

インターロイキン4のヒト骨芽細胞に
対する細胞外基質蓄積促進作用

石橋 英 明

インターロイキン4のヒト骨芽細胞に
対する細胞外基質蓄積促進作用

指導教官 黒川高秀 教授

東京大学大学院医学系研究科
外科学専攻
平成4年4月入学

石橋 英明

目次

	ページ
1. 緒言 -----	2
2. 方法 -----	5
2.1. 材料 -----	5
2.2. 細胞培養 -----	5
2.3. IL-4受容体(IL-4R)のmRNA発現の確認 -----	5
2.4. 細胞増殖 -----	6
2.5. コラーゲンの合成活性および蓄積量 -----	6
2.5.1. コラーゲン合成活性の測定	6
2.5.2. Prolyl hydroxylase活性の測定	7
2.5.3. Hydroxyproline含量の測定	7
2.5.4. I型コラーゲン蛋白合成活性の比較	8
2.5.5. rhIL-4によるSaM-1細胞のI型コラーゲン遺伝子の発現 レベルへの影響	8
2.6. 細胞外基質の石灰化 -----	9
2.6.1. 細胞外基質の石灰化の開始時期	9
2.6.2. 一部の期間にIL-4を投与した場合の細胞層へのCa、Pおよび hydroxyprolineの蓄積量	9
2.7. IL-4により発現が促進されるmRNAの検出と解析 -----	9
2.7.1. Differential display法	9
2.7.2. VI型コラーゲン $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$ 鎖のmRNA対する ノザンプロット分析	11
2.7.3. 細胞外基質中のVI型コラーゲンに対する ウエスタンプロット分析	12
2.8. 統計学的手法 -----	13
3. 結果 -----	14
3.1. SaM-1細胞のIL-4RmRNAの発現 -----	14
3.2. IL-4のSaM-1細胞の増殖への影響 -----	14
3.3. SaM-1細胞におけるrhIL-4のコラーゲン合成および蓄積促進作用	14
3.4. IL-4によるSaM-1細胞の石灰化誘導作用 -----	15
3.5. SaM-1細胞においてIL-4により誘導されるmRNAの検出と解析 -----	15
4. 考察 -----	17
5. 結語 -----	22
6. 図表 -----	23
7. 謝辞 -----	41
8. 参考文献 -----	42

1. 緒言

骨折治療は、軟部組織の断裂の場合と同様に、保存的療法、観血的療法のいずれにおいても、骨片の断端をできるだけ接近させて保持するにとどまっている。その後の骨癒合は自然修復に委ねられるため、骨折の治療には内固定材料の発達した今日でも長期間を要し、少数ではあるが偽関節となることもある。骨折治療を促進し、骨癒合を確実にする方法を新たに開発することは、現在においても整形外科の大きな課題である。

骨折治療は、骨折部の血腫形成と、骨折線に接する骨、骨膜、骨髄の壊死組織周囲の炎症から始まる (Simmons 1980)。凝血塊への間質系細胞浸潤と肉芽組織形成が仮骨形成への出発であるが、この凝血塊および肉芽組織に浸潤する炎症性細胞は、主としてT細胞とマクロファージである (Hulth 1985, Henricson 1991)。

マクロファージの役割は、壊死組織の貪食、platelet derived growth factor (PDGF) および transforming growth factor·beta (TGF- β) を分泌することによる仮骨形成への関与 (Nemeth 1988, Andrew 1993) が推測されるが、T細胞の役割は全く不明である。

B細胞が骨折部の凝血塊と肉芽組織中にほとんど見られないことから、T細胞は、単純に出血の結果として骨折部に現れたものではなく、何らかの機序により選択的に動員されていることが考えられる。また、HLA-DR 抗原陽性細胞が見られることから (Andrew 1994)、抗原提示によるT細胞の活性化機構が働いていると考えられる。したがって、T細胞は、骨折治療の初期段階で何らかの役割を果たしている可能性がある。

T細胞はさまざまなサイトカインを分泌して、標的細胞に作用している。T細胞が産生するサイトカインのひとつであるインターロイキン4 (IL-4) を含む培地で骨芽細胞様細胞を長期間培養すると、細胞外基質のコラーゲン量を反映していると思われる hydroxyproline 量が増加し、基質が石灰化することが知られている (Ueno 1992)。IL-4は、主に活性化T細胞が産生するサイトカインであり、1982年にT細胞の培養上清中に存在するB細胞の増殖 (Howard 1982) およびIgG産生 (Isakson 1982) を刺激する因

子として初めて報告された。その後、T細胞自身、肥満細胞、単球、マクロファージに対しても広範な生理活性を示すことが明らかとなった (Banchereau 1990)。1988年には、免疫系および血液系の細胞のみならず、間質系細胞を含む非免疫系の多くの種類の細胞にIL-4受容体が発現していることが示された (Lowenthal 1988) が、免疫系以外の細胞におけるIL-4の作用については未だ不明な点が多い。骨折部におけるT細胞の選択的動員と、IL-4の骨芽細胞に対する石灰化誘導作用を考え合わせると、IL-4が骨折部においてT細胞から分泌され、仮骨形成に関与している可能性がある。しかし、IL-4の骨芽細胞に対する作用の詳細な機序は不明であり、前述の報告においても、IL-4を含む培地で一定期間骨芽細胞を培養した結果を観察しているに過ぎず、その時間経過については触れていない。したがって、骨折部のT細胞がIL-4を分泌することにより仮骨形成に関与する可能性を検討するにあたって、IL-4の骨芽細胞への作用を時間経過を含めて詳細に検討する必要がある。特に、骨折部の炎症は時間の経過とともに沈静し、骨折治療の初期に集結したT細胞は、基質の石灰化段階では見られなくなる。すなわち、T細胞の集結と石灰化の開始との間には、時間的なずれがある。したがって、T細胞の分泌するIL-4の作用は、基質産生のみならず作用し、基質石灰化には作用しない可能性がある。しかし、IL-4が石灰化の開始まで継続的に存在する必要があるかどうか、すなわち、どの段階のIL-4の作用が骨芽細胞の石灰化を誘導しているかは未知である。

本研究の目的は、T細胞の仮骨形成における役割という観点から、IL-4の基質形成促進作用および基質石灰化作用の特徴を細胞レベルで明らかにすることである。

骨の石灰化は、骨芽細胞によって分泌される基質小胞内部で開始し、コラーゲン線維に沿うコラーゲン性石灰化によって進行する。すなわちコラーゲン線維は石灰化の直接の基質である。このことから、IL-4の基質形成に関する役割を検討するために、IL-4によって骨芽細胞のコラーゲン合成および蓄積が促進されるか、特に、骨の主要線維コラーゲンであるI型コラーゲンの産生が増加しているかを時間経過を含めて検討した。

IL-4の継続的な投与により骨芽細胞の基質が石灰化することがわかっているが、石灰化開始までの、どの時期の、どのようなIL-4の作用が石灰化に重要であるのかは不明で

ある。そのため、IL-4の投与時期を区分して基質の石灰化と投与時期との関係を調べ、さらに、石灰化に必要と考えられるIL-4の作用時期における骨芽細胞に対する具体的な作用をDifferential display法を用いて検討した。

2. 方法

2.1. 材料

上野好司氏(小野薬品)より、ヒトIL-4cDNAをpKCR発現ベクターに組み込み、チャイニーズハムスター卵巣細胞へトランスフェクトして発現させ、精製したrecombinant human IL-4 (rhIL-4)を供与された。sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)で95%以上の純度があることと、ヒト末梢血リンパ球に対し3.0 ng/mlの濃度で最大増殖促進能を示すことが既に確認されている。

2.2. 細胞培養

ヒト尺骨骨膜由来骨芽細胞様細胞SaM-1は、手術時に採取した尺骨骨膜を細切した後 explant法により得た細胞群から、alkaline phosphatase (ALP)活性の高いものを選んで継代培養した骨芽細胞様細胞であり、34代の継代寿命(population doubling level: PDL)を持ち、高いALP活性、parathyroid hormone (PTH)処理によるcyclic adenosine monophosphate (cAMP)の誘導、 $1\alpha,25\text{-dehydroxy vitamin D}_3$ ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$)によるosteocalcinの産生、 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ と $\alpha\text{-glycerophosphate}$ との併用下での培養における石灰化結節の出現と基質小胞の存在、I型コラーゲンの産生等の骨芽細胞の形質を備えている(Koshihara 1989, 1991, Hosoda 1993)。以上の形質を維持している21または22PDLのSaM-1細胞を、5% $\text{CO}_2/95\%$ air、 37°C の条件下で、10% fetal bovine serum (FBS)および5 $\mu\text{g/ml}$ のkanamycinを含む $\alpha\text{-minimum essential medium}$ ($\alpha\text{-MEM}$)で単層培養し、2日毎に培地交換した。RNAの抽出および酵素活性の測定の際には、24時間前に培地交換をした。

2.3. IL-4受容体(IL-4R)のmRNA発現の確認

SaM-1細胞からacid guanidine-phenol-chloroform (AGPC)法(Chomczynski 1987)

で抽出した total RNA から M-MLV 逆転写酵素 (Gibco BRL, Co., Ltd.) および oligo-dT (12-16) (宝酒造) を用いて、cDNA を作製した。ヒト IL-4R の 3' 末端非コード領域の塩基配列 (Idzerda 1990) をもとに、2種の PCR primer A, B を作製した。それぞれのセットの primer による PCR 産物は、770 bp および 498 bp と推測された。primer の塩基配列は、以下の通りである。

Set A

sense-primer : 5'-GTTGCTGAGTCTGCAGATGAGGACTAG-3'

antisense-primer : 5'-GTAAGTGGTGCCTTATGCCTGCTGTCTG-3'

