

論文内容の要旨

農学生命科学研究科獣医学専攻

平成 12 年度博士課程 入学

氏 名 李 始 美

指導教官氏名 岩倉 洋一郎

論文題目 The role of IL-1 in physiological bone metabolism

(生理的骨代謝に於ける IL-1 の役割)

骨は自らの形態変化や血中カルシウム濃度の維持のため、常に破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成からなる再構築を日々繰り返すことにより、骨量を一定に維持している。骨形成・骨吸収に関わる因子に異常が生じ、両者のバランスが崩れると、骨粗鬆症などの骨疾患を引き起こす。骨粗鬆症患者は、アメリカでは約 1800 万人、日本では 1000 万人ほどと推定されるが、この数字はさらに増加する傾向にある。

破骨細胞は骨破壊・骨吸収を直接担当する細胞であり、破骨細胞分化因子によって monocyte- macrophage 系の造血系前駆細胞から分化することが知られている。破骨細胞は骨吸収に必要な酸やプロテアーゼを分泌するだけでなく、骨吸収反応を閉鎖腔において行うための細胞接着や細胞骨格変化などのダイナミックな細胞運動を可能にする形

態的な制御機構を有している。一方、*in vitro* 培養系において、骨芽細胞と破骨細胞前駆細胞との共存培養による直接接触が破骨細胞形成には必須であること、*in vivo* において活発に再構築が行われている骨を電子顕微鏡で観察すると、骨芽細胞と破骨細胞が隣接して存在していることなどから、破骨細胞形成には骨芽細胞との直接接触が必要であることが考えられてきた。数年前にこのような直接接触の実体が、骨芽細胞がその細胞膜上に発現する Receptor Activator of NF- κ B Ligand (RANKL) と呼ばれるサイトカインであることが発見された。RANKL は副甲状腺ホルモン (PTH) などの骨吸収因子によって骨芽細胞上に発現が誘導され、破骨細胞前駆細胞上に存在する受容体である RANK と結合することによって破骨細胞を分化・活性化する。Osteoprotegerin (OPG) は RANK と競合する RANKL のおとり受容体と考えられており、破骨細胞形成を抑制することが知られている。破骨細胞分化の分子機構の解明は、RANKL、RANK および OPG の発見によって急速に進歩した。

免疫系は複雑なサイトカインネットワークによって制御されているが、そのサイトカインネットワークが骨代謝に関わる細胞を制御する機構については、ほとんど明らかにされていなかった。炎症部位で主に活性化マクロファージから産生されるサイトカインである IL-1, TNF- α , IL-6 は強力な破骨細胞性骨吸収促進作用をもち、骨吸収性サイトカインとも呼ばれる。しかし、生理的状态でこれらのサイトカインが骨代謝に果たす役割はわかっていない。本研究では、IL-1 遺伝子欠損 (KO) マウスを用いることにより、生理的な条件下での IL-1 の骨代謝における作用メカニズムについて解析した。

IL-1 は炎症性サイトカインであり、破骨細胞の分化・活性化において重要な役割を果たすことが主に *in vitro* 培養系を用いた実験により報告されている。しかし、IL-1 は単独での破骨細胞分化誘導能はなく、成熟破骨細胞の活性化に直接作用することが知られている。IL-1 には IL-1 α と IL-1 β の二つのタイプが存在するが、その生物学的作用は類似している。今回、IL-1 α ノックアウト (KO), IL-1 β KO, および IL-1 $\alpha\beta$ ダブル KO マウスにおいて、海綿骨の骨密度および皮質骨厚が野生型に比べて有意に増加することが明らかとなった。IL-1 α KO マウスと IL-1 β KO マウスの間には骨量増加において有意な差は認められなかったことから、これ以後の解析には IL-1 $\alpha\beta$ ダブル KO (IL-1KO) マウスを用いた。IL-1 KO マウスの海綿骨において破骨細胞数が野生型マウスの約 60% に減少していることが認められ、IL-1 KO マウスにおける骨量の増加は破骨細胞数の減少によることが示唆された。この結果は IL-1 が生理的な条件において骨代謝に重要な役割をすることを示唆している。

上述したように破骨細胞前駆細胞が含まれる骨髄細胞と骨芽細胞とを骨吸収因子の存在下で共存培養することにより、*in vitro* で骨髄細胞から破骨細胞を形成させることができる。野生型および IL-1 KO マウスの骨芽細胞と骨髄細胞を用いた4種類の組み合わせからなる *in vitro* 共存培養の解析から、骨芽細胞、骨髄細胞共に KO を用いた場合だけ

