ヒト歯肉線維芽細胞が産生する細胞画分IL-1 α は、細胞接触により単核破骨細胞の延命および多核破骨細胞への癒合を促進する

岡松良昌・小林 誠・魏 秀峰^{*1)}、宇田川信之・高橋直之^{*2)}、長谷川紘司^{*1)}

Interleukin-1 α produced in human gingival fibroblasts stimulates the survival and fusion of osteoclasts via cell-to-cell contact

We here investigated effects of intracellular interleukin-1 α (IL-1 α) produced in human gingival fibroblasts (HGF) on differentiation of osteoclasts (OCLs) precursor cells into OCLs and survival and fusion of mononuclear OCLs. Treatment with IL-1 β stimulated to produce intracellular IL-1 α in HGF. The cell layer of HGF treated with IL-1 β or not was subsequently fixed with 1 % paraformaldehyde. Cell membrane of the fixed HGF treated with IL-1 β possessed IL-1 activity, which was mainly attributed to IL-1 α . Soluble form of receptor activator of NF- κ B ligand/osteoclasts differentiation factor (RANKL/ODF) stimulated differentiation of RAW cells, a OCLs precursor cell line, into tartrate resistant acid phosphatase (TRAP)-positive OCLs. However, the RAW cells could not be differentiated into the TRAP-positive OCLs, when the cells were cultured on the fixed HGF treated with IL-1 β . On the other hand, the fixed HGF treated with IL-1 β stimulated survival and fusion of TRAP-positive mononuclear OCLs, when prefusion OCLs (pOCs), which were formed in coculture of murine osteoblasts and bone marrow cells, were cultured on the fixed HGF. The stimulatory effects of the fixed HGF treated with IL-1 β was suppressed by adding anti-human IL-1 α antibody or inhibition of cell-to-cell contact between the pOCs and the fixed HGF, but addition of anti-human M-CSF antibody and osteoprotegerin/osteoclastogenesis inhibitory factor (OPG/OCIF) had no effect. These results suggest that intracellular IL-1 α produced in HGF treated with IL-1 β has no effect on differentiation of OCLs precursor cells into OCLs, however it stimulates survival and fusion of mononuclear OCLs via cell-to-cell contact.

Rec. 1/12/2001, Acc. 2/1/2001, pp 583~592

*Yoshimasa Okamatsu • Makoto Kobayashi • Xiufeng Wei^{*1)},
Nobuyuki Udagawa • Naoyuki Takahashi^{*2)}, Kohji Hasegawa^{*1)}
key words : human gingival fibroblasts, osteoclast formation, IL-1 α ,
RANKL/ODF, TRAP*

破骨細胞は単球・マクロファージより分化することが知られているが、この分化や破骨細胞の機能は骨芽細胞/ストローマ細胞により制御されている。近年、骨芽細胞の細胞表面には receptor activator of NF- κ B ligand/osteoclast differentiation factor (RANKL/ODF) が存在し、1, 25-

dehydroxy vitamin D 3, prostaglandin E 2, parathyroid hormone などの骨吸収因子はすべて骨芽細胞に作用し、この RANKL/ODF を介して破骨細胞の分化を促進することが報告された¹⁾。

一方近年、炎症性サイトカインの一つである interleukin-1 (IL-1) は RANKL/ODF を介することなく直接破骨細胞の延命および活性化を促進することが明らかにされた。すなわち、純化した破骨細胞はアポトーシスを起こし短時間に死滅す

^{*1)} Department of Periodontology, ^{*2)} Department of Biochemistry, School of Dentistry, Showa University, Tokyo, Japan ^{*1)} 昭和大学歯学部歯周病学教室, ^{*2)} 同生化学教室

るが、IL-1はこの細胞死を抑制することにより、破骨細胞の延命を促進すること^{2,3)}また、IL-1は破骨細胞の細胞表層に存在するI型IL-1レセプターを介して純化した破骨細胞を活性化し、骨吸収窩の形成を促進すること⁴⁾が報告された。

