原 著

ヒト前骨髄性白血病細胞 (HL 60) の RANK 遺伝子発現と破骨細胞への分化に対するインターロイキン 11 (IL-11) の効果について

古 田 保

岩手医科大学歯学部歯科矯正学講座 (主任: 三浦廣行教授)

岩手医科大学歯学部口腔生化学講座 (指導: 佐藤詔子教授)

[受付: 平成 11 年 9 月 30 日, 受理: 平成 12 年 1 月 25 日]

Effects of Interleukin 11 (IL-11) on the Expression of RANK mRNA and Osteoclast Differentiation in a Human Myeloid Leukemia Cell Line (HL 60)

Tamotsu Furuta

Department of Orthodontics, Iwate Medical University School of Dentistry

(Chief: Prof. Hiroyuki Miura)

Department of Biochemistry, Iwate Medical University School of Dentistry

(Director: Prof. Nobuko Sato)

1-3-27, Chuodori, Morioka, Iwate 020-8505, Japan

[Received on September 30, 1999; Accepted on January 25, 2000]

Key words: receptor activator of NF- κ B (RANK)/human myeloid leukemia cell (HL 60)/Interleukin 11 (IL-11)/osteoclast/RT-PCR

Abstract: Osteoclast differentiation factor (ODF) expressed on the membranes of osteoblasts/stromal cells in response to bone resorption factor binds to a receptor activation NF- κ B (RANK), a receptor for ODF, associated with membranes of osteoclast precursor cells and induces osteoclast differentiation. In the present study, we investigated the effects of IL-11 on RANK gene expression and osteoclast differentiation in a human myeloid leukemia cell line (HL 60). RANK mRNA was constitutively expressed in HL 60 and bone resorption factors such as IL-11, PGE₂ or VD₃ increased dose-dependently with increasing levels of RANK mRNA. HL 60 differentiated into osteoclasts when cocultured with a bone marrow-derived clonal preadipocytic cell line (ST 2) in the presence of IL-11. Also, a similar result was obtained after the stimulation of macrophage-colony stimulating factor (M-CSF). Additionally, the level of RANK mRNA in HL 60 after the stimulation of IL-11 in association with M-CSF was no greater than that obtained after the stimulation of IL-11. On the other hand, the formation of osteoclasts was enhanced by treatment with M-CSF in association with IL-11.

These results suggest that IL-11 is involved in the regulation of bone resorption mediation through the induction of RANK gene expression on osteoclast precursor cells.

抄録: 骨吸収因子の刺激により骨芽細胞/ストローマ細胞膜上に発現する破骨細胞分化誘導因子 (ODF) は、破骨細胞前駆細胞膜上に発現する ODF 受容体である Receptor activator of NF- κ B (RANK) と結合することにより、破骨細胞への分化を誘導する。そこで、ヒト前骨髄性白血病細胞 (HL 60) の RANK 遺伝子発現ならびに

破骨細胞への分化に対する IL-11 の効果について検討した。HL 60 は恒常的に RANK mRNA を発現しており、骨吸収因子である IL-11, PGE_2 ならびに VD_3 は HL 60 の RANK mRNA 量を濃度依存的に増加させた。また HL 60 をマウス骨髄由来ストローマ細胞 (ST 2) と共存培養する際、IL-11 を添加したところ破骨細胞が形成された。M-CSF 単独刺激においても同様の結果が得られた。M-CSF 存在下に IL-11 処理を行っても HL 60 における RANK の発現量は IL-11 単独刺激で得られた値を超えることはなかった。一方、破骨細胞形成能は M-CSF との同時処理により増強された。これらの結果から IL-11 は、破骨細胞前駆細胞の RANK 発現を誘導することにより骨吸収の調節に関与することが示唆された。

結 言

骨組織に存在する主な細胞は破骨細胞、骨芽細胞、骨細胞であり、骨の成長および骨改造現象におけるそれぞれの細胞の分化、増殖、活性化が制御されている。骨改造現象における主役のひとつである破骨細胞は、顆粒球-マクロファージ形成細胞 (colony forming unit-granulocyte-macrophage; CFU-GM) などの造血幹細胞に由来する骨吸収能を有する多核巨細胞である。現在までに破骨細胞に関する研究は数多くあるが、破骨細胞が骨に局限して存在し、*in vitro* での破骨細胞の形成が困難であったため、その形成過程およびその機能の調節機構の詳細については不明な点が多かった。近年、*in vitro* での骨代謝分析法が進歩し、破骨細胞形成抑制因子 (osteoclastogenesis inhibitory factor; OCIF)^{1,2)}、破骨細胞分化誘導因子 (osteoclast differentiation factor; ODF)³⁾、さらに ODF の受容体として receptor activator of NF- κ B (RANK) が相次いでクローニングされ⁴⁾、破骨細胞の分化を調節する機構の解明が分子レベルで可能となってきた。ODF は、さまざまな骨吸収因子の刺激により骨芽細胞/ストローマ細胞膜に発現する腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor; TNF) ファミリーに属する膜結合タンパク質であり、これは osteoprotegerin ligand (OPGL)⁵⁾、TNF-related activation-induced cytokine (TRANCE)⁶⁾、receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL)⁷⁾ と同一のタンパク質であった。また RANK は、ヒトの樹状細胞の cDNA ライブラリーからクローニングされ⁷⁾、TNF レセプタースーパーファミリーに属する 625 アミノ酸から構成される I 型の膜タンパク質である。この RANK はこれまでの研究から ODF の受容体であることが明らかとなった⁷⁾。破骨細胞前駆細胞が有する RANK は ODF のシグナルを受けて、破骨細胞へと分化・成熟する。同定された OCIF は TNF レセプターファミリーに属する可溶性タンパク質であり、骨に特異的に作用する。ほぼ同時期に osteoprotegerin (OPG)⁸⁾、TNF-like molecule 1 (TR 1)⁹⁾ が

