

氏名	久保 克行
学位	博士
専門分野の名称	歯学
学位授与番号	博甲第4519号
学位授与の日付	平成24年3月23日
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科病態制御科学専攻 (学位規則(文部省令)第4条第1項該当)
学位論文題目	IL-6 および可溶性 IL-6 受容体が前破骨細胞の分化方向におよぼす影響ならびに IL-1ra が骨改造関連サイトカイン産生性におよぼす影響に関する研究
学位論文審査委員	教授 山本 敏男 教授 高柴 正悟 准教授 久保田 聡

学位論文内容の要旨

【緒言】

炎症部位で産生が亢進しているインターロイキン (IL) -1, IL-6 等の炎症性サイトカインは、骨芽細胞を介して破骨細胞の成熟化を誘導し、骨代謝の不均衡を引き起こす。IL-6 は慢性関節リウマチや歯周炎等の慢性炎症性疾患の病態進展に深く関与する炎症性サイトカインの一つとして考えられており、従来、IL-6 は破骨細胞分化を促進すると考えられてきた。しかし、近年、IL-6 は破骨細胞分化を抑制するという従来の知見とは異なる研究結果が報告されている。すなわち、IL-6 が破骨細胞分化におよぼす影響は不明な点が多い。また、IL-6 の作用を検討する上でアゴニスト作用を有する可溶性 IL-6 受容体 (sIL-6R) の効果を検討する必要があるが、破骨細胞分化における sIL-6R の作用について報告した研究は少ない。

IL-1 が骨芽細胞に作用すると、IL-6 の産生を誘導することで新たな炎症反応が惹起される。また、RANKL のデコイレセプターである osteoprotegerin (OPG) の産生を抑制することで、骨代謝のバランスが崩れ、骨吸収が亢進される。このような背景から炎症性骨吸収の制御を考える上で IL-1 シグナル経路を検討することは重要である。IL-1 receptor antagonist (IL-1ra) は、IL-1 に対して拮抗作用を有しており、既に治療薬として慢性関節リウマチに対して臨床応用されている。よって、歯周炎治療に対しても IL-1ra は応用できると考える。

以上のような背景から、炎症性骨吸収の病態メカニズムにおいて、IL-6 が破骨細胞分化に及ぼす影響は不明な点が多く、さらにアゴニストとしての sIL-6R の効果も不明である。そして骨芽細胞において IL-1 誘導性の OPG と IL-6 産生に着目することによって、IL-1 と IL-6 による骨代謝バランスの傾倒を制御することが可能となれば歯周治療に応用できると考えた。よって本研究は、IL-6 が、sIL-6R の存在下で骨代謝 (主として破骨細胞分化) に及ぼす影響と、骨芽細胞における IL-1 誘導性の IL-6 および OPG 産生性に対する IL-1ra の効果を検討することを目的とした。

【材料・方法】

1. 試薬：リコンビナントマウス (rm) IL-1 α , rmIL-1 β , rmIL-6, rmsIL-6R, および rmRANKL は、R&D Systems から購入した。ラット由来抗 F4/80 モノクローナル IgG 抗体は、Abcam から購入した。
2. 細胞および培養：マウス単球系細胞 RAW264.7 やマウス骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 は、理化学研究所 Cell Bank から購入した。培養は、ウシ胎児血清 (Invitrogen) を 10% の割合

に含み, RAW264.7 は α -MEM (Invitrogen), MC3T3-E1 は α -MEM (Sigma) を用いて, 37 °C, 5 % CO₂ 存在下で行った。

3. 破骨細胞分化の検討: rmIL-6 および rmsIL-6R が RANKL 誘導性の破骨細胞分化におよぼす影響を検討するため, TRAP 染色法を用いて, 陽性細胞数を光学顕微鏡下で計測した。
4. マクロファージ分化の検討: rmIL-6 および rmsIL-6R が RANKL 誘導性の破骨細胞分化時に F4/80 の発現におよぼす影響を検討するため, 蛍光免疫染色法を用いて, 蛍光顕微鏡下で観察した。
5. カテプシン K mRNA 発現の検討: rmIL-6 および rmsIL-6R が RANKL 誘導性の破骨細胞分化時のカテプシン K mRNA の発現におよぼす影響を確認するため, real-time RT-PCR 法を用いて検討した。
6. サイトカイン産生性の検討: RAW264.7 において, rmIL-6 および rmsIL-6R が RANKL 誘導性破骨細胞分化時のサイトカイン (CXCL2, CCL2, IL-4, IL-12) 産生性におよぼす影響を検討するため, ELISA 法を用いた。また, MC3T3-E1 において, IL-1ra が IL-1 α または IL-1 β 誘導性の OPG と IL-6 産生性におよぼす影響を検討するために, ELISA 法を用いた。
7. 統計処理: 各実験系における有意差は, 対応のない群間の Student's *t*-test を用いて検定した。なお, *p* 値が 0.05 以下をもって有意差ありと判定した。