歯周炎は口腔内常在菌、特に歯周病病原性細菌群により歯周組織において誘発される慢性の炎症性疾患であるが、歯を支持している歯槽骨の吸収を含めた結合組織の破壊を特徴としている。一方、IL-1は多彩な生物学的活性をもち、炎症反応、免疫応答において中心的な役割を果たしていると考えられているが、歯周炎においても、その炎症局所において高濃度に認められることから、歯周炎病態形成において重要な役割を演じている可能性が示唆されている⁵⁾。

近年筆者らは、歯周組織の主要な構成細胞であるヒト歯肉線維芽細胞(HGF)を主要な炎症性サイトカインであるIL-1 β やtumor necrosis factor- α で刺激すると、細胞画分にIL-1 α を産生し、このIL-1 α 産生にはprotein kinase Cが関与していること、またこの産生はTh細胞由来のサイトカインであるinterleukin-4やinterferon- γ の同時刺激により抑制的に制御されることを明らかにした⁶⁾。さらに筆者らは、細胞画分IL-1 α を産生したHGF上でマウス頭蓋骨を直接的に接触させて培養すると、培養上清中のカルシウム濃度が上昇することから、HGFが産生した細胞画分IL-1 α は直接的な接触により骨吸収を促進することを報告した⁷⁾。したがって、HGFが産生する細胞画分IL-1 α は破骨細胞の分化、延命および癒合を促進する可能性が考えられる。

そこで今回筆者らは、HGFが産生する細胞画分IL-1 α が破骨細胞前駆細胞から破骨細胞への分化および単核破骨細胞の延命や癒合におよぼす作用について検討した。

材料と方法

(1) マウス

6～7週齢のddy系統マウス(雄)および、同系統の哺乳1日齢マウスは三共ラボサービス社(埼玉)より購入した。

(2) 試薬および培地

リコンビナントヒトIL-1 β (rhIL-1 β)、rhIL-1 α 、マウス抗ヒトIL-1 α 抗体(anti-hIL-1 α)およびマウス抗ヒトmacrophage-colony stimulating factor(anti-hM-CSF)はともにGenzyme社(USA)より購入した。Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM)および α Minimum Essential Medium(α MEM)はFlow Laboratories社(USA)より購入した。RPMI 1640 mediumはGIBCO社(USA)より購入した。活性型ビタミンD₃[1 α , 25(OH)₂D₃]、可溶性RANKL/ODF(sRANKL/ODF)およびosteoprotegerin/osteoclastogenesis inhibitory factor(OPG/OCIF)は昭和大学歯学部口腔生化学教室(東京)より供与を受けた。

(3) 細胞の分離、培養

① ヒト歯肉線維芽細胞(HGF)

実験の趣旨に対し同意を得たあと、臨床的に健康な歯周組織を有する5人の被験者の口蓋歯肉よりそれぞれ歯肉片を採取した。採取した歯肉片をそれぞれシャーレ上に静置したあと、10%FBS含有DMEMにてHGFをout growthさせ、3～6代目の細胞(HGF-1～5細胞)を実験に使用した。

② RPMI 1788細胞

ヒトEBV-transformed cell lineであるRPMI 1788細胞はAmerican Type Culture Collection社(USA)から購入し、10%FBS含有RPMI 1640 mediumにて培養した。

③ マウス骨髄細胞

ddy系統マウスを脊髄脱臼で屠殺したあと、大腿骨および脛骨部分の皮膚を切開し、股関節を脱臼させ大腿骨以下の骨を摘出した。その後、さらに関節部分で脱臼させ大腿骨と脛骨を分離した。これらの骨に付着している筋肉を完全に除去したあと、骨髄中に注射針を差し込み骨髄を押し出し回収、遠心分離後、得られた細胞を新鮮な α MEM中に懸濁した。

