

学 位 論 文 題 名

Effect of Interleukin 1β on clonal osteoblast-like cell

（骨芽細胞様細胞株に対するインターロイキン 1β の作用）

学位論文内容の要旨

【背景と目的】

生体に対する傷害性の刺激や細菌感染などに対する防御反応である炎症において、種々のケミカルメディエータが産生される。IL- 1β は骨芽細胞に作用して RANKL (receptor activator of NF- κ B ligand) の発現を促すことにより破骨細胞の形成を促進するという報告や、直接破骨細胞の分化や機能を制御するという報告から骨吸収に深く関連していると推測されるが、骨形成に対する作用についての報告は少ない。そこで IL- 1β の石灰化への作用の一端を明らかにするために骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 細胞（E1 細胞）を用いて、硬組織石灰化マーカーであるアルカリ性ホスファターゼ（ALP）活性ならびに mRNA 発現を指標として石灰化への影響を検討した。

【材料と方法】

細胞培養： マウス頭蓋冠由来骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 細胞（E1 細胞）は 10% FCS 含有 α -MEM を用い、37℃、5%CO₂ の気相下で通法に従い培養した。コンフルエンス後 14 日目に、種々濃度の IL- 1β にて所定時間、処理を行った。

蛋白質定量： Lowry 法に従い測定した。

ALP 活性測定： IL- 1β 0、50、100、200、400 (unit/ml) にて 3 日あるいは 6 日間処理を行い、*p*-nitrophenylphosphate (*p*-NPP) を基質とした Bessay 法に従い測定した。

ALP mRNA の発現： E1 細胞を IL- 1β 0、25、50、75、100 (unit/ml) で 6 時間処理し、total RNA を抽出して RT-PCR 法により検出した。

オステオカルシンの産生量測定： 培養液を Biomedical Technologies 社の抗体と ¹²⁵I 標識オステオカルシンを用い、Radioimmunoassay (RIA 法)により測定した。

IL-6 及び PGE₂ 産生量測定： IL-6 はマウス IL- 1β 0、50、100、200、400 (unit/ml) で 3 日及び 6 日間処理を行った。PGE₂ 測定では 0、1000 (unit/ml) で 3 日及び 6

日間処理を行った後に培養上清を回収し、Mouse IL-6 および PGE₂ ELISA Kit (BioSource) を用い ELISA 法により行った。

COX-1 及び COX-2 の発現：E1 細胞を IL-1 β 0、25、50、75、100(unit/ml) で 2、4、6 時間処理した後、Lysis Buffer にて回収した。COX-1 の発現は 20 μ g の全蛋白質を SDS-PAGE 電気泳動し、PVDF 膜に転写した後、anti-mouse monoclonal COX-1 antibody を用いてウエスタンブロッティング法により検出した。COX-2 の発現は前述した細胞抽出物を用いてアガロース結合 anti-goat polyclonal COX-2 antibody で免疫沈降した後、anti-goat polyclonal COX-2 antibody を用いてウエスタンブロッティングを行い、検出した。

細胞の形態学的所見：E1 細胞をコンフルエンス時まで通法に従い培養、種々濃度の IL-1 β を添加後、30 日間培養を行い、von Kossa 染色により E1 細胞の石灰化状態を観察した。

【結果】

E1 細胞の総蛋白量は対照群との有意な差は認められなかった。骨芽細胞の分化および石灰化のマーカー酵素である ALP 活性は IL-1 β 処理により 3 日間処理では 100 unit/ml より、6 日間処理では 200 unit/ml より濃度依存的な低下を示した。また、3 日間より 6 日間での減少量が大きく、経時的な低下も示した。ALP mRNA の発現は IL-1 β 処理により濃度依存的に減少した。さらに ALP と同様に骨芽細胞のマーカーであるオステオカルシン産生量は IL-1 β 処理により濃度依存的、経時的な低下を示した。