Set B

sense-primer : 5'-GAAGAACCATGGTATGAAGG-3'

antisense-primer : 5'-CCTTAACTGAACACCCTTG-3'

PCR 反応は、Taq DNA polymerase (AGS, GmbH) を使い、set A または set B の primer の存在下に、94°C 1分、55°C 2分、72°C 3分を 40 cycle 行なった。PCR 産物は、1% agarose gel 内で電気泳動し、ethidium bromide で染色した。

2.4. 細胞増殖

SaM-1細胞を 3000 個/well (4cm²/well) の割合で播種し、24時間後から、0、0.3、3.0 ng/ml の rhIL-4 を含む培地に交換した。1、3、5、7 および 10 日後に細胞を回収し、Coulter counter (Coulter Electronics Inc.) で細胞数を計測した。

2.5. コラーゲンの合成活性および蓄積量

2.5.1. コラーゲン合成活性の測定

コラーゲン合成活性は、Peterkofsky and Diegelmann (1971) の方法により測定した。SaM-1細胞を 0、0.3 および 3.0 ng/ml の rhIL-4 を含む培地で 1 から 30 日間培養した後、10 μ Ci/ml の L-[2,3-³H(N)]-proline (DuPont-New England Nuclear, Co., Ltd.)、5

0 $\mu\text{g/ml}$ ascorbic acid、50 $\mu\text{g/ml}$ β -aminopropionitrile および 0、0.3、3.0 ng/ml の rhIL-4 を含んだ無血清培地で3時間培養した後、細胞層および上清からTCAで酸不溶画分を沈殿させた。この沈殿を、type VII bacterial collagenase (Sigma, Co., Ltd.) 溶液で、37°C、3時間消化し、上清中に溶出されたcollagenase-digestible protein (CDP) 中の放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定した。次に、酸不溶性画分中のDNA含量をBurton ら(1956)の方法により測定し、CDPとの比から μg DNAあたりの合成活性を算出した。

2.5.2. Prolyl hydroxylase活性の測定

0、0.3または3.0 ng/ml の rhIL-4 を含む培地で1から21日間培養した後、細胞層をHank's balanced salt solutionで2回洗浄後、0.1 mMのdithiothreitolを含んだ0.05 MのTris-HClで回収した。細胞層を超音波で破碎後、35,000Gで20分間超遠心した上清を酵素抽出液とし、Peterkofsky and DiBlasio(1975)の方法に従い、3,4-prolyl hydroxylase活性を以下のように測定した。prolyl hydroxylase阻害剤およびL-3,4- $^3\text{H}(\text{N})$ -proline存在下に培養した15日齢の鶏胚の頭蓋冠から抽出した ^3H 標識した非水酸化コラーゲン(4.0 $\times 10^5$ dpm)と、上述の酵素抽出液とを37°C、15分間反応させた。TCAを加えて反応を停止させ、4°Cで1,500G、5分間遠心した上清を水で平衡化したBio-Rad AG 50W-X8カラムに通した後、溶出液中の $^3\text{H}_2\text{O}$ を液体シンチレーションカウンターにより測定して酵素抽出液中のprolyl hydroxylase活性を求めた。酵素抽出液中の蛋白質量をBradford法(1976)により求め、 μg 蛋白あたりの比活性を算出した。

2.5.3. Hydroxyproline含量の測定

0、0.3または3.0 ng/ml の rhIL-4 を含む培地で最長30日間培養した細胞を Ca^{2+} and Mg^{2+} -free phosphate buffered saline (PBS)で洗浄後、well(4 cm^2)あたりのhydroxyproline含量をKivirikkoら(1967)の方法により定量した。まず、6 NのHClで細胞を回収し、130°C、3時間加熱して完全に加水分解した。KOHで中和後、Chloramine T

(和光純薬)で還元した後、tolueneを加え振盪後、遠心して非水酸化物を含むtoluene層を吸引除去し、水層を100°C、1時間加熱した。再びtolueneを加え振盪、遠心し、toluene層に溶出してきた、hydroxyproline由来のpyrroleを *p*-dimethylaminobenzaldehyde 溶液と反応させ、560 nmでの吸光度を測定した。

2.5.4. I型コラーゲン蛋白合成活性の比較

SaM-1をrhIL-4で10日間処理したのち、200 $\mu\text{Ci/ml}$ [^3H]-proline、50 $\mu\text{g/ml}$ ascorbic acid、50 $\mu\text{g/ml}$ β -aminopropionitrile、0、0.3、3.0 ng/ml のrhIL-4を含んだ無血清培地で3時間培養した。細胞層のコラーゲンを1 mg/ml のペプシンで可溶化し、2 M NaClを加え、塩析した。遠心後の沈殿を0.5 N酢酸溶液に溶解し、2-mercaptoethanolによるdelayed reduction法 (Sykes 1976)を用いたSDS-PAGEを行なった。泳動後、ゲルを ENLIGHTNING autoradiography enhancer (Du Pont, Co., Ltd.)に浸して増感させた後、オートラジオグラフィを行なった。

2.5.5. rhIL-4によるSaM-1細胞のI型コラーゲン遺伝子の発現レベルへの影響

0または3.0 ng/ml のrhIL-4を含む培地で1、5、10、15および20日間培養したSaM-1細胞からAGPC法により、全RNAを抽出した。各10 μg の全RNAをglyoxalで変性させた後、1% agarose gel/0.01M phosphate buffer (pH7.0)中で泳動した。泳動後ナイロン膜 (Hybond-N, Amersham, Co., Ltd.)にプロットし、Random-primed DNA labeling kit (Boehringer Mannheim, GmbH)を用いて [^{32}P]-dCTP (DuPont)で標識した pro- $\alpha 1$ (I) collagen cDNA (Chu 1982)およびヒト β -actin cDNA (Nakajima 1985)をハイブリダイズさせた。0.1% SDSを含む 2 x SSC (0.15 M NaCl, 0.015 M sodium citrate, pH 7.0)内で室温で30分3回、0.1% SDSを含む 0.2 x SSC内で65°Cで30分3回洗浄した後、autoradiographyを行なった。

2.6. 細胞外基質の石灰化

2.6.1. 細胞外基質の石灰化の開始時期

SaM-1細胞を、3.0 ng/mlのrhIL-4を含む培地で、10、16、20日間または30日間培養した後、冷5% perchloric acid (PCA)でCalcium (Ca)とPhosphorus (P)とを抽出し、wellあたりのCaとP含量をo-cresolphthalein complexone法 (Gitelman 1967) およびChenらの方法 (1956) で測定した。

2.6.2. 一部の期間にIL-4を投与した場合の細胞層へのCa、Pおよびhydroxyprolineの蓄積量

SaM-1細胞の石灰化に重要なIL-4の投与時期を明らかにするために、SaM-1細胞を、10日目の前と後でrhIL-4処理の有無を変化させて、20日間および30日間の培養を行なった。培養条件と培養期間により、表1に示すように、20-/-、20-/+、20+/+、20+/+、30-/-、30-/+、30+/-、30+/+の8群について、培養終了時の細胞外基質に蓄積したCa、P、hydroxyproline含量を測定した。

2.7. IL-4により発現が促進されるmRNAの検出と解析

2.7.1. Differential display法

Differential display法 (Liang 1992) は、比較したい二つの細胞または組織のmRNAを、polyA部分に相補的なoligo-dT配列を含むoligonucleotideをantisense primer (T₍₁₂₎MA:TTTTTTTTTTMA, T₍₁₂₎MC:TTTTTTTTTTMC, T₍₁₂₎MG:TTTTTTTTTTMG, T₍₁₂₎MT:TTTTTTTTTTMT, ただしMは、A,C,Tのmixture)として、また、任意に作成した10merのoligonucleotideをsense primerとして用いたRT (reverse transcription) -PCR法により、非特異的に増幅されたそれぞれのPCR産物の量を個別に比較して、mRNA発現

のレベルに差のある遺伝子を検出する方法である。sense primerの作製の条件は、A+T/G+C比が0.4から0.6であること、self-annealingおよびantisense primerとのannealingによるprimer dimerの形成が起こりにくい配列であることで、以上の条件を満たすsense primerを4種類 (AP-1: GCCTGGACCT, AP-2: TGCTCACCAC, AP-3: TGTCAGGGTG または AP-4: GGGCACTGCA) 作製した。

Sam-1細胞を3.0 ng/mlのrhIL-4を含む培地または含まない培地で1日間または5日間培養した後、細胞からAGPC法でtotal RNAを抽出し、以下のごとくdifferential display法を行なった。まず、抽出したtotal RNAをDNase Iで処理した後、4種のantisense primerを用いて、4種のcDNAを作製した。次に、4種のsense primerおよび4種のantisense primer、合計16通りのprimer setで $[\alpha^{32}\text{P}]$ -dCTP存在下でPCRを行なった。PCR条件は、95°C 30秒、42°C 1分、72°C 30秒で40 cycleである。終了後、熱変性させてDNA sequencing gel上で、それぞれのprimer setごとに、培養の条件および期間が、1) rhIL-4無添加で1日間、2) rhIL-4添加で1日間、3) rhIL-4無添加で5日間、4) rhIL-4添加で5日間、の順序で電気泳動した。オートラジオグラフィー後のフィルム上で、rhIL-4添加で1日、5日のlane上のバンドのうち、それぞれ無添加の1日、5日のlane上で対応するバンドよりシグナルの強いバンドを選択した。2回の実験で再現性のあるものを選択し一次候補とした。選択されたバンドに一致した位置からゲルを切り出した。PCR産物をゲル断片からTE buffer (10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA) 中で100°Cで加熱することにより溶出させ、遠心後の上清を回収した。この上清中に、目的としたPCR産物が含まれていることを確認するため、初回と同じprimerセットでPCR法による再増幅を行なった。PCR条件は、前述の初回のPCRと同一である。反応後の反応液を、1% agarose gel/TAE buffer (40mM Tris acetate, 2mM EDTA, pH 8.5) 内で泳動し、泳動後のゲルをethidium bromideで染色し、目的のPCR産物が回収されたことを確認した。

