

1,25-DihydroxyvitaminD₃による ヒト骨肉腫細胞 MG63からの insulin-like growth factor binding protein 3 の産生増加

岡山大学医学部小児科学教室 (指導: 清野佳紀教授)

守 分 正

(平成 3 年12月26日受稿)

Key words : 1,25 (OH)₂D₃, insulin-like growth factor binding protein 3, human osteosarcoma cell line MG63

緒 言

細胞の分化増殖因子のひとつである insulin-like growth factor (IGF) には幾つかの特異的な結合蛋白 (insulin-like growth factor binding proteing : IGFbps) が存在する¹⁾。そのうち、IGFBP-3²⁾は血中に最も大量に存在する IGFBP で、GH 依存的にその血中濃度が変化し、GH 作用に促進的な作用を有する可能性があり、GH-IGF-I 系において重要な役割を担っていると考えられている蛋白である³⁾。

成長ホルモン (GH) の骨成長促進作用は局所において産生されている IGF-I が仲介していると考えられている^{4,5)}。しかし IGFBP-3 も、IGF-I と同様、線維芽細胞、骨芽細胞をはじめとする末梢組織由来の培養系での産生が確認され、GH 以外にも transforming growth factor β (TGF- β)⁶⁾、epidermal growth factor (EGF)⁷⁾などの因子による産生亢進作用が次々と報告されている。これらの因子は IGFBP-3 を介して、GH-IGF-I 系の作用を促進する可能性⁸⁾があり、IGF-I と他の生理活性物質の相互作用を検討する場合に IGFBP の要素も同時に検討する必要があると考えられる。

1,25-DihydroxyvitaminD₃ (1,25-(OH)₂D₃) は骨芽細胞の分化に重要な因子の一つである。1,25-(OH)₂D₃ と IGF-I は骨芽細胞由来細胞株においてそのアルカリフォスファターゼ活性

促進に関して、協同的に作用すると報告されている⁹⁾が、1,25-(OH)₂D₃ と IGFBP との関係を検討した報告はなく、1,25-(OH)₂D₃ と IGF-I の相互作用の機序解明の一段階として、今回骨由来の細胞系で IGFBP-3 に対する1,25-(OH)₂D₃ の影響を検討した。

対象と方法

細胞培養

ヒト骨肉腫細胞 MG63 (American Type Culture Collection, USA) 2 × 10⁵/well を24 穴 multi-culture plate にて、10%牛胎児血清 (FCS, Irvine, USA) 添加 α -minimal essential medium (α MEM, Gibco, USA) を用いて3日間、subconfluent state まで培養した。その後、種々の濃度の1,25-(OH)₂D₃を加えた2%あるいは10% FCS 加 α MEM に変更し、以下の実験を行った。

抗血清の作成

IGFBP-3 の acid stable β subunit に対する抗血清を家兔を免疫して作成した。すなわち、New Zealand White Rabbit に recombinant human IGFBP-3 β subunit peptide (Biogrowth, USA) 150 μ g を Freund's complete adjuvant と共に3回皮下注し、Enzyme-linked immunosorbent assay による抗体価が15000倍になった抗血清を実験に利用した。

免疫細胞化学

上記 MG63細胞を10% FCS 添加 α MEM でさらに48時間培養し, confluent になった状態で上記抗血清を用いて, 免疫細胞化学的に細胞内のIGFBP-3 β subunit の検出を行った。まず, 細胞を3.7%ホルムアルデヒド液で10分間固定, 次に内因性のペルオキシダーゼを0.3% H_2O_2 /メタノール液30分間処理でブロック, PBS で500倍に希釈した抗IGFBP-3 β 血清と30分間室温でincubate, 洗浄後, ワサビペルオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG ポリクローナル抗体 (Kirkgaard & Perry Laboratories, USA) とincubate し, その後, ペルオキシダーゼ基質(0.08%, 3, 3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride, 0.01% H_2O_2 , in 100mM Tris HCl pH7.5) と7分間反応させた。対染色はhematoxylin で2分間染色を行った。

