

氏名	幸 篤 武
学位の種類	博士（体育学）
学位記番号	第7号
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位授与年月日	平成22年10月27日
学位論文題目	Upregulation of osteogenic factors induced by high-impact jumping suppresses adipogenesis in marrow but not adipogenic transcription factors in rat tibiae
論文審査委員	主査 教授 竹倉 宏明 副査 教授 齋藤 和人 副査 准教授 田巻 弘之

論文概要

Jump training is a high-impact training regimen that increases bone volume in young bones. The aim of our study was to determine whether downregulation of adipogenesis that is associated with upregulation of osteogenesis detected after jump training in growing rat tibiae. Four week-old rats were jump trained for 1, 2, or 4 weeks for 5 days/week, and the height of jumping progressively increased to 35cm. We performed morphometry to directly quantitate changes in bone volume and marrow adipocyte distribution in tibiae after the jump training. We also examined changes in the expression of osteogenic and adipogenic transcription factor proteins and mRNAs after the jump training. Four weeks of jump training induced an increase in trabecular bone volume, which was associated with the recruitment of runt-related transcription factor 2 expressing cells, as well as a decrease in marrow fat volume. However, peroxisome proliferator-activated receptor 2 protein and mRNA expression levels did not change after high-impact jump training. The mRNA expression levels of the adipocyte differentiation genes CCAAT/enhancer-binding proteins (C/EBPs),

C/EBP, and C/EBP also showed no change during the training period in jump-trained rats. We suggest that the levels of osteogenic factors that were upregulated by mechanical loading from high-impact jumping suppress adipogenesis in marrow rather than adipogenic transcription factors.

論文概要（和訳）

一般に、バレーボールやバスケットボールなど、骨に強い力学的ストレスの加重される運動種目を長期間行っている選手は、水泳やマラソンなどの種目の選手と比較して骨量が多いことが報告されている。骨量増加の程度は、力学的ストレスが短時間で強く加重される方が、長時間にゆっくりと加重される場合に比較して大きいことも報告されている。

高齢者や骨粗鬆症患者の骨組織は、骨量が低いことに加えて骨髄に脂肪の蓄積が認められる。骨髄中の脂肪細胞は、骨芽細胞と同じく骨髄中の間葉系幹細胞に由来する。従って、間葉系幹細胞から脂肪細胞への分化を抑制し、骨形成に働く骨芽細胞への分化を促進することにより骨粗鬆症の予防、改善が期待できるものと考えられる。近年、間葉系幹細胞の分化動態を制御する因子についての研究が進展し、力学的ストレスが間葉系幹細胞から脂肪細胞への分化を抑制し、骨芽細胞への分化を促進させることが *in vitro*の実験で明らかとなった。しかし、*in vivo*における力学的ストレスと間葉系幹細胞の分化動態について不明な点が多く、力学的ストレスの強弱に着目した研究は報告されていない。

本研究では、下肢骨に強い力学的ストレスを加重できるジャンプトレーニングを行わせたラットを対象として、運動トレーニングに伴う力学的ストレスの加重が骨における間葉系幹細胞の分化動態に与える影響を明らかにすることを目的とした。

実験には、生後4週齢のFischer 344系雌性ラット31匹を用い、無作為にジャンプトレーニング群 (n=15)と対照群 (n=16)に分類した。ジャンプトレーニングは1日20回、週5日間の頻度で行わせ、トレーニング期間は1、2及び4週間 (各週n=5)とした。ジャンプトレーニングは、Umemuraら(1995)の方法で行った。トレーニング終了後、脛骨を摘出し、未固定、非脱灰のまま液体窒素により凍結した。また、一部のサンプルはクエン酸-硫酸緩衝液に浸漬した後、reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)法を用いて間葉系幹細胞の分化動態に関与する転写因子及

びサイトカインの発現動態の分析に用いた。凍結した脛骨は、5%カルボキシメチルセルロース(CMC)ゲルに包埋した。凍結ミクロトームを用いてCMCブロックより厚さ5~50 μ mの連続縦断切片を作成した。作成した切片は支持用フィルムに接着し、凍結乾燥後、組織化学染色に用いた。オイルレッド染色並びにHE染色を行い、骨髄脂肪細胞の分布様式を観察した。また、アリザリンレッド染色を行い、石灰化骨を可視化し、脛骨近位骨幹部における二次海綿骨骨梁形態について観察を行った。また、一次抗体に抗runx-related transcription factor 2(Runx2)抗体及び抗peroxisome proliferator-activated receptor 2(PPAR γ 2)抗体を用いた免疫組織染色を行い陽性細胞数の測定を行った。クエン酸-硫酸緩衝液に浸漬した脛骨骨髄よりmRNAを抽出し、リアルタイムRT-PCR法を用いて間葉系幹細胞の分化決定に関与する転写因子及びサイトカインのmRNA発現量を測定した。

4週間のジャンプトレーニング(最終到達ジャンプ高35cm)により海綿骨骨量は増加し、骨髄脂肪細胞に内包される脂肪滴の数は減少した。ジャンプトレーニングを行った群では、骨表層から離れた骨髄間質に位置した前骨芽細胞と思われるRunx2が発現した軸状の細胞を多数観察した。骨芽細胞の分化に必須なRunx2発現細胞は、ジャンプトレーニングにより増加した。一方で、脂肪細胞分化に必須であるPPAR γ 2発現細胞の数は、両群間に差は認められなかった。トレーニング開始から2週間後にかけてBone morphogenetic protein-4 mRNA発現量の増加が観察された。トレーニング開始から4週間後にRunx2 mRNA発現量の増加が認められた。一方、脂肪細胞分化を調節する転写因子であるPPAR γ 2とCCAAT/enhancer binding protein(C/EBP) α 、C/EBP β 、C/EBP δ mRNA発現量はトレーニング期間を通して変化が認められなかった。

継続的なジャンプトレーニングに伴う骨への力学的ストレス負荷は、間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化を強力に促進することが明らかとなった。しかし、脂肪細胞分化を調節する転写因子の発現量低下は観察されず、低頻度で実施されるジャンプトレーニングはPPAR γ 2及びC/EBPsを介した脂肪細胞分化の抑制を引き起こさない可能性が示唆された。

論文審査の要旨

学位論文は、下肢骨に強い力学的ストレスを加重できるジャンプトレーニングを行わせたラットを対象として、運動トレーニングに伴う力学的ストレスの加重が骨における間葉系幹細胞の分化動態及び骨形態に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。継続的なジャンプトレーニングに伴う骨への力学的ストレス負荷は、間葉系

幹細胞から骨芽細胞への分化を強力に促進することが明らかとなった。しかし、脂肪細胞分化を調節する転写因子の発現量低下は観察されず、低頻度で実施されるジャンプトレーニングはPPAR γ 2及びC/EBPsを介した脂肪細胞分化の抑制を引き起こさない可能性が示唆された。

審査会においては、研究内容及び関連する研究を総括した発表が行われ、続いて発表に対する質疑応答が行われた。