PGE₂ 産生量は IL-1 β 処理により顕著な増加を示した。IL-1 β 処理により COX-2 は 2 時間後より誘導され、4 時間で最大となった。さらにこの発現は濃度に依存して増加し、75 unit/ml 処理で最大となった。一方、COX-1 の発現は IL-1 β 処理により変化は認められなかった。

E1 細胞に IL-1 β をコンフルエンス後より 30 日間作用させ、von Kossa 染色すると IL-1 β 無添加ではコンフルエンス後 14 日より石灰化結節を形成し、培養継続により結節数は増加した。一方、IL-1 β 処理群では結節数は濃度依存的に減少した。IL-6 産生量は IL-1 β 処理により 0~400 unit/ml で濃度依存的に増加した。また、処理後 3 日間、6 日間で経時的な増加を示した。

【考察】

IL-1 β を E1 細胞に作用させても総蛋白質量に影響を与えなかった。このことは IL-1 β が細胞の増殖や細胞外基質蛋白に影響を与えないことを示唆する。また、本研究において IL-1 β により E1 細胞の ALP 活性が低下し、さらに ALP mRNA 発現量が減少した。この結果は IL-1 β が ALP 蛋白質合成過程の mRNA 発現までの段階で抑制し、結果として ALP 蛋白質量が低下して見かけの活性も

低下しことを示唆する。PGE₂ はオートクライン的に作用し ALP 活性を低下させることが報告されている。本研究において IL-1 β 処理により PGE₂ 産生量が増加した。さらに PGE₂ 合成酵素である COX-2 の発現も誘導された。以上より、IL-1 β は COX-2 を誘導することで PGE₂ 産生量を増加させ、ALP 活性を低下させることが示唆された。さらに IL-1 β はその濃度に依存して E1 細胞が形成する石灰化結節量を減少させた。また IL-1 β は ALP と同じく骨芽細胞のマーカーとされるオステオカルシン産生量も低下させた。

IL-1 β による石灰化抑制には COX-2 誘導により PGE₂ 産生量が増加し、オートクライン的に作用することで ALP mRNA の合成を低下させ、ALP 蛋白質合成が低下する。その結果として ALP 活性の低下、オステオカルシン合成の低下が一因となっていることが以上の結果から示唆された。炎症性サイトカインである IL-6 は破骨細胞の活性化に関与し骨吸収を促進することで知られている。本研究においても IL-1 β 添加により IL-6 産生が増大した。この結果は IL-1 β 処理により E1 細胞から産生された IL-6 により破骨細胞が活性化され骨吸収が促進する経路も成立することを示唆する。

【結論】

本研究において、IL-1 β は骨芽細胞様細胞である MC3T3-E1 細胞の石灰化を抑制することを von Kossa 染色の結果から明確に示した。これに伴い、骨芽細胞のマーカーとされる ALP 活性が低下し、オステオカルシン量も減少した。ALP 活性の低下は COX-2 の誘導による PGE₂ 産生の増加と ALP mRNA 合成低下による ALP 蛋白合成の低下が原因である可能性が示唆された。一方で IL-1 β は E1 細胞の IL-6 産生量を増加させた。これらの結果から IL-1 β は従来知られている破骨細胞活性化因子の産生促進のみではなく、直接骨芽細胞の石灰化能を抑制することによっても骨吸収を促進することが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 大 畑 昇

副 査 教 授 鈴 木 邦 明

副 査 教 授 田 村 正 人

学 位 論 文 題 名

Effect of Interleukin 1β on clonal osteoblast-like cell

(骨芽細胞様細胞株に対するインターロイキン 1β の作用)