同定され、OCIF と同一のタンパク質であることが証明された^{2,10)}。OCIF が骨芽細胞/ストローマ細胞表面上の ODF に結合すると、ODF は RANK と結合できないため ODF のシグナル伝達は阻止され、その結果破骨細胞の分化が抑制される²⁾。

脾臓細胞や末梢血細胞などに存在する破骨細胞前駆細胞は骨芽細胞/ストローマ細胞と共存培養すると、破骨細胞に分化する。このような培養系ではインターロイキン (IL)-6, IL-11, プロスタグランジン E_2 (PGE_2), $1\alpha, 25(\text{OH})_2$ -ビタミン D_3 (VD_3), 副甲状腺ホルモン (PTH) などの骨吸収因子の処理により破骨細胞の誘導が亢進する¹¹⁻¹³⁾。また骨吸収因子は、骨芽細胞/ストローマ細胞が産生する可溶性因子であるマクロファージコロニー刺激因子 (macrophage colony stimulating factor; M-CSF) 存在下で ODF の遺伝子発現を誘導することにより破骨細胞形成を促進することが報告されている¹⁴⁻¹⁷⁾。一方ヒト前骨髄性白血病細胞 (HL 60) は急性前骨髄性白血病患者の末梢血から樹立された細胞で¹⁸⁾、 VD_3 処理により破骨細胞へ分化する^{19,20)}。また薬剤処理により顆粒球系成熟細胞やマクロファージ様細胞への分化も可能であり、そのため細胞分化に関与する分子やそれら受容体の研究に広く用いられている。

現在までに ODF および OCIF の遺伝子発現に対する骨吸収因子の効果についての報告があるが^{21,22)}、破骨細胞前駆細胞や破骨細胞に発現している ODF 受容体である RANK の遺伝子発現調節に関する報告はほとんどみられない。そこで本研究では、HL 60 を用いて RANK 遺伝子発現ならびに破骨細胞分化に対する骨吸収因子、特に IL-11 の効果を検討した。

材料ならびに方法

1. 細胞と培養条件

ヒト前骨髄性白血病細胞、HL 60 (理研ジーンバンク、埼玉) は、10%牛胎仔血清 (fetal bovine serum; FBS) を含む RPMI 1640 培養液 (GIBCO 社製, USA) で、マウス骨髄由来ストローマ細胞、ST 2 (理研ジーンバンク、

埼玉) は, 10% FBS を含む α -MEM 培養液 (GIBCO 社製) で培養した。

HL 60 を 6 穴プレート (Nunc 社製, USA) 上に 1×10^6 cell/well で播種し, 各種濃度の IL-11 ($0.001-100$ ng/ml) (Sigma 社製, USA), PGE_2 ($10^{-11}-10^{-7}$ M) (Sigma 社製), VD_3 ($10^{-12}-10^{-8}$ M) (Sigma 社製) を添加して, 37°C , 5% CO_2 下で 24 時間培養した。IL-11 処理の経時変化を調べる実験では HL 60 に IL-11 (1 ng/ml) を添加後, 3, 6, 12, 24, 72 時間培養を行った。また IL-11 と M-CSF との関連性を調べるために HL 60 に IL-11 (1 ng/ml) または M-CSF を単独あるいは両者を同時に添加して 37°C , 5% CO_2 下で 12 時間培養を行った。IL-6 処理実験では HL 60 に IL-6 (0.625 ng/ml) (Sigma 社製) を添加して 37°C , 5% CO_2 下で 12 時間培養を行った。

2. 総 RNA の分離

上記実験で得られた細胞の浮遊液を 3,000 rpm で 3 分間遠心し, 細胞を沈殿させた。回収した細胞から総 RNA を Chomczynski と Sacchi²³⁾の方法に従って分離した。細胞ペレットに 800 μl のグアニジンチオシアネート溶液 (4 M グアニジンチオシアネート, 25 mM クエン酸ナトリウム, 0.5% サルコシル, 0.1 M 2-メルカプトエタノール) を加え, 30 秒間超音波処理してホモゲナイズした。次に 80 μl 2 M 酢酸ナトリウム (pH 4), 800 μl 水飽和フェノール, 240 μl クロロホルム-イソアミルアルコール (49:1) を加えて混和し, 20 分間氷冷した後, 4°C , 15,000 rpm で 20 分間遠心した。遠心上清に, 同量のイソプロパノールを加えて混和し, -20°C で 1 時間静置後, 15,000 rpm で 20 分間遠心し, RNA を沈殿させた。その後, 沈殿物を 50 μl のグアニジンチオシアネート溶液に溶解させ, 同量のイソプロパノールを加えて静置, 遠心操作を行った。得られた RNA 沈殿物を 70% エタノールで洗浄し, RNase-free 蒸留水 20 μl に溶解した。総 RNA の濃度は, 260 nm での吸光度から算出した。

3. cDNA の合成

総 RNA 2 μg と 35 nM oligo (dT) を含む水溶液 6 μl を 70°C , 10 分間インキュベート後, ただちに氷冷した。次に, 2 μl の 5 $\times$ 緩衝液 [250 mM トリス塩酸 (pH 8.3), 375 mM 塩化カリウム, 15 mM 塩化マグネシウム], 1 μl の 0.1 M ジチオスライトール, 0.5 μl の 10 mM dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 0.5 μl の逆転写酵素 (Super ScriptTM II, GIBCO BRL 社製) を加えて, 42°C で 50 分間逆転写後, さらに 72°C で 15 分間インキュベートを行った。合成された cDNA 溶液を滅菌蒸留水で 10

