

プロスタグランジンJの骨芽細胞機能に 及ぼす影響に関する細胞生物学的研究

大阪市立大学医学部第二内科 助教授 西 沢 良 記

【背景】プロスタグランジン J₂ (PGJ₂) は PGD₂ の誘導体であり、その代謝産物である Δ¹²-PGJ₂ はヒトの尿中で検出されている。PGD₂ は血漿またはアルブミン存在化で PGJ₂ に転換される。PGJ₂ はヒト骨芽細胞においてアルカリホスファターゼ (ALP) 活性およびカルシウム沈着を増加させることが報告されている。しかし、その他の骨芽細胞機能 (副甲状腺ホルモン受容体の発現、骨基質タンパクの発現など) に対する影響や PGJ₂ の作用機序については明らかにされていない。

最近、PGJ₂ がその受容体である peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPARγ) を介して脂肪細胞の分化を調節することが明らかにされている。PPARγ には2つのアイソフォーム (PPARγ1、PPARγ2) の存在が確認されており、脂肪細胞の分化調節には PPARγ2 が主として関与している。また、PPARγ2 の発現は脂肪組織に特異的であるが、PPARγ1 は種々の組織で認められている。しかし、PPARγ1 の機能特に脂肪組織以外の組織での機能については不明である。また、糖尿病治療薬である thiazolidinedione 誘導体が PPARγ に特異的に結合し、脂肪細胞への分化を促進することが報告されている。

そこで、本研究では、PGJ₂、その活性型である 15-deoxy-Δ^{12,14}-PGJ₂ および thiazolidinedione 誘導体のひとつである troglitazone の骨芽細胞機能に対する影響をマウス骨芽細胞株 (MC3T3-E1) を用いて検討した。また、破骨細胞の分化誘導に骨芽細胞の関与が報告されていることから、これらの化合物の in vitro での破骨細胞分化誘導に対する作用についても検討した。

【検討項目】PGJ₂、15-deoxy-Δ^{12,14}-PGJ₂ および troglitazone の骨芽細胞機能に対する作用として以下の項目について検討を行った。

- 1) 骨芽細胞におけるアルカリ性ホスファターゼ (ALP) 活性に対する作用
- 2) 骨芽細胞の in vitro での石灰化に対する作用
- 3) 骨芽細胞における Peroxisome Proliferated Receptor-γ (PPAR-γ) の遺伝子発現に対する作用
- 4) in vitro での破骨細胞分化誘導に対する作用

【方法】

1) 細胞培養：骨芽細胞としてマウス骨芽細胞株 (MC3T3-E1) を用いた。MC3T3-E1 細胞は理研細胞バンクより入手した。MC3T3-E1 細胞は 10% ウシ胎児血清 (FCS) を含む α-Modified Eagle Medium (α-MEM) で培養・維持した。

In vitro における破骨細胞の分化誘導は、マウス骨髄由来の非付着性単核細胞

(BMM)とマウス骨髄ストローマ細胞株 (ST2) を 10^{-8} M 1,25-dihydroxyvitamin D₃ および 10^{-7} M dexamethasone 存在下で 10 日間共存培養することにより行った。この系に用いた細胞はいずれも 10% ウシ胎児血清 (FCS) を含む α -Modified Eagle Medium (α -MEM) で培養した。

2) アルカリ性ホスファターゼ活性の測定: MC3T3-E1 細胞を培養後、細胞層の蛋白を 0.1% Triton X-100 を含む 0.9% NaCl 溶液により可溶化し、*p*-nitrophenyl phosphate を基質として 495 nm の吸光度を測定することにより酵素活性を求めた。最後に、細胞層の蛋白量により酵素活性の補正を行った。

3) *in vitro* での石灰化能の評価: MC3T3-E1 細胞を confluent になるまで培養した後、10 mM β -glycerophosphate (β -GP) および 50 μ g/ml ascorbic acid を添加することにより石灰化を誘導した。石灰化誘導後に出現する細胞層の石灰化 nodules を von Kossa 染色し、その数を算定することにより石灰化能を評価した。

4) Northern Blot 法による Peroxisome Proliferated Receptor- γ (PPAR- γ) 遺伝子発現の検討: マウス Peroxisome Proliferated Receptor- γ 1 (PPAR- γ 1) の cDNA probe は Dr. J. K. Reddy (Northwestern University Medical School, Chicago, IL) より供与された。培養細胞より total RNA を acid guanidium phenol chloroform 法により抽出し、1% agarose で電気泳動した後、nylon membrane に転写した。cDNA probe は random priming 法を用いて [³²P] α -dCTP で標識した。

5) 酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ (TRAP) 染色: 上記の共存培養により得られた多核巨細胞を破骨細胞の分化マーカーのひとつである酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ (TRAP) で酵素化学的に染色し、TRAP 陽性で 3 つ以上の核を有する細胞を破骨細胞として算定した。