培養上清の電気泳動

培養上清中のIGFBP-3分子の分子量を確認するため, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) 後, 抗血清を用いてimmunoblottingを行った。10% FCS 添加 α MEM で2日間培養した培養上清と $1,25-(OH)_2D_3$, $10^{-8}M$ 加10% FCS α MEM で2日間培養した培養上清の2者について, サンプルと同量のsample buffer (3% SDS, 5% 2-mercaptoethanol, 10% glycerol) と共に $100^\circ C$ 1分間加熱で処理後, SDS-10% polyacrylamide gel にて, 電動泳動を行った。その後, サンプルをsemidry method でニトロセルロース膜に転写, 抗血清とワサビペルオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG ポリクローナル抗体を用いて蛋白分子の検出を行った。Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for IGFBP-3

96穴 high adsorbent multi-titer plate (Maxisorp, Nunc, Denmark) を用いて, 培養上清のIGFBP-3測定のためのELISAを作成した¹⁰⁾(表)。スタンダードには recombinant human IGFBP-3 β peptide を0.1% BSA/PBS で希釈して使用した。スタンダード濃度と吸光度は0.1から $0.6 \times 10^{-2} nmol/ml$ の濃度内で良好な直線関係を示した(図1)。培養に使用した牛胎児

血清のIGFBP-3はこの系では検出不能であった。

培養細胞中の蛋白含量は Protein assay system (Bio-Rad, USA) を用いて測定し, IGFBP-3は蛋白含量当たりの量で表現した。

表 Enzyme-linked immunosorbent assay によるIGFBP-3測定法

sample apply
100 μ l/well apply onto 96-well microtiter plate.
incubation for 12 hours at $4^\circ C$
wash with TTBS (0.1% Tween 20 in Tris-Buffered Saline) 4 times
incubation with 0.1%BSA/PBS (100 μ l/well) for 1 hour.
incubation with 100 μ l/well of anti IGFBP 3 β anti-serum (1 : 4000 by 0.1%BSA/PBC) for 30 min.
wash with TTBS 4 times
incubation with 100 μ l/well of anti-rabbit IgG-HRP conjugate (diluted by TTBS) for 30min.
wash with TTBS 4times
incubation with 100 μ l/well of coloring reagent for 15min.
put 100 μ l/well of 1N H_2SO_4
read absorbance at 492nm

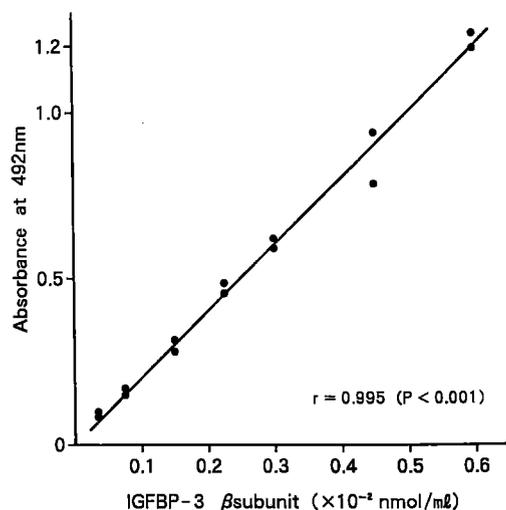


図1 ELISA の標準曲線

1,25- (OH)₂D₃添加実験

1) 1,25- (OH)₂D₃添加後時間による培養上清中の IGFBP-3 濃度の変化を検討するため、10⁻⁹Mの1,25- (OH)₂D₃を加えた10% FCS 添加 αMEM で培養し、24, 48, 72, 96時間後の培養上清中の IGFBP-3 を ELISA により測定した。

2) 1,25- (OH)₂D₃の濃度による IGFBP-3 産生への影響を検討する為、1,25- (OH)₂D₃の濃度を0, 10⁻¹²M, 10⁻¹¹M, 10⁻¹⁰M, 10⁻⁹M, 10⁻⁸M と変化させた培地について検討を行った。同時に添加血清の影響も検討するため、血清無添加、2% FCS 添加 αMEM と10% FCS 添加 αMEM の3者について検討を行った。

3) 細胞内 IGFBP-3 濃度の検討を行うため6穴 multi-culture plate において同様の培養を行い、1,25- (OH)₂D₃濃度：0, 10⁻¹⁰M, 10⁻⁸M の濃度について培養上清の濃度を検討すると同時に、超音波破碎 (10sec, ×3 : Handy sonic,