④ マウス骨芽細胞

哺乳1日齢のマウスを屠殺し、頭蓋部の皮膚を剝離した後、頭蓋骨を摘出した。頭蓋骨をPBSで

図 1 An experimental design for bioassays in this study

洗浄した後、コラゲナーゼ消化法(0.1%collagenase, 0.05%Trypsin, 4 mM 2 naEDTA)にて細胞を回収した。回収した細胞は10%FBS含有 α MEM中で培養し、3~5代継代した細胞を実験に使用した。

⑤ 単核破骨細胞(prefusion osteoclasts: pOCs)

Takami ら⁸⁾の方法に準じて回収した。すなわち、上記のごとく得られたマウス骨髄細胞およびマウス骨芽細胞を10 mm シャーレ中にそれぞれ 2×10^7 個および 1×10^6 個の割合で撒き、 1α , $25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (10^{-8}M)の存在下で共培養(20 ml: 10%FBS含有 α MEM)した。2日ごとに培養液を交換し、培養6日目に新鮮 α MEM(10%FBS含有)5 mlで細胞層を数回洗浄することにより単核破骨細胞と考えられる付着性の球状細胞を骨芽細胞層から洗い落とし回収した。このように回収した単核破骨細胞をtartre resistant acid phosphatase(TRAP)染色すると、約60%の細胞はTRAP陽性であった。

⑥ RAW細胞

Murine myelomonocytic cell lineであるRAW細胞は昭和大学歯学部口腔生化学教室(東京)より供与を受けた。RAW細胞は10%FBS含有 α MEMで培養した。

(4) 細胞画分 IL-1 α の測定

HGFを1 wellあたり 5×10^4 個の割合で24穴プレートに撒き、10%FBS含有DMEMにて培養した。3日間培養後、recombinant human(rh) IL-1 β (2.5 ng/ml)を添加、非添加の条件下でさらに6, 12, 24, 48時間培養した。培養後、細胞層をPBSで1回洗浄し、さらにPBSを500 μ l添加した。上記のごとく調整した細胞層を -80°C で凍結解凍を3回繰返し細胞膜を破壊、遠心分離後、その上清中のIL-1 α 量をヒトIL-1 α ELISAキット(Amersham社, USA)にて測定した。

(5) 膜IL-1活性の測定

HGFを1 wellあたり 1×10^4 個の割合で96穴プレートに撒き、10%FBS含有DMEMにて培養した。培養3日後にrhIL-1 β (2.5 ng/ml)を添加、非添加の条件下で12時間培養した。その後、細胞をPBSで2回洗浄し、1%パラホルムアルデヒドにて15分間インキュベートして細胞層を固定した。固定後、新鮮DMEMにて細胞層を3回洗浄し、さらに24時間インキュベートした。上記のごとく調整したHGF上に、IL-1依存的に増殖するRPMI 1788細胞を1 wellあたり 1×10^3 個の割合で撒き、各種濃度のanti-hIL-1 α の添加、非添加の条件下で6日間培養したあと、RPMI 1788細胞の増殖をMTT比色定量法にて測定した(図1)。

図2 Time-dependent changes in intracellular IL-1 α production in HGF treated with rhIL-1 β

HGF-1 cells at confluence were treated with rhIL-1 β (2.5 ng/ml) for 6, 12, 24 and 48 hours. The amount of IL-1 α in cell fraction was measured by using ELISA kit for human IL-1 α . The values shown are the means $\pm$ SD of 3 separate experiments, each conducted in triplicate (n=9). Same results were obtained in HGF-2, -3, -4 and -5 cells.

(6) 破骨細胞前駆細胞から破骨細胞への分化に及ぼす作用の検討

上記のごとく調整した HGF 上に破骨細胞前駆細胞である RAW 細胞を 1 well あたり 1×10^3 個の割合で撒き, 4 日間培養後, TRAP 染色を行い, TRAP 陽性単核および多核破骨細胞数を計測した(図 1). また, RAW 細胞のみを sRANKL/ODF (50 ng/ml) の添加, 非添加の条件下で 4 日間培養後, 同様に TRAP 陽性単核あるいは多核破骨細胞数を計測した。

