

学位論文内容の要旨

愛知学院大学

論文提出者

岡部 猪一郎

論文題目

破骨細胞原生に対する IL-15 と RANKL の
相乗効果について

I. 緒言

慢性炎症はリウマチ(RA)や歯周病(PD)における骨破壊に重要な役割を担っている。RAやPD患者において、その病巣局所にはサイトカインが大量に産生されている。関節炎の滑膜および炎症性歯肉や歯肉溝浸出液において、腫瘍壊死因子(TNF)- α 、インターロイキン(IL)-1 β 、IL-6などの炎症性サイトカインが上昇していることが報告されている。これらのサイトカインは骨芽細胞に作用し、破骨細胞形成促進因子(RANKL)の発現促進と破骨細胞形成抑制因子(OPG)の産生抑制により、骨吸収を誘導することが分かっている。

炎症性サイトカインであるIL-15はIL-2の生物学的活性と多くを共有するT細胞増殖因子として発見され、上皮細胞、内皮細胞、線維芽細胞、筋細胞、マクロファージ、樹状細胞、マスト細胞など多くの細胞から産生される。そして、直接的な関与は分かっていないが、IL-15がRAやPDのような病的骨破壊を伴う疾患に関係しているという報告があり、破骨細胞の分化、活性化において重要な役割を担っている可能性がある。さらに、IL-15の中和抗体によりコラーゲン誘導性関節炎の骨破壊を抑制するといった報告がある。一方、IL-15の欠如によりT細胞誘導性の直接的、間接的破骨細胞形成が阻害され、骨過形成を伴う疾患が引き起こされるとの報告がある。そこで本研究では*in vitro*におけるIL-15のRANKL誘導性破骨細胞形成への影響を詳細に検討した。

II. 材料および方法

1. 細胞培養

マクロファージ系細胞である RAW 細胞を 24-well 細胞培養用プレートに播種した。25 ng/ml RANKL と 100 ng/ml IL-15 にて刺激を行い 5 日間分化培養を行った。

2. 酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ

(Tartrate-Resistant Acid Phosphatase; TRAP) 染色

RAW 細胞を 5 日間分化培養後、TRAP Kit を用い染色を行った。3 核以上の TRAP 陽性細胞数を光学顕微鏡下で観察した。細胞の分化状態の算出は下記の方程式にて求めた。

$$\text{Fusion index (\%)} = \frac{\text{3 核以上を持つ TRAP 陽性細胞数}}{\text{すべての TRAP 陽性細胞数}}$$

3. Hydroxyapatite resorption assay

RAW 細胞を 24-well Corning Osteo Assay Surface 上で培養し、5 日目に細胞除去を行った後、光学顕微鏡下で吸収窩の観察を行った。

4. Real-time quantitative PCR (qPCR)

RAW細胞を3日間分化培養後、Total RNA抽出を行い、破骨細胞のマーカであるmatrix metalloproteinase (MMP)-9、TRAP、Cathepsin K、receptor activator of NF- κ B (RANK)、nuclear factor of activated T cells (NFAT)c1、

carbonic anhydrase (CA) II に特異的なプライマープローブを用いてqPCRを行った。

5. Western-blotting

RAW 細胞を 30 分および 60 分刺激後、タンパクの回収を行い、同サンプルを電気泳動によりタンパク分離を行い、メンブレンに転写した。その後、p-38 MAPK (p-38) 抗体、phospho-p-38 抗体、c-jun N-terminal kinase (JNK) 抗体、phospho-JNK 抗体、extracellular signal-regulated kinase (ERK) 抗体、phospho-ERK 抗体、nuclear factor-kappa B (NF- κ B) 抗体、phospho-NF- κ B 抗体、RANK 抗体、および NFATc1 抗体を用いて反応させた。

6. Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA)

RAW 細胞を 5 日間培養後、細胞培養上清の回収を行い MMP-9 産生量の解析を行った。

7. 破骨細胞分化への MAPK、NF- κ B 経路阻害剤の評価

RAW 細胞にそれぞれ SB203580 (p-38 MAPK 阻害剤)、PD98059 (ERK 阻害剤)、SP600125 (JNK 阻害剤)、MG-132 (プロテアソーム阻害剤) 10mM にて 1 時間処理を行い、その後 5 日間培養後、TRAP 染色を行った。

8. 統計学的解析

すべての値は、平均値±標準誤差で表し、統計学的解析には SPSS12.0 ソフトウェアを用い、多重比較における検定には one-way ANOVA を使用し、 $p < 0.05$ をもって有意とした。

