

# 森田 幸子 論文内容の要旨

## 主 論 文

IL-18 Inhibits TNF- $\alpha$ -Induced Osteoclastogenesis Possibly via a T Cell-Independent Mechanism in Synergy with IL-12 In Vivo

IL-18 による生体内における T-cell を介さない TNF- $\alpha$  誘導破骨細胞形成への抑制効果と IL-12 との相乗的抑制効果

森田幸子, 北浦英樹, 吉松昌子, 藤村裕治, 小原悠, 江口俊子, 吉田教明

Calcified Tissue International • Volume 86, Number 3, page 242-248, 2010

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科医療科学専攻  
(主任指導教員: 吉田教明教授)

## 緒 言

破骨細胞分化の必須誘導因子の一つとして、炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$  があげられる。近年、*in vitro*、*in vivo* の実験において、TNF- $\alpha$  は破骨細胞を分化・誘導することが多く報告されている。また IL-18 は、INF- $\gamma$  を誘導し強く免疫を活性化し生体防御にはたらく炎症性サイトカインであることが知られ、炎症の場で、IL-12 と同時に存在することが知られている。これまでの我々の実験にて、マウスの大腿骨及び脛骨から採取した全骨髄細胞を M-CSF および TNF- $\alpha$  存在下で培養し、同時に IL-18 を作用させたところ、破骨細胞形成が抑制されるという結果が得られた。生体内で TNF- $\alpha$  は、炎症時に他のサイトカインと同時に存在することが考えられる。本研究では、炎症時に重要な働きをする IL-18 に着目し、生体内での TNF- $\alpha$  誘導破骨細胞形成への影響の検討と IL-12 との相互作用の検討を行った。

## 対象と方法

### 1) 被験動物

実験には 8 週齢雄 C57/BL6 マウスを用いた。

### 2) 生体内への TNF- $\alpha$ 、IL-18、IL-12 投与と組織学的観察

マウスの頭蓋縫合部にそれぞれ PBS (1.5ug/day) のみ、TNF- $\alpha$  (1.5ug/day) のみ、TNF- $\alpha$  (1.5ug/day) +IL-18 (1.5ug/day)、IL-18 (1.5ug/day) のみを 5 日間連続で注射投与した。頭蓋縫合部を組織学的に観察するために、パラフィン切片標本を作製

し、TRAP 染色を施した。また、上記方法で、マウスの頭蓋縫合部に TNF- $\alpha$  (1.5ug/day) のみ、TNF- $\alpha$  (1.5ug/day) +IL-18(0.15ug/day)、TNF- $\alpha$  (1.5ug/day) +IL-12(0.15ug/day) 、 TNF- $\alpha$  (1.5ug/day) +IL-18(0.075ug/day) +IL-12(0.075ug/day) をそれぞれ投与し組織学的観察を行った。

### 3) IL-18 レセプター、IL-12 レセプターの発現分析

マウス的大腿骨から骨髓細胞を採取し、control と、IL-18、IL-12 をそれぞれ加えて、37°Cで3日間培養、トータル RNA を取り出し RT-PCR 分析にて IL-18 レセプターと IL-12 レセプターの発現を調べた。

### 4) in vivo での T-cell の抑制

抗 CD4、抗 CD8 抗体を C57/BL6 マウスの腹腔内へ投与し T-cell を抑制した。T-cell 抑制の確認を FACS 分析にて行った。T-cell 抑制マウスの頭蓋縫合部に TNF- $\alpha$  (1.5ug/day) のみ、TNF- $\alpha$  (1.5ug/day) +IL-18(1.5ug/day) を5日間連続して注射投与し、組織学的観察を行った。

統計分析は、Scheffe' s F-test と Student' s t-test を用いた。

## 結 果

マウスの頭蓋部に TNF- $\alpha$  と同時に IL-18 を5日間連続して投与したところ、頭蓋部の TNF- $\alpha$  による破骨細胞形成は IL-18 により抑制され、IL-18 は in vivo においても TNF- $\alpha$  が誘導する破骨細胞形成を抑制することが確認された。マウスの全骨髓細胞を M-CSF および TNF- $\alpha$  存在下で培養し、IL-18 と IL-12 をそれぞれ単独あるいは同時に作用させたところ、単独で作用させた場合よりも、IL-18 と IL-12 を同時に作用させた方がより効果的に破骨細胞形成が抑制された。マウスの頭蓋部に TNF- $\alpha$  と IL-18、IL-12 を少量同時投与した場合、IL-18、IL-12 を単独投与した場合よりも、TNF- $\alpha$  が誘導する破骨細胞形成を抑制した。RT-PCR の結果、IL-18 を作用させた場合、IL-12 のレセプターの発現が増加、また IL-12 を作用させた場合、IL-18 のレセプターの発現が増加し、IL-18 と IL-12 は相互にレセプターの発現を促進することが確認された。FACS 分析により T-cell の成熟抑制が確認されたマウスの頭蓋部に TNF- $\alpha$  と同時に IL-18 を5日間連続して投与したところ、TNF- $\alpha$  による破骨細胞形成は IL-18 により抑制され、野生型マウスとの有意差はなかった。

## 考 察

TNF- $\alpha$  による破骨細胞形成に対して、IL-18 はこれまで報告されていた in vitro だけでなく、in vivo においても破骨細胞形成に対して抑制的にはたらき、さらにその作用は、in vitro 、in vivo にて IL-12 と相乗的にはたらき、そのメカニズムは、IL-18 と IL-12 の相互のレセプターの発現を促進するためであることが確認された。

T-cell は IL-18 の標的細胞であることが広く知られている。これまでの我々の実験で、IL-18 は TNF- $\alpha$  による破骨細胞形成において、破骨細胞前駆細胞に対しては直接的に作用しないことを報告している。本研究にて、生体内で T-cell の成熟が抑制されたマウスにおいても IL-18 の抑制効果が得られたため、IL-18 による TNF- $\alpha$  誘導破骨細胞形成への抑制効果は、T-cell 以外の他の細胞の関与が示唆された。

IL-18 の役割は、強い炎症があった場合、生体防御にはたらいていると同時に、破骨細胞形成には抑制的にはたらき、炎症により誘導される骨吸収を IL-12 と相乗的にはたらきながらフィードバック的に抑制し、生体の恒常性の維持に関与しているのではないかと考えられる。