選択したPCR産物を、E.Coli plasmid vectorにTA-cloning法 (pGEM-T Vector Systems, Promega, Co., Ltd.) により組み込んだ。まず、PCR産物を同じprimer setを用いたPCR法により再増幅した後、TA-cloning plasmid vectorとPCR産物をT4 DNA ligase (Promega)を用いて連結させた。連結反応は、未精製のPCR反応液に、plasmid

vector, ligation buffer (最終濃度: 20 mM Tris-HCl pH 7.4, 5 mM EDTA), T4 DNA ligaseを混合し、16°Cで2時間静置した。反応後、Ca法を応用した井上、野島ら(1990)の方法によりXL-1 Blue E. Coli competent cell (Stratagene, Co., Ltd.)に導入した。transformation buffer (10 mM PIPES, 15 mM CaCl₂/2H₂O, 250 mM KCl)に懸濁して液体窒素中に保存してあるXL-1 Blueを、氷上で緩徐に解凍し、前述の連結反応液を加えた後、氷上で1時間静置後、42°Cの温水中で45秒間熱ショックを与え、SOC buffer (2% Bacto Tryptone, 0.5% Bacto Yeast Extract, 10 mM NaCl, 2 mM KCl, 10 mM MgSO₄/7H₂O, 10 mM MgCl₂/6H₂O, 20 mM glucose)内で37°Cで1時間振盪した溶液を、LB/ABPC/X-Gal (宝酒造)/IPTG (和光純薬)を含む1.5% agar plate上に播種し、37°Cで約17時間培養した。PCR産物が挿入されたplasmidを含むwhite colonyを選択し、LB/ABPC buffer内で37°C、24時間培養した後、精製キット (RPM DNA purification kit, BIO101, Co., Ltd.)を用いてplasmidを精製した。

このplasmidから適当な制限酵素で挿入部分を切り出して泳動した後、DNA精製kit (QIAEX, QIAGEN, Co., Ltd.)を用いて精製後、^[32P]-dCTPで標識したものをプローブとして、上述の培養条件、培養期間の4種のtotal RNAに対して、ノザンプロット分析を前述の方法で行なった。ただし、hybridization後の洗浄条件は、0.1% SDSを含む2 x SSC (0.15 M NaCl, 0.015 M sodium citrate, pH 7.0)内で室温で15分を3回、0.1% SDSを含む0.2 x SSC (sodium chloride-sodium citrate)内で50°Cで30分を3回とした。

このノザンプロット分析の結果、rhIL-4による何らかのmRNAレベルの上昇が確認できたプローブの鋳型となったPCR産物の塩基配列を、これを含むplasmid vectorの上流に存在するT7 promoter領域に相補的なT7 primerを用いてdideoxy法 (SEQUENASE sequencing kit, United States Biochemical, Co., Ltd.)により決定した。読みとった塩基配列について、GenBank遺伝子データベースでホモロジー検索を行なった。

2.7.2. VI型コラーゲン $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$ 鎖のmRNA対するノザンプロット分析

VI型コラーゲンの $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$ 鎖のmRNAの塩基配列 (Chu 1989, 1990)に対応する3組の

PCR primerを作製した。

α 1鎖 sense primer :CTGGTTTTTCCACCAATCC
antisense primer:CGTCGAACACATCACTATTC
 α 2鎖 sense primer :CGGAGAGCATTGGGTACACC
antisense primer:GGAGAACAGCGTCATGTTGC
 α 3鎖 sense primer :TGGTCTGCTACCTGAGGTCT
antisense primer:CATTGGTCCCAACGGTGCAC

α 1、 α 2、 α 3鎖のprimerによる増幅産物は、それぞれ434bp、483bp、949bpと予想された。SaM-1細胞より抽出したtotal RNAより合成したcDNAを鋳型にして、これらのprimerを用いてPCRを行った。PCRの条件は、95°C 1分、60°C 2分、72°C 3分で40 cycleである。反応液を1% agarose gel上で電気泳動し、ethidium bromide染色で単一のバンドが増幅されたことを確認した。ゲルからPCR産物を抽出し、TA-cloningベクターに組み込み、塩基配列をシークエンシングし、予想される配列と一致することを確認した。

rhIL-4を1、3、5、10日間作用させたSaM-1細胞の各10 μ gのtotal RNAを電気泳動し、VI型コラーゲン α 1、 α 2、 α 3鎖および β -actinのcDNAをプローブとしてノザンプロットを行なった。

2.7.3. 蓄積したVI型コラーゲンに対するウエスタンプロット分析

SaM-1細胞をrhIL-4で1、3、5および10日間処理した後、細胞層をPBSで2回洗浄後、200 ml/ディッシュの6 Mの尿素と10% SDSを含む溶液で可溶化した。超音波で破砕した後、4°C、10,000g、10分間遠心し、上清を蛋白抽出液とした。各サンプルを等溶体量ずつ還元条件下で7.5% SDS-PAGEで泳動した後、polyvinylidene fluoride (PVDF) 膜 (Millipore) に電氣的にプロットした (Towbin 1979)。5% skim milk/TBS-T buffer (50 mM Tris, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20) でブロッキング後、ウサギ由来ウシVI型コラーゲンポリクローナル抗体を用いてavidin-biotin-complex法 (Vectastain ABC kit、

Vector Laboratories) で免疫染色した。この抗体は、Adelaide 大学 Gibson 博士より供与されたもので、ヒト VI 型コラーゲンと 1:160,000 の ELISA titer で $\alpha 1$ あるいは $\alpha 2$ 鎖を認識するが、ヒト I, II, III, IV, V 型コラーゲンとは、1:200 の ELISA titer で弱く交叉反応するポリクローナル抗体である。

2.8. 統計学的手法

数値データを得る実験は、 $n=3$ または $n=4$ の標本数で行ない、平均土標準誤差を求めた。有意差検定は、実験値の正規分布を仮定し、等分散が認められた場合には Student-t-test を、等分散が認められない場合には Welch-t-test を、それぞれ両側検定で行ない、1% ($p<0.01$) および 5% ($p<0.05$) の危険率での有意差を調べた。

3. 結果

3.1. SaM-1細胞のIL-4R mRNAの発現

IL-4のSaM-1細胞への作用を調べる前に、SaM-1細胞のIL-4Rの発現をRT-PCR法で調べた。2種類のprimer setについて、予想された770 bpおよび498 bpのPCR産物が電気泳動ゲル上で認められた(図1)。

3.2. IL-4のSaM-1細胞の増殖への影響

増殖期のヒト骨芽細胞様細胞SaM-1に、0.3および3.0 ng/mlのrhIL-4を作用させると、細胞増殖速度を遅延させた。3000個/wellの細胞を播種後、rhIL-4無添加の場合では7日間でconfluentに達した。培地中にrhIL-4を添加した場合には、0.3および3.0 ng/mlのいずれの濃度の場合も増殖速度が低下し、10日目で無添加の場合と同数に達した。経過中に培地中に浮遊してくる死細胞は観察されなかった(図2)。

3.3. SaM-1細胞におけるrhIL-4のコラーゲン合成および蓄積促進作用

コラーゲン合成活性は、培地中のrhIL-4の有無に関わらず6日目まで減少した。その後、培地にrhIL-4を含む場合では10日目より再び増大し、20日目には再び低下し始めた。(図3)。

プロリルヒドロキシラーゼ活性は、rhIL-4の有無に関わらず、1日目に高値を示し、4日目には低下した。培地中にrhIL-4が含まれていない場合は、20日目まで低値のままだが、rhIL-4を含む培地では、処理開始後8日目以降でrhIL-4により促進された(図4)。

細胞層のhydroxyproline含量は、培地中のrhIL-4の有無に関わらず、時間依存的に増加した。培養開始後10日目以降は、0.3および3.0 ng/mlのrhIL-4により、また、培養開始後6日目では、3.0 ng/mlのrhIL-4により、hydroxyproline含量が有意に増加していた(図5)。

処理開始後10日目のI型コラーゲンの合成活性を、 $[^3\text{H}]$ -proline取り込み後の細胞層から抽出したコラーゲン分画のSDS-PAGE fluorographyにより調べた。0.3および3.0 ng/mlのrhIL-4処理で、I型コラーゲンが増加した(図6)。

$\alpha 1(I)$ のmRNAレベルは、rhIL-4により5日目より増加し、10日目以降さらに増大したが、20日目には、rhIL-4を含まない培地の場合でも $\alpha 1(I)$ のmRNAレベルが増加していた。標準化の為に用いた β -actinのバンドが、rhIL-4によりやや増加していた(図7)。

3.4. IL-4によるSaM-1細胞の石灰化誘導作用

3.0 ng/mlのrhIL-4を添加した培地で培養した場合の細胞外基質に蓄積したCaの質量は、16日目までは無添加の場合と変わらず、20日目から増加が見られ、30日目ではさらに増加した(図8)。rhIL-4を投与しない場合は、Ca量の増加は見られなかった。30日目の細胞層を位相差顕微鏡で観察すると、細胞の狭小化および重層化が見られ、石灰沈着と思われる白く光る部分が広がっていた。von Kossa染色でリン酸カルシウム結晶の沈着が観察された(図9)。

rhIL-4の培地中への投与時期を区分した実験では、20日目の細胞層に沈着したCaおよびP量は、20+/-群で、20+/+群と同様に、20-/+群と20-/-群に比べて有意に増加していた(図10a)。細胞層のhydroxyproline量の多さは、20+/+群>20+/-群>20-/+群>20-/-群であり、20+/-群は20-/+群の1.8倍のhydroxyproline量を示した(図10b)。30日目の沈着CaおよびP含量は、30+/-群と30+/+群で、それ以外の培養条件の場合に比べて有意に増加していた。30+/+群のCaおよびP含量は、30+/-群の1.4倍であった(図10c)。30日目の細胞層のhydroxyproline量の多さは、30+/+群>30+/-群>>30-/+群>30-/-群であった(図10d)。

