素 5%の条件で培養を行った。分化メディウムは、DMEM に Ascorbic acid (最終濃度 1%)、Hydrocortisone (最終濃度 0.2%)、 β -Glycerophosphate (最終濃度 2%)となるよう調整した。以下この溶液を分化メディウムと記載する。抗 HIV 薬は ritonavir, darunavir, atazanavir, lopinavir, abacavir, lamivudine, tenofovir, emtricitabine を使用し、いずれも Toronto Research Chemicals 社より購入した。各種抗 HIV 薬は健常人に治療常用量を単回投与した場合の血中薬物濃度の最大値(Cmax)となるよう分化メディウムに添加した。

ALP 活性の測定による抗 HIV 薬の分化への影響の確認：ALP 活性は骨芽細胞系の分化において初期の重要な骨形成マーカーとなり、分化の過程で ALP 活性が上昇することが知られている。細胞を 96 ウェルプレートに 1×10^4 cells/well となるよう播種し、24 時間培養した後に培養液を除去し、DMEM のみ(陰性コントロール)、前述の分化メディウム、各種抗 HIV 薬を添加した分化メディウムで刺激し、この日を 0 日目とした。9 日目に細胞抽出液を回収し、pNPP(p-nitro-phenyl phosphate)を基質とした ALP 活性の測定を行った。細胞数補正のため、同時に細胞抽出液の総タンパク質量を算出し、単位タンパクあたりの ALP 活性で比較を行った。分化メディウムで刺激した細胞では陰性コントロールに比べ有意に ALP 活性の上昇を認めた。ritonavir(RTV)を添加した分化メディウムで刺激した細胞では、分化メディウム単独で刺激した細胞と比較し有意に ALP 活性の抑制を認めた。その他の抗 HIV 薬を添加した分化メディウムで刺激した細胞の ALP 活性は、分化メディウム単独で刺激した細胞の ALP 活性と比較し、有意差は認めなかった。また、14 日目まで培養期間を延長しても、RTV を添加した分化メディウムで刺激した細胞では、分化メディウム単独で刺激した細胞と比較し ALP 活性の有意な低下を認めた。そのため、RTV によって MC3T3-E1 細胞の分化が抑制されていると考えられた。

骨芽細胞石灰化の確認：MC3T3-E1 細胞を分化メディウムで培養を継続すると、最終的に石灰化を認めることが知られている。石灰化を可視的に確認するため、アリザリンレッド染色を行った。細胞を 48 ウェルプレートに 1 ウェルあたり 5×10^4 cells/well となるように播種し、24 時間後より培養液を除去し、DMEM(陰性コントロール)、分化メディウム、RTV を添加した分化メディウムを使用し刺激を行った。刺激開始日を 0 日とし、培地は 24-48 時間おきに交換し、7 日目より 1 週間おきにアリザリンレッド染色を行い石灰化の確認を行った。21 日目、28 日目の細胞に対しアリザリンレッド染色を行うと、分化メディウムで刺激した細胞は赤く染色され、石灰化が確認された。しかし、DMEM のみで刺激した細胞、または RTV を添加した分化メディウムで刺激した細胞では、21 日目、28 日目でも染色されず、石灰化は認めなかった。そのため RTV によって石灰化は抑制もしくは遅延させると考えられた。

また、RTV 以外の抗 HIV 薬を各々分化メディウムに添加し、上記の手順に従い 28 日間培養した。28 日目の細胞に対しアリザリン染色を行ったところ、石灰化を認めた。そのため、

今回使用した抗 HIV 薬の中では、RTV のみが MC3T3-E1 の石灰化を抑制もしくは遅延させることが確認できた。

RUNX2 に対する RTV の影響の確認：骨芽細胞の分化には様々なシグナル経路が存在するが、分化に必須の転写因子として RUNX2 がある。RUNX2 が初期段階で抑制されると、骨芽細胞の分化が抑制されることが知られている。RUNX2 の発現に RTV が影響を及ぼしているか、リアルタイム PCR 法、Western blot 法によって確認を行った。リアルタイム PCR 法は Roche 社 lightcycler480 を使用した。細胞を 12 ウェルプレートに 1 ウェルあたり 1×10^5 cells/well となるように播種し、翌日に培養液を除去し DMEM(陰性コントロール)、分化メディウム、RTV を添加した分化メディウムで刺激し、この日を 0 日目とした。刺激後 3、5 日目の細胞を洗浄した後、フェノール、クロロホルム、イソプロパノールを使用し total RNA を抽出した。その後、cDNA に逆転写を行った後、リアルタイム PCR 法によって RUNX2 mRNA 発現の定量を行った。同時に β -actin mRNA の定量も行い、その比で比較を行った。3 日目、5 日目ともに分化メディウムで刺激した細胞では、陰性コントロールと比較し RUNX2 mRNA の発現の増加を有意に認めた。RTV を添加した分化メディウムで刺激した細胞の RUNX2 mRNA の発現は、分化メディウムで刺激した細胞と比較し、有意に低下を認めた。

また、Western blot 法で RUNX2 のタンパク定量を行った。刺激後 7 日目の細胞溶解液の RUNX2 タンパク量と β -actin タンパク量を Western blot 法で検出し、バンド強度の比を算出した。分化メディウムで刺激した細胞では陰性コントロールに比べ有意に RUNX2/ β -actin タンパク量の増加を認めた。RTV を添加した分化メディウムで刺激した細胞の RUNX2/ β -actin タンパク量は、分化メディウムで刺激した細胞と比較し有意に低下を認めた。そのため、RTV は RUNX2 もしくはその上流のシグナルを抑制することによって、MC3T3-E1 細胞の分化を抑制していることが判明した。

I 型コラーゲンに対する RTV の影響の確認：I 型コラーゲンは ALP と同様に、分化の初期に上昇する重要な骨形成マーカーとして使用される。I 型コラーゲンも ALP と同様に RTV による影響を受けるのか、リアルタイム PCR 法で確認を行った。RUNX2 mRNA を測定した際と同様の手順で 3、5、7 日目の細胞の I 型コラーゲン mRNA を測定した。3、5、7 日目いずれの細胞の I 型コラーゲン mRNA の発現量は、陰性コントロールと比較し、分化メディウムで刺激した細胞では有意差をもって上昇を認めたが、RTV を添加した分化メディウムで刺激した細胞では上昇を認めなかった。そのため、RTV が RUNX2 もしくはその上流のシグナルを抑制することによって ALP、I 型コラーゲンの産生が抑制され、MC3T3-E1 細胞の分化及び石灰化が抑制もしくは遅延していると考えられた。

・結論

抗 HIV 薬の一つである RTV は、RUNX2 の発現を抑制することによって、マウス骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 の分化を抑制もしくは遅延させた。この結果は、生体内で RTV が骨形成を阻害し、薬剤性骨粗鬆症を引き起こす可能性を示唆している。しかし、抑制が認め

られるのは、RTVを高濃度で使用したときのみであり、RTVの濃度が現在のブースターとして使用される投与量の場合には分化抑制が起らなかったなどから、実際ブースターとしてRTVを治療に用いた場合に、生体に影響が少ない可能性がある。また、観察期間が28日間と短く、長期投与における骨形成への影響については今回の実験では示すことができなかった。RTVを含むcART療法は多くの患者に使用されており、RTVを使用せずHIVの治療を行うことは困難であるが、これらの結果は今後の抗HIV薬の選択や、骨粗鬆症の治療開始時期などを決定する上で重要な役割を担うと考えられた。