Tomy Seiko Co., Tokyo, Japan) した細胞内成分について同様に ELISA で IGFBP-3 の濃度を測定した。

4) 1,25- (OH)₂D₃の誘導体である26,27-hexafluoro-1,25- (OH)₂D₃, 2β-(3-hydroxypropoxy)-1,25- (OH)₂D₃で、2% FCS 添加 αMEM に D 誘導体を10⁻¹⁰M, 10⁻⁸Mの濃度になるように加え、添加後48, 72時間の培養上清、細胞内の IGFBP-3 濃度を測定した。

結 果

免疫細胞化学

抗ヒト IGFBP-3 β 血清によって MG63 の核周囲の細胞質に特異的な染色物質が確認された (図2)。ほとんどすべての細胞が染色陽性であり、活発な IGFBP-3 β subunit の合成が推察された。

培養上清の電気泳動

電気泳動により、培養上清から抗血清と特異的に反応する2本のバンドが検出された (図3)。最も、明瞭なバンドは分子量40-60KD に相当するもので、報告されている¹¹⁾ IGFBP-3 β subunit の分子に相当した。140-150KD に相当するもう一つの高分子量の特異的バンドは IGFBP-3 の全分子に相当する分子量であった。

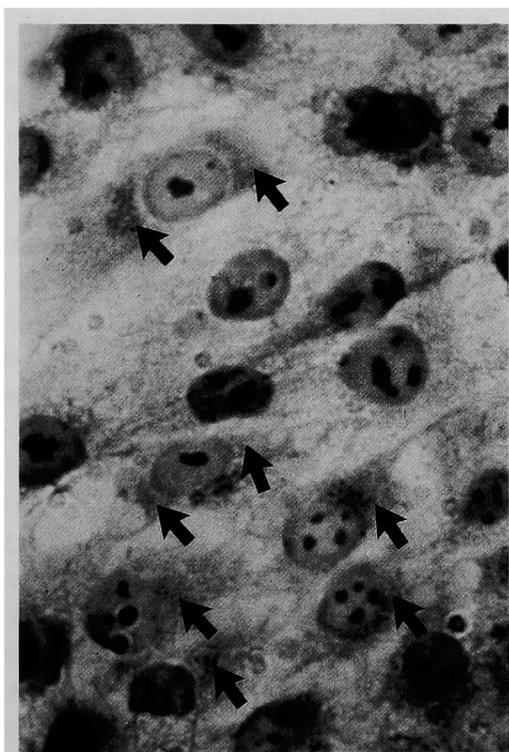


図2 ヒト骨肉腫細胞 MG63 の抗 IGFBP-3 抗体による免疫細胞学的染色 (矢印で染色陽性部位を示す)

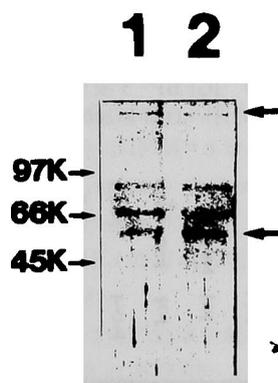


図3 MG 63培養上清の SDS-PAGE
1 : 10%FCS 添加 αMEM,
2 : 10⁻⁸M1,25 (OH)₂D₃, 10%FCS 添加 αMEM
高分子領域 (140-150KD) の矢印が IGFBP-3 全分子を、低分子領域 (40-60KD) の矢印が IGFBP-3 β subunit を示す。

1,25-(OH)₂D₃添加後の培養上清についても同様の分子量のバンドが検出され、分子量の変化は認めなかった。

1,25-(OH)₂D₃添加実験

1) 1,25-(OH)₂D₃添加後、24時間後には培養上清中の IGFBP-3 の濃度は対象に比し約2倍にまで増加した。48時間後に約4倍まで増加、以後96時間まではほぼ一定の濃度を維持した(図4)。

2) 1,25-(OH)₂D₃の濃度による IGFBP-3 産生への影響: 1,25-(OH)₂D₃は濃度依存的に培養上清中の IGFBP-3 濃度を増加させた。その濃度変化は FCS 濃度によって異なっていた。すなわち、2% FCS、添加時は1,25-(OH)₂D₃10⁻⁹Mから濃度の上昇がみられその上昇率もわずかであったが10% FCS 添加時は、10⁻¹¹Mからすでに上昇が認められ、10⁻¹⁰M でほぼ最大