3.5. SaM-1細胞においてIL-4により誘導されるmRNAの検出と解析

Differential display法で得られた一次候補は、表2の通りDD-1からDD-11までの11個であった。このうち、DD-1からDD-3までのDNA sequencing gel上に現われたバンド

を示す(図11)。DD-1からDD-11に対応するPCR産物はすべて、それぞれの初回のPCRと同じprimer setで再増幅することが確認された(図12)。このうち、再増幅産物をプローブにしたノザンプロットでバンドが表われたものは3個(DD-1、2、3)、実際にrhIL-4でのmRNAレベルの増強が確認されたものは1個(DD-3)であった(図13)。

遺伝子データベースGenBankで検索をした結果、DD-3の塩基配列は、VI型コラーゲンの $\alpha 1$ 鎖(pro- $\alpha 1$ (VI))のmRNAの塩基配列の一部とほぼ完全に一致した(図14)。

VI型プロコラーゲン $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$ 鎖のmRNAレベルの培養開始後10日目までの経時的变化をノザンプロット法で調べたところ、 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 鎖のmRNAはrhIL-4処理により5日目をピークにして発現が増強していた。 $\alpha 3$ 鎖のmRNA発現は、rhIL-4処理による変化はなく、また、10日目ではほとんど消失していた(図15)。

培養開始後5日目および10日目のVI型コラーゲン蓄積量の変化を、ウエスタンプロット法を用いて調べたところ、IL-4を培地中に添加した場合、VI型コラーゲン蓄積量が特に5日目に強く増加していた。無添加の場合、細胞層のVI型コラーゲン量は培養日数に関わらず一定であった(図16)。

4. 考察

本実験に用いる細胞は、骨芽細胞固有の形質を安定して発現することが確かめられていること、できるだけ正常細胞に近い細胞であることが望ましく、ヒト骨膜由来骨芽細胞様細胞SaM-1は、その条件を満たしていた。しかし、この細胞のような初期培養細胞の場合は、細胞の純度が問題となる。本実験の場合、他の間質系細胞、特に線維芽細胞が混入している可能性があり、線維芽細胞の形態は骨芽細胞と類似しており外見では区別が付かない。しかし、SaM-1細胞のすべてのクローンで、21回から22回の継代を経ても骨芽細胞形質を顕著に示すオステオカルシンの産生が見られる (Koshihara 1994) ことから、他の細胞の混入は、全くないか、極めて少ないと考えられた。

IL-4のSaM-1細胞に対する作用は受容体を介していると考えられる。本研究ではまず、SaM-1細胞にもIL-4R mRNAが発現していることを、PCR法を用いて確かめた。PCR法で起こり得る非特異的増幅によるfalse positiveを排除するために、2種のprimer setでそれぞれ予想された大きさの増幅産物ができることを確かめ、特異的な増幅であることの確認をした。IL-4Rの蛋白レベルでの確認、IL-4との結合実験は行っていないが、IL-4RのmRNA発現と石灰化誘導を始めとするrhIL-4のSaM-1細胞への作用が見られることから、この細胞に機能的なIL-4Rが発現していると考えられた。

増殖期のSaM-1細胞にrhIL-4を作用させると増殖速度の遅延が起きるが、浮遊死細胞は観察されず、播種後10日目にはrhIL-4無添加と同数になるので、細胞毒性の結果とは考えれない。何らかの機序により増殖期から分化期への移行が促進された可能性がある。

IL-4の基質形成に関わる作用については、既にSaM-1細胞においてIL-4により細胞層のhydroxyproline量が増加することが確認されている (Ueno 1992)。hydroxyprolineは、大部分がコラーゲンに含まれるので、細胞層のhydroxyproline量の増加はコラーゲン蓄積量増加を間接的に示している。そこで、IL-4のコラーゲン合成活性に対する作用とhydroxyproline蓄積量との経時的变化を調べた結果、コラーゲン合成活性、prolyl hydroxylase活性、細胞層のhydroxyproline含量のすべてにおいて、培養開始後10日目以後でIL-4による促進効果が見られた。培地中のIL-4の有無に

依らず、1日目のprolyl hydroxylase活性とコラーゲン合成活性とが高いのは、この時期はまだ細胞が増殖しており、増殖期にコラーゲン合成が高いとするOwenらの報告(1990)と一致するものである。骨基質においても、またSaM-1細胞の細胞外基質においても、I型コラーゲンはコラーゲンの90%以上を占めている(Koshihara 1989)ので、以上の変化は主にI型コラーゲンの合成および蓄積がIL-4により促進されたものと考えられる。実際、IL-4は、培養10日目のI型コラーゲンの合成を促進し、さらにpro α 1(I)のmRNAレベルを培養5日目から増強して、10日目以後はさらに増強した。以上の検討から、主に処理開始後10日目以降に、IL-4はコラーゲンの合成と蓄積とを促進することが明らかとなった。

培養骨芽細胞の石灰化を観察する方法として、電子顕微鏡による基質小胞および鉱質結晶の観察、X線による微小領域の元素分析などがあるが、本研究では異なる培養条件や培養期間におけるCa沈着量の差が重要なので、IL-4による細胞外基質の石灰化の指標として、CaおよびPの細胞層への総沈着量を測定した。IL-4をSaM-1細胞に作用させた場合の細胞層のCa量は、処理開始後20日目より増加し、30日目ではさらに増加する。この期間中どの時期のIL-4の作用が重要であるかを確かめるために、培養期間を10日目以前と10日目以後に区分し、それぞれの期間のみIL-4を作用させて、20日目と30日目でのCa、P、hydroxyproline量を測定した。その結果、次の3点が示唆された。第一に、10日目までのIL-4の作用が、石灰化の十分条件である。10日目までのIL-4投与により、20日目、30日目での石灰化が認められた。第二に、10日目までの培地中のIL-4の存在が、石灰化に必要なものである。10日目からIL-4の投与を始めた場合、20日目と30日目でCa、P含量の増加が見られなかった。第三に、コラーゲン蓄積量の増加は、石灰化のための十分条件ではない。10日目からIL-4を投与した場合の30日目のhydroxyproline量は、10日目までIL-4を投与した場合の約1.2倍であったが、Ca、P量は著しく少なく、IL-4を投与しない場合と有意差がなかった。以上より、rhIL-4によるSaM-1細胞の細胞外基質の石灰化には、処理開始後10日目までのIL-4の作用が必要かつ十分であることが明らかとなった。IL-4の処理開始後10日目までに、SaM-1細胞の発現形質に重要な変化があったと考えられる。10日目までにIL-4がSaM-1細胞に対して及ぼした作用として、第一に、IL-4が何らかの細胞外基質の産生あるいは蓄積を促進する

こと、第二は、基質中に蓄積するような何らかの生理活性物質の産生をIL-4が誘導すること、第三に、IL-4により細胞が非可逆的な変化を遂げたこと、が考えられる。処理開始後10日目までのIL-4のSaM-1細胞に対する作用のうち、この3点のいずれかに関わるものが、石灰化に重要であると考えられた。IL-4は、他のサイトカインと同様に何らかの遺伝子発現を調節することにより細胞に作用し、その作用は短時間で発現されると考えられる。また、細胞へIL-4を継続的に投与した場合、処理開始後初期のIL-4の作用が何らかの細胞分化あるいは細胞外基質の蓄積を引き起こし、その後のIL-4の作用がさらに細胞に変化をもたらすことが繰り返されたと考えられる。したがって、IL-4の作用発現は培養日数で変化していく可能性があるため、複数の時点で作用を検討すべきであると考えられた。以上より、IL-4処理開始後1日目と5日目で、IL-4により発現が促進されるmRNAをDifferential display法を用いて調べた。

Differential display法の利点は、細胞より得たtotal RNAからcDNAを作製し、 $[^{32}\text{P}]$ -dCTP存在下でPCR法により増幅したDNA断片をDNA sequencing gel上で泳動してオートラジオグラフィーを行うことにより、発現量に変化のあるmRNAの候補が簡単に選択できること、また選択された候補の塩基配列を読みとれることである。一方、この方法の欠点は、すべてのmRNA量の変化を拾うことは手法の原理上不可能であること、PCRによる増幅量の差で候補を選択するので、必ずしも実際のmRNAレベルの変化と一致しないこと、またsequencing gelより選択されたPCR産物を切り出す際に、目標とするバンドの近傍にある無関係のPCR産物が混入する恐れがあることである。しかし、本実験では、IL-4によるSaM-1細胞の遺伝子発現の変化をすべて網羅することが目的ではなく、10日目以降のコラーゲン産生の増大や石灰化に関係のある遺伝子の発見が目的であることから、本法を用いて検索を行なった。その結果、rhIL-4処理により1日目からVI型コラーゲンの $\alpha 1$ 鎖のmRNAレベルが増加することが明らかとなった。また、VI型コラーゲンは、 $\alpha 1$ 鎖、 $\alpha 2$ 鎖、 $\alpha 3$ 鎖の三つのサブユニットで構成されているが、これらのサブユニットの10日目までのmRNAレベルの経時変化を調べたところ、IL-4により、 $\alpha 1$ 鎖、 $\alpha 2$ 鎖のmRNAレベルが5日目をピークにして促進された。しかし、 $\alpha 3$ 鎖のmRNAレベルはIL-4の影響を受けず、10日目にはほとんど発現が見られなくなった。したがって、SaM-1細胞のVI型コラーゲン蛋白は、10日目以降はほとんど産生されず、10日目までの産生量は、 $\alpha 3$ 鎖

