



Effect of etidronate on COX-2 expression and PGE2 production in macrophage-like RAW 264.7 cells stimulated by titanium particles

鈴木, 祥浩

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2008-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲4124

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1004124>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏 名	鈴木 祥浩
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学 位 記 番 号	博い第 1878 号
学位授与の 要 件	学位規則第 5 条第 1 項該当
学位授与の 日 付	平成 20 年 3 月 25 日

【 学位論文題目 】

Effect of etidronate on COX-2 expression and PGE2 production in macrophage-like RAW 264.7 cells stimulated by titanium particles (チタン粒子刺激によりマクロファージ様 RAW264.7 細胞に生ずる COX-2 誘導、PGE2 産生に対するエチドロネートの効果)

審 査 委 員

主 査	教 授	西尾 久英
	教 授	杉村 和朗
	教 授	平井 みどり

【目的】

人工関節置換術後に頻繁にみられる合併症のひとつとして、インプラント周囲の骨吸収に伴う無腐性の loosening があげられる。これまでの研究で、インプラントから生ずる摩耗粉を食食したマクロファージが産生する、interleukin-1 β (IL-1 β)、interleukin-6 (IL-6)、tumor necrosis factor- α (TNF- α)等の炎症性サイトカインや prostaglandin E₂ (PGE₂)が骨吸収に関与していることが報告されている。近年、人工関節置換術後の患者にビスフォスフォネートを投与することでインプラント周囲の骨吸収が抑制されたとの報告がいくつかなされているが、この作用機序にはいまだ不明瞭な点が残されている。またビスフォスフォネートの骨吸収抑制作用に加え、一部のビスフォスフォネートが抗炎症作用を有するとのも報告もある。本研究の目的は、エチドロネートが、インプラント周囲の骨吸収を抑制する機序の1つを in vitro の系にて検討することである。

【方法】

マクロファージ様 RAW 264.7 細胞を Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) 培地にて培養した。logarithmic phase にて細胞を回収し、6 穴プレートに 1 $\times$ 10⁶ cells/well の濃度にて播種し DMEM 培地にて培養した。24 時間培養の時点で、インプラント磨耗粉のモデルとして、チタン合金粒子 (Titanium-6 Aluminium-4 Vanadium、直径 5 μ m 以下) を PBS 中に懸濁した溶液を滅菌した後、最終濃度が 0.1、0.5、1 mg/ml となるように調整し各 well に加えた。培養 6、12、24 時間後に培養細胞より RNA を抽出し、cyclooxygenase-1 (COX-1)、cyclooxygenase-2 (COX-2)、IL-1 β 、IL-6、TNF- α の mRNA 発現を reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法を用いて検出した。また培養液を同様に培養 6、12、24 時間後に回収し、PGE₂、IL-1 β 、IL-6、TNF- α の産生を enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法にて測定した。

次に同細胞にチタン粒子 1 mg/ml と共に、エチドロネートを 0.001、0.01、0.1、1、10、100 μ M の各濃度で添加し、24 時間培養後に、COX-2 の mRNA を RT-PCR 法を用いて検出し、また培養液中の PGE₂、IL-1 β 、IL-6、TNF- α の産生を同様に ELISA 法にて測定した。

【結果】

位相差顕微鏡像にて、マクロファージ様の形態を有する RAW264.7 細胞がチタン粒子を食食している像が観察された。この細胞において COX-2、IL-1 β 、IL-6、TNF- α mRNA の発現がチタン刺激に対し、濃度依存性および時間依存性に上昇していた。一方 COX-1 の発現はチタン刺激の影響を受けなかった。また PGE₂、IL-1 β 、IL-6、TNF- α の産生も同様にチタン粒子によって濃度依存性および時間依存性に促進された。

チタン粒子とともにエチドロネートを加えた系では、エチドロネートによって COX-2 mRNA の発現、PGE₂、IL-1 β 、IL-6、TNF- α の産生が濃度依存性に抑制された。

【考察】

骨吸収は破骨細胞上に発現する receptor activator nuclear factor- κ B (RANK) に、骨芽細胞上に発現する receptor activator nuclear factor- κ B ligand (RANKL) が作用することで促進され、RANKL のおとりレセプターである osteoprotegerin (OPG) によって抑制される。PGE₂ は骨芽細胞の RANKL 産生を促進し、OPG 産生を抑制する作用を有し、骨吸収を促進することが報告されている。エチドロネートがチタン粒子を食食したマクロファージに作用し、PGE₂ の産生を抑制する作用は、エチドロネートが骨芽細胞を通じて破骨細胞の活性を抑制し、インプラント周囲の骨吸収を抑制するというエチドロネートの新たな作用機序の1つとして示唆された。

