



Role of interleukin-6 and prostaglandins in the effect of monocyte-conditioned medium on osteoclast formation

金谷, 政則

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1996-11-13

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙2087

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2002087>

※ 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・（本籍）	かな たに まさ のり 金 谷 政 則	（兵庫県）
博士の専攻分野の名称	博 士（医 学）	
学位記番号	博ろ第1549号	
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当	
学位授与の日付	平成8年11月13日	
学位論文題目	Role of interleukin-6 and prostaglandins in the effect of monocyte-conditioned medium on osteoclast formation （単球培養上清の破骨細胞形成に及ぼす効果におけるinterleukin-6とprostaglandinの役割）	
審査委員	主査 教授 千 原 和 夫 教授 春 日 雅 人 教授 久 野 高 義	

論 文 内 容 の 要 旨

【緒言】

骨髄中に存在する免疫系の細胞が骨リモデリングにおいて調節的な役割を果たすことが知られている。また、形態学的にも骨吸収後期の骨吸収窩に単核球が出現することも示されており、単核球が骨リモデリングにおいて重要な役割を果たしている可能性がある。実際、ヒト末梢血単球から分泌されるIL-1活性が骨代謝回転を反映すること、骨基質成分がヒト末梢血単核球からのIL-1分泌を促進することが報告され、末梢血単球の作用が吸収窩における単核球の作用を反映することが示唆されている。さらに私どもはヒト単球培養上清（CM）が骨芽細胞増殖を促進すること、エストロジェン、活性型ビタミンD₃、細胞外Ca濃度の上昇が単球を介して骨芽細胞増殖を調節することを報告してきた。このことは単球が局所調節因子の分泌を介して骨吸収から骨形成へのカップリングになんらかの役割を果たしていることを示唆するものである。また私どもはCMが活性型ビタミンD₃により誘導される破骨細胞様細胞形成を抑制することを見出し、吸収窩の単核球が破骨細胞形成に対し重要なシグナルを送っている可能性を提起した。そこで私どもは単球が骨代謝調節因子の分泌を介して破骨細胞形成に及ぼす影響を明らかにするために、支持細胞共存、非共存下でのCMの破骨細胞様細胞形成に及ぼす影響とその機序を検討した。

【方法】

閉経後健康人末梢血からFicoll-Hypaque比重遠心法により単核球を分離、単球を48h培養しCMを得た。培養液のみを対照とした。破骨細胞様細胞形成の検討は5-FU処理マウス脾細胞に1L-3、IL-6を添加し未分化芽球colonyを形成、colonyをGM-CSF存在下で培養後、10⁻⁸M1,25(OH)₂D₃または10⁻⁸MPTH-(1-34)とともに20%CM、種々の因子を添加し4日後に形成される酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ陽性多核細胞（MNC）数を求め、支持細胞非存在下での検討を行なった。一方、マウスの全骨細胞を既存の破骨細胞が消失した培養5日後1,25(OH)₂D₃またはPTH-(1-34)とともに20%CM、種々の因子を添加し7日後に形成されるMNC数を求め支持細胞存在下での検討を行なった。

また、全骨細胞を象牙片上で5日間培養し既存の破骨細胞の消失を確認後 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ とともに20%CM、種々の因子を添加し新しく形成されたMNCの骨吸収活性を評価した。

【結果】

支持細胞存在、非存在の両系でCMは $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ またはPTHによるMNC形成促進作用を有意に抑制した。

支持細胞非存在の系でIL-1 β 、TNFは $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ またはPTHによるMNC形成促進作用を阻害しなかったが、IL-6(10^{-12} - 10^{-8} M)、 PGE_2 (10^{-12} - 10^{-6} M)は各々、容量依存性にMNC形成促進作用を阻害した。そこでCMのMNC形成抑制作用におけるIL-6、PGの関与を検討した。IL-6によるMNC形成抑制効果は抗ヒトIL-6抗体存在下で消失した。さらに、CMによるMNC形成抑制効果も抗ヒトIL-6抗体存在下で消失した。インドメタシン(10^{-6} M)で処置された単球から得られたCMは非処理CMと異なりMNC形成抑制効果を示さなかった。さらに、インドメタシンで処理された単球から得られたCMは抗ヒトIL-6抗体存在下で $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ またはPTHによるMNC形成促進効果を有意に促進した。