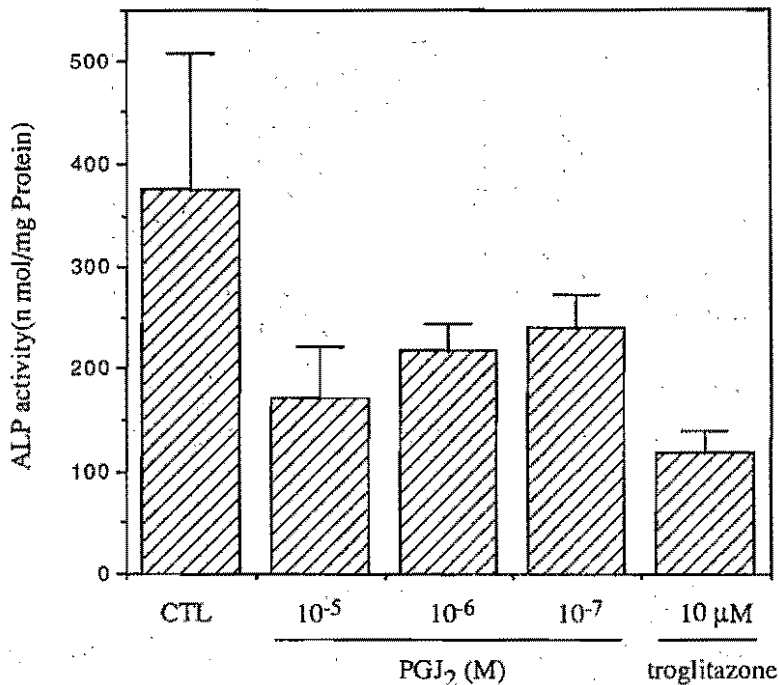
6) 吸収窩アッセイ (Pit Assay): *in vitro* で形成された破骨細胞の骨吸収能を検討するため、pit assay を行った。ウシ脛骨より low speed diamond saw を用いて 7 x 7 x 0.5 mm 骨片を作製した。骨片上で共存培養を行い、10 日後に骨片を 10% formalin で固定した。その後、0.1 M 水酸化ナトリウムで 1 時間処理し、PBS で洗浄した後、トルイジンブルー染色を行った。吸収窩は境界明瞭なトルイジンブルー陽性領域として光学顕微鏡下で観察された。

【結果】

1) 骨芽細胞におけるアルカリ性ホスファターゼ (ALP) 活性に対する作用

骨芽細胞の分化マーカーのひとつである ALP 活性を測定した。MC3T3-E1 細胞を 7 日間培養した後、PGJ₂ および troglitazone を添加した。添加 4 日後の MC3T3-E1 細胞における ALP 活性を測定したところ、PGJ₂ は 10⁻⁷ - 10⁻⁵ M の範囲で用量依存的に ALP 活性を抑制し、10⁻⁵ M ではコントロールに比して約 50% まで ALP 活性を低下させた (図 1)。また、troglitazone は 10⁻⁵ M でコントロールに比して約 40% まで低下させた (図 1)。

図 1. PGJ₂ および troglitazone の MC3T3-E1 細胞における ALP 活性に対する作用



2) 骨芽細胞の in vitro での石灰化に対する作用

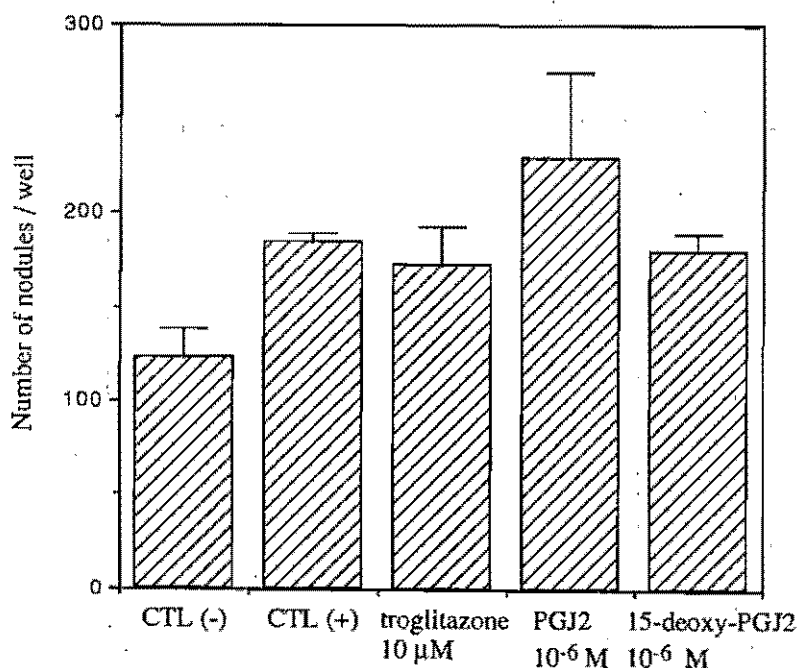
骨芽細胞機能のひとつとして in vitro での石灰化能について検討した。MC3T3-E1 細胞を 7 日間培養した後、10 mM β-GP および 50 μg/ml ascorbic acid を添加することにより石灰化を誘導した。石灰化誘導 4 日後に細胞層に形成された石灰化 nodules を von Kossa 染色した後、その数をカウントすることにより石灰化能を評価した。PGJ₂、15-deoxy-Δ^{12,14}-PGJ₂ および troglitazone は石灰化誘導開始時に添加した。PGJ₂ (10⁻⁶ M)、15-deoxy-Δ^{12,14}-PGJ₂ (10⁻⁶ M) および troglitazone (10⁻⁵ M) は MC3T3-E1 の石灰化に対して有意な変化を与えなかった (図 2)。