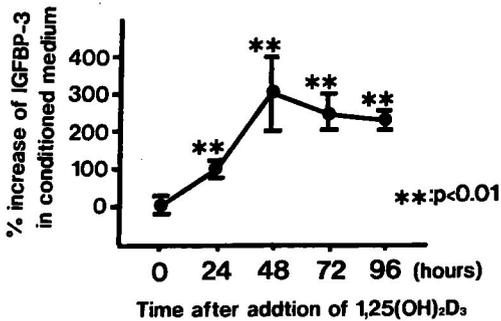


図4 10⁻⁹M 1,25(OH)₂D₃添加後の MG 63培養上清中の IGFBP-3 濃度の経時的な変化 (1,25(OH)₂D₃非添加群との増加率)

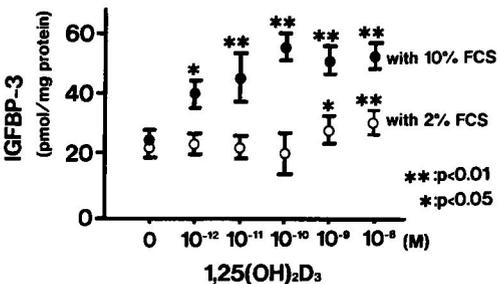


図5 1,25(OH)₂D₃濃度の MG 63培養上清中 IGFBP-3 濃度に及ぼす影響 (有意差は 1,25(OH)₂D₃非添加群との間で検討した) (open circle: 10% FCS 添加, closed circle: 2% FCS添加)

効果が認められ、その上昇率も大であった(図5)。無血清培地では IGFBP-3 は非常に低濃度で測定不可能であった。

3) 細胞内 IGFBP-3 濃度の検討: 細胞内 IGFBP-3 濃度も培養上清の濃度とほぼ平行して推移し、10% FCS 添加培地では1,25-(OH)₂D₃濃度: 10⁻¹⁰M で最大効果が認められた(図6)。

4) 1,25-(OH)₂D₃の誘導体である 2β-(3-hydroxypropoxy)-1,25-(OH)₂D₃では10⁻¹⁰M で26,27-hexafluoro-1,25-(OH)₂D₃では10⁻⁸M で最大となる IGFBP-3 の濃度の上昇が認められた(図7)。1,25-(OH)₂D₃と同様、血清濃度が低い状態では、1,25-(OH)₂D₃の誘導体に対する反応も乏しかった。

考 察

IGFBP-3 は, Baxter ら¹²⁾によれば, acid labile α subunit, acid stable β subunit, IGF

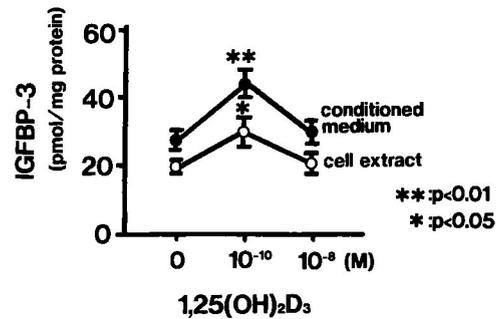


図6 1,25(OH)₂D₃濃度の MG 63培養上清並びに細胞質内 IGFBP-3 濃度に及ぼす影響 (open circle: 細胞抽出成分 closed circle: 培養上清)

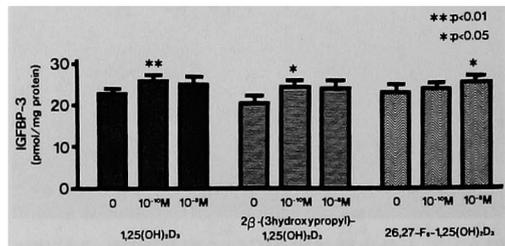


図7 1,25(OH)₂D₃の誘導体添加の MG 63培養上清中 IGFBP-3 濃度に及ぼす影響

の3つのsubunitから構成されている。IGF分子と直接結合する能力を有しているのは acid stable β subunit であり、まずこの β subunit がIGFと結合し、さらにこの β subunit-IGF complex が血中に大量に存在する acid labile α subunit と結合し、最終的に140-150KDの分子を形成し血中に存在すると考えられている。

今回、この β subunit に対する抗体を用いてヒト骨肉腫細胞 MG63からの IGFBP-3 β subunit の合成と、培養上清中への分泌を確認した。その分泌は、1,25-(OH)₂D₃によって濃度依存的に促進され、細胞内濃度の増加も認められる事から、1,25-(OH)₂D₃は IGFBP-3 β subunit の合成促進を促進し、培養上清中の IGFBP-3 増加を引き起こしていると考えられた。IGFBP-3 産生と、1,25-(OH)₂D₃の効果は培地中の血清濃度に依存する事からその作用には血清中の因子の存在が必要であると考えられた。