倍希釈し, ポリメラーゼチェーン反応 (Polymerase Chain Reaction; PCR) を行うまで, -20°C で保存した。

4. 半定量的 PCR 法による分析

合成 cDNA を鋳型としてジゴキシゲニン (digoxigenin; DIG) 標識 dUTP を反応液に加えた PCR 法で, RANK ならびに対照としてグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素 (GAPDH) 遺伝子を増幅した。RANK のセンスプライマー (AACCTTCGGAGTAGCTGGG) とアンチセンスプライマー (GAGCCCCATGTCCTGTTCA) ならびに GAPDH のセンスプライマー (TGAAG-GTCGGTGTGAACGGATTTGGC) とアンチセンスプライマー (CATGTAGGCCATGAGGTCCACCAC) をそれぞれ用いた。

PCR は cDNA 2 μl , ジゴキシゲニン-dUTP (100 nM) を含む 0.2 mM dNTP, 0.2 μM のセンスプライマーとアンチセンスプライマー, 0.1 M ジチオスライトール, 250 mM トリス塩酸 (pH 8.3), 375 mM 塩化カリウム, 15 mM 塩化マグネシウム, 5 units の Taq DNA polymerase (Super Taq DNA polymerase, Sawaday 社製, 東京) を含む反応液中で熱変性 94°C (20 秒) — アニリング 60°C (45 秒) — 伸長 72°C (45 秒) の反応を 20 サイクル行った。さらに追加伸長反応 72°C (7 分) を行った。目的遺伝子の増幅を確認するため, PCR 増幅産物を 2% アガロースゲル電気泳動し, サザンブロットで分子サイズを調べた。また RANK の発現量の変動を定量的に調べるために PCR 増幅産物をスロットブロット法に供した。DIG 標識した PCR 反応産物を 0.4 M 水酸化ナトリウムと混和後, ナイロンメンブラン (Hy bondTM-N+, Amersham 社製, USA) にスロットブロットした。DIG 標識増幅産物の検出にはアルカリフォスファターゼ結合抗 DIG 抗体/CDP-star (Boehringer Ingelheim 社製, Germany) の化学発光系を用いた。遺伝子発現量は対照群 (100%) と比較した相対量で表した。

5. 共存培養方法

破骨細胞形成能を調べるために HL 60 と ST 2 の共存培養を Nagai と Sato²⁰⁾の方法に従って行った。まず, 96 穴プレート (Nunc 社製) 上に播種した ST 2 (1×10^5 cell/well) を VD_3 (10^{-8} M), デキサメタゾン (dexamethason; Dex) (10^{-7} M) 共存下で 37°C , 5% CO_2 で 24 時間培養した。培養液除去後の ST 2 を 2% パラホルムアルデヒド固定液を用いて室温で 2 分間処理後, PBS で 3 度洗浄した。次いで固定化された ST 2 上に HL 60 (1×10^4 cell/well) を播種し, IL-11 (1 ng/ml) あるいは M-CSF

(10 ng/ml) の存在/非存在下で6日間共存培養を行った。なお共存培養の培地として、10% FBS を含む α -MEM を使用した。

6. TRAP 染色による酵素組織化学的観察

共存培養後に形成された破骨細胞を観察するため、酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ (tartrate-resistant acid phosphatase; TRAP) 染色を行った。細胞をパラホルムアルデヒド固定液[2%パラホルムアルデヒド, 3.5%サッカロース, 0.1 M カコジル酸緩衝液(pH 7.4)]で、10分間固定した。アゾ色素法²⁴⁾に従い、Naphthol AS-BI phosphoric acid (Sigma 社製) を基質に用いた酸性ホスファターゼ活性検出反応液 [0.05% Naphthol AS-BI phosphoric acid, 50 mM L(+)-酒石酸ナトリウム, 0.1 M 酢酸緩衝液(10%氷酢酸, 1%酢酸ナトリウム, pH 5)] に、室温で15-30分浸漬した。反応終了後、光学顕微鏡を用いて観察を行った。また、3つ以上の核を有する TRAP 染色陽性細胞を破骨細胞として計測した。

7. 組織化学的染色による吸収窩の観察

M-CSF や IL-11 存在/非存在下で HL 60 と ST 2 の共存培養を6日間行った。その後、象牙切片(新日本象牙社製, 東京)を細胞上に置き、さらに3日間共存培養を行った。培養終了後、象牙切片上に付着している細胞を1 M 水酸化アンモニウムで洗浄して取り除き、Mayer のヘマトキシリン液(0.1%ヘマトキシリン, 0.02%ヨウ素酸ナトリウム, 5%カリウムミョウバン, 2%氷酢酸)に、室温で35-45秒浸漬した。反応終了後、光学顕微鏡を用いて象牙切片上に形成された吸収窩の観察を行った。

実験結果

1. HL 60 の RANK mRNA 発現に及ぼす骨吸収因子の影響

最初に HL 60 が ODF に対する受容体である RANK の遺伝子を発現しているかどうかを調べるために、HL 60 から調製した RNA の RT-PCR を行い、得られた増幅産物をアガロースゲル電気泳動をした。その結果、RANK として予想された 619 塩基対をもつ単一バンドが検出された (Fig. 1)。このことは HL 60 が RANK 遺伝子を発現していることを示すものである。

一般に骨吸収因子は、主に3つのシグナル伝達経路によって骨芽細胞/ストローマ細胞を活性化し、間接的に破骨細胞前駆細胞から破骨細胞への分化を誘導する²⁵⁾。第1は IL-6 や IL-11 などの gp 130 系経路、第2に PTH

Fig. 1 Expression of RANK mRNA in HL 60.