(7) TRAP 陽性単核破骨細胞の延命および癒合に及ぼす作用の検討

上記のごとく調整した HGF 上に pOCs を 1 well あたり 5×10^5 個の割合で撒き, anti-hIL-1 α (500 ng/ml), anti-hM-CSF (50 ng/ml) あるいは OPG/OCIF (50 ng/ml) の添加, 非添加の条件下で 24 時間培養したあと, TRAP 染色を行い, TRAP 陽性単核および多核破骨細胞数を計測した。また, 調整した HGF と pOCs との接触をメンブレンフィルター(ポアサイズ $0.45 \mu\text{m}$: ミリポア社, USA)で遮断して 24 時間培養したあと, 同様に

図3 IL-1 activity in cell membrane of fixed HGF treated with rhIL-1 β is mainly attributed to IL-1 α

HGF-1 cells at confluence were treated with rhIL-1 β (2.5 ng/ml) or not for 12 hours. After that, each of the cell layers was fixed with 1 % paraformaldehyde in DMEM. RPMI 1788 cells (1×10^3 cells/well) were cultured on the fixed cell layers of HGF-1 cells in the presence or absence of various concentrations of anti-hIL-1 α for 6 days. IL-1 activity was estimated by cell proliferation of RPMI 1788 cells, which was measured by a MTT assay. The values shown are the means $\pm$ SD of 3 separate experiments, each conducted in triplicate (n=9). The difference from the value for untreated HGF-1 cells or for HGF-1 cells treated with rhIL-1 β (2.5 ng/ml) alone was significant at $P < 0.01$ (★ ★) or $P < 0.01$ (* *), respectively. Same results were obtained in HGF-2, -3, -4 and -5 cells.

TRAP 陽性単核および多核破骨細胞数を計測した(図 1)。さらに pOCs のみを rhIL-1 α (2.5 ng/ml) で 24 時間刺激後, TRAP 陽性単核および多核破骨細胞数を計測した。

結 果

(1) HGF の細胞画分 IL-1 α 産生と膜 IL-1 活性

rhIL-1 β (2.5 ng/ml) で刺激した HGF-1 細胞はその細胞画分に IL-1 α を産生した。また, その産生量は刺激開始後 12 時間でピークとなり, その後急速に減少した(図 2)。RPMI 1788 細胞は IL-1

図4 Effect of fixed HGF treated with rhIL-1 β on differentiation of RAW cells into TRAP-positive OCLs

HGF-2, -3 and -4 cells at confluence were treated with rhIL-1 β (2.5 ng/ml) or not for 12 hours. After that, each of the cell layers was fixed with 1% paraformaldehyde in DMEM. RAW cells (1×10^3 cells/well) were cultured on the fixed cell layers of HGFs for 4 days. Some RAW cells were treated with sRANKL/ODF (50 ng/ml) for 4 days. After the cells were fixed and stained for TRAP, number of TRAP-positive mononuclear (□) and multinuclear (■) OCLs were measured. The values shown are the mean $\pm$ SD of 3 separate experiments, each conducted in triplicate, for each of the 3 HGFs ($n=27$). The difference from the value for control cultures was significant at $P < 0.01$ (* *). TRAP-positive OCLs were observed in the culture with sRANKL/ODF (B-1) but not in culture on HGF-2 cells treated with rhIL-1 β (B-2).

の主体は, IL-1 α であることが明らかとなった.

(2) HGFの細胞画分 IL-1 α が破骨細胞前駆細胞から破骨細胞への分化に及ぼす作用

RAW細胞を sRANKL/ODF (50 ng/ml) で4日間刺激すると, TRAP陽性単核および多核破骨細胞数の著しい増加が認められた(図4A, 4B-1). これに対し, RAW細胞を rhIL-1 β (2.5 ng/ml) で刺激あるいは非刺激の条件下で12時間培養後固定した HGF (HGF-2, -3, -5細胞) 上で培養した場合においては, TRAP陽性単核および多核破骨細胞の発現は認められなかった(図4A, 4B-2).