支持細胞存在の系でIL-1 β 、TNFは $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ またはPTHによるMNC形成促進作用を増強したのに対し、IL-6(10^{-11} - 10^{-8} M)は容量依存性にこれを阻害した。 PGE_2 は阻害効果を示さなかった。またインドメタシンで処置された単球から得られたCMは非処理CMと同様MNC形成抑制作用を示した。そこでCMのMNC形成促進作用におけるIL-6の関与を検討した。 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ またはPTHによるMNC形成促進作用に対するIL-6の阻害効果は抗ヒトIL-6抗体存在下で消失した。さらに、CMによるMNC形成抑制効果も抗ヒトIL-6抗体存在下で消失した。

CMは $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 存在下で新たに形成されたMNCによる骨吸収を抑制せず、むしろ促進した。さらに、MNCあたりの骨吸収窩の数はCM添加により有意に増加した。IL-1 β は $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 存在下で新たに形成されたMNCによる骨吸収を有意に促進した。TNF、 PGE_2 も $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 存在下で新たに形成されたMNCによる骨吸収を有意に促進する傾向を認めた。しかし、IL-1 β 、TNF、 PGE_2 はMNCあたりの骨吸収窩の数には影響を与えなかった。一方、IL-6は $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 存在下で新たに形成されたMNCによる骨吸収に影響を及ぼさなかったが、MNCあたりの骨吸収窩の数を有意に増加させた。

【考察】

CMが支持細胞存在、非存在の両系で $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ またはPTHにより促進されるMNC形成を抑制したことから、単球は骨代謝回転の局所調節因子を自然にかつ生理的に分泌することにより、MNC形成に影響を及ぼすことが明らかとなった。単球の分泌する因子の検討から支持細胞非存在の系ではPG、IL-6が、そして支持細胞存在の系ではIL-6がCMによる抑制作用の惹起因子と考えられた。支持細胞非存在の系で PGE_2 がMNC形成を抑制し支持細胞存在の系では逆に促進したことから PGE_2 は破骨細胞の前駆細胞に直接的には抑制的に働くが支持細胞等を介する間接作用により支持細胞存在の系では全体として促進効果を示すと考えられた。一方、IL-6は造血幹細胞からの破骨細胞形成の初期の段階で促進的に作用することはよく知られているが、両系においてIL-6は濃度依存的にMNC形成を抑制し、この作用は抗IL-6抗体により阻害されたことより、最終段階の分化過程においては抑制的に作用すると考えられた。さらに、支持細胞存在の系でCMによるMNC形成抑制作用が抗IL-6抗体により消失したことからCMによる抑制作用にIL-6が関与することが明らかとなった。

CMが $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 存在下で新たに形成されたMNCによる骨吸収を促進したことから、CMはMNC形成を抑制するが、形成されたMNCの骨吸収活性を促進することが明らかとなった。IL-1 β 、TNF、PGE₂はMNCあたりの骨吸収活性に影響を与えず、IL-6がMNCあたりの骨吸収活性を促進したことから、CMによるMNCあたりの骨吸収活性促進効果にIL-6が関与していることが示唆された。

【結論】

単球が骨代謝調節因子の生理的な分泌を介して破骨細胞形成に抑制的に作用し、またその因子の中でIL-6、PGが重要な役割を果たすことが明らかとなった。一方、形成された破骨細胞に対しては骨吸収活性を促進し、その効果にIL-6の関与が示唆された。