Total RNA was isolated from HL 60 as described in Materials and Methods.

RT-PCR analysis was performed for RANK gene. The thermal cycle of denaturation (95°C, 20 sec), annealing (60°C, 45 sec) and extension (72°C, 60 sec) was repeated 40 times (left band) or 20 times (right band) for the amplification of RANK gene. PCR products were run on a 2% agarose gel and stained with ethidium bromide (left band) or analysed by Southern blotting (right band).

や PGE₂ などのプロテインキナーゼ A 系経路、第3に VD₃ とその受容体を介する経路である。そこで各系の代表的骨吸収因子として IL-11, PGE₂ ならびに VD₃ をそれぞれ選び、HL 60 に種々の濃度で添加して RANK mRNA 量を調べた。mRNA 量を定量化する際、前述の PCR 法ではサイクル数が多いことから定量性に欠けることが懸念される。そこで本実験では最適なサイクル数を決める目的で、DIG 標識 dUTP を反応液に加えた PCR を行いスロットプロット法に供した。また同時に、対照として GAPDH 遺伝子の発現を調べて内部標準としたが、GAPDH 遺伝子の発現は骨吸収因子処理濃度による変動は認められなかった(データを示さない)。したがって、結果は対照群(未処理群)を100%とした際の各処理群の相対量で示した。Fig. 2 A に示したように20サイクルという少ない増幅サイクルでも定量可能な増幅産物が得られた。Fig. 2 B に示したように IL-11 は、1 ng/ml まで濃度依存的に RANK mRNA 量を増加させたが、10 ng/ml では減少し、さらに 100 ng/ml では対照群(未処理群)と同程度の値まで減少した。PGE₂ は、10⁻⁶ M

A

Fig. 2 Dose dependency of RANK mRNA expression by IL-11, PGE₂ or VD₃.

HL 60 were treated for 1 day with increasing doses of IL-11, PGE₂ or VD₃. Total RNA was analysed for RT-PCR of RANK gene. The thermal cycle as described in Fig. 1 was repeated 20 times. The obtained PCR products were analysed by slot blot (panel A) and the amount of amplified cDNA was calculated. Results are given as percentage of control values. Values for IL-11 (panel B), PGE₂ (panel C) or VD₃ (panel D) are the means $\pm$ SD of three independent experiments.

まで濃度依存的に RANK mRNA 量を増加させた (Fig. 2 C)。また VD₃ は 10^{-9} M まで濃度依存的に RANK mRNA 量を増加させたが、高濃度の 10^{-8} M や 10^{-7} M では減少した (Fig. 2 D)。したがって HL 60 において IL-11, PGE₂ ならびに VD₃ による RANK mRNA 発現促進の最大効果はそれぞれ 1 ng/ml, 10^{-6} M ならびに 10^{-9} M の濃度であった。そこで 3 種類の骨吸収因子が、それぞれ最大効果を示す濃度で HL 60 を処理した際の RANK mRNA 量を調べたところ、IL-11 が 450%, PGE₂ は 317%, VD₃ が 300% であった (Fig. 3)。これら骨吸収因子のなかで IL-11 は RANK mRNA 量の発現を最も強く促進した。そこで IL-11 の効果が IL-6 と共通のシグナル伝達経路を介するかどうかを調べるために IL-6 を HL 60 に添加し RANK mRNA の発現量を調べた。その結果、IL-6 は RANK mRNA の発現量を増加させ、その発現量は、IL-11 による発現量と同程度であった (Fig. 4)。したがって、HL 60 において IL-11 は IL-6 と同様 gp 130 系経路を介して RANK mRNA 量の発現を

B

C

D

促進することが示唆された。

2. IL-11 添加による HL 60 の RANK mRNA 発現の経時的変化

RANK mRNA 量の発現促進効果の最も強かった IL-11 を HL 60 に添加し、RANK mRNA の発現量を経時的に調べた (Fig. 5)。その結果、培養時間とともに RANK mRNA の発現量が増大し、12 時間で最大となりその後、24 時間で減少したが、その発現量は 72 時間後でも維持されていた。

Fig. 3 Effect of IL-11, PGE₂ or VD₃ on RANK mRNA expression.

HL 60 were treated for 1 day with IL-11 (1 ng/ml), PGE₂ (10⁻⁶ M) or VD₃ (10⁻⁹ M). Total RNA was analysed for RT-PCR and the amplified PCR products were measured by slot blot analysis as described in Fig. 2. Values are the means±SD of three independent experiments.

Fig. 4 Effect of IL-6 on RANK mRNA expression.

HL 60 were treated for 12 hours with IL-6 (0.625 ng/ml) or IL-11 (1 ng/ml). Total RNA was analysed for RT-PCR and the amplified PCR products were measured by slot blot analysis as described in Fig. 2. Values are the means±SD of three independent experiments.

3. HL 60 の RANK mRNA の発現に及ぼす M-CSF の影響

破骨細胞前駆細胞は骨芽細胞/ストローマ細胞との共存培養により破骨細胞へ分化する。その際、骨吸収因子の存在下で破骨細胞前駆細胞から破骨細胞に分化するためには、骨芽細胞/ストローマ細胞より分泌される M-CSF の存在を必要とする¹⁴⁻¹⁷⁾。また M-CSF 存在下では膜欠損型可溶性 ODF (soluble ODFs; sODF) のみで、骨芽細胞/ストローマ細胞に依存せずに破骨細胞前駆細胞から破骨細胞を分化誘導することができるとの報告が

Fig. 5 Time course of RANK mRNA expression after the treatment of IL-11.