の合成量が過剰であれば、IL-4により増加すると考えられる。実際にVI型コラーゲン蛋白の蓄積は、5日目および10日目でIL-4により促進された。

VI型コラーゲンは、3本鎖からなる微細線維コラーゲンで、N末端とC末端側に大きな非コラーゲン性球状ドメインを持ち、中央にコラーゲン様ドメインがある。約100nmのダブル型の形状をしており、生体内ではダイマーまたはテトラマーを単位として網目状に広がる高分子を形成している (Timpl 1987)。非コラーゲン性部分には、von Willebrand因子のコラーゲン結合性Aドメイン類似の構造があり、さらに唾液腺蛋白質、fibronectin III型ドメイン、Kunitz型serine protease inhibitorに似た構造が存在する多機能蛋白質であると予想される (Chu 1988, Chu 1990, Bonaldo 1989a, Bonaldo 1989b)。他の細胞外基質と結合しやすく、ヒアルロン酸 (McDevitt 1991)、デコリンやバイグリカンなどのプロテオグリカン (Bidanset 1992)、I型コラーゲン (Bonaldo 1990) などと結合する。VI型コラーゲンのコラーゲン様ドメインには、11個のRGD配列が存在し、インテグリンを介した細胞接着能が高いことや細胞との相互作用が活発であることが推測される (Van Der Rest 1991)。実際、VI型コラーゲンは平滑筋細胞や線維芽細胞ではRGD依存性に接着する (Kielty 1992, Pfaff 1993)。

以上のようなVI型コラーゲン分子の構造、性質から、IL-4によりSaM-1細胞層に早期に蓄積したVI型コラーゲンが、その後の基質蛋白の蓄積や、細胞接着による細胞への作用を介して細胞分化を進めることにより、コラーゲン合成の増加や石灰化誘導に関与している可能性がある。VI型コラーゲンは成熟骨にはほとんど含まれないが、胎児骨には多量に含まれ (Keene 1991)、また骨折部の肉芽または仮骨におけるVI型プロコラーゲン $\alpha 2$ 鎖のmRNAレベルは、成熟した骨基質内に比較して著明に増加している (Hiltunen 1995)ことから、VI型コラーゲンは、骨折部の仮骨形成に何らかの役割を果たしていると考えられる。

本研究において、IL-4の骨芽細胞に対する基質形成促進作用と石灰化誘導作用とについて検討した。基質形成については、石灰化の直接の基質であるコラーゲンの産生及び蓄積をIL-4が高めることが示された。石灰化誘導については、IL-4が石灰化の開始を直接刺激するのではなく、より早い時期に細胞に与える影響が間接的に作用して石灰化を誘導することが明らかとなった。特に、IL-4の早期の作用が、他の基質との親和性が

高く細胞接着能も高いVI型コラーゲンの蓄積を増加し、石灰化しやすい細胞外基質の形成、特にI型コラーゲンの産生、あるいは石灰化に向けた骨芽細胞分化を促進する可能性が考えられた。

5. 結語

1. IL-4は、ヒト骨膜由来骨芽細胞様細胞SaM-1のコラーゲンの合成を、mRNA、翻訳、翻訳後修飾のいずれのレベルにおいても増強して、コラーゲンの蓄積を促進する。
2. コンフルエントに達したSaM-1細胞をIL-4を含む培地で培養すると20日目で石灰化が誘導される。この細胞外基質の石灰化誘導には、培養開始後10日目までのIL-4の作用が必要かつ十分である。
3. IL-4は、培養開始後5日目をピークに、SaM-1細胞のVI型コラーゲン α 1鎖および α 2鎖のmRNA発現を促進し、VI型コラーゲン蛋白の基質への蓄積を増加する。

6. 図表

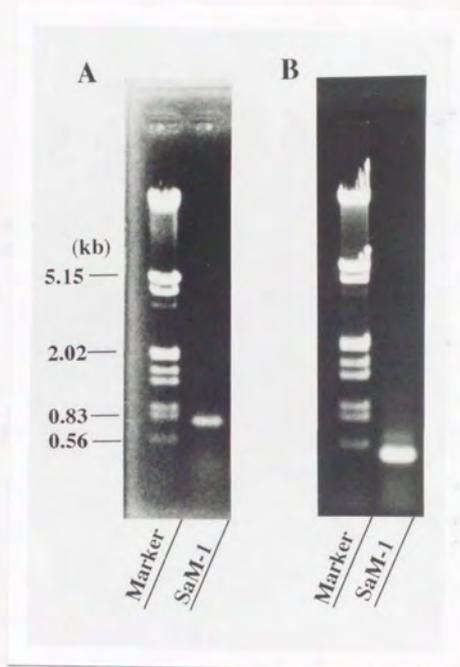


図 1 : SaM-1細胞のIL-4R mRNAの発現

SaM-1のcDNAを、IL-4Rの3'非コード領域のcDNAに対応するA、Bの2種類のprimer setを用いてPCRで増幅後、agarose gel上で泳動した。予想される増幅産物の大きさは、それぞれ770 bp、498 bpである。

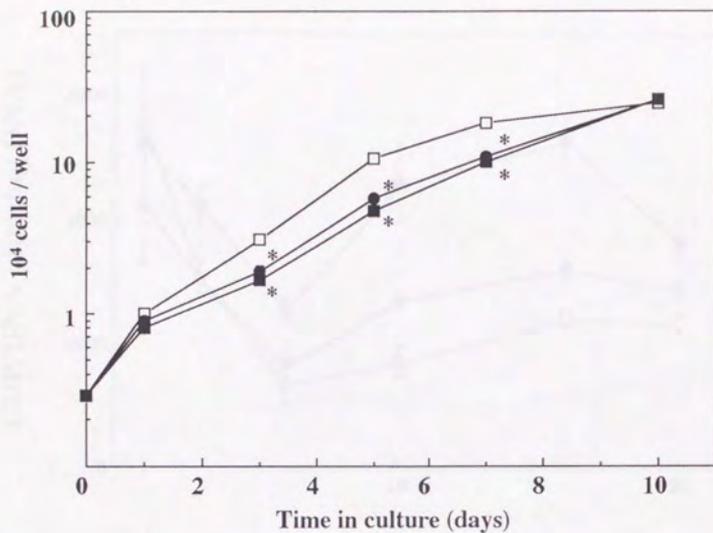


図2：IL-4のSaM-1細胞の増殖に与える影響

3000個/well (4 cm²)のSaM-1細胞を播種し、24時間後より0 (□)、0.3 (●)または3.0 (■) ng/mlのrhIL-4を含む培地で培養し、1, 3, 5, 7, 10日目の細胞数を計測した。平均±標準誤差 (n=4)で表している (*: p<0.05)。

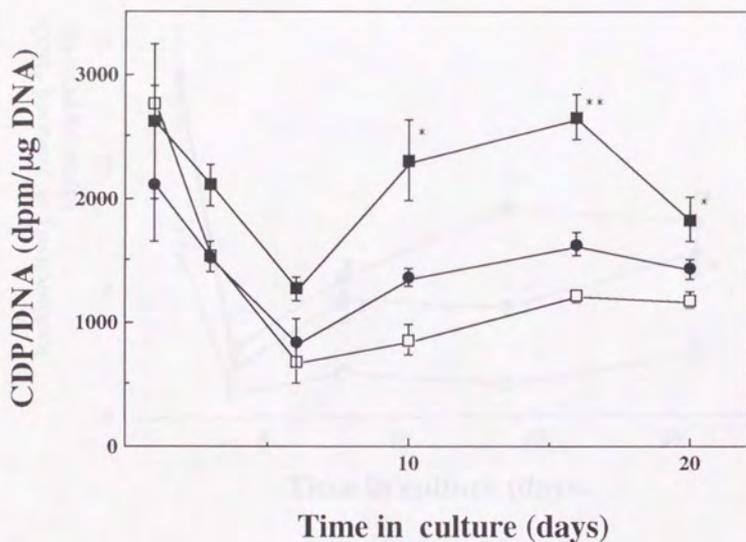


図3：SaM-1細胞のコラーゲン合成活性に及ぼすrhIL-4の影響

SaM-1細胞を0 (□)、0.3 (●)または3.0 (■) ng/mlのrhIL-4を含む培地で1から20日間培養した後、細胞を10 μ Ci/mlの 3 H-prolineとともに3時間培養し、培地と細胞層のCDPの放射活性を液体シンチレーションカウンターで計数した。それぞれ μ g DNAあたりの平均 \pm 標準誤差 (n=4)で表わしている (*: p<0.05, **: p<0.01)。

