

免疫抑制物質 APC0576のヒト骨肉腫由来 MG-63
細胞培養系におけるケモカインならびに
マトリックスメタロプロテアーゼ遺伝子の発現抑制

学位論文内容の要旨

【緒言】

免疫抑制効果を有する薬剤のうちいくつかの薬剤は、副作用として骨に対しても作用し全身の骨量の減少をもたらすことが知られている。例えば、カルシニューリン阻害を作用機序とするシクロスポリンやタクロリムスは、動物実験において用量依存的な骨量減少が報告されている。2002年 Takehana らはヒト臍帯静脈内皮細胞において IL-1 β による NF- κ B の活性化阻害を指標としてスクリーニングを行い、新規化合物 APC0576 を同定した。この物質は免疫抑制作用を有するとの報告もあるが、その詳細な作用の分子機構は不明であり、また骨に対する作用についても明らかではない。本研究ではヒト骨肉腫由来の骨芽細胞様細胞である MG-63 細胞の培養系を用いて APC0576 が種々の遺伝子発現についてどのような影響を及ぼすかを調べ、骨芽細胞に対する作用を明らかにすることを目的とした。

【材料と方法】

MG-63 細胞を 10%ウシ胎児血清 (FBS), 100 μ g/ml カナマイシン, 2 mM L-グルタミン酸含有 minimum essential medium alpha (α -MEM) を用いて、100 mm 細胞培養用ディッシュにて 37°C, 5%CO₂, 95%気相下で培養を行った。培地は 3 日毎に交換した。細胞がコンフルエントに達した後、1%FBS 含有 α -MEM に交換し、炎症性サイトカイン IL-1 α ならびに APC0576 を添加し培養を行った。経時的に RNA を抽出し RT-PCR 法およびリアルタイム定量 RT-PCR 法を用い、各種 mRNA の発現量を調べた。また、APC0576 の MG-63 細胞に対する細胞障害性などを調べるために、APC0576 を添加して培養し MTT 法を用いてその生細胞数を測定した。培養上清中の IL-8 タンパク量は、細胞の培養上清を採取し

human IL-8 immunoassay kit を用いて測定した。

【結果】

IL-1 α (0.2 ng/ml) を添加して 12 時間後の MG-63 細胞では、ケモカインである IL-8, MCP-1, マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) である MMP-1, MMP-3, OPG ならびに M-CSF の mRNA 量は増加した。このとき同時に 10 μ M APC0576 を加えて培養したところ、IL-8, MCP-1, MMP-1, MMP-3 ならびに OPG の mRNA 量は IL-1 α 単独で添加した場合と比べて増加量は少なかった。また、MG-63 細胞において APC0576 は M-CSF, α 1 (I) プロコラーゲン, オステオカルシンならびにオステオネクチンの mRNA 発現量を変化させなかった。APC0576 を 10 μ M 以上添加し 48 時間培養した場合、生細胞数が減少した。APC0576 の添加の有無にかかわらず IL-1 α を添加し 48 時間培養後の培養上清中の IL-8 タンパク量には違いは認めなかった。

【考察】

これまで APC0576 の作用機序については、NF- κ B を標的とし NF- κ B 依存性転写活性を抑制することが報告されている。IL-8, MCP-1, MMP-1 ならびに MMP-3 遺伝子の IL-1 α による発現誘導にはいずれも NF- κ B の関与が報告されていることから、本研究においても APC0576 は NF- κ B を介する転写活性化を抑制した可能性が考えられる。OPG 遺伝子の IL-1 α による発現誘導を APC0576 は完全に抑制したことから、この発現誘導に関わるシグナル伝達経路を APC0576 は標的としうるということが推察された。これまで OPG 遺伝子の転写活性化には p38 MAPK の関与を示唆する報告もあり、本研究において APC0576 は MG-63 細胞の p38 MAPK に対しても作用しその経路を阻害した可能性が考えられた。