(3) HGFの細胞画分 IL-1 α が単核破骨細胞の延命と癒合に及ぼす作用

5×10^5 個/well の pOCs を単独で24時間培養する (control) と, TRAP陽性単核破骨細胞数は著明に減少したが, このような細胞数の著しい減少は rhIL-1 α (2.5 ng/ml) の刺激によって有意に抑制された(図5A). また, pOCs を rhIL-1 β (2.5 ng/ml) で刺激したあと固定した HGF (HGF-2, -3, -4細胞) 上で24時間培養した場合においても,

依存的に増殖することが報告されている⁹⁾. そこで, この細胞を用いて固定した HGF-1細胞の膜 IL-1活性を計測したところ, RPMI 1788細胞の増殖は rhIL-1 β で刺激した HGF-1細胞上で培養した場合, 非刺激の HGF-1細胞上で培養した場合と比較して有意に促進された. また, この細胞増殖促進作用は 500 ng/ml の anti-hIL-1 α を添加することにより, 非刺激の HGF-1細胞上で培養した場合とほぼ同等なレベルにまで抑制された(図3)が, anti-hIL-1 β はこれを抑制しなかった(未発表データ). また, これらの結果はほかのいずれの HGF でも同様に認められたことから, rhIL-1 α で刺激した HGFにおける膜 IL-1活性

図 5 Effect of fixed HGF treated with rhIL-1 β on survival of TRAP-positive mononuclear OCLs

HGF-2, -3 and -4 cells at confluence were treated with rhIL-1 β (2.5 ng/ml) or not for 12 hours. After that, each of the cell layers was fixed with 1% paraformaldehyde in DMEM. Prefusion OCLs (pOCs: 5×10^5 cells/well) were cultured on the fixed cell layers of HGFs for 24 hours. Some pOCs were treated with rhIL-1 α (2.5 ng/ml) alone or not for 24 hours. After the cells were fixed and stained for TRAP, number of TRAP-positive mononuclear OCLs were measured. The values shown are the means $\pm$ SD of 3 separate experiments, each conducted in triplicate, for each of the 3 HGFs ($n=27$). The difference from the value for cultures on untreated HGFs or for control cultures was significant at $P < 0.01$ (***) or $P < 0.01$ (**), respectively. Larger number of TRAP-positive mononuclear OCLs were observed in the culture on HGF-2 cells treated with rhIL-1 β (B-2) than in the culture on untreated HGF-2 cells (B-1).

HGF 上で培養した場合では、TRAP 陽性多核破骨細胞数の有意な増加が認められた(図 6 A, 6 B-1, 2)。これらの結果は、pOCs を rhIL-1 β で刺激後固定した HGF 上で培養すると、TRAP 陽性単核破骨細胞の延命と癒合が促進されることを示している。

TRAP 陽性単核破骨細胞数は control と比較して有意に多く、またこれを非刺激で固定した HGF 上で 24 時間共培養した場合と比較しても、有意に高い値を示した(図 5 A, 5 B-1, 2)。一方、同一の実験系で TRAP 陽性多核破骨細胞数を測定すると、rhIL-1 α (2.5 ng/ml) の 24 時間刺激は TRAP 陽性多核破骨細胞形成を有意に促進しており、また pOCs を非刺激で固定した HGF (HGF-2, -3, -4 細胞) 上で 24 時間培養した場合と比較して、rhIL-1 β で刺激したあと固定した

また、anti-hIL-1 α (500 ng/ml), anti-hM-CSF (50 ng/ml) あるいは OPG/OCIF (50 ng/ml) の存在下において、pOCs を rhIL-1 β で刺激したあと固定した HGF (HGF-3, -4, -5 細胞) 上で培養すると、anti-IL-1 α を添加した場合においてのみ、この TRAP 陽性単核破骨細胞の延命および癒合の促進が有意に抑制された(図 7 A, 7 B)。さらに、rhIL-1 β で刺激後固定した HGF と pOCs との接触をメンブレンフィルターで遮断すると、このような延命および癒合の促進作用は、認められな