3) 骨芽細胞における Peroxisome Proliferated Receptor-γ (PPAR-γ) の遺伝子発現に対する作用

PGJ₂ の受容体である PPAR-γ の遺伝子発現を Northern Blot 法により解析し

た。PPAR- γ には2つのアイソフォームが知られており、PPAR- γ 1は種々の組織に発現しているのに対して、PPAR- γ 2の発現は脂肪細胞に特異的であると考えられている。MC3T3-E1では、PPAR- γ 1の発現が確認されたが、PGI₂およびtroglitazoneの添加でもPPAR γ 2の発現は誘導されなかった。

図2. PGI₂、15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PGI₂およびtroglitazoneの石灰化に対する作用



4) in vitroでの破骨細胞の分化誘導に対する作用

in vitroでの破骨細胞の分化誘導に対する作用を上記の共存培養系を用いて検討した。PGI₂、15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PGI₂およびtroglitazoneはそれぞれ用量依存的に破骨細胞の形成を抑制した(図3, 4, 5)。PGI₂および15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PGI₂は、コントロールに比して10⁻⁵ Mでそれぞれ50%および33%まで低下させた。また、troglitazoneは50 μ Mでコントロールの15%まで抑制した。これらの化合物が共存培養に用いているBMMとST2細胞のいずれに主として作用し抑制効果を発揮しているのかを明らかにするため、2段階培養法をもちいてこれらの化合物の作用を検討した(図6)。これらの化合物のBMMに対する作用は、BMMを5,000 U/ml M-CSF存在下で培養する際にこれらの化合物を添加し、4日間培養した後にST2細胞と共存培養を開始し、10日後の破骨細胞形成能により評価した。また、これらの化合物のST2細胞に対する作用は、ST2細胞単独で培養する際にこれらの化合物を添加し、添加3日後にBMMと共存培養を開始し、10日後の破骨細胞形成能により評価した。BMMに対するこれらの化合物の処理は、その後の共存培養における破骨細胞形成能に対して影響を示さなかった(図

