

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 李 女令 美

本論文は骨代謝に対するインターロイキン-1 (IL-1) の役割を検討したもので、IL-1 が炎症時だけでなく、生理状態においても骨代謝に重要な役割を果たしていることを初めて明らかにしている。この中で申請者は、IL-1 遺伝子欠損 (KO) マウスを用い、生体における骨量の変化を解析すると共に (Results I)、細胞培養系でそのメカニズムについて解析を行っており (Results II-VI)、以下にその結果を述べる。

骨は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繰り返すことにより、骨量を一定に維持している。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。また、破骨細胞形成には骨芽細胞との直接接触が必要であると考えられている。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- $\kappa$ B Ligand (RANKL) と呼ばれるサイトカインにより担われてい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 のおとり受容体であり、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。一方、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、それらのサイトカイン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 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、生理的状态でこのサイトカインが骨代謝に果たす役割はこれまで解っておらず、申請者はその役割を検討した。

その結果、申請者は IL-1KO 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を見いだした。この時、IL-1 KO マウスの海綿骨における破骨細胞数は野生型マウスの約 60%に減少しており、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 *in vivo* で 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している。

さらに申請者は、破骨細胞形成に対する IL-1 の役割を調べるために、培養細胞レベルでの検討を行っている。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 (PTH) の存在下で共存培養 (coculture) 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ることを示した。この結果は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 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、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、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共存培養時には、顕著な RANKL 発現の亢進が認められ、IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  の高い発現が認められた。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-1 KO 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 の発現が高くても、骨髄細胞において IL-1 $\alpha$  および IL-1 $\beta$  の高い発現がなければ、破骨細胞形成の効率は悪いことが明らかとなった。このことから、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 の構成的な発現が必須であることが示唆された。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 が重要であることが示唆された。

次に、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を用いて、RANKL による破骨細胞形成に対する IL-1 の影響を詳細に検討した。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ることがわかった。また、KO マウスの骨髄マクロファージ培養に IL-1 を添加すると、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。以上から、IL-1 が RANKL 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、この分化促進は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。

この結果、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。これは二つの独立なメカニズムからなり、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直接作用して、RANKL による破骨細胞分化を促進する stimulator として機能することを初めて明らかにした。この作用が無いことが 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 PTH などの骨吸収因子による RANKL 発現を促進することであり、この効果は破骨細胞形成に弱いながらも寄与していることが認められた。このように、本研究は IL-1 の炎症時の骨破壊に於ける役割だけでなく、生理的な骨代謝における重要性を初めて明らかにしたものであり、骨代謝研究に極めて大きな貢献をなすものである。

なお、論文提出者が主体となり、研究立案と実験および検証を行ったもので、論文提出者が中心的に寄与したものと判断できる。

よって、審査委員一同は本論文が博士（獣医学）の学位論文として価値があるものと認めた。