でなく、骨芽細胞が野生型であっても骨髄細胞が KO の場合は、破骨細胞形成が著しく阻害された。また、IL-1 受容体アンタゴニスト (IL-1Ra) を加えることによって野生型マウスの骨芽細胞と骨髄細胞の共存培養での破骨細胞形成が有意に抑制された。また、IL-1 を加えることによって IL-1KO マウスの骨芽細胞と骨髄細胞の共存培養での破骨細胞形成阻害が回復した。以上の結果は共存培養において、骨髄細胞が構成的に産生する IL-1 が破骨細胞形成に重要であることを示唆する。

共存培養において骨髄細胞が IL-1 KO 由来の時に破骨細胞形成が阻害される理由を調べるために、共存培養における IL-1 α 、IL-1 β 、RANKL および OPG の遺伝子発現をリアルタイム PCR で調べた。その結果、基本型である、破骨細胞形成が良好な野生型マウスの骨芽細胞と骨髄細胞の PTH 存在下における共存培養時には、顕著な RANKL 発現の亢進が認められ、IL-1 α 、IL-1 β の発現は高いままであった。次に、破骨細胞形成が悪かった野生型マウスの骨芽細胞と IL-1KO マウスの骨髄細胞の共存培養時には 顕著な RANKL 発現の亢進が認められたが、IL-1 発現は低いことがわかった。一方、破骨細胞形成が良好な KO マウスの骨芽細胞と野生型マウスの骨髄細胞の共存培養時には、弱い RANKL 発現の亢進と高い IL-1 発現が認められた。OPG の発現変動は4種類の共存培養間に大きな差はなかった。これらの結果から、骨芽細胞での RANKL の発現が十分に亢進していても骨髄細胞において IL-1 α および β の高い発現がなければ破骨細胞の形成は抑制されることが明らかとなった。また、破骨細胞形成には骨芽細胞における RANKL 発現誘導だけではなく骨髄細胞による IL-1 の構成的な発現が重要なことが示唆された。さらに、骨髄細胞における IL-1 発現が高くても骨芽細胞における IL-1 発現がなければ RANKL 発現が低いことから、PTH による RANKL 発現誘導には、骨芽細胞由来の IL-1 のオートクラインメカニズムが重要であることが示唆された。

次に、RANKL による破骨細胞形成に対する IL-1 の影響を詳細に調べるために、骨髄細胞を M-CSF と可溶性 RANKL (sRANKL) 存在下で培養する破骨細胞形成系 (骨髄マクロファージ培養系) を用いて解析した。その結果、KO マウス由来の骨髄マクロファージ培養系では野生型に比べて破骨細胞形成が顕著に抑制されていた。また、KO マウスの骨髄マクロファージ培養を IL-1 存在下で行った場合、濃度依存的に有意に単核および多核の破骨細胞数が増加した。IL-1 を添加しても sRANKL 非存在下では破骨細胞形成は認められず、IL-1 単独では破骨細胞を分化させる活性がないことが明らかとなった。以上から、IL-1 が sRANKL の作用を強め破骨細胞の分化を促進できることが示唆された。また、この分化促進が破骨細胞前駆細胞への直接作用である可能性が考えられた。

これまで、IL-1 は、骨芽細胞/ストローマ細胞に作用して PGE₂ 産生を介して RANKL 発現を誘導するため、破骨細胞の分化に関しては骨芽細胞における RANKL の発現上昇を介した間接作用であると考えられてきた。しかし、本研究の結果から、IL-1 は破骨細

胞上に RANKL を発現させるだけでなく、骨髄マクロファージに作用して破骨細胞の分化を促進することが明らかとなった。

以上をまとめると、本研究により IL-1 は破骨細胞分化を促進することにより生理的な骨代謝に重要な役割をすることが初めて明らかとなった。さらに IL-1 は新しい二つの独立なメカニズムで破骨細胞分化を促進することが明らかとなった。一つ目の効果は骨髄細胞由来の IL-1 が破骨細胞前駆細胞に作用して RANKL による破骨細胞分化を促進する stimulator としての作用であり、この効果が無いことが IL-1KO マウスにおいて破骨細胞数が少ない主な原因と考えられる。二つ目の効果は骨芽細胞由来の内在性 IL-1 がオートクライン的に PTH などの骨吸収因子による RANKL 発現を促進することである。この効果は破骨細胞形成において弱いながらも有意に認められた。本研究により IL-1 の病態における役割は言うまでもなく、生理的な骨代謝における役割も再認識する必要性が示された。