図3. PGI₂およびtroglitazoneの破骨細胞分化誘導に対する作用

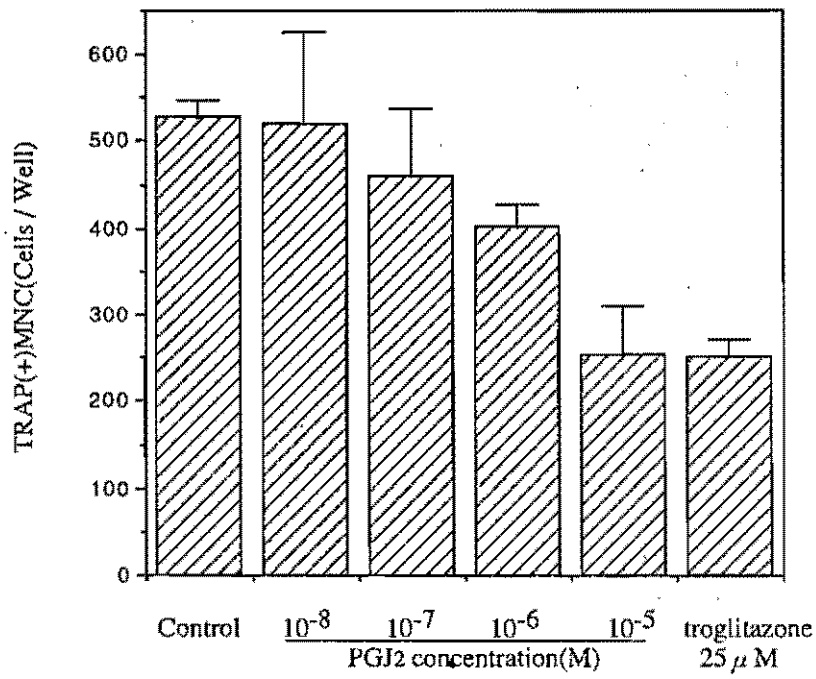


図4. 15-deoxy-Δ^{12,14}-PGJ₂の破骨細胞分化誘導に対する作用

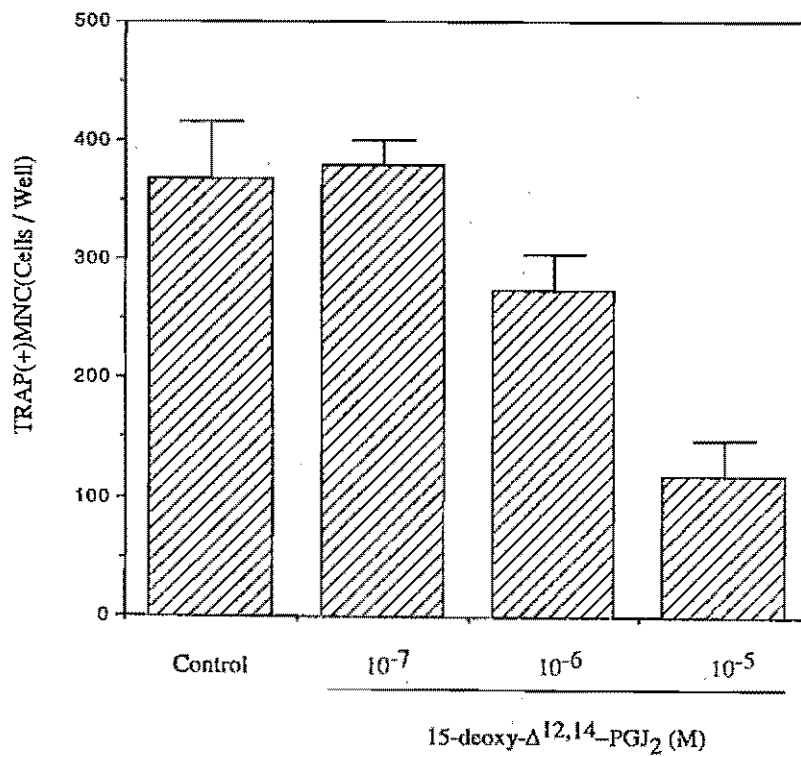


図5. troglitazoneの破骨細胞分化誘導に対する作用

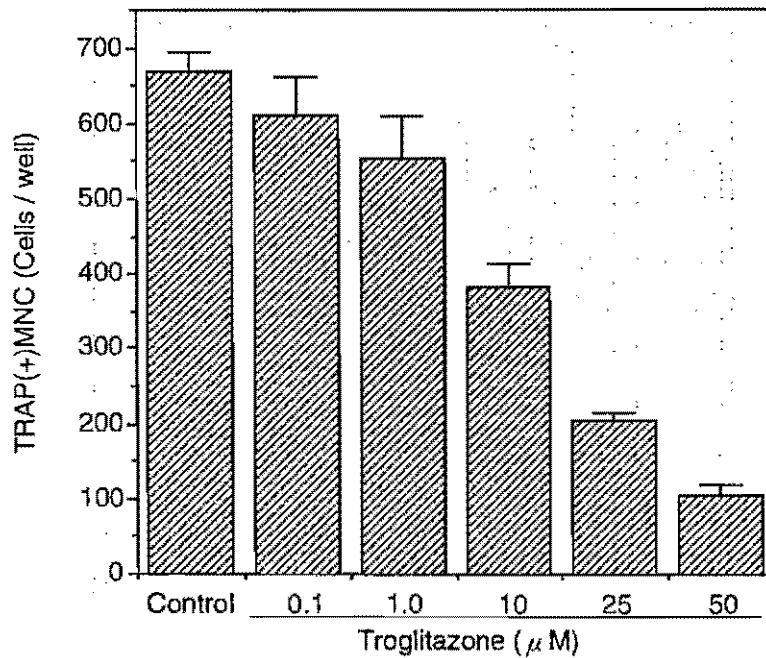
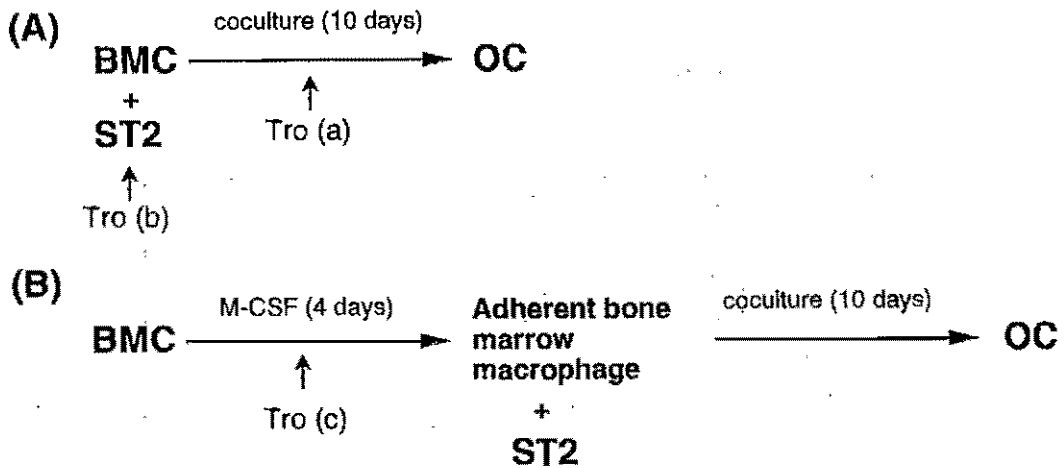