α 1 (I) プロコラーゲン, オステオカルシンならびにオステオネクチンといった骨芽細胞の産生するマトリックスタンパク質遺伝子の発現調節においては NF- κ B の関与は現在まで報告されていない。本研究において APC0576 はこれらの mRNA 量に変化を及ぼさなかったことから、MG-63 細胞においてこれらの遺伝子発現を調節するシグナル経路には NF- κ B を含む APC0576 の標的となる分子が関与していないものと考えられた。

MMP の産生を APC0576 が抑制したことは、骨吸収過程の一部を担う骨芽細胞が関与するマトリックスタンパク質の分解の抑制に作用しうる可能性を示唆すると考えられた。また、APC0576 が炎症時において炎症性細胞の走化性を誘導する IL-8 ならびに MCP-1 の産生を抑制したことは、骨組織において抗炎症

作用の一部を有していることも考えられた。マトリックスタンパク質の mRNA 量を変動させなかったことと併せて考えると、APC0576 は骨芽細胞に対しては比較的副作用の少ない物質と推察された。しかしながら、APC0576 が 10 μ M 以上の条件では MG-63 細胞の生細胞数の減少が認められたことから、高濃度の APC0576 は細胞に対して障害性を有するもしくはアポトーシスを誘導するという作用を有するかもしれない。また APC0576 による IL-8 mRNA の減少が 48 時間後には認められなかったことや培養上清中の IL-8 タンパク質のレベルに変化が認められなかったことから、その作用時間は比較的短時間である可能性も考えられた。APC0576 の破骨細胞に対する作用や個体レベルで骨量にどのような影響を及ぼすかについて、さらなる研究が必要と考えられた。

【結論】

APC0576 は、MG-63 細胞に対して IL-1 α により誘導された IL-8, MCP-1, MMP-1, MMP-3 ならびに OPG の mRNA 量を減少させる作用を有することが明らかとなった。これらより、APC0576 は、骨組織に対しては、骨芽細胞が関与するマトリックスタンパク質の分解の抑制ならびに抗炎症作用の一部を有している可能性が示唆された。一方、APC0576 は、M-CSF, α 1 (I) プロコラーゲン, オステオカルシンならびにオステオネクチン mRNA 量は変化させず、APC0576 は骨芽細胞のマトリックスタンパク質の産生には影響を及ぼさないことが推察された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 戸 塚 靖 則
副 査 教 授 田 村 正 人
副 査 教 授 鈴 木 邦 明

学 位 論 文 題 名

免疫抑制物質 APC0576のヒト骨肉腫由来 MG-63

細胞培養系におけるケモカインならびに

マトリックスメタロプロテアーゼ遺伝子の発現抑制

審査は、審査員全員出席の下に、申請者に対して提出論文とそれに関連した学科目について口頭試問により行われた。

審査論文の概要は、以下の通りである。

本研究は、NF- κ B の活性化を抑制することにより免疫抑制作用を発揮する物質である APC0576 の骨芽細胞への作用を明らかにするために、ヒト骨肉腫由来の骨芽細胞様細胞である MG-63 細胞の培養系を用いて、APC0576 の遺伝子発現に及ぼす影響について検討したものである。

MG-63 細胞を 10%ウシ胎児血清 (FBS), 100 μ g/ml カナマイシン, 2 mM L-グルタミン酸含有 minimum essential medium alpha (α -MEM) を用いて、細胞培養用ディッシュにて 37°C, 5%CO₂, 95%気相下で培養した。培地は 3 日毎に交換した。細胞がコンフルエントに達した後、1%FBS 含有 α -MEM に交換し、炎症性サイトカイン IL-1 α ならびに APC0576 を添加し培養を継続した。経時的に RNA を抽出し RT-PCR 法およびリアルタイム定量 RT-PCR 法を用い、各種 mRNA の発現量を調べた。また、APC0576 の MG-63 細胞に対する細胞障害性を調べるために、APC0576 を添加して培養し MTT 法を用いてその生細胞数を測定した。さらに、細胞の培養上清を採取し human IL-8 immunoassay kit を用いて、培養上清中の IL-8 タンパク量を測定した。

