

## 亜鉛イオンが骨芽細胞株 (Saos-2) の生細胞および サイトカイン産生に及ぼす影響 (第2報)

横瀬 勝美 中野 善夫 桑田 文幸

### Effects of zinc ion on cell viability, IL-1 $\alpha$ and IL-6 production by the human osteosarcoma cell line, Saos-2

Katsumi Yokose, Yoshio Nakano and Fumiyuki Kuwata

#### Abstract

The effects of zinc ions on cell viability and production of interleukin 1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ) and interleukin 6 (IL-6) using the human osteosarcoma cell line, Saos-2, were investigated in the present study. Cells were cultured in DMEM supplemented with 10% FBS and antibiotics for 24h before the addition of 0.1mM of (CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>Zn<sub>2</sub>. Cell viability was assessed by a colorimetric assay using a LDH cytotoxic test following incubation for 1, 3, 5 or 7 day. The production of IL-1 $\alpha$  and IL-6 in Saos-2 cells was examined using ELISA. The addition of 0.1 mM zinc ions did not alter cell viability during 48h. Moreover, the addition of zinc ions had little effect on production of IL-6 in these cells.

**Key words**: cell viability, IL-1 $\alpha$  production, IL-6 production, osteosarcoma cell, zinc ion

#### 緒 言

亜鉛はすべての生物の生命維持に必須であることが明らかである<sup>1)</sup>。それは亜鉛が数多くの金属酵素 (metallo-enzyme) の構成成分であることや、生体において細胞分裂やタンパク質合成に密に関係しており、DNA, RNA の生合成に際しては、DNA polymerase, RNA polymerase および thymidine kinase の構成成分としてその酵素活性に重要な役割を果たしているということである。さらに個々の細胞に対しては酵素を介し、細胞膜構造に直接働きかけて細胞の機能を左右している<sup>2,3)</sup>。このように亜鉛は生体において微量必須元素である。そして、亜鉛

の欠乏やその濃度によっては生体および局所的な部分において代謝の変化をもたらすものと考えられている<sup>4)</sup>。

著者らは、先に金属イオンが口腔軟組織、とくに上皮組織におよぼす影響を解明する第一ステップとして、歯科補綴物の成分であるチタンおよびニッケル、歯科修復物の合金中に存在する亜鉛について、ヒト口腔由来上皮細胞株 (Ca 9-22) のコンフルエント後の生細胞数および DNA 合成能におよぼす影響について報告した<sup>5)</sup>。本研究では、口腔内口臭予防薬中に含まれている酢酸亜鉛を使用し、ヒト骨肉腫由来の株化骨芽細胞 (Saos-2) を使用し、亜鉛を長時間添加し、生細胞数への経時変化に及ぼす影響に

日本大学歯学部化学教室  
日本大学歯学部総合歯学研究機能形態部門  
〒101-8310 東京都千代田区神田駿河台 1-8-13  
(受理: 2011年9月30日)

Department of Chemistry, Nihon University School of Dentistry  
Division of Functional Morphology, Dental Research Center, Nihon University School of Dentistry  
1-8-13 Kanda-Surugadai, Chiyoda-ku, Tokyo 101-8310, Japan

ついて検討を行った。さらに、インターロイキン-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ) および IL-6<sup>6)</sup> の 2 種類のサイトカイン産生に及ぼす亜鉛イオンの影響も併せて検討した。

## 材料および方法

### 1. 細胞培養

実験には骨芽細胞として理化学研究所細胞開発銀行から購入した Saos-2 細胞を使用した<sup>7,8)</sup>。Saos-2 細胞は、Dullbecco's modified Eagle medium (DMEM, 旭テクノグラス) に、10%ウシ胎児血清(FBS, 旭テクノグラス), 50 U/ml ペニシリンおよび 50  $\mu$ g/ml ストレプトマイシン (Sigma) を加えた培地を用い、37°C, 5%CO<sub>2</sub>の湿潤条件下で培養を行った。

