

学 位 論 文 題 名

骨芽細胞様 MC3T3-E1細胞に対するヒスタミンの作用

学位論文内容の要旨

【目的】ヒスタミンは肥満細胞や好塩基球の貯蔵アミンである。ヒスタミンは末梢ではI型アレルギーや急性炎症においてその受容体を介して細胞外へ放出され、局所の作用を表す。胃における胃酸分泌そして中枢では神経伝達等の多様な生理学的、病理学的現象における機能する重要なアミンの一つである。また、ヒスタミンは血球系幹細胞の増殖を促進し、これらの細胞の分化も調節している。骨代謝機構においては、ヒスタミンは H_1 受容体を介して破骨細胞を活性化して骨吸収作用を促進させ、 H_2 受容体を介して破骨細胞の遊走を促進させることが報告された。しかし、ヒスタミンの石灰化機構に対する作用については未だ明らかにされていない。本研究は骨芽細胞様 MC3T3-E1 細胞を用いてヒスタミンの骨芽細胞に対する作用について明らかにすることを目的として行った。

【材料と方法】細胞はマウス新生仔頭蓋冠由来骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 (E1) 細胞を用いた。培養は 10%牛胎児血清 (FBS) ならびに L-アスコルビン酸含有 α -MEM 培地を用いて、37°C、5%CO₂、95%気相下にて通法に従い培養した。E1 細胞に対するヒスタミンの短期間作用による影響を調べるため細胞をコンフルエンス後 10、20、30 日目まで培養した後、1%FBS 含有の培地と交換し、さらに 24 時間培養して最終濃度 10^{-4} M ヒスタミンを添加して 72 時間まで処理を行った。また、ヒスタミン長期間作用させた場合の影響を調べるため細胞をコンフルエンスまで培養した後、最終濃度 10^{-4} M ヒスタミンを添加して 3、6、9、12、30 日目さらに培養した。培養終了後細胞はスクロースにて洗浄剥離し、遠心して再懸濁後、氷冷下にて超音波破碎して試料とした。

ヒスタミン拮抗薬とは H_1 受容体拮抗薬であるクロロフェニラミン、 H_2 受容体拮抗薬であるファモチジン、 H_3 受容体拮抗薬であるチオペラミドを用いた。

試料中の蛋白質量は、Lowry 法に従い測定した。

アルカリホスファターゼ (ALP) 活性ならびに酸性ホスファターゼ (ACP) 活性は Bessey 法により、パラニトロフェニルリン酸 (pNPP) を基質として、

反応産生されたパラニトロフェノール (pNP) を 420 nm での吸光度を測定した。ALP、ACP の比活性は 1 mg の蛋白質当たり 1 分間で生成された pNP モル量として算出した。

mRNA の発現は E1 細胞を所定時間刺激後、細胞を回収し、日本ジーン社の ISOGENE を用いて全 RNA 抽出を行い、RT-PCR 法により検出した。

IL-6 産生量は E1 細胞をコンフルエンスまで培養し、最終濃度 10^{-4} M ヒスタミンを添加した培地と交換して更に 3、6、9、12 日培養し、培養液は所定時間培養終了後回収し、遠心分離後、上清を回収し、マウス IL-6 ELISA kit (BioSource) を用いて、ELISA 法により測定した。

【結果】 RT-PCR により E1 細胞に H_1 受容体、 H_2 受容体、 H_3 受容体 mRNA の発現が認められた。E1 細胞にヒスタミンを短期間作用させた場合も長期間作用させた場合も総蛋白質量は変化しなかった。また、ALP 活性及び ACP 活性にも有意な変化は認められなかった。IL-6 産生量はヒスタミン添加により、対照群と比較して初期には抑制されたが、培養開始後 12 日目より増加する傾向を示した。COX-1 mRNA はヒスタミン添加により変化しなかったが、COX-2 mRNA 発現は経時的に二相性の発現の増加を示した。最初は添加後 3 時間まで発現が増加して 6 時間後には減少し、12 時間後から再びその発現は増加した。 10^{-9} ~ 10^{-4} M のヒスタミン添加による COX-2 mRNA の発現は 10^{-7} M を最大とした濃度依存な増加が認められたが、 10^{-4} M では減少した。 H_1 受容体拮抗薬のクロロフェニラミン、 H_2 受容体拮抗薬のファモチジン、または H_3 受容体拮抗薬のチオペラミドをヒスタミンと共に E1 細胞に作用させて、3 時間後にクロロフェニラミンは濃度依存的に COX-2 mRNA の発現を減少したが、ファモチジンとチオペラミドは影響を与えなかった。

