



Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士 (医学)
報告番号	甲第1465号
学位記番号	第1051号
氏名	黒柳 元
授与年月日	平成 27年 3月 25日
学位論文の題名	<p>(-)Epigallocatechin gallate amplifies interleukin-1-stimulated interleukin-6 synthesis in osteoblast-like MC3T3-E1 cells (骨芽細胞においてカテキンは interleukin-1(IL-1)による IL-6 産生を促進的に制御している)</p> <p>Biochimie. Vol. 95 : P.1933-1938, 2013</p>
論文審査担当者	主査： 岡本 尚 副査： 山崎 小百合, 大塚 隆信

論文内容の要旨

【目的】

骨代謝は、骨形成を担う骨芽細胞と骨吸収を担う破骨細胞によって巧緻に制御されている。骨形成と骨吸収が絶えず活発に行われ、骨はリモデリングされているが、その平衡が保たれ正常な骨量が維持されている。しかし、そのバランスの破綻により骨粗鬆症に代表される代謝性骨疾患及び骨折治癒の異常が生じる。近年、interleukin-1 (IL-1)等の骨吸収因子の受容体が、骨芽細胞に存在することが示され、骨芽細胞はその細胞膜上の RANKL (receptor activation of NF- κ B ligand)を介し、破骨細胞の形成、分化を制御することが明らかとなってきた。現在、骨芽細胞は骨形成のみならず骨吸収をも制御し、骨代謝の中心的な役割を担っていると考えられている。しかし、骨代謝の制御機構の詳細は未だ明らかとされていない。私共の研究室では骨代謝制御の中心を担う骨芽細胞の増殖、分化制御機構を検討し、骨代謝調節因子の細胞内情報伝達機序の詳細を明らかとしてきた。

緑茶ポリフェノールの主成分として知られる(-)-epogallocatechin gallate (EGCG)は種々の作用を有することが知られている。骨代謝においては、EGCGは骨吸収を抑制することが報告されている。一方、IL-6は骨吸収因子として作用し、破骨細胞の分化誘導を刺激することが知られている。また、最近ではIL-6が骨代謝を制御し、骨折治癒過程に重要な働きを担うことも報告されている。私共の研究室では既に骨芽細胞様 MC3T3-E1 細胞において IL-1 が p44/p42 mitogen-activated protein (MAP) kinase 及び p38 MAP kinase を介して IL-6 の産生を促進すること、一方、AMP-activated protein kinase (AMPK)を介し nuclear factor- κ B (NF- κ B)を活性化し、IL-6 の産生を抑制することを報告している。今回、骨芽細胞様 MC3T3-E1 細胞において IL-1 による IL-6 産生に対する EGCG の影響を検討した。

【方法】

新生マウス頭蓋冠より分離株化された骨芽細胞様 MC3T3-E1 細胞を 10%牛胎仔血清を含む α -MEM 培地で 5 日間培養した後、牛胎仔血清を 0.3%とし、48 時間後実験に供した。細胞を EGCG で前処置した後に IL-1 で刺激し、上清中の IL-6 を ELISA 法で測定した。また、p44/p42 MAP kinase、p38 MAP kinase、AMPK、inhibitor of κ B (I κ B)及び NF- κ B のリン酸化を Western blot 法にて解析した。さらに、IL-6 mRNA を real-time RT-PCR 法にて測定した。

【結果】

EGCG は、IL-1 刺激による IL-6 遊離を用量依存的に増強した(50-100 μ M)。また、EGCG は IL-1 刺激による IL-6 mRNA の発現を増強した。EGCG は IL-1 刺激による p44/p42 MAP kinase、p38 MAP kinase 及び AMPK α のリン酸化に何ら影響を及ぼさなかった。一方、IL-1 による I κ B 及び NF- κ B のリン酸化は EGCG により著明に抑制された。

【考察】

以上の結果より、骨芽細胞において EGCG は NF- κ B を抑制し IL-1 刺激による IL-6 の産生を増強すること及びその作用点は AMPK と I κ B の間であることが示唆された。緑茶は高齢者の骨量低下や骨折を予防するなど人体に有効な効能を有することが知られている。また、これまで骨吸収因子として考えられてきた IL-6 は、骨代謝の亢進した状態においては骨代謝調節因子として骨形成を促進することが報告されている。今回の私共の結果から、EGCG が高齢者の骨折予防に資する新たな分子機構が示唆された。