### 2. 細胞障害率 (経時変化)

生細胞への亜鉛イオンによる経時変化の影響を調べるために、24 穴プレートに Saos-2 細胞  $1 \times 10^5$  個/cm<sup>2</sup> を播種し、500  $\mu$ l の DMEM (10%FBS および抗生物質を含有) で培養を開始した。Saos-2 細胞播種後、24 時間後に亜鉛イオン ((CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>Zn<sub>2</sub>) を含む無血清の DMEM (抗生物質を含有) に交換した。生細胞への亜鉛イオン経時変化の影響を調べるためにその作用時間をそれぞれ 1, 3, 5 および 7 日間と継続して培養を行った。なお、培地中の亜鉛イオン ((CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>Zn<sub>2</sub>) は終末濃度 0.1 mM になるように添加した。亜鉛イオンを作用させた後、無血清の DMEM と交換し 24 時間培養後、上清を回収する。回収した上清は 3000 rpm, 5 分遠心し、LDH-Cytotoxic Test (和光純薬) を用い細胞障害率を比色測定した。また、実験は 2 連で行い、結果は平均値で示した。金属イオン経時変化を比較するため、亜鉛イオン無添加の場合をコントロールとし、DMEM (10%FBS および抗生物質を含有) で 24 時間培養を行った。

### 3. IL-1 $\alpha$ および IL-6 産生

材料および方法の 2. と同様に、24 穴プレ-

ートに Saos-2 細胞を播種後、24 時間後、亜鉛イオン ((CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>Zn<sub>2</sub>) の濃度、0.1 mM を含む DMEM に交換し、その作用時間をそれぞれ 1, 3, 5 および 7 日間として培養を行った。なお、培地中の亜鉛イオン ((CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>Zn<sub>2</sub>) は終末濃度 0.1 mM になるように添加した。亜鉛イオンを作用させた後、無血清の DMEM と交換し 24 時間培養後、上清を回収する。培養上清を回収後、IL-1 $\alpha$  定量用 ELISA キット (BioSource) および IL-6 定量用 ELISA キット (BioSource) を用いて上清中のサイトカイン量を定量した。コントロールは材料および方法の 2. と同様である。

## 成績

### 1. 細胞障害率 (経時変化)

Saos-2 細胞に亜鉛イオン ((CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>Zn<sub>2</sub>) 0.1 mM 濃度を添加した影響を第 1 図 (経時変化 (細胞障害率)) に示した。

第 1 図では、亜鉛イオン ((CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>Zn<sub>2</sub>) 濃度 0.1 mM, 作用時間 1, 3, 5 および 7 日間として培養を行った。亜鉛イオン添加により細胞障害率は、コントロールでは 0.2%, 1 日では 0.2%, 3 日では 5.1%, 5 日では 17.0%, 7 日では 45.7% の細胞障害率であった。亜鉛イオン添加後ではコントロールからわずかに細胞障害