HL 60 were treated for indicated times with IL-11 (1 ng/ml). Total RNA was isolated and RT-PCR was performed. PCR products were analysed as described in Fig. 2. Values are the means±SD of three independent experiments.

ある^{26,27)}。Fig. 1 に示したようにヒト前骨髄性白血病細胞である HL 60 は RANK を発現しており、この RANK 遺伝子の発現量は IL-11 単独処理により増大する (Fig. 2 B)。そこで、HL 60 の RANK mRNA 発現に対する M-CSF の効果について検討した (Fig. 6)。その結果、M-CSF 単独処理群は IL-11 単独処理群と同様に RANK mRNA 量を増加させたが、その発現量は IL-11 に比較して低値であった。IL-11 と M-CSF とが共存した群の RANK mRNA の発現量は、M-CSF 単独処理群に比べ高値を示したが、IL-11 単独処理群と同程度の増加を示し、M-CSF 添加による相乗効果は認められなかった。これらの結果から、IL-11 は M-CSF に依存せずに直接 HL 60 に作用して RANK を発現させることが示唆された。

4. HL 60 と ST 2 の共存培養による破骨細胞の形成

骨芽細胞/ストローマ細胞である ST 2 は VD₃ 刺激により、濃度依存的に ODF mRNA を増加させ、Dex の共存によりさらに ODF mRNA を上昇させる²⁾。そこで、ST 2 を VD₃ ならびに Dex 共存下で培養し ST 2 表面上に ODF を発現させた。次いで 2% パラホルムアルデヒド固定液で細胞を固定することにより、その他の M-CSF を含む細胞産生因子の分泌を停止させた。固定した ST 2 に HL 60 を播種して共存培養を行い、HL 60 が IL-11 ならびに M-CSF 存在下により破骨細胞に分化するかどうかを検討した。Fig. 7 A に示すように IL-11 ならびに

Fig. 6 Effects of IL-11 and M-CSF on the expression of RANK mRNA.

HL 60 were cultured for 12 hours in the presence or absence of IL-11 (1 ng/ml) and M-CSF (10^{-7} M). Total RNA was isolated and RT-PCR was carried out. PCR products were analysed as described in Fig. 2. Values are the means $\pm$ SD of three independent experiments.

M-CSF が存在しない対照群では TRAP 陽性多核細胞は観察されなかった。しかし、M-CSF 処理により TRAP 陽性多核細胞の出現が認められた (Fig. 7 B)。また IL-11 単独処理群でも M-CSF 単独処理群と同様に対照群で観察されなかった TRAP 陽性多核細胞が出現した (Fig. 7 C)。このことは HL 60 は M-CSF あるいは IL-11 単独刺激で破骨細胞へ分化誘導されることを示している。IL-11 存在下に M-CSF を添加した群でも IL-11 ならびに M-CSF 単独処理と同様に TRAP 陽性多核細胞が認められた (Fig. 7 D)。そこで、これら TRAP 陽性多核細胞が骨吸収能を有するか否かを調べるため、象牙切片上で共存培養を行った。その結果、対照群では吸収窩は形成されなかった (Fig. 7 E)。しかし IL-11 ならびに M-CSF 単独処理においては象牙切片上に吸収窩を形成することが観察された (Fig. 7 F, G)。また IL-11 存在下に M-CSF を添加した群においても吸収窩を認めた (Fig. 7 H)。これら TRAP 陽性多核細胞は骨吸収能を有する破骨細胞であることが示された。

次に TRAP 陽性細胞を数量化するために HL 60 と ST 2 の共存培養後に出現した 3 つ以上の核をもった TRAP 陽性の破骨細胞を計測した。Fig. 8 に示すように対照群 (IL-11, M-CSF 非存在) では、TRAP 陽性の破骨細胞は認められなかった。しかし M-CSF 単独処理群では、TRAP 陽性の破骨細胞数は 1 well あたり 17 ± 3.2 個であった。同様に IL-11 単独処理群でも TRAP 陽性の破骨細胞が多数認められ、破骨細胞数は 1 well あたり

M-CSF 単独処理群の約 2 倍の数値を示した。これは IL-11 による破骨細胞形成能は、M-CSF のそれより高いことを示す。また IL-11 と M-CSF の両者共存群の破骨細胞数は M-CSF 単独処理群の約 3 倍、IL-11 単独処理群の約 1.5 倍に増加した。

考 察

最近、ODF, ODF 受容体の RANK および ODF のデコイ受容体としての OCIF が、破骨細胞の分化・成熟を調節する 3 つの重要な分子であることが明らかとなった。一般に骨吸収因子は、骨芽細胞/ストローマ細胞では ODF の発現に促進的に働く²⁸⁾。一方、骨吸収因子は OCIF の産生を抑制し、ODF の作用を強める²²⁾。本研究において HL 60 は ODF 受容体である RANK の遺伝子を恒常的に発現していることが確認された。そこで骨吸収因子が破骨細胞前駆細胞において RANK を誘導するか否かを調べるために、HL 60 に骨吸収因子としてそれぞれシグナル伝達経路が異なる IL-11, PGE_2 ならびに VD_3 を添加し、RANK mRNA レベルを RT-PCR 法を用いて分析した。その結果、これらの骨吸収因子はいずれも単独で RANK mRNA 量を濃度依存的に増加させた。したがって HL 60 にはこれら骨吸収因子に対する受容体が存在し、各々の受容体を介して RANK の発現を誘導するものと考えられた。

