

平成 24 年度 博士後期課程学位論文要旨

学位論文題名 (注: 学位論文題名が欧文の場合は和訳をつけること)

The effects of immune cytokines on bone mineral density and osteometabolism
(骨代謝・骨密度における免疫系サイトカインの作用に関する研究)

学位の種類: 博士 (健康科学)

人間健康科学研究科 博士後期課程 人間健康科学専攻 ヘルス・パフォーマンス学系

学修番号: 08999601

氏名: 大石芳江

(指導教員名: 北 一郎)

【研究背景と目的】骨密度は、栄養の摂取状況、運動による機械的ストレスといった外的要因によって影響されることはよく知られているが、さらに遺伝的要因が重要な規定因子であることも遺伝子多型の分布と骨密度との関係を検討した研究などから指摘されている。これまでの遺伝子多型の分布と骨密度との関係についての報告ではその多くが閉経後の女性を対象としており、若年期の骨密度・骨質に関する遺伝的要因を把握したものは少ない。女性において、若年期に獲得した骨量が閉経後の骨粗鬆症の発症に影響すると報告されていることから、若年期に骨密度・骨質に関する遺伝的要因を把握し、骨量獲得のための生活を習慣づけることにより、閉経後の骨粗鬆症の予防が可能になると考えられる。近年、免疫系細胞と骨格系細胞はサイトカイン、シグナル分子、転写因子、膜受容体などの制御分子を共有していることが明らかになり、免疫系と骨代謝の相互関係が注目されている。そこで本研究では、骨密度に関連する遺伝的要因として免疫系サイトカインに焦点をあて、最大骨量獲得期である若年期および骨粗鬆症発症期である高齢期の女性を対象に、骨代謝に関与すると報告されている免疫系サイトカイン(IL-6, TNF- α , IL-17F, TGF- β , OPG)および骨質関連因子(メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素)の遺伝子多型と骨密度の関係について明らかにすることを目的とした。また、骨代謝における免疫系サイトカインの作用についてヒト培養細胞系を用いて実験を行った。これまで免疫系サイトカインの単独作用として骨芽細胞の骨形成促進および破骨細胞の骨吸収促進についての報告はあるが、各細胞に対する免疫系サイトカインの共存作用について検討した報告は少ない。そこで、ヒト培養骨芽細胞における骨形成、破骨細胞分化促進作用およびヒト培養破骨細胞系における骨吸収作用について免疫系サイトカインの単独および共存効果について検討した。

【実験と検討結果】

実験 1: 若年女性および高齢女性を対象とした免疫系サイトカイン遺伝子多型解析と骨密度との関係

本学女子学生 100 名 (若年女性群; 18 歳~23 歳) および東京都羽村市に在住の女性 100 名 (高齢女性群; 60 歳~83 歳) を対象に身長、体重、BMI の測定を行った。また、DXA 法による骨密度 (全身、大腿骨頸部、腰椎; L_1 または L_4) の測定をイーク丸の内クリニックおよび公立福生病院にて行った。協力者の手指爪より DNA を抽出し、各遺伝子の一塩基多型を Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) 法により検出した。解析した遺伝子は

インターロイキン(IL)-6; -634C>G (rs 1800796), 腫瘍壊死因子(TNF)- α ; -308G>A (rs 361525), IL-17F; +7488T>C (rs 763780), 変異増殖因子 (TGF)- β ; +869T>C (rs 1800470), osteoprotegerin (OPG); 163A>G (rs 3102735), およびその多型が骨質の劣化を招くと報告されているメチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素 (MTHFR); 677C>T (rs 1801133)とした。異なる遺伝子型による骨密度の差は、若年女性群内および高齢女性群内で比較検討を行った (t-test および Mann-Whitney's U-test)。実験の結果、若年女性群では、IL-6, IL-17F および MTHFR の遺伝子型と、また、高齢女性群では、IL-17F の遺伝子型と骨密度との関係が見いだされた。IL-6 遺伝子多型では、若年女性群の腰椎において、CG 型が CC 型に比べて骨密度が高い結果となった。IL-6 プロモーター領域の-634C>G 多型は IL-6 の産生量を増加させる作用があり、一方、IL-6 の産生量はエストロゲンにより抑制されることが知られている。これらのことから、若年女性群では、高いエストロゲンの分泌量が IL-6 の血中レベルを低く抑え、さらに CG 型で産生される IL-6 は安定性が低いことから骨密度が高く維持されている可能性が考えられる。IL-17F については、若年女性の全身、腰椎、大腿骨および高齢女性の全身、腰椎において C アレルをもつ C キャリアーの骨密度が低かった。IL-17F 遺伝子多型はぜん息の発症や重症度に影響を与える可能性があるとして報告されているが、これまで骨密度に関する報告はなく、本研究は初めて日本人女性 200 名の解析結果から骨密度との関係を示したものである。

実験 2 : ヒト培養細胞系における免疫系サイトカインの骨代謝に及ぼす影響

ヒト胎児骨芽細胞系 hFOB 1.19 (ATCC CRL-11372; 不死化) を用いて、IL-6, IL-17F の影響を骨形成の指標であるアルカリフォスファターゼ (ALP) 活性、石灰化および破骨細胞分化因子 (RANKL) の検出によって評価を行った。さらに、破骨前駆細胞の分化抑制作用が報告されている IL-4, INF- γ との組み合わせによる影響を検討した。また、ヒト破骨前駆細胞 Osteoclast Precursors (LONZA 2T-110; 初代培養) を用いて、RANKL 濃度およびサイトカインの破骨細胞分化作用への影響を成熟破骨細胞数の変化によって検討した。実験の結果、ヒト骨芽細胞に対し、IL-6 は RANKL の発現を促進し、さらに ALP 活性を抑制する傾向にあった。このことは、IL-6 が骨吸収を促進する可能性を示唆するが、石灰化の促進作用もみられたことから、過剰に産生された RANKL が破骨前駆細胞に作用し、破骨細胞への必要以上の分化や骨吸収を進行させないための 1 つの防御機構にも働いている可能性が考えられる。骨芽細胞に対する IL-6, INF- γ の共存条件では、IL-6 単独による RANKL 発現促進、ALP 活性低下および石灰化促進作用は抑制された。また、IL-17F と INF- γ の共存による骨芽細胞への影響は、各サイトカインの単独条件に比べ RANKL 発現の増加傾向が見られたが、ヒト破骨前駆細胞に対しては、破骨細胞への分化が抑制された。

【まとめ】

本研究において IL-6 (-634C>G; rs 1800796), IL-17F (+7488T>C; rs 763780) の遺伝子多型は骨密度との関係が認められ、特に IL-17F については若年女性及び高齢女性の両方にその関与が認められ、骨粗鬆症の予防に役立つ新たな候補遺伝子と考えられる。また、ヒト培養細胞系による検討結果から RANKL を中心とした骨代謝機構において、骨芽細胞の RANKL 発現促進に働く免疫系サイトカインの共存条件が、破骨前駆細胞では破骨細胞への分化抑制に働くことから、培養細胞系において免疫系サイトカインの共存による作用は骨代謝のバランスの維持に関与している可能性が示唆された。