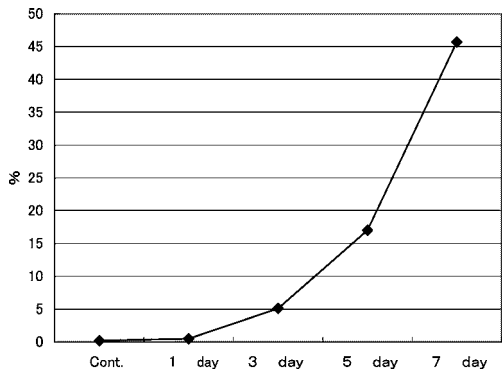


図 1 Saos-2 細胞の細胞障害率に及ぼす亜鉛イオンの影響

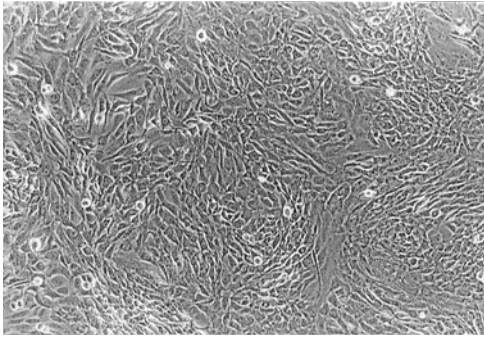


図2 Saos-2細胞48時間後のcontrol形態

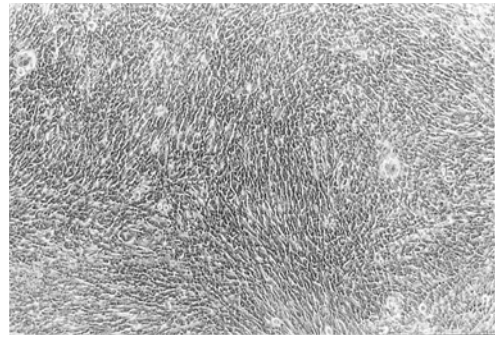


図5 亜鉛イオン0.1mM 5日作用させたときの細胞形態

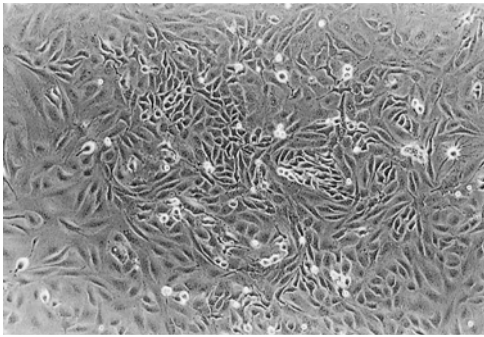


図3 亜鉛イオン0.1mM 1日作用させたときの細胞形態

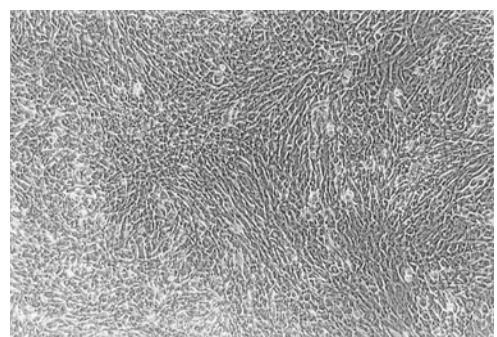


図6 亜鉛イオン0.1mM 7日作用させたときの細胞形態

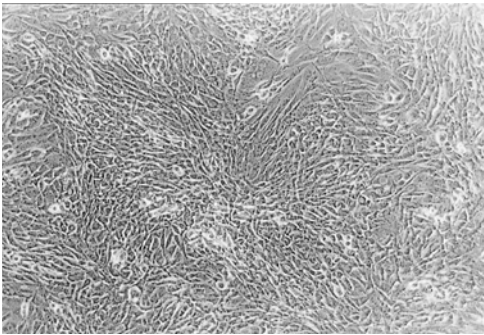


図4 亜鉛イオン0.1mM 3日作用させたときの細胞形態

率が増加した。各々の細胞状態をコントロールと亜鉛イオン作用時間(コントロール, 1日~7日)を比較し, 細胞状態を図2~6に示した。各週のコントロールと亜鉛イオン添加を比較す

ると亜鉛イオン添加していると細胞の増殖に大きな変化はなかった。

## 2. IL-1 $\alpha$ 産生

コンフルエントに達した後の Saos-2 細胞の IL-1 $\alpha$  産生におよぼす亜鉛イオン ( $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Zn}_2$ ) 0.1 mM 濃度の経時的变化の影響を調べた結果を第1表に示した。

Saos-2 細胞の IL-1 $\alpha$  産生におよぼす亜鉛イオン ( $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Zn}_2$ ) 濃度の経時的变化の影響を調べた結果, コントロールおよび1~7日においては測定検出限界以下のため測定不可であった。

## 3. IL-6 産生

Saos-2 細胞の IL-6 産生におよぼす亜鉛イオン ( $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Zn}_2$ ) 濃度の経時的变化の影

表1 Saos-2細胞のIL-1 $\alpha$ の産生に及ぼす亜鉛イオンの影響

IL-1 $\alpha$ 量 (pg/ml)		平均値		
作用時間				
1 day	Cont.	<0.80	<0.80	<0.80
	Zn	<0.80	<0.80	<0.80
3 day	Cont.	<0.80	<0.80	<0.80
	Zn	<0.80	<0.80	<0.80
5 day	Cont.	<0.80	<0.80	<0.80
	Zn	<0.80	<0.80	<0.80
7 day	Cont.	<0.80	<0.80	<0.80
	Zn	<0.80	<0.80	<0.80

表2 Saos-2細胞のIL-6産生に及ぼす亜鉛イオンの影響

IL-6 量 (pg/ml)			平均値
作用時間			
Cont.	1.15	1.12	1.14
1 day	1.23	1.35	1.29
3 day	1.73	1.78	1.76
5 day	2.35	2.03	2.19
7 day	2.75	2.55	2.65

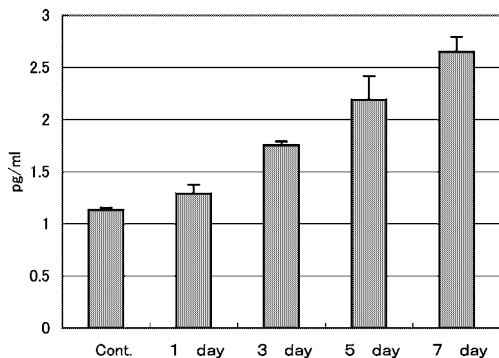


図7 Saos-2細胞のIL-6の産生に及ぼす亜鉛イオンの影響

響を調べた結果を第2表, 第7図に示した。

Saos-2細胞のIL-6産生におよぼす亜鉛イオン((CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>Zn<sub>2</sub>)濃度の経時的变化の影