図 6 Effect of fixed HGF treated with rhIL-1 β on fusion of TRAP-positive mononuclear OCLs

HGF-2, -3 and -4 cells at confluence were treated with rhIL-1 β (2.5 ng/ml) or not for 12 hours. After that, each of the cell layers was fixed with 1% paraformaldehyde in DMEM. pOCs (5×10^5 cells/well) were cultured on the fixed cell layers of HGFs for 24 hours. Some pOCs were treated with rhIL-1 α (2.5 ng/ml) alone or not for 24 hours. After the cells were fixed and stained for TRAP, number of TRAP-positive multinuclear OCLs was measured. The values shown are the means $\pm$ SD of 3 separate experiments, each conducted in triplicate, for each of the 3 HGFs ($n = 27$). The difference from the value for cultures on untreated HGFs or for control cultures was significant at $P < 0.05$ (*) or $P < 0.01$ (**), and $P < 0.05$ (*), respectively. Larger number of TRAP-positive multinuclear OCLs was observed in the culture on HGF-2 cells treated with rhIL-1 β (B-1) than in the culture on untreated HGF-2 (B-2).

かった(図7A, 7B).

考 察

これまで HGF はコラーゲン代謝を司り、主として歯肉組織の恒常性の維持において重要な役割を演じていると考えられてきたが、近年、この細胞は炎症性サイトカインや歯周病原性細菌由来 lipopolysaccharide の刺激により各種炎症性因子や細胞表面分子を産生、発現することから、局所における炎症反応や免疫応答にも積極的に関与している可能性があることが明らかにされてき

た^{10~14}。

主要な炎症性サイトカインであり、歯周炎の病態形成への強い関与が指摘されている IL-1 は、主としてマクロファージ/モノサイトにより産生分泌されるが、近年筆者らは、HGF を IL-1 β , TNF- α で刺激すると、細胞画分中の IL-1 α 産生が促進されることを報告した^{6,7}。また、IL-1 β で刺激した HGF を細胞質画分と膜画分に分け、それぞれの画分における IL-1 α 蛋白を western blot 法にて確認すると、両画分ともに 31 kDa 近傍の前駆型と 18 kDa 近傍の成熟型が確認され、細胞内に産生された前駆型 IL-1 α の一部は成熟型に蛋白プロセッシングされていることを明らかにした(未発表データ)。また、IL-1 α は前駆型、成熟型ともに活性を示すことが知られている。実

on HGFs treated with rhIL-1 β (2.5 ng/ml)

図7 Effects of anti-hIL-1 α , anti-hM-CSF, OPG/OCIF or contact inhibition on survival and fusion of TRAP-positive mononuclear OCLs stimulated with the fixed HGF treated with rhIL-1 β

HGF-3, -4 and -5 cells at confluence were treated with rhIL-1 β (2.5 ng/ml) or not for 12 hours. After that, each of the cell layers was fixed with 1% paraformaldehyde in DMEM. pOCs (5×10^5 cells/well) were cultured on the fixed cell layers of HGFs in the presence or absence of anti-hIL-1 α (500 ng/ml), anti-hM-CSF (50 ng/ml) or OPG/OCIF (50 ng/ml) for 24 hours. Some pOCs and the fixed HGFs were separately cultured for 24 hours, the separation being achieved with a membrane filter. The survival (A) and fusion (B) of TRAP-positive mononuclear OCLs were determined by counting the number of TRAP-positive mononuclear and multinuclear OCLs. The values shown are the means $\pm$ SD of 3 separate experiments, each conducted in triplicate, for each of the 3 HGFs ($n=27$). The difference from the value for cultures on HGFs treated with rhIL-1 β alone was significant at $p < 0.01$ (**).