IL-1 β 、IL-6、TNF- α 等の炎症性サイトカインはマクロファージによる PGE₂ 産生を促進する作用が報告されている。今回の実験で、チタン粒子刺激によってマクロファージの IL-1 β 、IL-6、TNF- α 産生が促進され、またエチドロネート添加によりそれらが抑制されることが示された。したがって、マクロファージの PGE₂ 産生に対するエチドロネートの抑制作用はこれらの炎症性サイトカイン抑制を通じた間接的作用である可能性も考えられた。エチドロネートが間接的ないし直接的に PGE₂ 産生を抑制したことは、エチドロネートが人工関節術後の骨吸収抑制とともに、術後疼痛を緩和する可能性を示唆し、したがって術後鎮痛に必要とする NSAIDs の投与量を減量できる可能性が示された。

また今回の実験で、チタン粒子を食食したマクロファージにおける COX-2 発現がエチドロネートにより濃度依存性に抑制されたのに対し、COX-1 発現は影響を受けなかった。したがって、エチドロネートが、COX-2 選択的阻害剤類似の作用を有し、胃腸障害等の副作用が少ない鎮痛剤としての有用性が示唆された。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 1880 号	氏 名	鈴木 祥浩
論文題目 Title of Dissertation	Effect of etidronate on COX-2 expression and PGE ₂ production in macrophage-like RAW 264.7 cells stimulated by titanium particles チタン粒子刺激によりマクロファージ様 RAW 264.7 細胞に生ずる COX-2 誘導、PGE ₂ 産生に対するエチドロネートの効果		
審査委員 Examiner	主 査 Chief Examiner 副 査 Vice-examiner 副 査 Vice-examiner 西尾久英 杉村和朗 平井みどり		
審査終了日	平成 19 年 11 月 21 日		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

【要 旨】

人工関節置換術後に頻繁にみられる合併症のひとつとして、インプラント周囲の骨吸収に伴う無腐性の loosening があげられる。これまでの研究で、インプラントから生ずる摩耗粉を食食したマクロファージが産生する炎症性サイトカインや prostaglandin E₂ (PGE₂) が骨吸収に関与していることが報告されている。近年、人工関節置換術後の患者へのビスフォスフォネートの投与がインプラント周囲の骨吸収を抑制したとの報告がなされているが、この作用機序にはいまだ不明瞭な点が残されている。またビスフォスフォネートの骨吸収抑制作用に加え、一部のビスフォスフォネートが抗炎症作用を有するとの報告もある。本研究の目的は、エチドロネートが、インプラント周囲の骨吸収を抑制する機序の1つを in vitro の系にて検討することである。

マクロファージ様 RAW 264.7 細胞を6穴プレートに 1×10^6 cells/well にて播種し DMEM 培地にて培養した。24 時間培養の時点で、インプラント磨耗粉のモデルとして、チタン合金粒子 (Titanium-6 Aluminium-4 Vanadium) を最終濃度が 0.1、0.5、1 mg/ml となるように調整し各 well に加えた。培養 6、12、24 時間後に培養細胞より RNA を抽出し、cyclooxygenase-1 (COX-1)、cyclooxygenase-2 (COX-2)、interleukin-1 β (IL-1 β)、interleukin-6 (IL-6)、tumor necrosis factor- α (TNF- α) の mRNA 発現を reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法を用いて検出した。また培養液を同様に培養 6、12、24 時間後に回収し、PGE₂、IL-1 β 、IL-6、TNF- α の産生を enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法にて測定した。

次に同細胞にチタン粒子 1 mg/ml と共に、エチドロネートを 0.001、0.01、0.1、

1、10、100 μM の各濃度で添加し、24 時間培養後に、COX-2 の mRNA を RT-PCR 法で検出し、また培養液中の PGE_2 、IL-1 β 、IL-6、TNF- α の産生を ELISA 法にて測定した。

位相差顕微鏡にて、チタン粒子を貪食している RAW264.7 細胞が観察された。この細胞において COX-2、IL-1 β 、IL-6、TNF- α mRNA の発現および PGE_2 、IL-1 β 、IL-6、TNF- α の産生がチタン刺激に対し濃度依存性、時間依存性に促進された。またエチドロネートによって COX-2 mRNA の発現、 PGE_2 、IL-1 β 、IL-6、TNF- α の産生が濃度依存性に抑制された。

以上、エチドロネートが磨耗粉を貪食したマクロファージに作用し、炎症性サイトカインや PGE_2 の産生を抑制する作用は、エチドロネートがインプラント周囲の骨吸収を抑制する作用機序の 1 つとして示唆された。

本研究は、エチドロネートが人工関節置換術後のインプラント周囲の骨吸収を抑制するメカニズムについて、インプラント磨耗粉を貪食したマクロファージにおける炎症性メディエーター産生について種々の角度から研究したものであるが、従来、ほとんど知られていなかったエチドロネートの COX-2 選択的阻害剤類似作用について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。