論文審査の結果の要旨

骨は器官としての機能維持及び生体内のミネラルの恒常性を保持する為に、常に形成と溶解を繰り返す、再構成すなわち骨リモデリングを行っている。組織学的には破骨細胞による骨吸収が先行し、その後吸収された部位が骨芽細胞によって新しい骨に置き換えられる。骨吸収後期の骨吸収窩に単核球が出現することが以前より形態学的に確認されていたが骨リモデリングにおける役割についてはまだ十分には明らかでなかった。申請者は、単球が何らかの骨代謝調節因子を放出し骨リモデリングに影響している可能性を考え、なかでも破骨細胞形成能および破骨細胞の骨吸収活性を指標に研究した。閉経後健常人末梢血からFicoll Hypaque比重遠心法により単核球を分離、48時間培養してその培養上清を得た。破骨細胞の前駆細胞から成熟破骨細胞の形成には共存する骨髄間質支持細胞によって影響されるので支持細胞の存在あるいは非存在下で破骨細胞形成を観察した。支持細胞存在下の実験はマウス全骨細胞を5日間培養し既存の破骨細胞が消失した後、種々の試験物質を添加し4日後に形成される破骨細胞数を計測した。支持細胞非存在下での破骨細胞形成は、5-FU処理マウス脾細胞にIL-3、IL-6さらにGM-CSFを加えて分化誘導した後、各種試験物質を添加して形成される破骨細胞数を計測した。支持細胞存在、非存在の両系で $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ またはPTHは破骨細胞形成を促進したが単核球培養上清を同時投与すると有意に抑制された。単核球培養上清中には種々のサイトカインが含まれているのでそれぞれについて検討した。支持細胞非存在下でIL-1 β 、TNFは $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ またはPTHによる破骨細胞形成促進作用を阻害しなかったが、IL-6、PGE₂はそれぞれ容量依存性に破骨細胞形成を阻害した。単核球培養細胞上清による破骨細胞形成抑制効果は抗ヒトIL-6抗体を同時投与することにより消失した。同様の結果は支持細胞存在下でも得られた。インドメサシン処理した単核球培養上清は非処理培養上清と異なり破骨細胞形成抑制効果を示さず、逆に抗ヒトIL-6抗体存在下で $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ やPTHによる破骨細胞形成を有意に促進した。

一方、支持細胞存在下ではPGE₂は破骨細胞形成抑制効果を示さず、インドメサシン処理した単核球培養上清は非処理培養上清と同様に破骨細胞形成を抑制した。新しく形成された破骨細胞の骨吸収活性は、全骨細胞を象牙片上で5日間培養し既存の破骨細胞の消失を確認した後 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ とともに種々の試験物質を添加し、新しく形成された破骨細胞あたりの骨吸収窩の数で評価した。単核球培養上清の添加は、破骨細胞あたりの骨吸収窩の数を有意に増加させ、またIL-6の添加も骨吸収窩数を増加させた。

単核球培養上清が支持細胞存在、非存在の両系で $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ またはPTHにより促進される破骨細胞形成を抑制したことから、単核球が破骨細胞形成に影響を及ぼす因子を分泌していることが明ら

かとなった。単核球の分泌する因子の検討から支持細胞非存在の系ではPG, IL-6が、そして支持細胞存在の系ではIL-6が単核球培養上清による抑制作用の惹起因子と考えられた。支持細胞非存在の系でPGE₂が破骨細胞形成を抑制し支持細胞存在の系では逆に促進したことからPGE₂は破骨細胞の前駆細胞に直接的には抑制的に働くが支持細胞等を介する間接作用により支持細胞存在の系では全体として促進効果を示すと考えられた。一方、IL-6は造血幹細胞からの破骨細胞形成の初期の段階で促進的に作用することはよく知られているが、両系においてIL-6は濃度依存的に破骨細胞形成を抑制し、この作用は抗IL-6抗体により阻害されたことより、最終段階の分化過程においては抑制的に作用すると考えられた。さらに、支持細胞存在の系で単核球培養上清による破骨細胞形成抑制作用が抗IL-6抗体により消失したことから単核球培養上清による抑制作用にIL-6が関与することが明らかとなった。単核球培養上清が1,25(OH)₂D₃存在下で新たに形成された破骨細胞による骨吸収を促進し、また、IL-6も同様に骨吸収活性を促進したことから、単核球培養上清中のIL-6が関与していることが示唆された。

以上、本研究は、骨リモデリングの機構についてヒト末梢血単核球から放出される骨代謝調節因子の役割を研究したものであるが、従来知られていなかった破骨細胞形成およびその骨吸収活性の調節に単核球から放出されるIL-6やプロスタグランジンが重要な役割を果たすことを明らかにした価値ある業績であると認める。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。