図6. 2段階共存培養法



7、8、9)。それに対して、ST2に対するこれらの化合物の処理では、それぞれ破骨細胞の形成を抑制した（図10、11、12）。したがって、破骨細胞分化誘導の初期におけるこれらの化合物の作用の主な標的はST2細胞であることが示唆された。しかし、分化誘導の後半にもこれらの化合物が作用している可能性も考えられる。そこで、共存培養の時期を1-4日、4-7日、7-10日の3つに分けてそれぞれの時期に troglitazone の添加を行い、いずれの時期がその作用発現に重要であるかを検討したところ、作用期間が長くなるにした

図7. PGJ₂の破骨細胞分化誘導におけるBMMへの直接作用

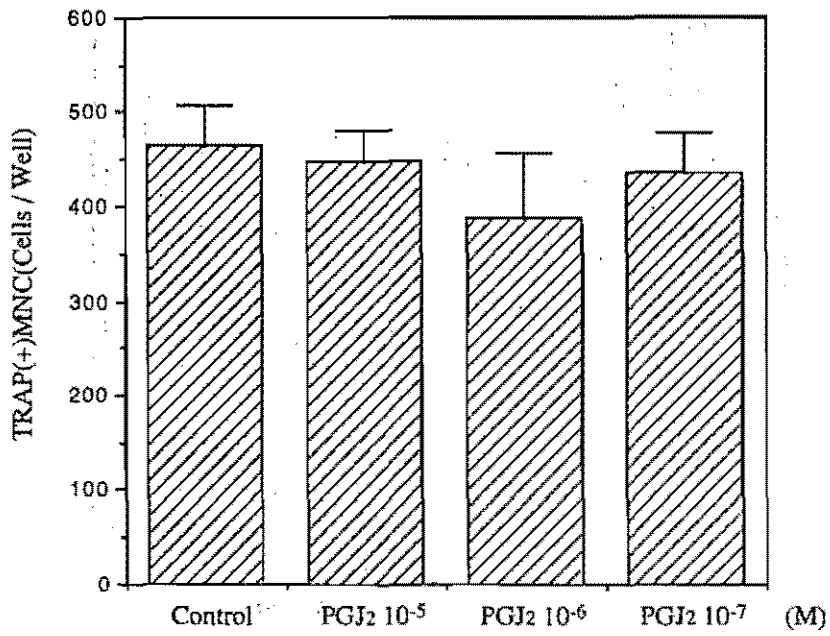


図8. 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PGJ₂の破骨細胞分化誘導におけるBMMの直接作用