際本研究において、HGFをrhIL-1 β で刺激すると、細胞画分IL-1 α の産生と主としてIL-1 α に基づく膜IL-1活性が誘導されたことから、rhIL-1 β で刺激したHGFの細胞内、特に細胞膜に存在するIL-1 α は、これと近接する細胞に対し細胞接触を介してそのシグナルを伝達する可能性があると考えられる。

RAW細胞は未分化なマクロファージ・モノサイト系の破骨細胞前駆細胞であり、RAW細胞をsRANKL/ODFで刺激すると破骨細胞に分化誘導され、またこの破骨細胞は吸収窩の形成能をもつことが報告されている¹⁵⁾。そこで今回、この細胞を用いてIL-1 β で刺激したHGFが破骨細胞前

駆細胞から破骨細胞への分化を促進するか否かを検討したところ、RAW細胞を、IL-1 β で刺激、非刺激の条件下で培養後固定したHGF上で培養しても、TRAP陽性単核および多核破骨細胞の誘導は認められなかった。このことは、HGFが産生する細胞画分IL-1 α は破骨細胞前駆細胞からTRAP陽性破骨細胞への分化を促進しないことを示している。

今回、Takamiらの方法に準じて分離したpOCsの約60%はTRAP陽性単核破骨細胞であった。そこで、この細胞を使用してHGFが産生する細胞画分IL-1 α が破骨細胞の延命および癒合に及ぼす作用を検討したところ、IL-1 β で刺激

図 8 Summary of the results clarified in this study
Intracellular IL-1 α produced in HGF, which were treated with IL-1 β , has no effect of differentiation of OCLs precursor cells into OCLs, however it stimulates survival and fusion of mononuclear OCLs via cell-to-cell contact.

後固定した HGF 上で pOCs を培養すると、TRAP 陽性単核破骨細胞の延命および TRAP 陽性単核破骨細胞から TRAP 陽性多核破骨細胞への癒合の促進が確認された。また、この培養系に anti-hM-CSF あるいは OPG/OCIF を添加した場合、この TRAP 陽性単核破骨細胞の延命および癒合の促進は抑制されず、anti-hIL-1 α を添加した場合においてのみ有意な抑制が認められた。これらの結果は、IL-1 β で刺激した HGF による単核破骨細胞の延命と癒合の促進作用の主体は、主として HGF の細胞内、特に膜に存在する IL-1 α であることを示しており、また、IL-1 は RANKL/ODF を介することなく直接的に破骨細胞に働き、その延命、癒合および活性化を促進するという過去の報告²⁻⁴⁾を支持している。近年、マウスの皮膚由来線維芽細胞は 1 α , 25(OH) $_2$ D $_3$ と dexamethasone (Dex) の存在下において RANKL/ODF を発現し、骨芽細胞/ストローマ細胞と同様に破骨細胞の形成を促進することが報告された¹⁶⁾。しかしこの報告は Dex の存在下でなければマウス線維芽細胞は 1 α , 25(OH) $_2$ D $_3$ で刺激しても RANKL/ODF を発現しないことを示し

ており、また本研究においても、IL-1 β で刺激した HGF による破骨細胞の延命、癒合の促進作用は OPG/OCIF で抑制されなかったことから、本研究における IL-1 β の刺激条件では、HGF における RANKL/ODF の発現が促進されない、あるいは HGF は IL-1 β 刺激により RANKL/ODF を発現しない可能性が考えられる。また本研究において、固定した HGF と pOCs の接触をフィルターで遮断すると、TRAP 陽性単核破骨細胞の延命および癒合は認められなかった。この結果は、HGF が産生する細胞画分 IL-1 α は、細胞接触により TRAP 陽性単核破骨細胞にシグナルを伝達し、この細胞の延命と癒合を促進することを示している。

これらの結果から、IL-1 β で刺激した HGF はその細胞画分に IL-1 α を産生し、特に細胞膜に存在する IL-1 α は、破骨細胞前駆細胞から破骨細胞への分化に影響を与えないものの、直接的な接触を介して TRAP 陽性単核破骨細胞へシグナルを伝達し、この細胞の延命および癒合を促進することが明らかとなった(図 8)。