分泌された IGFBP-3 分子の分子量の変化は immunoblotting では証明されなかった。IGFBP-3 β subunit には妊婦血中などに、特異的な蛋白分解酵素活性が存在する事が知られている¹³⁾。今回の検討では、蛋白分解酵素活性の検討は行っていないが、immunoblotting 上で分子量の変化、新たな低分子物質の出現などは認めておらず、ELISA に影響する程の蛋白分解酵素活性は認められないと考えられた。

IGFBP-3 の末梢組織での合成及び分泌は多くの因子によって規定されている。Growth hormone¹⁴⁾、transferrin growth factor- β ⁹⁾、epidermal growth factor⁷⁾などが強力な IGFBP-3 分泌促進因子として報告されている。1,25-(OH)₂D₃が IGFBP-3 の産生を促進する機序については、添加する牛胎児血清の濃度に依存して1,25-(OH)₂D₃による IGFBP-3 産生促進が顕著にみられる事から、1,25-(OH)₂D₃は胎児血清中の IGFBP-3 産生促進因子の作用の増強を介する機序によって、IGFBP-3 産生を促進している可能性が考えられる。Petkovichら¹⁵⁾は胎児ラット頭頂骨由来の細胞の培養系において、1,25-(OH)₂D₃投与によって、ラット腎細胞を用いた bioassay 系における TGF- β 活性増加、EGF receptor 数の増加を認めたと報告

している。その報告によれば、EGF の binding は1,25-(OH)₂D₃10⁻⁹M から増加、10⁻⁷M では添加後24時間で既に投与効果が出現している。1,25-(OH)₂D₃はこれら、TGF- β 、EGF などの作用を介して、IGFBP-3 産生を増強する可能性があると考えられた。

黒瀬らは、マウスの骨芽細胞様細胞 MC 3 T 3-E1におけるアルカリフォスファターゼ活性亢進に関して、1,25-(OH)₂D₃と IGF-I は相乗的な作用を有すると報告し⁹⁾、さらに1,25-(OH)₂D₃による IGF-I receptor の増加を証明している¹⁶⁾。井上らは、MC 3 T 3-E1、MG63 どちらの細胞においても1,25-(OH)₂D₃による IGF-I receptor mRNA の増加は認められなかったと報告している¹⁷⁾。1,25-(OH)₂D₃が IGF-I の濃度に及ぼす影響については黒瀬らは変化を認めなかったとしている¹⁸⁾。IGFBP-3 は、IGF-I 作用に促進的に作用する場合と抑制的に作用する可能性がある事が知られている。De Mellow はヒト皮膚線維芽細胞の培養において、IGFBP-3 の前処置により IGF-I の作用は増強され、IGFBP-3 の同時添加によって IGF-I の作用は減弱すると報告している¹⁸⁾。他にも同時添加による free IGF-I 分子の作用の減弱は他にも報告が認められる¹⁹⁾。これは、結合蛋白の性質として、free IGF-I を減少させる作用に起因すると想像されるが、IGFBP-3 に認められる IGF-I の作用を増強する機序については、最近、Conover らが、牛皮膚線維芽細胞の培養系において、IGF-I 自身によって引き起こされる IGF-I receptor の down regulation を IGFBP-3 が抑制すると報告しており²⁰⁾、この receptor の down regulation の抑制は IGF-I receptor の loss を防ぐ事になり、結果として IGF-I 作用の増強、遷延を引き起こす可能性がある。

従来報告と、今回の結果を総合して考察すると1,25-(OH)₂D₃は IGFBP-3 の産生増加を介して、IGF-I receptor の分解抑制による receptor 数の増加を引き起こし、その結果、IGF-I の作用を増強する可能性があると考えられた。

1,25-(OH)₂D₃は強力な骨吸収因子として知られている²¹⁾。しかし、in vivo では1,25-(OH)₂D₃は生理的な濃度で骨形成を促進する事が知ら

れている²²⁾。これまで、この1,25-(OH)₂D₃の骨形成促進作用は骨芽細胞への直接作用ではなく、カルシウム、リンの消化管からの吸収増加、腎尿細管からの再吸収増加によるものと考えられてきた。今回の実験結果から1,25-(OH)₂D₃によるIGFBP-3産生増加によるIGF-Iによる骨形成の促進という新しい機序も考慮しなければならぬと考えられた。