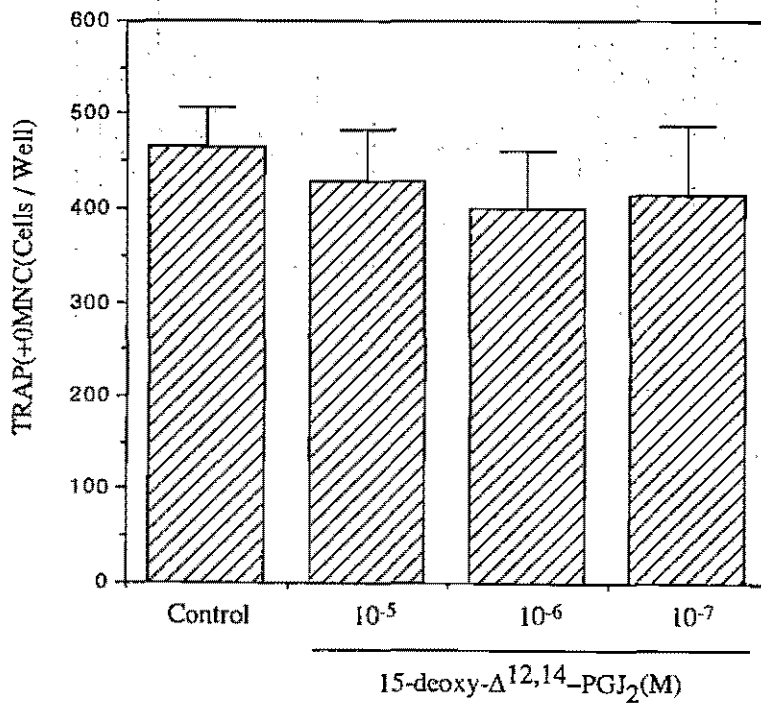


図9. troglitazoneの破骨細胞分化誘導におけるBMMに対する直接作用

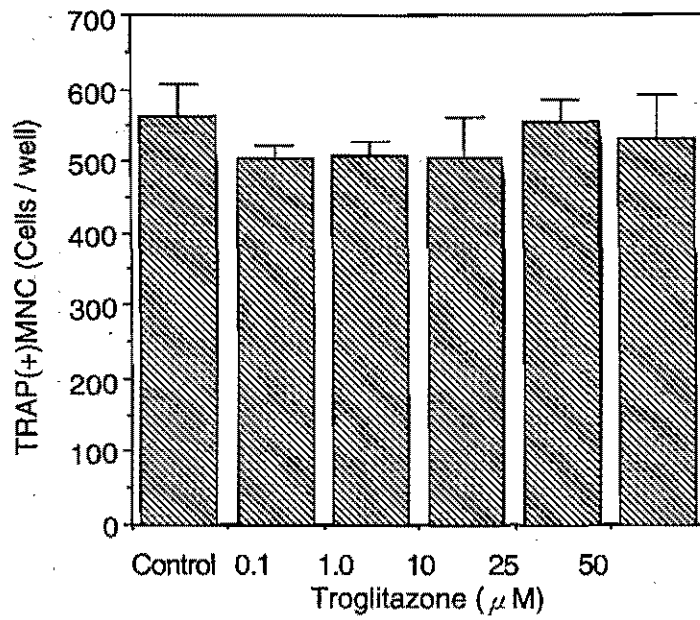


図10. PGJ2の破骨細胞分化誘導におけるST2への直接作用

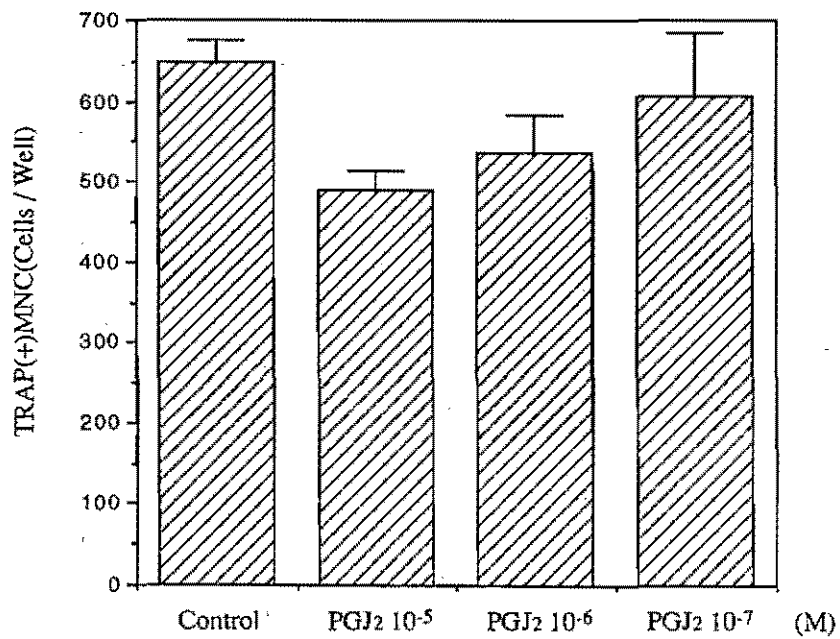


図 1 1 . 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PGJ₂の破骨細胞分化誘導におけるST2への直接作用