響を調べた結果, IL-6産生量は亜鉛イオン((CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>Zn<sub>2</sub>)濃度0.1mM, 1日作用させ培養した場合で1.14pg/ml, 3日で1.29pg/ml, 5日で2.19pg/ml, 7日で2.65pg/mlとなった。IL-6産生量は時間と共に徐々に増加がみられた。

## 考 察

亜鉛は必須金属元素であり, 他の微量元素よりも高濃度で生体に広く分布し, 人体では, 肝臓, および筋肉に多く, 全血液中には900 $\mu$ g/dl含まれているといわれている<sup>9-11)</sup>。亜鉛が欠乏するとラットにおいて発育遅延, 脱毛症および皮膚粘膜の肥厚や角化などを呈することが報告され, 上皮の代謝にも重要な役割を担っていることが示唆される。また, 亜鉛は, いろいろな金属酵素の構成成分として, 亜鉛フィンガー, 亜鉛クラスターおよび亜鉛ツイストの3種類の結合様式を形成しDNAなどと結合していること<sup>12)</sup>, また, 亜鉛は癌の抑制効果からの研究がなされており<sup>13)</sup>, 紫外線が関与した活性酸素の生成による皮膚の細胞毒性, さらには発癌性を防御する効果があるという報告もある<sup>4)</sup>。このように生体において微量必須元素でありながら, その濃度によっては生体および局所的な部分において悪影響を与えると考えられる金属イオンに亜鉛イオンがあげられる。

著者らは一般的な細胞毒性試験による金属イオンの生細胞数に及ぼす影響に加えて, より感度の高いDNA合成に及ぼす影響も併せて検討した結果から, 金属イオンに対するわずかな反応性も捉える可能性を示唆することができたと考える<sup>5)</sup>。本研究ではより詳細な検討を加えるために, 口腔内口臭予防薬中に含まれている酢酸亜鉛を使用し金属イオンを作用させる時間を変化させて骨芽細胞株(Saos-2)に対する影響を検討した。

生細胞数に及ぼす影響を生細胞障害率の測定

には LDH 測定法を用いた。本測定 of LDH-Cytotoxic Test は細胞毒性を簡便に測定できるばかりでなく、細胞が細胞膜に障害を受けて細胞から遊離した LDH (乳酸脱水素酵素) 活性を測定することができ、生理活性物質による細胞障害や細胞性免疫による細胞障害、補体依存性細胞障害、抗体依存性細胞障害の他、細胞の生存率にも利用できることからこの方法を用いた。コントロールは血清培地で 48 時間培養を行い、上清を回収する前の 24 時間を無血清培地と交換し上清を回収し測定を行った。同時に血清培地中で細胞状態を観察した。

細胞障害率は第 1 図に示したように、亜鉛イオン添加後ではコントロールから徐々に細胞障害率は 7 日間まで徐々に増加した。亜鉛作用時間後の細胞状態をコントロール、1 日間～7 日間ごとの細胞状態 (図 2～6) を示した。亜鉛イオンを添加していると細胞の増殖がやや劣っているが、大きな変化はみられなかった。

サイトカイン産生に及ぼす影響をチタンイオンの経時的変化にあわせて検討した。インターロイキン-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ) は単核球が産生する歯骨細胞刺激因子の主成分であることが明らかにされて以来、IL-1 $\alpha$  の骨代謝・骨疾患との関連が検討されて、最も強力な骨吸収促進因子の 1 つである。IL-1 $\alpha$  はきわめて低濃度で、ヒト骨髄細胞より歯骨細胞を誘導する作用をもち、更に骨芽細胞を介して間接的に歯骨細胞の活性化を促進する。一方、IL-1 $\alpha$  はヒト骨芽細胞の DNA 合成促進作用を示し、コラーゲン合成に関しては少量で促進、大量で抑制作用を示すため、亜鉛イオンが Saos-2 細胞の IL-1 $\alpha$  の産生を促進するかどうか調べた。その結果、Saos-2 細胞の IL-1 $\alpha$  産生におよぼす亜鉛イオン ((CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>Zn<sub>2</sub>) 濃度の経時的変化の影響を調べた結果、IL-1 $\alpha$  産生量は表 1、に示したように、各週コントロールは測定検出限界以下のため測定不可であった。IL-6 産生量の測定は、