IL-1 α (0.2 ng/ml) を添加して 12 時間後の MG-63 細胞では、ケモカインである IL-8, MCP-1, マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) である MMP-1, MMP-3, ならびに OPG や M-CSF の mRNA 量は増加した。同時に 10 μ M APC0576 を加えて培養した場合は、IL-8, MCP-1, MMP-1, MMP-3 ならびに OPG の mRNA 量は IL-1 α 単独で添加した場合に比べて増加量は少なかった。一方、APC0576 は、MG-63 細胞において、

M-CSF, $\alpha 1$ (I) プロコラーゲン, オステオカルシンならびにオステオネクチンの mRNA 発現量を変化させなかった. APC0576 を 10 μ M 以上添加し, 48 時間培養した際に, 生細胞数は減少した. IL-1 α 添加, 48 時間培養後の培養上清中の IL-8 タンパク量は, APC0576 の添加の有無にかかわらず, 違いはなかった.

これまで APC0576 の作用機序については, NF- κ B 依存性転写活性を抑制することが報告されている. IL-8, MCP-1, MMP-1 ならびに MMP-3 遺伝子の IL-1 α による発現誘導にはいずれも NF- κ B の関与が報告されていることから, 本研究結果においても, APC0576 が NF- κ B を介する転写活性化を抑制した可能性が考えられる. また OPG 遺伝子の IL-1 α による発現誘導を APC0576 が完全に抑制したことから, APC0576 はこの発現誘導に関わるシグナル伝達経路を標的としうることが推察された.

一方, $\alpha 1$ (I) プロコラーゲン, オステオカルシンならびにオステオネクチンといった骨芽細胞の産生するマトリックスタンパク質遺伝子の発現調節においては NF- κ B の関与は現在まで報告されていない. 本研究において, APC0576 はこれらの mRNA 量に変化を及ぼさなかったことから, MG-63 細胞においてこれらの遺伝子発現を調節するシグナル経路には NF- κ B を含め APC0576 の標的となる分子が存在していないものと考えられた.

これらの結果は, APC0576 は, 骨組織に対して, 骨芽細胞が関与するマトリックスタンパク質の分解の抑制ならびに抗炎症作用の一部を有する可能性はあるものの, 骨芽細胞に対しては比較的副作用の少ない物質であることを示唆している. ただし, 10 μ M 以上の条件では MG-63 細胞の減少が認められ, 高濃度では細胞障害性を有することも示された.

論文の審査にあたって, 論文申請者による研究の要旨の説明後, 本研究ならびに関連する研究について質問が行われた.

主な質問事項は, 1) IL-1 α 添加により, mRNA レベルでは IL-8 が増加したのに, タンパクレベルでは増加しなかったのは何故か, 2) NF- κ B の役割は, 3) NF- κ B は慢性炎症の際にも働いているのか, 4) 臓器移植時に免疫抑制剤とステロイド剤が併用されるのは何故か, 5) APC0576 はシクロスポリンと構造が類似しているのか, 6) MG-63 細胞は石灰化能を有しているのか, 7) RT-PCR 法とリアルタイム定量 RT-PCR 法でプライマーが異なるのは何故か, 8) 免疫抑制剤の作用機序は, 等であった.

いずれの質問についても, 論文申請者から明快な回答が得られ, また将来の研究の方向性についても具体的に示された.

本研究は, APC0576 は, 骨組織に対して, 骨芽細胞が関与するマトリックスタンパク質の分解の抑制ならびに抗炎症作用の一部を有する可能性はあるものの, 骨芽細胞に対しては副作用が比較的少なく, 従来の免疫抑制薬に比べて骨代謝への影響が少ない物質であることを明らかにした点が高く評価された. 本研究の業績は, 口腔外科の分野はもとより, 関連領域にも寄与するところ大であり, 博士 (歯学) の学位授与に値するものと認められた.