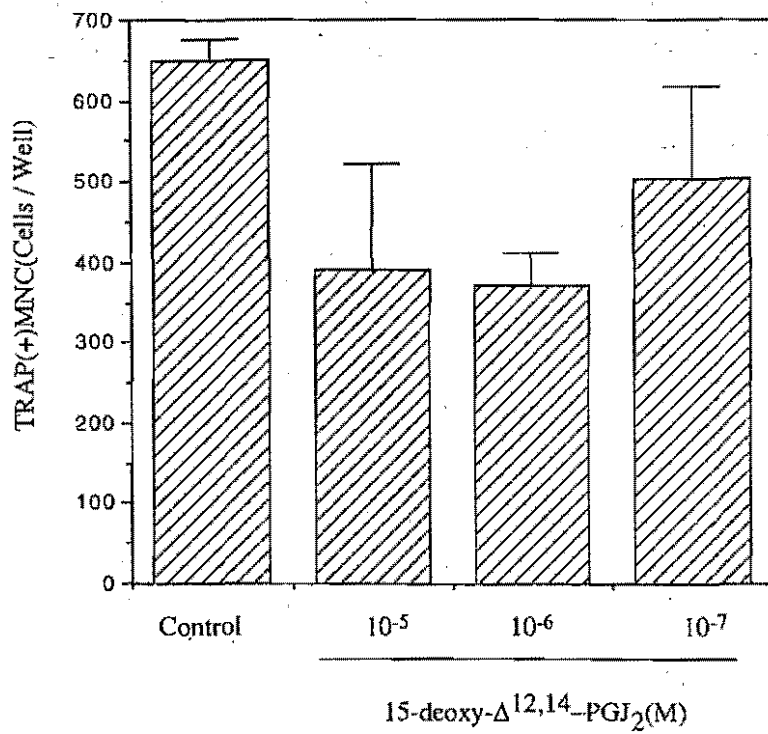
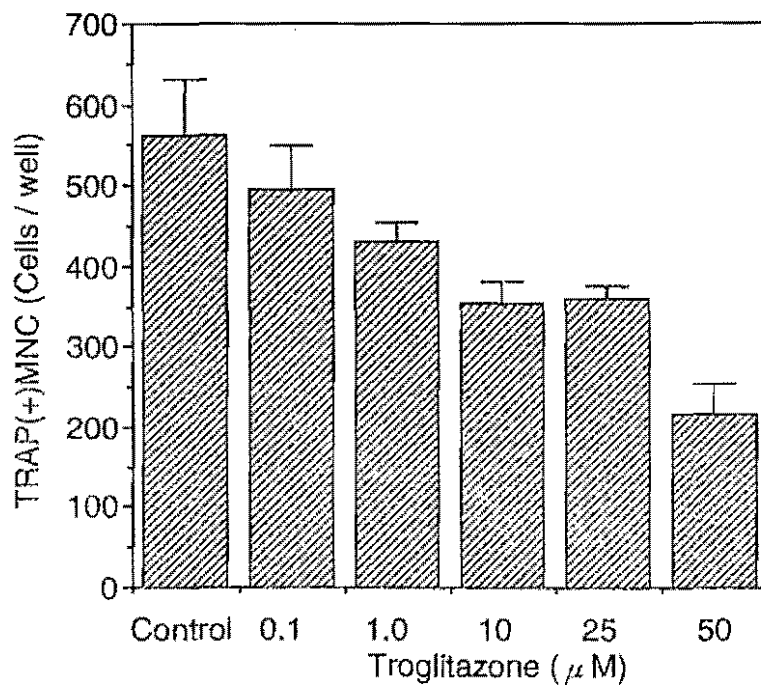
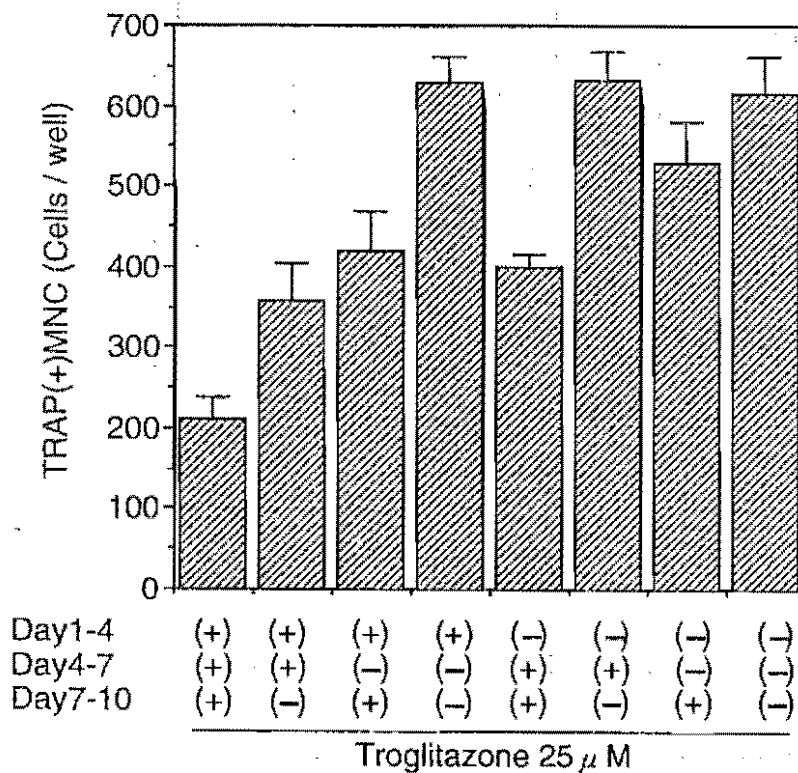


図 1 2 . troglitazoneの破骨細胞分化誘導におけるST2への直接作用



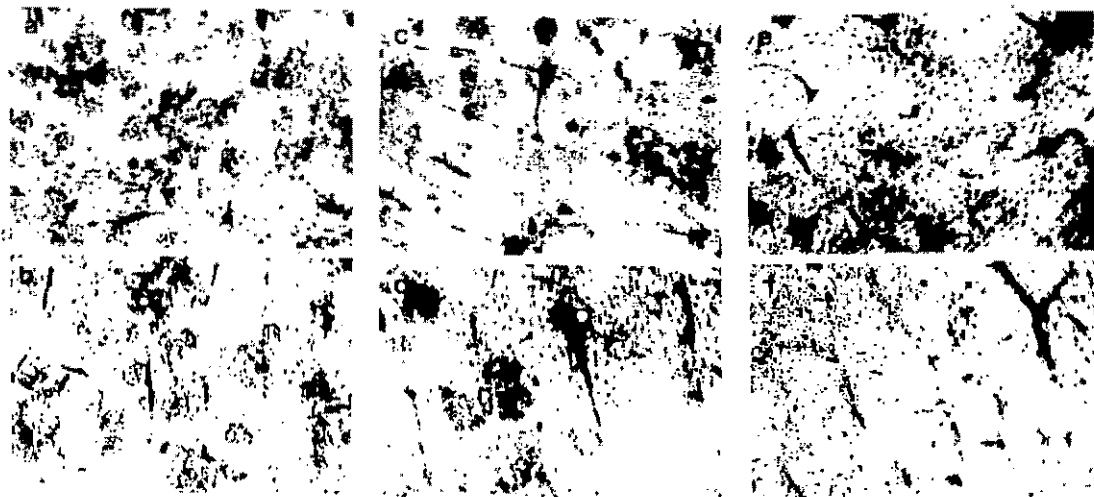
がって抑制効果が強くなることが明らかにされた (図1-3)。特に、共存培養4日目以降に troglitazone を添加した場合でも明らかな抑制効果が認められたことから、その作用は破骨細胞分化の後期にも認められることが示唆された。