【考察】 E1 細胞に H_1 受容体、 H_2 受容体、 H_3 受容体 mRNA の発現が確認された。このことからヒスタミンが骨芽細胞に対して何らかの作用を示すことが示唆された。ヒスタミンを E1 細胞に短期間作用させた場合も長期間させた場合も共に、総蛋白質量に変化は認められなかった。この結果よりヒスタミンは E1 細胞の増殖、細胞外基質合成・分泌に影響を与えないことが示された。ヒスタミンが E1 細胞の石灰化に影響を与えるか否かを推定するために ALP 活性を測定した。その結果、ヒスタミンにより E1 細胞の ALP 活性は変化しなかった。以上結果からヒスタミンは骨芽細胞成熟に対して作用せず、骨形成能に対して影響を与えないことが示唆された。ヒスタミンは各種細胞のサイトカイン産生を調節する作用が有することが知られている。骨芽細胞は IL-6 を産生し、オートクライン的に作用して自らの細胞表面に存在する破骨細胞誘導因子 (ODF/RANKL) の発現を直接的に促進し、プロスタグランジン E_2 (PGE₂) の

産生促進を介して間接的に促進させるほか、破骨細胞前駆細胞に対してパラクラインに作用して分化を促進させることが報告されている。また、我々はヒスタミンを骨芽細胞に作用させると ODF/RANKL の mRNA ならびに蛋白質の発現が増加することを報告した。ヒスタミンを E1 細胞に作用させると初期には IL-6 産生量が抑制されるが、その後増加する傾向が認められた。このことから、ヒスタミンは最初直接的に IL-6 の産生を抑制するが、その後ヒスタミンによる産生が促進される他のサイトカイン等により間接的に IL-6 の産生が促進される可能性や抑制系と促進系で受容体が異なる可能性が推測された。続いて IL-6 同様、破骨細胞活性化に関与する PGE₂ の合成酵素である COX-2 mRNA の発現はヒスタミン刺激により経時的かつ濃度依存的 ($10^{-9} \sim 10^{-7} \text{M}$) に増加した。この結果から骨芽細胞の PGE₂ の産生を促進することが示唆された。次に、ヒスタミンと共に H₁ 受容体拮抗薬のクロルフェニラミン、H₂ 受容体拮抗薬のファモチジン、又は H₃ 受容体拮抗薬のチオペラミドを E1 細胞に作用させると、クロルフェニラミンは濃度依存的に COX-2 mRNA の発現を減少したが、ファモチジンとチオペラミドは影響を与えなかった。この結果より、ヒスタミンの COX-2 mRNA 発現効果は H₁ 受容体を介することが推測される。

【結論】ヒスタミンは骨芽細胞に H₁ 受容体を介して COX-2 mRNA 発現させてプロスタグランジン E₂ 産生を促進し、破骨細胞の分化・活性化を促進させるが、骨芽細胞の増殖や成熟に対しては作用しないことが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 鈴 木 邦 明

副 査 教 授 飯 田 順一郎

副 査 教 授 田 村 正 人

学 位 論 文 題 名

骨芽細胞様 MC3T3-E1細胞に対するヒスタミンの作用

審査は審査担当者が一同に会して約2時間かけて行った。まず申請者に本論文の概要の説明を求め、その後に口頭試問の形式で提出論文の内容及び関連分野について試問した。

申請者は論文の概要を液晶プロジェクターを用いて以下のように説明した。

ヒスタミンは破骨細胞を活性化して骨吸収作用を促進させると報告されているが、石灰化機構に対する作用については未だ明らかにされていない。そこで骨芽細胞様MC3T3-E1細胞を用いてヒスタミンの骨芽細胞に対する作用について明らかにすることを目的として研究を行った。

