

Title	インターロイキン6は破骨細胞前駆体に直接作用し、破骨細胞への分化を制御する
Author(s)	吉武, 史郎
Citation	大阪大学, 2007, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/47578">https://hdl.handle.net/11094/47578</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	吉 武 史 郎
博士の専攻分野の名称	博士 (歯 学)
学位記番号	第 21071 号
学位授与年月日	平成 19 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 歯学研究科分子病態口腔科学専攻
学位論文名	インターロイキン 6 は破骨細胞前駆体に直接作用し、破骨細胞への分化を抑制する
論文審査委員	(主査) 教授 恵比須繁之 (副査) 教授 米田 俊之 教授 山城 隆 助教授 和田孝一郎

## 論文内容の要旨

### 【研究目的】

インターロイキン (IL)-6 は、さまざまな細胞から分泌され、免疫・造血・骨代謝など種々の生命現象において重要な役割を果たすサイトカインである。骨代謝において IL-6 は、受容体である gp130 を介して骨芽細胞内のシグナル伝達経路を活性化し、破骨細胞の分化に必須である RANKL の発現を誘導する。この RANKL は、破骨細胞前駆体に発現する RANK と結合し破骨細胞へと分化を誘導する。しかし、破骨細胞の分化過程において IL-6 が破骨細胞前駆体に対して及ぼす直接的な作用については未だ明らかとなっていない。そこで、IL-6 の破骨細胞前駆体に対する直接的な作用について明らかにすることを本研究の目的とした。

### 【材料および方法】

#### 1. 破骨細胞前駆体の分化に対する IL-6 の効果

4～6 週齢マウスの大腿骨より骨髓を採取し、M-CSF と 10%胎仔血清 (FBS) を含む  $\alpha$ -MEM 培地にて 16 時間培養し、浮遊系細胞を回収した。回収した浮遊細胞をさらに 2 日間培養し、得られた附着細胞を破骨細胞前駆体として実験に用いた。この前駆細胞をさらに M-CSF と RANKL そして IL-6 存在下および非存在下で 4 日間培養し、破骨細胞様細胞への分化を誘導した。分化した細胞数は、酒石酸耐性フォスファターゼ (TRAP) 染色法を用いて多核 TRAP 陽性細胞を検出、計測することにより評価した。また、破骨細胞前駆体をハイドロキシアパタイトプレート上で 6 日間培養し、吸収能の評価を行った。破骨細胞様細胞の分化については分化マーカーである、カルシトニンレセプター (CTR)、カテプシン K および TRAP の mRNA の発現量をリアルタイム PCR 法にて測定することにより評価した。

#### 2. IL-6 が RANK 下流のシグナル伝達分子の活性化に及ぼす影響

前記 1 項と同様の方法で得た破骨細胞前駆体を RANKL あるいは RANKL と IL-6 にて刺激した後に細胞を回収し、タンパクを抽出した。このタンパクを SDS page にて展開し、破骨細胞前駆体の分化に関わるシグナル分子、TRAF6、NF- $\kappa$ B、p38、JNK の活性化についてウェスタンブロッティング法にて解析を行った。なお、NF- $\kappa$ B の活性化については I $\kappa$ B のタンパク量にて評価を行った。

#### 3. IL-6 が破骨細胞分化シグナルに及ぼす影響に関する包括的な遺伝子発現量の検討

破骨細胞前駆体を RANKL または RANKL と IL-6 で 24 時間刺激をした後 RNA を回収し、マイクロアレイにて遺

伝子発現量の比較を行った。その中からユビキチン経路に関与している *Senp2* 及び *Cul4a*、JNK の脱リン酸化に関与している *MKP1* および *MKP7* について、リアルタイム PCR 法を用いて mRNA の発現量を定量的に解析した。

#### 【結果】

##### 1. 破骨細胞前駆体の分化に対する IL-6 の効果

破骨細胞前駆体を IL-6 非存在下で培養した場合と比べて、IL-6 存在下で培養した場合は、TRAP 陽性細胞の数が有意に減少していた。吸収窩の形成能も IL-6 により抑制された。また、分化マーカーであるカテプシン K、CTR、TRAP の mRNA の発現量は、いずれも IL-6 の添加により減少した。

##### 2. IL-6 が RANK 下流のシグナル伝達分子の活性化に及ぼす影響

ウェスタンブロッティング法による解析の結果、破骨細胞前駆体における TRAF6 の発現量および p38 の活性化は、IL-6 の刺激により変化しなかった。しかし、JNK の活性化は IL-6 にて刺激することにより抑制された。また、RANKL の刺激により誘導されるユビキチン経路による I $\kappa$ B の分解は IL-6 の刺激により分解が減少した。

##### 3. IL-6 が破骨細胞分化シグナルに及ぼす影響に関する包括的な遺伝子発現量の検討

RANKL で刺激した破骨細胞前駆体を基準として、IL-6 と RANKL で刺激した破骨細胞前駆体の遺伝子発現量の変化について調べたところ、約 200 種類の遺伝子の発現量に変化が認められた。その中からユビキチン経路に関与している *Senp2* および *Cul4a*、JNK の脱リン酸化に関与している *MKP1* および *MKP7* が検出され、リアルタイム PCR 法を用いて mRNA の発現量を定量的に解析した。その結果、*Senp2* および *Cul4a* の発現量は IL-6 存在下で減少し、*MKP1* および *7* の発現量は増加していることが分かった。

#### 【考察および結論】

IL-6 は炎症性サイトカインとして骨吸収を惹起することが知られており、骨芽細胞と破骨細胞前駆体の共培養系においても破骨細胞の分化を誘導することが確認されている。しかし本研究の解析結果から、骨芽細胞非存在下では IL-6 は破骨細胞前駆体に対して破骨細胞への分化を抑制的に制御することが明らかとなった。そして、この現象は JNK および I $\kappa$ B の経路を特異的に抑制することにより引き起こされることが明らかとなった。

### 論文審査の結果の要旨

本研究は、破骨細胞前駆細胞の分化過程におけるインターロイキン 6 の働きについて分子生物学的手法を用いて解析を行ったものである。

その結果、骨芽細胞を介さない破骨細胞前駆細胞の培養系において、インターロイキン 6 は破骨細胞前駆細胞の成熟破骨細胞への分化を抑制することが明らかになった。また、このインターロイキン 6 による分化抑制は、シグナル伝達経路の解析から、破骨細胞前駆細胞における JNK および NF- $\kappa$ B の活性化の低下により生じていることが示唆された。

以上の研究成果は、炎症性骨吸収の分子メカニズムの解明の一端を担うものであり、本研究は博士（歯学）の学位授与に値するものと認める。