1,25-(OH)₂D₃の新しい誘導体26,27-hexafluoro-1,25-(OH)₂D₃, および2β-(3-hydroxypropoxy)-1,25-(OH)₂D₃でも1,25-(OH)₂D₃に比し、ほぼ同様の作用が認められた。これら、種々作用の強度が異なる薬剤のうち、IGFBP-3産生能に解離が認められる誘導体を用いたin vivoの実験で、さらに1,25-(OH)₂D₃の骨形成に関わる主要な因子の解明が可能であると考えられた。

結 論

ヒト骨肉腫細胞MG63からinsulin-like growth factor binding protein 3 (IGFBP-3)の産生を確認し、1,25 dihydroxyvitamin D₃ (1,25-(OH)₂D₃)はその産生を増加させた。1,25-(OH)₂D₃とIGF-Iの関係に於いて、IGFBP-3を介した相互作用が存在する可能性が考えられた。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲の労を賜った岡山大学医学部小児科学教室教授清野佳紀先生、本研究を直接御指導いただいた岡山大学医学部小児科学教室助手田中弘之先生に深謝いたします。また、1,25-(OH)₂D₃誘導体の提供その他でご協力いただいた住友製薬株式会社、中外製薬株式会社に深謝いたします。

なお、本論文の要旨は、第9回日本骨代謝学会で発表した。

文 献

- 1) Baxter RC: Biochemical characterization of insulin-like growth factor binding proteins. *Acta Endocrinol (Copenh)* (1991) **124**, 33-40.
- 2) Wood WJ, Cachianes G, Henzel WJ, Winslow GA, Spencer SA, Hellmiss R, Martin JL and Baxter RC: Cloning and expression of the growth hormone-dependent insulin-like growth factor-binding protein. *Mol Endocrinol* (1988) **2**, 1176-1185.
- 3) Baxter RC: Insulin-like growth factor (IGF) binding proteins: the role of serum IGFBPs in regulating IGF availability. *Acta Paediatr Scand (Suppl)* (1991) **372**, 107-114.
- 4) D'Ercole AJ, Stiles AD and Underwood LE: Tissue concentration of somatomedin-C: further evidence for multiple sites of synthesis and paracrine or autocrine mechanisms of action. *Proc Natl Acad Sci* (1984) **81**, 935-939.
- 5) Orłowski CC and Chernauek SD: Discordance of serum and tissue somatomedin levels in growth hormone-stimulated growth in the rat. *Endocrinology* (1988) **122**, 44-49.
- 6) Martin JL and Baxter RC: Transforming growth factor-β stimulates production of insulin-like growth factor-binding protein-3 by human skin fibroblasts. *Endocrinology* (1991) **128**, 1425-1433.
- 7) Martin JL and Baxter RC: Insulin-like growth factor binding proteins (IGF-BPs) produced by human skin fibroblasts: Immunological relationship to other human IGF-BPs. *Endocrinology* (1988) **123**, 1907-1915.
- 8) Blum WF, Jenne EW, Reppin F, Kietzmann K, Ranke MB and Bierich JR: Insulin-like growth factor I (IGF-I)-binding protein complex is a better mitogen than free IGF-I. *Endocrinology* (1989) **125**, 766-772.
- 9) Kurose H, Seino Y, Yamaoka K, Tanaka H, Shima M and Yabuuchi H: Cooperation of synthetic