【結果】

RAW264.7 において, RANKL 誘導性の破骨細胞分化時に IL-6 および sIL-6R は, 以下の 4 点を示した。

1. TRAP 陽性細胞数を減少させた
2. カテプシン K mRNA 発現を減少させた
3. F4/80 発現を増加させた
4. CXCL2 産生を亢進した

MC3T3-E1 において, IL-1ra は, 以下の 1 点を示した。

5. IL-1 α または IL-1 β 誘導性の OPG 産生抑制を回復し, IL-6 産生亢進を抑制した

【考察】

sIL-6R 存在下で IL-6 が破骨細胞への分化を強く抑制することを, TRAP 陽性細胞数の減少, カテプシン K mRNA の発現減少の両面から観察した。sIL-6R のアゴニスト作用を発揮する背景として, 破骨細胞は細胞膜上に IL-6R だけでなく膜タンパク質 gp130 を発現している。すなわち, IL-6 単独で IL-6R と結合して作用するだけでなく, IL-6 および sIL-6R の複合体が破骨細胞膜上の gp130 と結合して作用した。よって, sIL-6R は IL-6 のアゴニストとして作用したと考える。また, F4/80 の発現においても, IL-6 および sIL-6R は F4/80 の発現を増加したことから, 破骨細胞の分化を抑制するという病態よりはマクロファージ分化による炎症反応の悪化に関与していると考えられる。

IL-6 および sIL-6R が RANKL 誘導性の破骨細胞分化時に周囲の細胞へ与える影響を検討すると, CXCL2 の産生亢進を確認した。すなわち, 炎症叢周囲に存在する炎症性細胞 (好中球や T 細胞) の走化性を亢進することによって, さらなる炎症の悪化に関与すると考えられる。

MC3T3-E1 に IL-1 α または IL-1 β を作用させると, OPG 産生が抑制され, IL-6 産生が亢進したことを確認した。IL-1ra は IL-1 誘導性 OPG 産生抑制を回復し, IL-6 産生亢進を抑制した。本結果から, IL-1ra は骨代謝において IL-1 を起点とした炎症の悪化を抑制することが期待できると考える。

【結論】

IL-6 および sIL-6R は, マウス単球系細胞 RAW264.7 における RANKL 誘導性の破骨細胞分化を抑制し, F4/80 陽性マクロファージ分化を増加し, CXCL2 の産生亢進に作用する。また, IL-1ra は IL-1 誘導性 OPG 産生抑制を回復し, IL-6 産生亢進を抑制する。

学位論文審査結果の要旨

Interleukin (IL) -1 や IL-6 等の炎症性サイトカインは、骨芽細胞を介して破骨細胞の成熟化を誘導し、骨改造の不均衡を引き起こす。従来、IL-6 は破骨細胞への分化を促進すると考えられてきたが、近年、IL-6 は破骨細胞への分化を抑制するという研究結果が報告されている。一方、IL-6 の作用を検討する上でアゴニスト作用を有する可溶性 IL-6 受容体 (sIL-6R) の効果を検討する必要があるにもかかわらず、破骨細胞への分化に対する sIL-6R の作用について報告した研究は少ない。

骨芽細胞において、IL-1 は receptor activator of nuclear factor κ B ligand (RANKL) のデコイレセプターである osteoprotegerin (OPG) の産生を抑制することで、骨改造のバランスを崩し、骨吸収を亢進する。また、IL-1 は IL-6 の産生を誘導し、新たな炎症反応を惹起する。このような背景から、炎症性骨吸収の制御を考える上で、IL-1 が生む効果を包括的に検討することは重要である。

本研究は、IL-6 が sIL-6R の存在下で破骨細胞への分化におよぼす影響と、IL-1 に対して拮抗作用を有する IL-1 receptor antagonist (IL-1ra) が骨芽細胞における IL-1 誘導性の IL-6 および OPG 産生におよぼす効果を検討することを目的としている。

研究結果は、以下の内容であった。

- 1) マウス単球系細胞である RAW264.7 において、IL-6 および sIL-6R は、RANKL によって誘導された破骨細胞への分化時に、
 - ① tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) 陽性細胞数を減少させた ($p < 0.05$)。
 - ② カテプシン K mRNA の発現を抑制した ($p < 0.05$)。
 - ③ マクロファージ分化マーカーの一つである F4/80 の発現を増加させた。
 - ④ ケモカインの CXCL2 と CCL2 の産生を亢進した ($p < 0.05$)。
- 2) マウス骨芽細胞様細胞である MC3T3-E1 において、IL-1ra は
 - ① IL-1 誘導性の OPG 産生抑制を回復させた ($p < 0.05$)。
 - ② IL-1 誘導性の IL-6 産生亢進を抑制させた ($p < 0.05$)。

以上のことから、IL-6 は sIL-6R 存在下で破骨細胞への分化を強く抑制し、マクロファージへの分化を促進することを確認した。その一方で IL-6 と sIL-6R の複合体が破骨細胞への分化を抑制する際にケモカインの産生を誘導することによって炎症性細胞 (好中球, T 細胞, マクロファージ等) の走化性を亢進し、骨吸収につながるさらなる炎症の悪化に関与する別の可能性をも示唆した。また、IL-1ra による IL-1 誘導性 IL-6 および OPG の産生を制御することによって歯周治療に応用できる可能性を示唆した点は、新しい知見である。

以上に基づき、審査委員会は本申請論文に博士 (歯学) の学位論文として価値があるものと認めた。