図1-3. troglitazoneの処理期間による破骨細胞分化誘導に対する影響



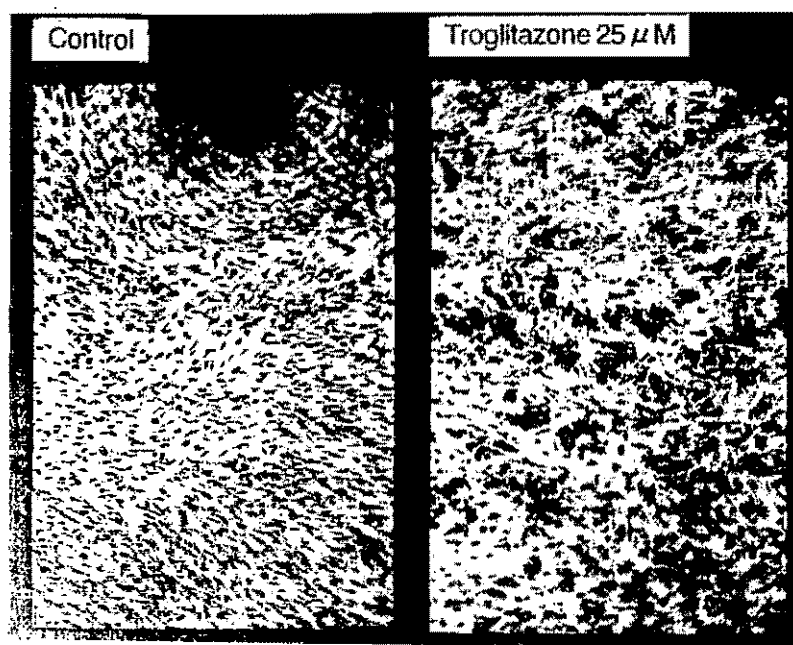
破骨細胞の骨吸収能に対する troglitazone の作用を pit assay を用いて検討した。Troglitazone により吸収窩の形成は用量依存的に抑制された（図 1 4）。したがって、troglitazone は破骨細胞形成だけでなく、その機能も抑制することが示唆された。

図 1 4. troglitazoneの吸収窩形成に対する作用



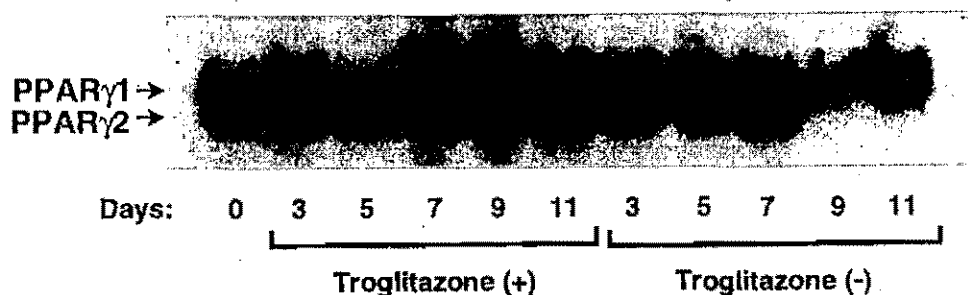
上記の検討から、 PGI_2 誘導体および troglitazone の破骨細胞分化抑制作用の主な標的が ST2 細胞であることが示唆されたため、これらの化合物の ST2 細胞に対する作用特に脂肪細胞への分化作用について検討した。ST2 細胞を $25 \mu M$ troglitazone で 6 日間処理した後、ST2 細胞を oil red O 染色を行った。Troglitazone により ST2 細胞はその形態を紡錘形から円形に変えるとともに細胞質内に oil red O 染色陽性の脂肪滴が認められた（図 1 5）。 PGI_2 誘導体では、4 日間の処

図 1 5. troglitazoneの脂肪細胞への分化促進作用



理では troglitazone でみられたほどの形態学的変化は見られなかったが、14～21日間の処理により弱いながら脂肪細胞への形態学的変化が観察された。最後に、脂肪細胞への分化に重要な PPAR- γ 2 の遺伝子発現に対する troglitazone の作用について Northern Blot 法により検討した。25 μ M troglitazone は ST2 細胞における PPAR- γ 2 の遺伝子発現が経時的に増加した (図16)。

図16. troglitazoneのPPAR γ 遺伝子の発現に対する作用



【考察】

本研究から、PGJ2 誘導体および troglitazone は骨芽細胞機能に対して抑制的に作用することが示唆された。また、破骨細胞の分化誘導に対しても抑制的に作用することから、これらの化合物は骨のリモデリングを低下させる可能性が考えられる。したがって、高回転型の骨粗鬆症モデルを用いた *in vivo* での検討が今後必要であることが推察される。また、これらの化合物の破骨細胞の分化誘導抑制作用は主として骨髄ストローマ細胞に作用することによると考えられた。また、その機序として骨髄ストローマ細胞を脂肪細胞に分化させることにより、その破骨細胞支持能を低下させる可能性が示唆された。