今回の実験で RANK の発現が最大であった IL-11 は、IL-6 と同様 gp 130 系のシグナル伝達経路を介する骨吸収因子である。新しいサイトカインとしてクローニングされた IL-11²⁹⁾ は破骨細胞分化に関与する骨吸収因子であり³⁰⁾、骨芽細胞には IL-11 受容体と gp 130 mRNA が発現している³¹⁾。本研究に使用した HL 60 において IL-11 と同様 IL-6 も RANK mRNA の発現量を増加させた。したがって HL 60 には、IL-6 と IL-11 に対する受容体ならびに共通のシグナル伝達分子である gp 130 が発現することが示唆された。IL-11 添加による HL 60 の RANK mRNA 発現の経時的変化を検討したところ、IL-11 添加開始 3 時間から RANK mRNA 量が増加し、12 時間で最大となった。このような RANK の発現誘導パターンはさまざまな骨吸収因子処理後に発現する ODF の誘導パターンと類似しており、いずれの骨吸収因子の場合でも 24 時間以内に最大効果を示した^{21,22)}。このことから、IL-11 は骨芽細胞においては、ODF の発現を増加させ²²⁾、一方、破骨細胞前駆細胞においては RANK の発現を誘導することにより、両者の相互作用を亢進させることが示唆された。

Fig. 7 Differentiation of HL 60 into osteoclasts in the coculture with ST 2.

ST 2 was precultured in the presence of VD_3 (10^{-8} M) and of Dex (10^{-7} M). After 1 days, cells were fixed with 2% paraformaldehyde for 2 min and washed with PBS for three times. HL 60 were then cocultured with fixed ST 2 in the presence or absence of IL-11 (1 ng/ml) and M-CSF (10^{-7} M). After 6 days, the cells were stained for TRAP (A–D). For the pit formation assay, dentin slices with 6-mm diameter were placed onto the cocultures and then cultured for 3 days. Resorption pits formed on dentin slices were stained with Mayer's hematoxylin (E–H).

Fig. 8 TRAP-positive multinucleated cell formation in HL 60 cocultured with ST 2 in the presence of IL-11 or M-CSF.

Coculture of HL 60 and ST 2 was performed as described in Fig. 7. The cells were stained for TRAP and TRAP-positive multinucleated cells containing three or more nuclei were counted. Values are the means $\pm$ SD of three independent experiments.

M-CSF は、骨芽細胞/ストローマ細胞が骨吸収因子の刺激を受けることにより発現する。分泌された M-CSF は破骨細胞前駆細胞の細胞膜上の M-CSF 受容体である c-Fms と結合することにより、単核破骨細胞へと分化する²⁵⁾。さらに単核破骨細胞が再度 M-CSF の刺激を受けると、成熟破骨細胞へと分化する²⁵⁾。培養系において M-CSF の非存在下では破骨細胞がほとんど誘導されないことから、M-CSF は破骨細胞分化に必須因子であることが明らかとなった¹⁴⁻¹⁷⁾。本研究では破骨細胞前駆細胞である HL 60 における RANK mRNA 発現に対する M-CSF の効果について検討したところ、M-CSF は IL-11 と同様単独刺激で RANK の発現を亢進させた。IL-11 と M-CSF 処理群の RANK mRNA の発現量は IL-11 単独処理群と同程度の増加を示したことから、IL-11 は M-CSF に依存せずに直接 HL 60 に作用して RANK を発現させることが考えられた。また HL 60 は、M-CSF に対する膜受容体である c-Fms を発現していることが推測された。

本研究では、IL-11 と M-CSF が単独で破骨細胞を形成できるかどうかを共存培養系を用いて調べた。その際、破骨細胞への分化は TRAP 染色、吸収窩形成能および 3 つ以上の核をもつ破骨細胞数により評価した。HL 60 と ST 2 との共存培養による破骨細胞形成の実験において、対照群では TRAP 陽性細胞は観察されなかったが、M-CSF、IL-11 単独処理群および IL-11 と M-CSF 共存群のいずれにおいても TRAP 陽性細胞が観察された。こ

の TRAP 陽性細胞は、象牙切片上に骨吸収窩を形成した。これは HL 60 は IL-11 あるいは M-CSF の単独刺激によっても破骨細胞を形成できることを示すものである。したがって IL-11 あるいは M-CSF によって誘導された RANK は、ST 2 膜に発現している ODF との細胞間接触機構を介して破骨細胞への分化シグナルを伝達することが示唆された。

以上のことから IL-11 は、破骨細胞前駆細胞において RANK の発現を誘導することにより骨吸収の調節に関与することが示唆された。

結 論

HL 60 における RANK 遺伝子発現と破骨細胞への分化に及ぼす IL-11 の影響について検討し、以下の結果を得た。

1. HL 60 は RANK 遺伝子を発現し、IL-11、PGE₂ ならびに VD₃ の添加は、濃度依存的にその発現量を増加させた。

2. RANK の発現誘導が最も高い IL-11 の処理により、RANK mRNA は 3 時間から増加しはじめ 12 時間で最大となり 24 時間で減少した。

3. 骨吸収因子である IL-11 ならびに破骨細胞分化に必須因子である M-CSF は、それぞれ単独刺激で RANK mRNA 量を増加させた。しかし、M-CSF は IL-11 の RANK 発現効果に影響を与えなかった。