文 献

- 1) Suda T, Takahashi N, Udagawa N, Jimi E, Mathew TG, Martin TJ : Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr Rev* 20 : 345-357, 1999.
- 2) Jimi E, Nakamura I, Ikebe T, Akiyama S, Takahashi N, Suda T : Activation of NF- κ B is involved in the survival of osteoclasts promoted by interleukin-1. *J Biol Chem* 273 : 8799-8805, 1998.
- 3) Okahashi N, Koide M, Jimi E, Suda T, Nishihara T : Caspases(interleukin-1 β -converting enzyme family proteases) are involved in the regulation of the survival of osteoclasts. *Bone* 23 : 33-41, 1998.
- 4) Jimi E, Nakamura I, Duong LT, Ikebe T, Takahashi N, Rodan GA, Suda T : Interleukin 1 induces multinucleation and bone-resorbing activity of osteoclasts is the absence of osteoblasts/stromal cells. *Exp Cell Res* 247 : 84-93, 1999.
- 5) Masada MP, Persson R, Kenney JS, Lee SW, Page RC, Allison AC : Measurement of interleukin-1 α and-1 β in gingival crevicular fluid : implications for the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodont Res* 25 : 156-163, 1990.
- 6) Kobayashi M, Okada N, Okamatsu Y, Mugikura K, Nishihara T, Hanazawa S, Kitano S, Hasegawa K : Intracellular interleukin-1 α production in human gingival fibroblasts is differentially regulated by various cytokines. *J Dent Res* 78 : 840-849, 1999.
- 7) Okamatsu Y, Kobayashi M, Nishihara T, Hasegawa K : Interleukin-1 α produced in human gingival fibroblasts induces several activities related to the progression of periodontitis by direct contact. *J Periodont Res* 31 : 355-364, 1996.
- 8) Takami M, Woo JT, Nagai K : Requirement of osteoblastic cells for the fusion of preosteoclasts. *J Bone Miner Metab* 16 : 151-157, 1998.
- 9) Vandenabeele P, Declercq W, Libert C, Fiers W : Development of simple, sensitive and specific bioassay for interleukin-1 based on the proliferation of RPMI 1788 cells, Comparison with other bioassay for IL-1. *J Immunol Method* 135 : 25-32, 1990.
- 10) Page RC : The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodont Res* 26 : 230-242, 1991.
- 11) Shimabukuro Y, Murakami S, Okada H : Antigen-presenting-cell function of interferon γ -treated human gingival fibroblasts. *J Periodont Res* 31 : 217-228, 1996.
- 12) Murakami S, Shimabukuro Y, Sato T, Hino E, Kasaki D, Hashikawa T, Hirano H, Okada H : Immunoregulatory roles of adhesive interactions between lymphocytes and gingival fibroblasts. *J Periodont Res* 32 : 110-114, 1997.
- 13) Okada N, Kobayashi M, Mugikura K, Okamatsu Y, Hanazawa S, Kitano S, Hasegawa K : Interleukin-6 production in human gingival fibroblasts derived from periodontal tissues is differentially regulated by cytokines and a glucocorticoid. *J Periodont Res* 32 : 559-569, 1997.
- 14) Hayashi Y, Kobayashi M, Kuwata H, Atsumi G, Deguchi K, Wei XF, Kudo I, Hasegawa K : Interferon- γ and interleukin 4 inhibit interleukin 1 β -induced delayed prostaglandin E2 generation through suppression of cyclooxygenase-2 expression in human fibroblasts. *CYTOKINE* 12 : 603-612, 2000.
- 15) Hailing H, David LL, Colin RD, Irina S, Anne C, Emma T, Houg-lin T, Gary E, Michael JK, Ildiko S, Ling W, Xing-zhong X, Robin E, Laura C, Tabitha B, Sheila S, Casey C, Sean M, Grant S, Michael BB, William JB : Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. *Proc Natl Acad Sci USA* 96 : 3540-3545, 1999.
- 16) Julian MWQ, Nicole JH, Jan E, Mathew TG, Martin TJ : Fibroblastic stromal cells express receptor activator of NF- κ B ligand and support osteoclast differentiation. *J Bone Miner Res* 15 : 1459-1466, 2000.