Ⅲ. 結 果

1. IL-15 による RANKL 誘導性の破骨細胞形成への影響

IL-15 および RANKL の共刺激群において RANKL 単独刺激と比較し有意に TRAP 陽性細胞数の増加を認めた。また、3 核以上を持つ TRAP 陽性細胞数の割合も RANKL 単独刺激と比較し、IL-15 との共刺激により有意に増加していた。

2. IL-15 による RANKL 誘導性の破骨細胞活性化への影響

IL-15 および RANKL 共刺激によって出来た吸収窩の割合は RANKL 単独刺激時よりも有意に増加していた。

3. IL-15 による RANKL 誘導性の破骨細胞分化マーカー遺伝子発現への影響

IL-15 および RANKL の共刺激によって MMP-9、TRAP、cathepsin K、NFATc1、CA II 遺伝子発現が RANKL 単独刺激と比較し有意に増加した。さらに、NFATc1、RANK タンパク発現量も同様に IL-15 および RANKL 共刺激により増加していた。

4. IL-15 による RANKL 誘導性破骨細胞分化促進メカニズム

IL-15 および RANKL 共刺激により ERK、JNK、p-38 MAPK、NF- κ B のリン酸化がそれぞれ単独刺激時に比較し有意に増加した。

5. IL-15 による MAPK、NF- κ B 経路阻害剤の破骨細胞形成促進への影響

RAW 細胞への PD98059 (ERK 阻害剤)による前処理により、IL-15 および RANKL 共刺激時の破骨細胞数は未処理群と比較し有意に減少した。

IV. 考 察

本研究は RAW 細胞に対する IL-15 の影響を検討しており、IL-15 と RANKL の破骨細胞形成への相互作用を報告するものである。以下に 4 つの重要な点について記す。第一に、IL-15 単独では破骨細胞形成に対して大きな影響を与えないが、RANKL との相乗作用により有意な促進作用を示す。現在までに報告されていることとして、初期の RA 患者において T 細胞由来の RANKL と IL-15 の分泌が増加し、破骨細胞形成を促進するという報告がある。実際に、炎症状態での IL-15 と RANKL の共在は生体内に見られ、そのことより RANKL の作用を IL-15 が増強する可能性は十分に考えられる。また、RA 患者の滑液中に最高 1200 ng/ml の IL-15 が検出されたとの報告もある。

第二に、今回比較的低濃度の IL-15 が RANKL 存在下で破骨細胞形成を促進したことより、局所炎症環境などでのわずかな IL-15 産生の増加で破骨細胞形成促進が起こることが考えられる。

第三に、RANKL の他にも TNF- α 等の破骨細胞誘導物質があるが、今回、RANKL 非存在下では IL-15 によるこれら破骨細胞誘導物質との相乗作用は見られないことを確認している。さらに、RAW 細胞において炎症性サイトカインである IL-15 による刺激が RANKL の産生誘導に寄与していないことも確認している。これらのことより今回見られた破骨細胞形成促進は IL-15 の

RANKL 誘導によるものではなく、RANKL と IL-15 の相乗作用によるものであることを示唆している。

最後に、RANKL による破骨細胞分化誘導に対して一般的には p-38 が重要な細胞内シグナル経路だと言われているが、IL-15 が関与する破骨細胞分化には ERK が重要な役割を担っていることを初めて確認した。様々な分裂促進因子、サイトカイン、成長因子、環境ストレスなどの細胞外刺激因子が受容体依存的、もしくは非依存的に複数の ERK 経路を刺激するとの報告がある。よって、今後の研究により ERK がどのように破骨細胞形成に関わっているかを解明することが重要である。

現在までに、IL-15 と破骨細胞形成との関連を示唆するいくつかの報告がある。RA 患者の T 細胞より産生される IL-15 が自己単球との共培養で破骨細胞形成を誘導するというものや、野生型の細胞と比較し IL-15 受容体欠損マウスの脾臓、骨髄細胞において破骨細胞形成および、破骨細胞の機能が減少するというものがある。また、IL-15 欠損マウスにおいて骨密度が増加することや、血清中の TRAP とオステオカルシンの濃度は IL-15 受容体欠損マウスにおいて低く、これは IL-15 シグナルの欠如による骨代謝の減少と相関があるといった報告がある。これらの報告は IL-15 の欠如が破骨細胞数の減少と深く関わっていることを示唆するものである。また一方で、IL-15 と骨髄細胞および骨芽細胞の共培養系で NK 細胞を活性化させることによって間接的に骨芽細胞数を減少させ、結果的に骨破壊へとつながる可

(論文内容の要旨)

No. 7

愛知学院大学

能性を報告したのものもある。以上の様に、IL-15 は骨代謝に対して大きな影響を持っており、その役割に関して今後更なる検討が必要ではあるが、IL-15 が生体内での破骨細胞分化に対して重要な役割を担っている可能性は高いと考えられる。