4. HL 60 を ST 2 と共存培養し、IL-11 の破骨細胞形成能を調べた。IL-11 ならびに M-CSF 単独刺激により TRAP 陽性多核細胞が形成された。これら TRAP 陽性多核細胞は骨吸収能を有していた。また M-CSF は、IL-11 の破骨細胞形成能を増強した。

以上のことより、IL-11 は RANK の発現を介して破骨細胞への分化を誘導する因子であることが示唆された。

稿を終えるにあたり、本研究の機会を与えていただき研究の遂行に終始懇篤なご教示とご校閲を賜りました岩手医科大学歯学部歯科矯正学講座三浦廣行教授ならびに口腔生化学講座佐藤詔子教授、またご懇切なるご指導とご教示を賜りました口腔解剖学第二講座名和橙黄雄教授に深甚なる感謝の意を表します。さらに研究の細部にわたり種々のご助言とご指導をいただきました口腔生化学講座永井雅純講師に感謝の意を表します。最後に、本研究の遂行にご協力をいただきました歯科矯正学講座、口腔生化学講座、口腔解剖学第二講座の諸先生方に厚く御礼申し上げます。

本論文の要旨の一部は、第 41 回歯科基礎医学会学術大会(平成 11 年 9 月)において発表した。

本研究は日本私立学校振興・共済事業団の特別補助を受けたものである。

文 献

- 1) Tsuda, E., Goto, M., Mochizuki, S., Yano, K., Kobayashi, F., Morinaga, T. and Higashio, K. : Isolation of a novel cytokine from human fibroblasts that specifically inhibits osteoclastogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **234** : 137—142, 1997.
- 2) Yasuda, H., Shima, N., Nakagawa, N., Mochizuki, S., Yano, K., Fujise, N., Sato, Y., Goto, M., Yamaguchi, K., Kuriyama, M., Kanno, T., Murakami, A., Tsuda, E., Morinaga, T. and Higashio, K. : Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG) : A mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis in vitro. *Endocrinology* **139** : 1329—1337, 1998.
- 3) Yasuda, H., Shima, N., Nakagawa, N., Yamaguchi, K., Kinosaki, M., Mochizuki, S., Tomoyasu, A., Yano, K., Goto, M., Murakami, A., Tsuda, E., Morinaga, T., Higashio, K., Udagawa, N., Takahashi, N. and Suda, T. : Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95** : 3597—3602, 1998.
- 4) Wong, B. R., Josien, R., Lee, S. Y., Vologodskaya, M., Steinman, R. M. and Choi, Y. : The TRAF family of signal transducers mediates NF- κ B activation by the TRANCE receptor. *J. Biol. Chem.* **273** : 28355—28359, 1998.
- 5) Lacey, D. L., Timms, E., Tan, H.-L., Kelley, M. J., Dunstan, C. R., Burgess, T., Elliott, R., Colombero, A., Elliott, G., Scully, S., Hsu, H., Sullivan, J., Hawkins, N., Davy, E., Capparelli, C., Eli, A., Qian, Y.-X., Kaufman, S., Sarosi, I., Shalhoub, V., Senaldi, G., Guo, J., Delaney, J. and Boyle, W. J. : Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* **93** : 165—176, 1998.
- 6) Wong, B. R., Rho, J., Arron, J., Robinson, E., Orlinick, J., Chao, M., Kalachikov, S., Cayani, E., Bartlett III, F. S., Frankel, W. N., Lee, S. Y. and Choi, Y. : TRANCE is a novel ligand of the tumor necrosis factor receptor family that activates c-Jun N-terminal kinase in T cells. *J. Biol. Chem.* **272** : 25190—25194, 1997.
- 7) Anderson, D. M., Maraskovsky, E., Billingsley, W. L., Dougall, W. C., Tometsko, M. E., Roux, E. R., Teepe, M. C., DuBose, R. F., Cosman, D. and Galibert, L. : A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature* **390** : 175—179, 1997.
- 8) Simonet, W. S., Lacey, D. L., Dunstan, C. R., Kelley, M., Chang, M.-S., Lüthy, R., Nguyen, H. Q., Wooden, S., Bennett, L., Boone, T., Shimamoto, G., DeRose, M., Elliott, R., Colombero, A., Tan, H.-L., Trail, G., Sullivan, J., Davy, E., Bucay, N., Renshaw-Gegg, L., Hughes, T. M., Hill, D., Pattison, W., Campbell, P., Sander, S., Van, G., Tarpley, J., Derby, P., Lee, R. and Boyle, W. J. : Osteoprotegerin : A novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* **89** : 309—319, 1997.
- 9) Tan, K. B., Harrop, J., Reddy, M., Young, P., Terrett, J., Emery, J., Moore, G. and Truneh, A. : Characterization of a novel TNF-like ligand and recently described TNF ligand and TNF receptor superfamily genes and their constitutive and inducible expression in hematopoietic and non-hematopoietic cells. *Gene* **204** : 35—46, 1997.
- 10) Kwon, B. S., Wang, S., Udagawa, N., Haridas, V., Lee, Z. H., Kim, K. K., Oh, K. O., Greene, J., Li, Y., Su, J., Gentz, R., Aggarwal, B. B. and Ni, J. : TR 1, a new member of the tumor necrosis factor receptor superfamily, induces fibroblast proliferation and inhibits osteoclastogenesis and bone resorption. *FASEB J.* **12** : 845—854, 1998.
- 11) Suda, T., Takahashi, N. and Martin, T. J. : Modulation of osteoclast differentiation. *Endocr. Rev.* **13** : 66—80, 1992.
- 12) Takahashi, N., Akatsu, T., Udagawa, N., Sasaki, T., Yamaguchi, A., Moseley, J. M., Martin, T. J. and Suda, T. : Osteoblastic cells are involved in osteoclast formation. *Endocrinology* **123** : 2600—2602, 1988.
- 13) Udagawa, N., Takahashi, N., Akatsu, T., Sasaki, T., Yamaguchi, A., Kodama, H., Martin, T. J. and Suda, T. : The bone marrow-derived stromal cell lines MC 3 T 3-G 2/PA 6 and ST 2 support osteoclast-like cell differentiation in cocultures with mouse spleen cells. *Endocrinology* **125** : 1805—1813, 1989.
- 14) Hattersley, G., Owens, J., Flanagan, A. M. and Chambers, T. J. : Macrophage colony stimulating factor (M-CSF) is essential for osteoclast formation *in vitro*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **177** :

