骨吸収モデルとしての骨巨細胞腫単核細胞の PGE2 産生能について

久留米大学整形外科

南 谷 和 仁・小 宮 節 郎
木 下 斎・中 島 雅 典
井 上 明 生

同 第2病理

篠 栗 靖 之・森 松 稔

Synthesis of Prostaglandin E2 by Cells Cultured From Giant Cell Tumor of Bone: a Model for Studying Bone Resorption

by

Kazuhiro Minamitani, Setsuro Komiya,
Hitoshi Kinoshita, Masanori Nakashima and Akio Inoue

Department of Orthopedic Surgery,
Faculty of Medicine, Kurume University, Kurume, Japan

Yasuyuki Sasaguri and Minoru Morimatsu

Department of Pathology,
Faculty of Medicine, Kurume University, Kurume, Japan

A cell line of giant cell tumor of bone has been established in our laboratory. The cultured cells are composed of mononuclear cells alone. The cells are found to express phenotypes of both osteoclast and monocyte-macrophage, and are considered as a good model for studying bone resorption. In the present study, it was examined whether or not the mononuclear cells produce prostaglandin E2 (PGE2) using radioimmunoassay kit. The production of PGE2 was found and was suppressed by indomethacin, dexamethasone, and Eel calcitonin. The production of PGE2 was low. Secreted PGE2 thus may not play a central role on bone resorption. However, the evaluation of the level of PGE2 may be useful for studying the metabolism of osteoclasts using this cell line.

はじめに

骨巨細胞腫 (GCT) は、長管骨の骨幹端部に偏心性に発生し、骨皮質を強く浸蝕し、時には良性像でありながら再発することが多く、また、非常に希ではあるが、転移さえ起こしえる骨腫瘍である。組織学的には特徴的な多核巨細胞の存在が必要であり、他に組織球様の単核細胞を認める¹⁾ (図1)。Jaffe らは、この腫瘍の病理組織学的分類を予後の推定に役立てようとしたが、現在では、その grading と予後とは関係しないと言われている。これは、むしろ宿主と病巣の関係に

関連するものと言われており、GCT の本態と組織起源が明確にされていないためによるものであろう。我々は、『破骨細胞に組織起源があるのではないか』と推論して研究をつづけているが²⁾、今回は、GCT 培養単核細胞の prostaglandin E2 (PGE2) の産生能について検索した。

方 法

材料は、当教室にて、1年以上継代を続けている GCT の培養細胞であり、多核巨細胞は初代時に消失しており、単核細胞のみとなっている (図2)。約5×

図1 骨巨細胞腫組織切片, H. E. 染色(×100)
特徴的な多核巨細胞と多角形単核細胞の細胞群で構成されている。

図2 1年以上継代を続けている骨巨細胞腫の培養細胞(×100)
培養初期に多核巨細胞は消失し, 単核細胞のみとなっている。

10^5 個の細胞を血清を含まない培地で48時間培養し, 培養液中の PGE₂ の産生量を NEN 製 RIA KIT にて測定した。また, indomethacin $1\mu\text{g}/\text{ml}$, Eel calcitonin 2unit/ml, dexamethasone $10^{-7}\text{M}/\text{well}$ を培養液中に添加した群を作り, 非添加の control 群との比較を行った。

結 果

control 群からは $15\text{pg}/\text{well}$ の PGE₂ が検出され, 薬剤を添加した群では, それぞれに PGE₂ 産生の抑制が認められた(図3)。しかし, 各 sample での細胞数にばらつきがあるため, それぞれの sample について, Markwell 法⁶⁾ による蛋白量の定量を行い, 単位蛋白

図3 PGE₂ 産生量(pg/well)

表1 Markwell 法による蛋白量の定量

1 N NaOH による細胞の抽出

↓
アルカリ性銅試薬 0.1ml 混合

↓
10分以上, 室温放置

↓
フォーリン・チオカルト液 0.1ml 混合

↓
45分以上, 室温放置

↓
660nm での吸光度にて測定

$$\text{計算式} \quad \frac{\text{O. D. sample} - \text{O. D. Blank}}{\text{O. D. St. BSA} - \text{O. D. Blank} (\mu\text{g}/\text{ml})} \times 100$$

図4 単位蛋白あたりの PGE₂ 産生量 (pg × 10⁻³ / μg)