細胞を通法に従って培養した。ヒスタミンの短期間作用による影響を調べる実験ではコンフルエンス後10、20、30日目まで培養した後、1%FBS含有の培地と交換し、さらに24時間培養したのち最終濃度 10^{-4} Mのヒスタミンを添加してさらに72時間処理した。また、長期間作用の影響を調べる実験では、コンフルエンス時に 10^{-4} Mのヒスタミンを添加して3、6、9、12、30日目までさらに培養した。細胞を回収後、超音波破碎して試料とし、タンパク質量、アルカリホスファターゼ (ALP) 活性ならび酸性ホスファターゼ (ACP) 活性を測定した。mRNAの発現はRT-PCR法により、IL-6産生量はELISA法により測定した。

その結果、E1細胞にはH₁、H₂、H₃3種の受容体mRNAの発現が認められた。E1細胞にヒスタミンを作用させると短期間、長期間にかかわらずタンパク質量、ALP及びACP活性には有意な変化は認められなかった。ヒスタミン添加により、IL-6産生量は初期には抑制されたが、培養開始後12日目より増加する傾向を示した。ヒスタミン添加によりCOX-1 mRNA発現量は変化しなかったが、COX-2 mRNAは添加後3時間まで増加した後6時間後には減少し、12時間後から再び増

加した。 10^{-9} ～ 10^{-4} M のヒスタミンを添加すると、COX-2 mRNA 発現量は 10^{-7} M を最大とした濃度依存的な増加を示し、 10^{-4} M では減少した。COX-2 mRNA の発現量は H_1 受容体拮抗薬のクロロフェニラミンにより濃度依存的に減少したが、 H_2 受容体拮抗薬のファモチジン及び H_3 受容体拮抗薬のチオペラミドによっては影響されなかった。

以上の結果は、ヒスタミンは E1 細胞の増殖や分化、骨形成能に対して影響を与えないことを示唆する。一方、培養後期に IL-6 産生量を増加させること、 PGE_2 の合成酵素である COX-2 mRNA の発現を増加させること、この増加はクロロフェニラミンによって抑制されることから、ヒスタミンは主に骨芽細胞の H_1 受容体を介して破骨細胞の分化・活性化を促進させることを示唆する。

本論文は炎症のケミカルメディエーターであるヒスタミンの骨芽細胞様細胞に対する作用を調べ、骨形成に関する機能には影響を与えないが、骨芽細胞の持つ破骨細胞の誘導、活性化機能を促進することを示唆したものである。炎症と骨吸収の間には密接な関連があることは臨床的にも良く知られた事実であるが、両者と炎症のケミカルメディエーターの関連については不明な点が多い。ヒスタミンが骨芽細胞の骨吸収関連生理活性物質の産生を促進するという本論文の結果は、今後の炎症と骨吸収に関する研究に大きく貢献するものと高く評価される。

口頭試問において、審査担当者から

- 1) ヒスタミンの H_1 、 H_2 、 H_3 各受容体の違いと E1 細胞における機能の違い
- 2) ヒスタミンの生体における作用濃度と本研究で用いた濃度との関連
- 3) IL-6 の産生が初期に抑制され、後期に増加する理由
- 4) 骨芽細胞における酸性ホスファターゼ活性測定の意義
- 5) 細胞の増殖、分化とタンパク質量の関係
- 6) FBS 濃度とヒスタミン処理の関係
- 7) その他、実験方法の詳細について
- 8) 今後この研究を進めていく方向性

などの試問がなされたが、いずれに対しても明快な回答が得られた。以上から申請者は本研究に直接関係する事項のみならず、関係分野における広い知識を有していると認められた。よって審査担当者は、口頭試問の結果に合格の評価を与え、申請者は博士（歯学）の学位を授与される資格を十分に有するものと認めた。