- insulin-like growth factor I/somatomedin C and 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on regulation of function in clonal osteoblastic cells. *Bone Miner* (1989) **5**, 335.
- 10) Ousler MJ, Bell LV, Clevinger B and Osdoby P : Identification of osteoclast-specific monoclonal antibodies. *J Cell Biol* (1980) **100**, 1592—1600.
 - 11) Bicsak TA, Nakatani A, Shimonaka M, Malkowski M, and Ling N : Insulin-like growth factor binding protein measurement : sodium dodecyl sulfate-stable complexes with insulin-like growth factor in serum prevent assessment of total binding protein by ligand blotting. *Anal Biochem* (1990) **191**, 75—79.
 - 12) Baxter RC, Martin JL and Beniach VA : High molecular weight insulin-like growth factor binding protein complex : purification and properties of the acid-labile subunit from human serum. *J Biol Chem* (1989) **264**, 11843—11848.
 - 13) Giudice LC, Farrell EM, Pham H, Lamson G and Rosenfeld RG : Insulin-like growth factor binding proteins in maternal serum throughout gestation and in the puerperium : Effects of a pregnancy-associated serum protease activity. *J Clin Endocrinol Metab* (1990) **71**, 806—816.
 - 14) Ernst M and Rodan GA : Increased activity of insulin-like growth factor (IGF) in osteoblastic cells in the presence of growth hormone (GH) : Positive correlation with the presence of the GH-induced IGF-binding protein BP-3. *Endocrinology* (1990) **127**, 807—814.
 - 15) Petkovich PM, Wrana JL, Grigoriadis AE, Heersche JNM and Sodek J : 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ increases epidermal growth factor receptors and transforming growth factor β -like activity in a bone-derived cell line. *J Biol Chem* (1987) **262**, 13424—13428.
 - 16) Kurose H, Yamaoka K, Okada S, Nakajima S and Seino Y : 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ (1,25-(OH)₂D₃) increases insulin-like growth factor I (IGF-I) receptors in clonal osteoblastic cells. Study on interaction of IGF-I and 1,25-(OH)₂D₃. *Endocrinology* (1990) **126**, 2088—2094.
 - 17) Inoue M, Tanaka H, Kanzaki S, Higuchi J and Seino Y : Stimulatory and inhibitory effect of vitamin D on collagen synthesis by osteoblasts. *J Bone Miner Res* (1991) **6** (suppl. 1), S 123.
 - 18) De Mellow JSM and Baxter RC : Growth hormone-dependent insulin-like growth factor (IGF) binding protein both inhibits and potentiates IGF-I-stimulated DNA synthesis in human skin fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* (1988) **156**, 199—204.
 - 19) Schmid C, Rutishauser J, Schlapfer I, Froesch ER and Zapf J : Intact but not truncated insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3) blockes IGF I-induced stimulation of osteoblasts : control of IGF signalling to bone cells by IGFBP 3-specific proteolysis? *Biochem Biophys Res Commun* (1991) **179**, 579—585.
 - 20) Conover CA and Powell DR : Insulin-like growth factor (IGF) -binding protein-3 blocks IGF-I-induced receptor downregulation and cell desensitization in cultured bovine fibroblasts. *Endocrinology* (1991) **129**, 710—716.
 - 21) Raisz LG, Trummel CL, Holick MF and DeLuca HF : 1,25-Dihydroxycholecalciferol : A potent stimulator of bone resorption in tissue culture. *Science* (1972) **175**, 768—769.
 - 22) Reichel H, Koeffler HP and Norman AW : The role of the vitamin D endocrine system in health and disease. *N Engl J Med* (1989) **320**, 980—991.

1, 25-Dihydroxyvitamin D₃ stimulates the secretion of insulin-like growth factor binding protein 3 (IGFBP-3) by cultured

human osteosarcoma cells

Tadashi MORIWAKE

Department of Pediatrics,

Okayama University Medical School,

Okayama 700, Japan

(Director : Prof. Y. Seino)

Several types of specific insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs) are produced by peripheral tissue-derived cells and they modulate the functions of insulin-like growth factors. In this study, both the secretion of IGFBP-3 from a human osteosarcoma cell line MG63 and effects of 1, 25-dihydroxyvitamin D₃ (1, 25-(OH)₂D₃) on the production of IGFBP-3 were investigated. The β subunit of IGFBP-3 was detected immunocytochemically in the perinuclear cytoplasm of MG63 cells. Immunoblotting and SDS-PAGE analysis revealed that both 140-150KD MW entire molecules and 40-60KD MW β subunit molecules of IGFBP-3 were present in cell-conditioned media. 1, 25-(OH)₂D₃ stimulated the production of the IGFBP-3 molecule by MG63 cells. The concentration of IGFBP-3 in conditioned media began to rise at 24 hours after the addition of 10⁻⁹M of 1,25-(OH)₂D₃ and reached the peak level at 48 hours. Dose-dependent effects of 1,25-(OH)₂D₃ were demonstrated. These findings show that MG63 produces IGFBP-3 and that 1,25-(OH)₂D₃ stimulates the production of this protein. These findings suggest that the synergistic effects of 1,25-(OH)₂D₃ on the action of IGF-I on osteoblastic cells may be modulated by locally produced IGFBP-3.