IL-6 は B 細胞刺激因子として純化されたサイトカインであるが、骨芽細胞<sup>14-16)</sup>でも産生され、IL-1 $\alpha$ 、TNF、PTH、などによりその産生が促進され間接的に破骨細胞の活性化をも促進するため、亜鉛イオンが Saos-2 細胞の IL-6 産生を促進するかどうかを調べた。その結果、Saos-2 細胞の亜鉛イオン添加による、IL-6 産生量は、表 2、第 11 図に示したように IL-6 産生量は時間と共に徐々に増加がみられた。

以上のことから亜鉛イオンによるヒト骨肉腫由来の株化骨芽細胞への影響は、7 日間亜鉛イオンを作用させた場合 IL-6 サイトカイン産生量をわずかに増加させた。炎症性サイトカインである IL-1 $\alpha$ 、IL-6 への影響を見るためには亜鉛イオンをさらに長時間作用させる必要があると考えられる。

## 謝 辞

本研究の一部は平成 21, 22 年度日本大学歯学部佐藤研究費によって行われたことを付記する。

## 文 献

- 1) Sommer AL Lipman CB (1926) Evidence on the indispensable nature of zinc and born for higher green plants. *Plant physiol*, 1, 231-249
- 2) Williams RJP (1989) An introduction to the biochemistry of zinc, Mills C F, *Zinc in human biology*, Springer-Verlag, London 15-31
- 3) 岡田正, 高木洋治 (1984) 亜鉛と臨床, 朝倉書店
- 4) Leccia MT, Richard MJ, Beani JC, Faure H, Monjo AM, Cadet J, Amblard J, Favier A (1993) Protective effect of selenium and zinc on UV-A damage in human skin fibroblasts. *Photochem Photobiol*, 58(4), 548-553
- 5) 横瀬勝美, 桑田文幸 (2001) 口腔由来細胞株 (Ca 9-22) の生細胞数および DNA 合成能に及

- ばす金属イオンの影響. 研究紀要 日本大学歯学部 (一般教養), 29, 37-44
- 6) Bridgewater LC, Manning FC, Woo ES, Patierno SR (1994) DNA polymerase arrest by adducted trivalent Chromium. *Mol Carcinog*, 9(3), 122-133
  - 7) Spyrou P, Papaioannou S, Hampson G, Brandy K, Palmer RM, McDonald F (2002) Cytokine release by osteoblast-like cell cultured on implant discs of varying alloy compositions. *Cline Oral Imp Res* 13, 623-630
  - 8) Fogh J, Wright WC, Loveless JD (1977) Absence of HeLa cell contamination in 169 cell line derived from human tumors. *J Nat Cancer Inst* 58, 209-214
  - 9) Dunsomore SE, Rubin JS, Kovacs SO, Dhedid M, Parks WC, Welgus HG (1996) Mechanisms of hepatocyte growth factor stimulation of keratinocyte metalloproteinase production. *J Biol Chem*, 271, 24576-24582
  - 10) Samachson J. and Schmitz A. (1968) The reactions of H<sup>+</sup> and Zn<sup>2+</sup> with the surfaces of bone and bone metabolism., *Biochem Biophys Acta*, 170, 409-419
  - 11) Schor RA (1974) Trace levels of manganese, copper, and zinc in rib cartilage to age in human and animals, both normal and dwarfed. *Clin Orthopaed Metabol* 17, 205-212
  - 12) Vallee BL, Colman JE (1991) Zinc fingers, zinc clusters, and zinc twists in DNA-binding protein domains. *Proc Natl Acad Sci USA* 88(3), 999-1003
  - 13) Koizumi T, Li ZG, Tatsumoto H (1992) DNA damaging activity of cadmium in Leydig cells, a target cell population for cadmium carcinogenesis in the rat testis. *Toxicol Lett* 63(2), 211-220
  - 14) Sauder DN, Kilian PL, McLane JA, Quick TW, Jakubovic H, Davis SC, Eaglestein WH, Mertz PM (1990) Interleukin-1 enhances epidermal wound healing. *Lymphokine Res* 9, 465-473
  - 15) Kupper TS (1990) The activated keratinocyte a model for inducible cytokine production by non-bone marrow-derived cells in cutaneous inflammatory and immune responses. *J Invest Dermatol* 94, 146s-150s
  - 16) Aida Y, Maeno M, Suzuki N, Nanba A, Motohara M, Matsumoto M, Makimura M, Matsumura H (2006) The effect of IL-1 $\beta$  on the expression of inflammatory cytokines and their receptors in human chondrocytes. *Life Sci* 79, 764-771