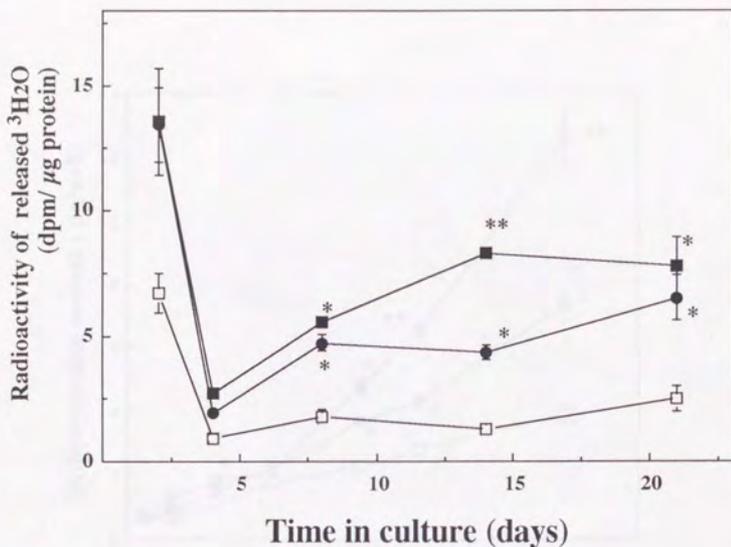


図4 : SaM-1細胞のprolylhydroxylase活性に及ぼすrhIL-4の影響

0 (□)、0.3 (●)および3.0 (■) ng/mlのrhIL-4を含む培地で、1から21日間培養した細胞から酵素分画を抽出し、3,4- ^3H -prolineを含んだ非水酸化コラーゲンを基質として、prolylhydroxylase活性を測定した。酵素活性は、基質より遊離した $^3\text{H}_2\text{O}$ により表わされる。 μg 蛋白あたりの酵素活性を、平均 \pm 標準誤差 (n=4)で表わしている (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$)。

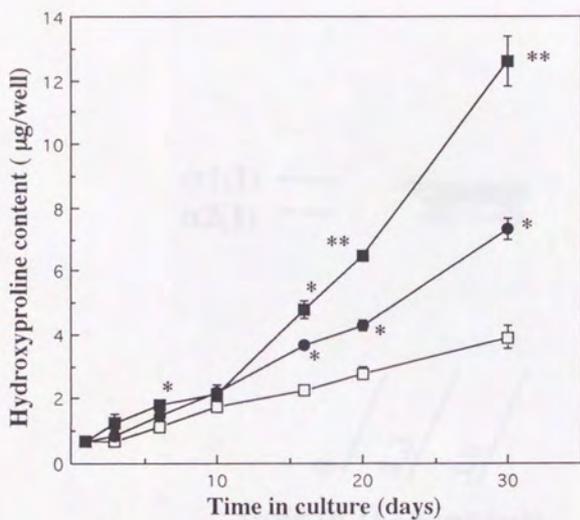


図5 : SaM-1の細胞層のhydroxyproline量に対するIL-4の作用

SaM-1細胞を0 (□)、0.3 (●)または3.0 (■) ng/mlのrhIL-4を含む培地で1から30日間培養した後、well (4cm²)あたりのhydroxyproline含量を測定した。平均±標準誤差 (n=3)で表している (*: p<0.05、 **:p<0.01)。

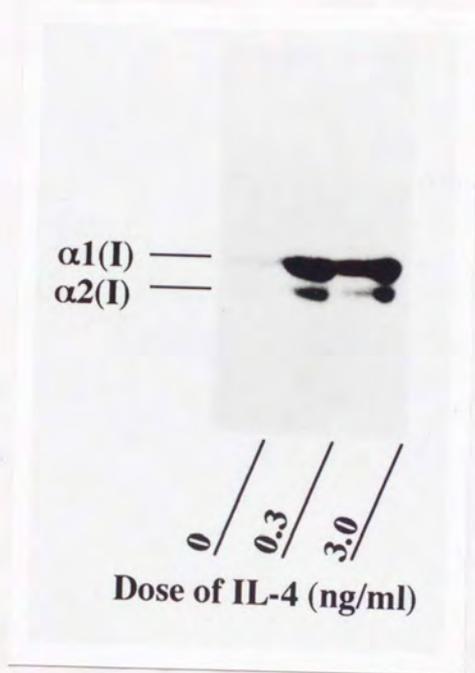


図 6 : 新規に合成された I 型コラーゲンの SDS-PAGE fluorography

SaM-1細胞を0、0.3および3.0 ng/mlのrhIL-4で10日間培養した後、同じ濃度のrhIL-4と200 μ Ci/dishの 3 H-prolineを含んだ培地で3時間培養した。細胞層をペプシン消化後、塩析して得たコラーゲン画分に対して SDS-PAGE fluorographyを行なった。

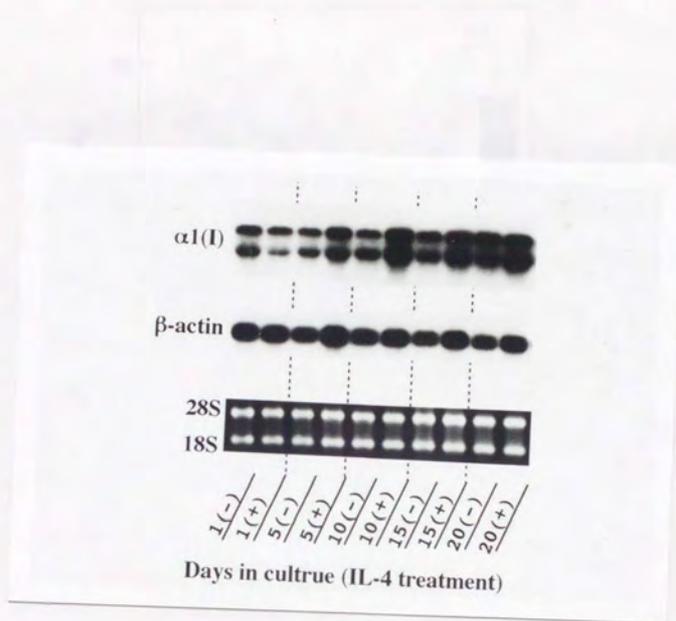


図7：pro- $\alpha 1$ (I) mRNAのノザンプロット分析

SaM-1細胞を0および3.0 ng/mlのrhIL-4で1から20日間培養した後、pro- $\alpha 1$ (I)および β -actinのcDNAをプローブとしてノザンプロットを行った。

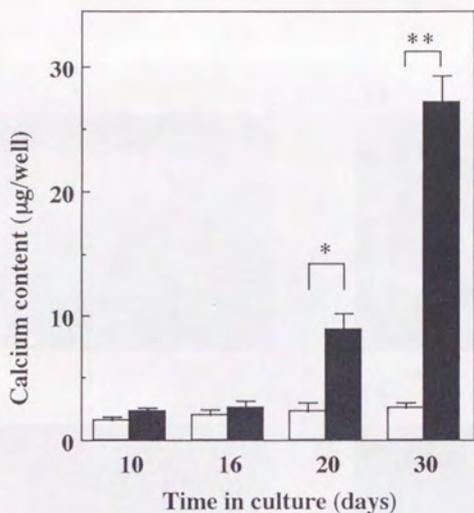


図 8 : IL-4 による SaM-1 細胞層の Calcium 沈着の促進

0 (□) または 3.0 (■) ng/ml の rhIL-4 を含む培地で SaM-1 細胞を 10、16、20、および 30 日間培養し、細胞層の Calcium 沈着量を測定した。平均 ± 標準誤差 (n=4) で表している (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$)。

A**B****C****D**

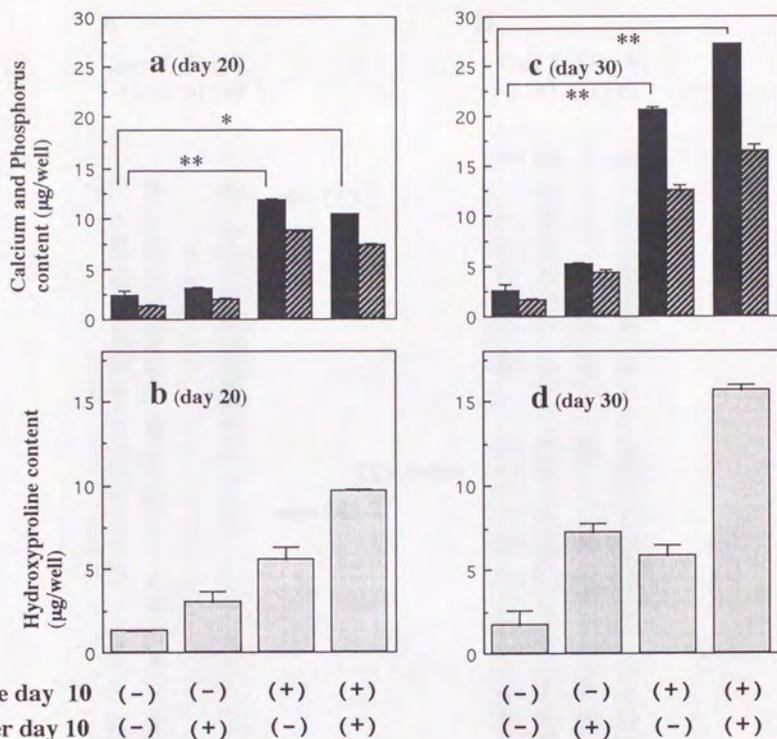
図 9 : IL-4を継続的に作用させた場合の培養30日目のSaM-1細胞の位相差顕微鏡像とvon Kossa染色像

3.0 ng/mlのrhIL-4を含む培地で、SaM-1細胞を30日間培養した(B、D)。A、Cは無添加の培地で同じ日数培養した細胞層である。A、Bが位相差顕微鏡像(x100)、C、Dがvon Kossa染色像(x40)である。

	Treatment with 3.0 ng/ml rhIL-4		day of harvest
	from day 0 to day 10	from day 10 to day 20	
20-/-	(-)	(-)	day 20
20-/+	(-)	(+)	day 20
20+/-	(+)	(-)	day 20
20+/+	(+)	(+)	day 20
	Treatment with 3.0 ng/ml rhIL-4		day of harvest
	from day 0 to day 10	from day 10 to day 30	
30-/-	(-)	(-)	day 30
30-/+	(-)	(+)	day 30
30+/-	(+)	(-)	day 30
30+/+	(+)	(+)	day 30