- 526—531, 1991.
- 15) Kodama, H., Nose, M., Niida, S. and Yamasaki, A. : Essential role of macrophage colony-stimulating factor in the osteoclast differentiation supported by stromal cells. *J. Exp. Med.* **173** : 1291—1294, 1991.
 - 16) Takahashi, N., Udagawa, N., Akatsu, T., Tanaka, H., Isogai, Y. and Suda, T. : Deficiency of osteoclasts in osteopetrotic mice is due to a defect in the local microenvironment provided by osteoblastic cells. *Endocrinology* **128** : 1792—1796, 1991.
 - 17) Tanaka, S., Takahashi, N., Udagawa, N., Tamura, T., Akatsu, T., Stanley, E. R., Kurokawa, T. and Suda, T. : Macrophage colony-stimulating factor is indispensable for both proliferation and differentiation of osteoclast progenitors. *J. Clin. Invest.* **91** : 257—263, 1993.
 - 18) Collins, S. J., Gallo, R. C. and Gallagher, R. E. : Continuous growth and differentiation of human myeloid leukaemic cells in suspension culture. *Nature* **270** : 347—349, 1977.
 - 19) Yoneda, T., Alsina, M. M., Garcia, J. L. and Mundy, G. R. : Differentiation of HL-60 cells into cells with the osteoclast phenotype. *Endocrinology* **129** : 683—689, 1991.
 - 20) Nagai, M. and Sato, N. : Reciprocal gene expression of osteoclastogenesis inhibitory factor and osteoclast differentiation factor regulates osteoclast formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **257** : 719—723, 1999.
 - 21) Takai, H., Kanematsu, M., Yano, K., Tsuda, E., Higashio, K., Ikeda, K., Watanabe, K. and Yamada, Y. : Transforming growth factor- β stimulates the production of osteoprotegerin/osteoclastogenesis inhibitory factor by bone marrow stromal cells. *J. Biol. Chem.* **273** : 27091—27096, 1998.
 - 22) Horwood, N. J., Elliott, J., Martin, T. J. and Gillespie, M. T. : Osteotropic agents regulate the expression of osteoclast differentiation factor and osteoprotegerin in osteoblastic stromal cells. *Endocrinology* **139** : 4743—4746, 1998.
 - 23) Chomczynski, P. and Sacchi, N. : Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162** : 156—159, 1987.
 - 24) 鈴木 祐 : 染色法のすべて. pp. 72—75, 医歯薬出版, 東京, 1988.
 - 25) Suda, T., Udagawa, N., Nakamura, I., Miyaura, C. and Takahashi, N. : Modulation of osteoclast differentiation by local factors. *Bone* **17** : 87 s—91 s, 1995.
 - 26) Quinn, J. M., Elliott, J., Gillespie, M. T. and Martin, T. J. : A combination of osteoclast differentiation factor and macrophage-colony stimulating factor is sufficient for both human and mouse osteoclast formation in vitro. *Endocrinology* **139** : 4424—4427, 1998.
 - 27) Matsuzaki, K., Udagawa, N., Takahashi, N., Yamaguchi, K., Yasuda, H., Shima, N., Morinaga, T., Toyama, Y., Yabe, Y., Higashio, K. and Suda, T. : Osteoclast differentiation factor (ODF) induces osteoclast-like cell formation in human peripheral blood mononuclear cell cultures. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **246** : 199—204, 1998.
 - 28) Suda, T., Udagawa, N. and Takahashi, N. : *in* Principles of Bone Biology (ed. Bilezikian, J. P., Raisz, L. G., Rodan, G. A.), PP. 87—102, Academic Press, San Diego, 1996.
 - 29) Paul, S. R., Bennett, F., Calvetti, J. A., Kelleher, K., Wood, C. R., O'hara Jr, R. M., Leary, A. C., Sibley, B., Clark, S. C., Williams, D. A. and Yang, Y-C. : Molecular cloning of a cDNA encoding interleukin 11, a stromal cell-derived lymphopoietic and hematopoietic cytokine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87** : 7512—7516, 1990.
 - 30) Girasole, G., Passeri, G., Jilka, R. L. and Manolagas, S. C. : Interleukin-11 : A new cytokine critical for osteoclast development. *J. Clin. Invest.* **93** : 1516—1524, 1994.
 - 31) Romas, E., Udagawa, N., Zhou, H., Tamura, T., Saito, M., Taga, T., Hilton, D. J., Suda, T., Ng, K. W. and Martin, T. J. : The role of gp 130-mediated signals in osteoclast development : Regulation of interleukin 11 production by osteoblasts and distribution of its receptor in bone marrow cultures. *J. Exp. Med.* **183** : 2581—2591, 1996.