審査は 審査委員が一同に会し、申請者から論文についての概要を説明させた後、各審査委員から口頭試問の形式で行われた。以下に、提出論文の要旨と審査の内容を述べる。

【目的】 インターロイキン (IL) -1β は炎症時に発現レベルが上昇し、その作用は炎症・免疫反応をはじめとして広範囲にわたり多様な生理活性を有するサイトカインとして知られている。IL- 1β は骨代謝機構において重要な役割を演じていることが知られており、骨吸収に深く関連していると考えられているが、骨形成に対する作用についての報告は少ない。そこで IL- 1β の石灰化への作用の一端を明らかにすることを目的として、骨形成機能を反映すると考えられるアルカリ性ホスファターゼ (ALP) 活性およびオステオカルシン (OC) 産生量、破骨細胞の活性化を促進する IL-6 やプロスタグランジン E_2 (PGE_2) の産生、について検討、解析を行った。

【材料と方法】 骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 (E1) 細胞は 10% 牛胎児血清 (FBS) 含有 α MEM 培地を用いて通法に従いコンフルエンス後 14 日目まで培養し、1% FBS 含有の培地と交換してさらに 24 時間培養した後に種々の濃度の IL- 1β で処理した。一定時間経過後、細胞および培養液を回収し、蛋白質量、ALP 活性とその mRNA 発現量、OC 産生量、 PGE_2 産生量、IL-6 産生量、さらにシクロオキシゲナーゼ 1 (COX-1) および 2 (COX-2) 産生量を測定した。

【結果および考察】 IL- 1β 処理により E1 細胞の総蛋白質量には変化が認められなかった。ALP 活性は IL- 1β 処理 3、6 日後と経時的に減少するとともに、処理した濃度にも依存して減少した。ALP mRNA 発現は 200 unit/ml まで濃度依存的に減少した。OC 量は IL- 1β 処理後 6 日目において有意な減少が認められた。また石灰化結

節を von Kossa 染色により観察したところ IL-1 β 処理濃度に依存した石灰化結節形成の減少が観察された。PGE₂ 量は IL-1 β 処理により3日後には顕著な増加を示した。IL-6 量は IL-1 β 処理により濃度依存的かつ経時的に増加した。COX-2 の発現は濃度依存的増加を示し、75 unit/ml で最大に達した。さらに、その発現は 50 unit/ml の IL-1 β 処理により経時的に増加し、処理後 4 時間で最大となった。一方、IL-1 β は COX-1 の発現には影響を与えなかった。以上の結果から、IL-1 β は E1 細胞に作用し石灰化を抑制することが示唆され、また ALP 活性の低下は COX-2 の誘導による PGE₂ 産生の増加と、ALP mRNA 発現低下による ALP タンパク合成の低下が原因である可能性が示唆された。一方で、IL-1 β は IL-6 などの炎症性サイトカインの放出を促して硬組織吸収促進に作用することが示唆された。

【結論】IL-1 β は従来知られている破骨細胞活性化因子の産生促進のみだけではなく、直接骨芽細胞の石灰化能を抑制することによっても骨吸収を促進することが示唆された。

各審査委員が行った主な質問事項は以下の通りである。

- 1) IL-6 と PGE₂ を測定した理由について
- 2) ALP 活性に対する IL-1 β の作用において3日間処理と6日間処理では活性減少の濃度が異なる理由について
- 3) ALP 活性の低下と ALP mRNA 発現減少の時間経過が異なっていることについて
- 4) IL-1 β 処理時間及び処理濃度が実験によって異なった理由について
- 5) 細胞ではなく培養液中のオステオカルシンを測定した理由
- 6) COX-1 の生理的な意義について
- 7) COX-2 の誘導が確認されたが COX-2 の活性と相関関係について
- 8) IL-1 β と骨粗鬆症の関係について
- 9) 顎関節症における炎症の IL-1 β の関与について
- 10) 本研究の結果が今後どのように臨床に反映されるか

これらの質問に対して、論文申請者からの明解な回答ならびに説明が得られ、さらに今後の研究においても明確な方向性をもっていると判断した。

審査委員は全員、本研究が学位論文に十分値し、申請者が博士（歯学）の学位を授与される資格を有するものと認めた。