あたりの PGE₂ 産生量を計算して(表1), 抑制の程度を比較検討することにした。その結果, indomethacin による抑制効果が最も著明であり, Dexamethasone では中等度抑制され, また, Eel calcitonin でも軽度の抑制効果が認められた(図4)。

考 察

この腫瘍は, giant cell tumor と命名されたころ (Bloodgood, 1912), その再発率の高さや生物学的態度により sarcoma の一種と考えられていた。また, その

後、その病理組織学的形態から、破骨細胞由来のものと考えられ、osteoclast sarcoma,あるいは、osteoclastoma と呼ばれた時もあったようである。我々も、『破骨細胞に組織起源があるのではないかと推論している。これまでの研究により、GCT は、MCS2, H-14 の単球膜表面抗原を90%以上に有し、また、C3 レセプターを一部に有した単球、マクロファージ系の細胞としての性格を持つ一方で、耐酒石酸酸性ホスファターゼ陽性であり、また、エルシトニンレセプターをも有しており、破骨細胞系としての性格も兼ね備えていることがわかってきた⁵⁾。また、collagenase, gellatinase, proteoglycanase などの matrix metalloproteinase (MMP) や、IL-1 β の産生も確認し、これらが局所骨破壊や遠隔転移に関与しているのではないかと考えている。

さて、PGE2 は、リンホカイン (IFN, IL-2, MIF など) の産生抑制や、抗腫瘍活性 (NK 活性, macrophage 活性, ADCC) の抑制など、様々な免疫系への抑制効果のほかに、骨芽細胞や破骨細胞を介した骨吸収作用を認めるアラキドン酸代謝物質である。今回検出された PGE2 は微量であり²⁾、骨吸収に関与するかは不明であるが³⁾、PGE2 を多量に産生する単球・マクロファージ系のひとつの性格と同じように持っていることが確認された。このように、GCT が PGE2 の産生能を有することは、破骨細胞系列の比較的未熟な細胞群として、また1つの性格を有していることを確認したことになり、骨吸収を解明していく上での鍵となる実験モデルではないかと考えられた。

結 語

- 1) GCT 培養細胞の PGE2 産生能について、RIA で実験を行った。
- 2) 微量ながら PGE2 の産生能を有していることが確認され、indomethacin, dexamethasone にて抑制され、Eel calcitonin でも軽度であるが抑制されることが確認された。
- 3) GCT は、破骨細胞系列の比較的未熟な細胞群と

しての性格を有し、骨吸収の実験モデルとなり得る。

参 考 文 献

- 1) Goldring, S.R., et al.: Human giant cell tumors of bone-indentification and characterization of cell types, J. Clin. Invest. 79: 483-491, 1987.
- 2) Hirata, Y., et al.: Specific receptors for epidermal growth factor in human tumor cells and its effect on synthesis of prostaglandin E2 by cultured osteosarcoma cell line, Acta Endocrinologica, 107: 125-130, 1984.
- 3) Klein, D.C. and Raisz, L.G.: Prostaglandins-stimulation of bone resorption in tissue culture, Endocrinology, 86: 1436-1440, 1970.
- 4) 小宮節郎: 骨巨細胞腫の組織起源に関する考察—組織化学, 組織培養を中心に—, 整形外科と災害外科, 32: 847-850, 1984.
- 5) Komiya, S. et al.: Characterization of cells cultured from human giant-cell tumors of bone-phenotypic relationship to monocyte-macrophage and osteoclast. (Clin. Orthop. in press)
- 6) Markwell, A.K., et al.: Protein determination in membrane and lipoprotein samples-manual and automated procedures, Method in Enzymology, 72: 296-303, 1972.

質 問 熊本大学 森 修

- ① 実際に骨巨細胞腫が骨を吸収していくメカニズムとして本日の発表のような所を考えておられるのか?
- ② GCT 以外の骨の融解性腫瘍での骨吸収のメカニズムは GCT と同じですか?

解 答 久留米大学 南谷 和仁

我々は、骨巨細胞腫の骨吸収機序は、MMP によるものが主であろうと考えているが、骨巨細胞腫の多核巨細胞が破骨細胞と同様に骨吸収を行なうかは、今後検討していかなければならないと考えている。

他の骨腫瘍でも、MMP や PGE2 を産生しているものもあり、これらが骨吸収に関与していると考えられるが、骨巨細胞腫と同じ骨吸収機序であるかは不明である。