表 1 : IL-4の投与時期によるSaM-1細胞への影響の変化

上表の通り、培養開始後10日目で培地中への3.0 ng/mlのrhIL-4の添加の有無(+、-)を変更し、培養開始後20または30日目の細胞層のcalcium、phosphorus、hydroxyproline量を測定した。



Treatment with 3.0 ng/ml of rhIL-4

図10：一部の期間にIL-4を作用させた場合の培養20および30日目のcalcium、phosphorus、hydroxyproline蓄積量

培養10日目で、rhIL-4 (3.0 ng/ml)の添加の有無(+、-)を変更し、20または30日間培養した後、細胞層のcalcium (■)、phosphorus (▨)、hydroxyproline (□)量を測定した。平均±標準誤差で表している。(*: p<0.05、** : p<0.01、ただしcalcium量についての有意差)。

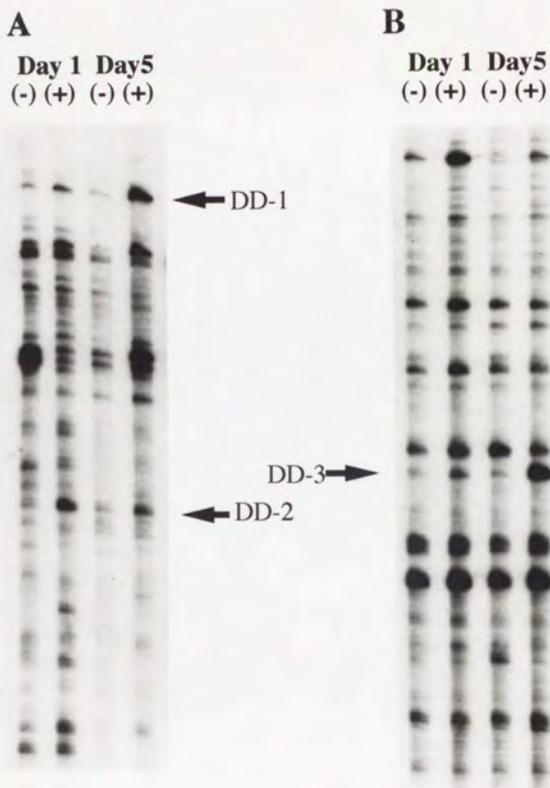


図11：Differential display法によるrhIL-4で発現誘導されるmRNAの検出

3.0 ng/mlのrhIL-4の存在下(+)または非存在下(-)で1または5日間培養した細胞から全RNAを抽出し、cDNAを作製後、方法で示した種々の組み合わせのsense primerとantisense primerで $[\alpha^{32}\text{P}]$ -dCTP存在下にPCRを行ない、反応液をDNAシーケンスゲル上で泳動し、オートラジオグラフィーを行なった。2回の実験で再現性のあったDD-1からDD-11の一次候補を選択した。そのうち、DD-1, 2, 3のバンドを示す。A：AP-1とT(12)MTプライマー、B：AP-1とT(12)MGプライマーの組み合わせである。



図12：Differential display法：一次候補PCR産物の再増幅

一次候補のPCR産物をそれぞれに対して最初に用いたprimer setで再増幅し、泳動した。各候補のprimer setは以下の通りである。DD-1,2: AP-1/T(12)MT、DD-3,4: AP-1/T(12)MG、DD-5: AP-2/T(12)MC、DD-6: AP-3 /T(12)MT、DD-7: AP-4/T(12)MA、DD-8:AP-4/T(12)MT、DD-9,10: AP-4/T(12)MA、DD-11:AP-4/T(12)MG。

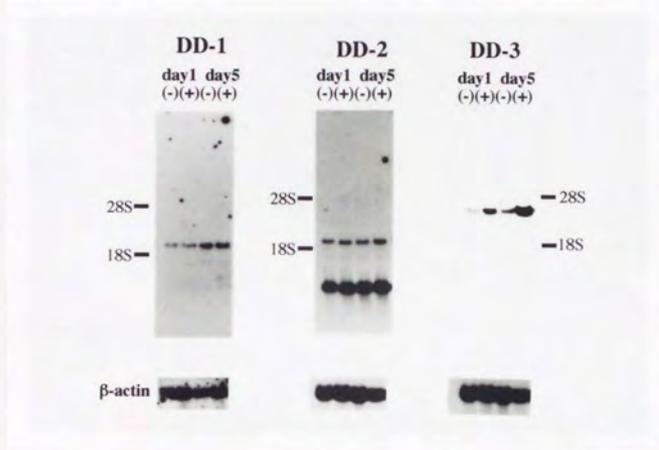


図13：Differential display法-ノザンプロットによる mRNA発現誘導の確認

3.0 ng/mlのrhIL-4の存在下(+)または非存在下(-)で1または5日間培養した細胞から抽出した10 μgの全RNAを泳動し、ノザンプロットを行なった。一次候補のPCR産物をプローブにしてhybridizationを行なった。バンドの現れたDD-1, 2, 3の結果を示す。

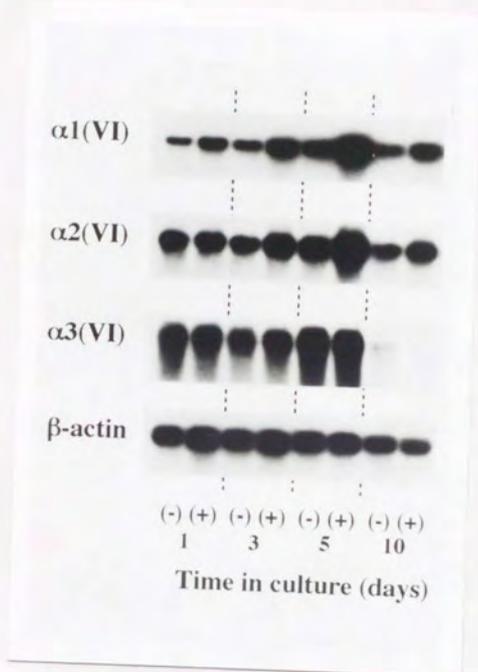


図 15 : VI型コラーゲンの $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$ 鎖のmRNAレベルの経時的変化

3.0 ng/mlのrhIL-4の存在下(+)または非存在下(-)で1から10日間培養したSaM-1細胞からtotal RNAを抽出し、VI型コラーゲンの $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$ 鎖のcDNAに対し、ノザンプロットを行った。

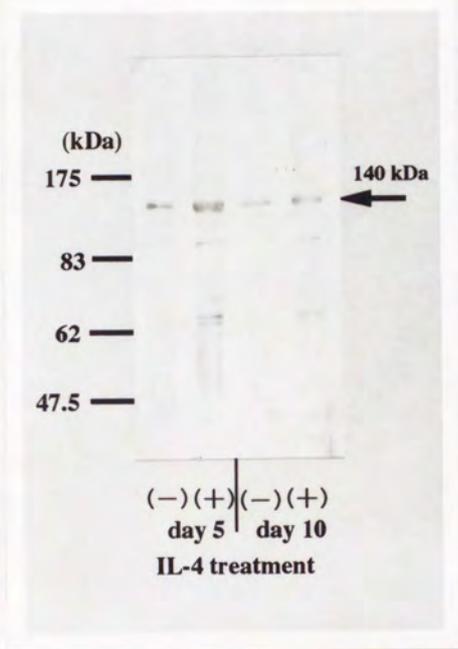


図16 : IL-4によるタイプVIコラーゲン蓄積量の変化

3.0 ng/mlのrhIL-4の存在下 (+)または非存在下 (-)で5日間あるいは10日間培養した細胞層を10% SDS/ 6M ureaで可溶化し、タイプVIコラーゲン量をウエスタンブロット法を用い、継時的に調べた。現われたバンドは、 $\alpha 1$ または $\alpha 2$ 鎖の大きさに一致する140 kDaである。

7. 謝辞

本論文の作成にあたり、終始御指導、御鞭撻を賜りました東京大学医学部整形外科学教室・黒川高秀教授に深甚なる謝意を表します。

また、本研究を遂行するにあたり、終始有益かつ具体的な御助言、御指導を賜りました東京都老人総合研究所生体情報部門・腰原康子主任研究員に心から感謝いたします。

最後に、本研究実施期間中に終始御理解、御激励、御協力を賜りました東京都老人医療センター・五十嵐三都男副院長、軽部俊二整形外科部長ならびに東京大学医学部整形外科学教室・織田弘美講師に御礼を申し上げます。

8. 参考文献

- Andrew, J.G., Hoyland, J., Andrew, S.M., Freemont, A.J., and Marsh, D.R.: Demonstration of TGF-beta 1 mRNA by in situ hybridization in normal human fracture healing. *Calcif. Tissue Int.* 52: 74-78, 1993.
- Andrew, J.G., Andrew, S.M., Freemont, A.J., and Marsh, D.R.: Inflammatory cells in normal human fracture healing. *Acta. Orthop. Scand.* 65: 462-466, 1994.
- Banchereau, J.: *Hematopoietic Growth Factors in Clinical Applications.* Marcel Dekker, INC. New York, pp. 433-469, 1990.
- Bidanset, D.J., Guidry, C., Rosenberg, L.C., Choi, H.U., Timpl, R., and Hook, M.: Binding of the proteoglycan decorin to collagen type VI. *J. Biol. Chem.* 267: 5250-5256, 1992.
- Bonaldo, P., Russo, V., Bucciotti, F., Bressan, G.M., and Colombatti, A.: $\alpha 1$ chain of chick type VI collagen. The complete cDNA sequence reveals a hybrid molecule made of one short collagen and three von Willebrand factor type A-like domains. *J. Biol.Chem.* 264: 5575-5580, 1989a.
- Bonaldo, P. and Colombatti, A.: The carboxyl terminus of the chicken $\alpha 3$ chain of collagen VI is a unique mosaic structure with glycoprotein Ib-like, fibronectin type III, and kunitz modules. *J. Biol.Chem.* 264: 20235-20239, 1989b.
- Bonaldo, P., Russo, V., Bucciotti, F., Doliana, R., and Colombatti, A.: Structural and functional features of $\alpha 3$ chain indicate a bridging role for chick collagen VI in connective tissues. *Biochemistry* 29: 1245-1254, 1990.
- Bradford, M.M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254, 1976.
- Burton, K.: A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. *Biochem. J.* 62: 315-323, 1956.