論文審査の結果の要旨

【目的】骨では骨形成と骨吸収が行われているが、その両者の均衡の破綻によって骨粗鬆症や骨折治癒の異常が生じる。近年の研究から IL-1 などの骨吸収因子の受容体が骨芽細胞に存在し、RANKL を介して破骨細胞の形成や分化が制御されることが明らかになった。他方、緑茶ポリフェノールの主成分として知られる(-)-epigallocatechin gallate (EGCG)は人体に様々な効果があり、骨代謝においては、EGCG は骨吸収を抑制することが報告されている。また、IL-6 は骨吸収因子として作用し、破骨細胞の分化誘導を刺激することが知られている。既に骨芽細胞様 MC3T3-E1 細胞を用いた実験で、IL-1 が p44/p42 mitogen-activated protein (MAP) kinase や p38 MAP kinase を介して IL-6 の産生を促進する一方、AMP-activated protein kinase (AMPK)を介して NF- κ B シグナルを抑制し、IL-6 の産生を抑制する、という両方向性の作用が報告されている。そこで、本論文では特に EGCG の骨芽細胞における IL-1 刺激による IL-6 産生に対する効果に着目して研究を進めた。

【方法】実験では骨芽細胞様 MC3T3-E1 細胞培養系を用いた。細胞を EGCG で前処置した後に IL-1 で刺激し、IL-6 の遊離を ELISA 法で、mRNA 発現レベルを RT-PCR 法で測定した。また、IL-1 による p44/p42 MAP kinase や p38 MAP kinase、AMPK や NF- κ B などを経た細胞内情報伝達に対する EGCG の影響について主としてリン酸化特異的抗体などを用いた Western blot 法にて解析した。

【結果】EGCG は、IL-1 刺激による IL-6 遊離を用量依存的に増強し、IL-6 mRNA の発現増強も起こしていたことから主として転写もしくはその上流に対する効果であると考えられた。この効果を細胞内情報伝達系の立場より調べたが、EGCG は IL-1 刺激による p44/p42 MAP kinase や p38 MAP kinase のリン酸化に何らの影響を及ぼさなかった。他方、EGCG は IL-1 刺激による I κ B/NF- κ B のリン酸化を抑制し、NF- κ B シグナル伝達を抑制したが、AMPK α のリン酸化には有意な影響が見られなかった。

【考察】以上の結果より、骨芽細胞において EGCG は、主として NF- κ B 経路を抑制し IL-1 刺激による IL-6 の産生を増強すること、また、その作用点は AMPK と NF- κ B 活性化シグナルの間であることが示唆された。以前より、緑茶は高齢者の骨量低下や骨折を予防するなど骨代謝に有効な効果を有することが知られ、これまで骨吸収因子として考えられてきた。また、IL-6 は、近年の研究からも骨代謝調節因子として骨形成を促進することが報告されている。今回の研究結果より、EGCG は高齢者の骨折予防に資する新たな分子機構をもつことが示唆された。

【審査の内容】主査の岡本教授より、NF- κ B 活性化経路に対する AMPK の抑制作用はマウス MC3T3-E1 細胞に特異的か、使用した EGCG が実際に実験時にも抗酸化作用を維持できているかどうかについて等、計 11 項目、第 1 副査の山崎教授より、Western blot 法及び ELISA 法の実験方法の詳細について等、5 項目、第 2 副査の大塚教授より、骨粗鬆症に対する予防、検査、治療について、サルコペニアについての 2 項目の質問があった。これらの質問に対して、申請者からはおおむね適切な回答が得られた。以上より、学位論文の内容を十分に把握し、また大学院修了者としての学力を備えていると判断した。本研究は、緑茶の主要なポリフェノールである EGCG の骨代謝における役割と作用機構の一端を明らかにした有意義な研究であり医学的にも高く評価される。よって、本論文著者は、博士(医学)の学位を授与するのに値するものと判定した。

論文審査担当者 主査 岡本 尚

副査 山崎小百合 大塚隆信