

論文要旨

区分	甲	論文提出者	中嶋宏樹
論文題目	Low concentration of etoposide induces enhanced osteogenesis in MG63 cells via Pin1 activation		
研究目的			
抗がん剤によるDNA損傷反応（DDR）の骨分化誘導への関与を明らかにするために、Etoposide刺激MG63細胞（ヒト前骨芽細胞）における骨分化誘導を検討した。Pin1遺伝子ノックダウン法により、DDR誘導性骨分化への同分子の役割も検討した。			
材料および方法			
1) EtoposideによるDDRの誘導：MG63細胞にEtoposide (0, 0.1, 1, 10 μ M、24時間)で刺激を行い、細胞増殖活性の低下や細胞老化を起こさずにDDRのみが誘導される濃度を検討した。増殖活性はCCK8assay、細胞老化はSA- β -Gal染色、DNA損傷は γ H2AX染色を用いてそれぞれ検索した。2) DDRの骨分化への影響：Etoposide刺激を行ったMG63細胞を骨分化誘導培地 (OIM) で培養してWestern Blotting法 (WB法) により骨分化マーカー (Runx2, Osterix) の検索および、ALP染色による染色性を検索した。3) Pin1の活性化と骨分化誘導についての検討：免疫染色法で軽度のDDRによるPin1活性の違いについて検索した。続いて、Pin1遺伝子をPin1 siRNAを用いてノックダウンし、骨分化マーカーの発現およびALP染色法の染色性を検索し、Pin1の骨分化への関与を検討した。			
結果			
1) 低濃度Etoposide刺激細胞 (0.1 μ M) において、CCK8assayによる増殖活性の低下はみられなかった。免疫染色法において核内の γ H2AXの染色性が亢進した。SA- β -Gal染色ではコントロール群との有意差を認めなかった。2) 低濃度Etoposide刺激細胞において、骨分化マーカーであるRunx2、Osterixの発現上昇を認めた。また、ALP染色の染色性亢進も認めた。3) 低濃度Etoposide刺激細胞では免疫染色法によりPin1の核内移行が明らかになった。Pin1 siRNA群とNC siRNA群でのEtoposide刺激細胞において、Pin1 siRNA投与細胞ではPin1の核内移行が減少し、Pin1、Runx2、Osterixの発現低下が認められた。また、同細胞ではALP染色の染色性も低下した。			
考察			
MG63細胞に対する0.1 μ M Etoposide刺激において、DNA損傷が誘導された。しかし、この濃度では増殖活性の低下や細胞老化は認めなかったことから、同濃度刺激では軽度DDRが誘導されたと考える。また、軽度DDRは骨分化誘導とPin1の活性を亢進させた。Pin1をノックダウンさせると、骨分化マーカーの発現を有意に低下させ、ALP染色法の染色性も低下させた。これらの結果は、DDRにより誘導された骨分化にはPin1の活性化が重要で、活性化したPin1がRunx2などの骨形成の主要な調節因子と直接相互作用する可能性が示唆された。			
結論			
低濃度Etoposide刺激はPin1活性化を介した、DDR誘導性の骨分化を促進する可能性が示唆された。			