- Chen, P. S., Tribara, T. Y., and Warner, H.: Microdetermination of phosphorus. *Anal. Chem.* 28:1756-1758, 1956.
- Chomczynski, P. and Sacchi, N.: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162: 156-159, 1987.
- Chu, M.L., Conway, D., Pan, C.T.C., Baldwin, C., Fleischmajer, R., and Timpl, R.: Immunochemistry, genuine size and tissue localization of collagen VI. *J. Biol.Chem.* 263: 18601-18606, 1988.
- Chu, M.L., Pan, T.C, Conway, D., Kuo, H.J., Glanville, R.W., Timpl, R., Mann, K., and Deutzmann, R.: Sequence analysis of Alpha 1(VI) and Alpha 2(VI) chains of human type VI collagen reveals internal triplication of globular domains similar to the A domains of von Willebrand factor and two Alpha 2(VI) chain variants that differ in the carboxy terminus. *EMBO J.* 8:1939-1946, 1989.
- Chu, M.L., Myers, J.C., Ding, J.F. and Ramirez, F.: Cloning and characterization of five overlapping cDNAs specific for the human pro $\alpha 1(I)$ collagen chain. *Nucleic Acid Res.* 10: 5925-5934, 1982.
- Chu, M.L., Zhang, R.Z., Pan, T.C., Stokes, D., Conway D., Kuo H.J., Glanville R., Mayer U., Mann K., Deutzmann R., and Timpl R.: Mosaic structure of globular domains in the human type VI collagen alpha 3 chain: similarity to von Willebrand factor, fibronectin, actin, salivary proteins and aprotinin type protease inhibitors. *EMBO J.* 9: 385-393, 1990.
- Gitelman, H. J.: An improved automated procedure for the determination of calcium in biological specimens. *Anal. Biochem.* 18: 520-531, 1967.
- Heckmann, M., Aumailley, M., Chu, M.L., Timpl, R., and Krieg, T.: Effect of transforming growth factor-beta on collagen type VI expression in human dermal fibroblasts. *FEBS Lett.* 310: 79-82, 1992.
- Henricson, A., Hulth, A., and Johnell, O.: The occurrence of accessory immunologic cells in bone induction. *Clin. Orthop.* 264: 270-277, 1991.

- Hiltunen, A., Metsaranta, M., Perala, M., Saamanen, A.M., Aro, H.T., and Vuorio, E.: Expression of type VI, IX and XI collagen genes and alternative splicing of type II collagen transcripts in fracture callus tissue in mice. *FEBS Lett.* 364: 171-174, 1995.
- Howard, M., Farrar, J., Hilfiker, M., Johnson, B., Takatsu, K., Hamaoka, T. and Paul, W.E.: Identification of a T-cell derived B cell growth factor distinct from interleukin-2. *J. Exp. Med.* 155: 914-923, 1982.
- Hulth, A., Johnell, O., Klareskog, L., and Henricson, A.: Appearance of T-cells and Ia-expressing cells in fracture healing in rats. *Int. J. Immunother.* 1:103-106, 1985.
- Idzerda, R.L., March, C.J., Mosley, B., Lyman, S.D., Bos, T.V., Gimpel, S.D., Din, W.S., Grabstein, K.H., Widmer, M.B., Park, L.S., Cosman, D. and Beckmann, M.P.: Human interleukin 4 receptor confers biological responsiveness and defines a novel receptor superfamily. *J. Exp. Med.* 171: 861-873, 1990.
- Inoue, H., Nojima, H., and Okayama, H.: High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96:23-28, 1990.
- Isakson, P.C., Pure, E., Vitetta, E.S. and Krammer, P.H.: T cell-derived B cell differentiation factor(s). Effect on the isotype switch of murine B cells. *J. Exp. Med.* 155: 734-748, 1982.
- Keene, D.R., Sakai, L.Y., and Burgeson, R.E.: Human bone contains type III collagen, type VI collagen, and fibrillin: type III collagen is present on specific fibers that may mediate attachment of tendons, ligaments, and periosteum to calcified bone cortex. *J. Histochem. Cytochem.* 39: 59-69, 1991.
- Kiely, C.M., Whittaker, S.P., Grant, M.E. and Shuttleworth, C.A.: Attachment of human vascular smooth muscles cells to intact microfibrillar assemblies of collagen VI and fibrillin. *J. Cell Sci.* 103: 445-451, 1992.
- Kivirikko, K.I., Latinen, O., and Prockop, D.J.: Modifications of a specific assay for hydroxyproline in urine. *Anal. Biochem.* 19: 249-255, 1967.

- Koshihara, Y., Kawamura, M., Endo, S., Tsutsumi, C., Kodama H., Oda, H. and Higaki, S.: Establishment of human osteoblastic cells derived from periosteum in culture. *In Vitro Cell. Develop. Biol.* 25: 37-43, 1989.
- Koshihara, Y., Hirano, M., Kawamura, M., Oda, H., and Higaki, S.: Mineralization ability of cultured human osteoblast-like periosteal cells does not decline with aging. *J. Gerontol.* 46: B201-B206, 1991.
- Koshihara, Y. and Honda, Y.: Cloned human periosteal cells migrating from an explant *in vitro* have an osteoblastic phenotype. *Connect. Tissue* 26: 117-125, 1994.
- Liang, P. and Pardee, A.B.: Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* 257: 967-971, 1992.
- Lowenthal, J.W., Castle, B.E., Christiansen, J., Schreurs, J., Rennick, D., Arai, N., Hoy, P., Takabe, Y. and Howard, M.: Expression of high affinity receptors for murine interleukin 4 (BSF-1) on hemopoietic and nonhemopoietic cells. *J. Immunol.* 140: 456-464, 1988.
- McDevitt, C.A., Marcelino, J. and Tucker, L.: Interaction of intact type VI collagen with hyaluronan. *FEBS letter* 294: 167-170, 1991.
- Nakajima-Iijima, S., Hamada, H., Reddy, P. and Kakunaga, T.: Molecular structure of the human cytoplasmic β -actin gene: interspecies homology of sequences in the introns. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 6133-6137, 1985.
- Nemeth, G.G., Bolander, M.E., and Martin, G.R.: Growth factors and their role in wound and fracture healing. *Prog. Clin. Biol. Res.* 266:1-17, 1988.
- Oono ,T., Specks, U., Eckes, B., Majewski, S., Hunzelmann, N., Timpl, R., and Krieg, T.: Expression of type VI collagen mRNA during wound healing. *J. Invest. Dermatol.* 100: 329-334, 1993.
- Owen, T.A., Aronow, M., Shalhoub, V., Barone, L.M., Willing, L., Tassinari, M.S., Kennedy, M.B., Pockwinse, S., Lian, J.B., and Stein, G.S.: Progressive development of the rat osteoblast phenotype *in vitro*: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and

- differentiation during formation of the bone extracellular matrix. *J Cell Physiol* 143: 420-430, 1990.
- Peterkofsky, B. and DiBlasio, R.: Modification of the tritium-release assays for prolyl and lysyl hydroxylases using Dowex-50 columns. *Anal. Biochem.* 66: 279-286, 1975.
- Peterkofsky, B. and Diegelmann, F.: Use of a mixture of proteinase-free collagens for the specific assay of radioactive collagen in the presence of other protein. *Biochemistry* 10: 988-994, 1971.
- Pfaff, M., Aumailley, M., Specks, U., Knolle, J., Zerwes, H.G., and Timpl, R.: Integrin and Arg-Gly-Asp dependence of cell adhesion to the native and unfolded triple helix of collagen type VI.: *Exp. Cell Res.* 206: 167-176, 1993.
- Shioi, A., Teitelbaum, S.L., Ross, F.P., Welgus, H.G., Suzuki, H., Ohara, J. and Lacey, D.L.: Interleukin-4 inhibits murine osteoclast formation in vitro. *J. Cell. Biochem.* 47: 272-277, 1991.
- Simmons, D.J.: Fracture healing, in *Fundamental and clinical bone physiology* ed. by Urist, M.R., Lippincott, Philadelphia, 1980, pp.283-330.
- Sykes, B., Puddle, B., Francis, M. and Smith, R.: The estimation of two collagens from human dermis by interrupted gel electrophoresis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 72: 1472-1480, 1976.
- Timpl, R. and Engel, J.: Type VI collagen in *Structure and function of collagen types*. Academic Press, pp.105-143, 1987.
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J.: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76: 4350-4354, 1979.
- Ueno, K., Katayama, T., Miyamoto, T. and Koshihara, Y.: Interleukin-4 enhances in vitro mineralization in human osteoblast-like cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 189: 1521-1526, 1992.
- Van Der Rest, M. and Garrone, R.: Collagen family of proteins. *FASEB J.* 5: 2814-

2823, 1991.

Watanabe, K., Tanaka, Y., Morimoto, I., Yahata, K., Zeki, K., Fujihira, T., Yamashita, U., and Eto, S.: Interleukin-4 as a potent inhibitor of bone resorption. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 172: 1035-1041, 1990.

