

# 学位論文内容の要旨

愛知学院大学

論文提出者

後藤 洋

論文題目

破骨細胞形成のための微小環境構成細胞の同定

## I. 緒言

矯正歯科材料の飛躍的な発展に伴い、歯科矯正治療の手法は日々進歩を遂げ続けている。また最近では、歯科矯正用アンカースクリューが薬事承認を受けたことにより、歯科矯正治療はさらに発展していくことが予想される。一方、歯科矯正治療に伴う歯の移動についての基礎的研究も行われている。歯の移動時には、歯槽骨における骨吸収と骨形成のカップリングが重要な役割を担うと報告されているが、これまでの骨髄細胞を用いた研究では多様な細胞や因子が存在する混合培養が多く、歯の移動に関するメカニズムの詳細はいまだ未解明な部分が多い。

骨恒常性は骨形成に関与する骨芽細胞と骨吸収を担う破骨細胞のバランスによって成立している。骨芽細胞は間葉系幹細胞由来であるのに対し、破骨細胞は骨髄球系の単球・マクロファージ系細胞由来である。骨芽細胞が分泌する Macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) や receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand (RANKL) といったサイトカインや、その他の破骨細胞分化誘導因子が骨髄における破骨細胞前駆細胞の分化を誘導する。

また骨髄では破骨細胞、骨芽細胞、血管内皮細胞、間質細胞、免疫細胞など多様な細胞で構成される微小環境が形成されており、骨恒常性の維持以外にも造血幹細胞の維持および分化など重要な役割をもつことが報告されている。

Stromal cell-derived factor 1 (SDF-1)は骨髄における間質細胞から分泌されるケモカインであり、SDF-1のレセプターである CXC chemokine receptor type 4(CXCR4)に結合する。CXCR4陽性細胞はSDF-1濃度勾配に従って遊走、集積し、細胞生存にとって重要な微小環境を構成している。SDF-1は非破骨細胞から産生され破骨細胞形成を促進することが明らかにされているが、詳しいメカニズムの解明には至っていない。

そこで、破骨細胞分化にとって適切な微小環境を構成する細胞集団を同定し、破骨細胞と非破骨細胞間の相互作用を明確にすることを本研究の目的とした。そのためフローサイトメーターを利用し、多様な細胞集団を正確に回収して破骨細胞培養を行い、細胞集団自身をもつ破骨細胞分化能や破骨細胞前駆細胞を分化させるメカニズムについて評価を行った。

## II. 対象および方法

### 1. 動物および試薬

マウス骨髄細胞は、7週齢オスddyマウスの脛骨から無菌状態で採取した。破骨細胞培養は48well培養plate (Corning Life Sciences)に  $1.0 \times 10^6$  cells/wellで播種し、10% fetal bovine serum (Gibco)を添加した  $\alpha$ -MEM培養液にて5%CO<sub>2</sub>濃度の加湿環境下で培養した。24時間培養した後に、20 ng/ml M-CSFと100 ng/ml human recombinant RANKLを加え、3日毎に培養液の半分を新鮮な培養液に交換した。培養後、細胞を固定し tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP)染色を行った。

## 2. 抗体

フローサイトメトリーおよびセルソーティングに使用した抗体は、FITC Rat Anti-Mouse CD45, APC Rat Anti-Mouse CD11b, BV421 Rat Anti-Mouse CD184, PE Rat Anti-Mouse Ter-119/Erythroid Cells であり、すべて BD Pharmingen™ から購入した。

## 3. マウス骨髄細胞からの細胞集団の単離

無菌状態で採取したマウス骨髄細胞を洗浄後、抗体の非特異的結合を抑制するため Mouse BD Fc Block™ (BD Pharmingen™) で処理した。その後、抗体で 30 分間染色し 7-amino-actinomycin D (7-AAD, BD Pharmingen™) を加えて再懸濁後、死細胞を除去し目的の細胞集団を FACSAria™ II と FACSDiva option (BD Biosciences) を用いて回収した。回収した細胞集団は、先述の方法と同様に培養と染色を行った。

## 4. Total RNA 抽出と定量的 RT-PCR 解析 (qRT-PCR)

破骨細胞分化関連遺伝子について 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems) を用い、qRT-PCR を行った。Total RNA は、Torizol 試薬 (Invitrogen) を用いて抽出した。逆転写はランダムプライマーと Ready-To-Go You-Prime First-Strand Beads (GE Healthcare Bio-Science Corp.) を用い cDNA の増幅を行った。qRT-PCR 解析は、SYBR Green Master Mix Reagents (Applied Biosystems) を用いて行った。RNA 量は Glyceraldehyde

3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) と各遺伝子 mRNA 比率の相対的標準曲線で算出した。

## 5. 統計的处理

得られた実験データは平均値±標準誤差で示し、統計的な有意差検定は対照群に対して Student t 検定か Bonferroni 補正の one-way factorial 分析を用いて検定した。P が 0.05 以下をもって有意とした。

## III. 結果

### 1. CD45 陽性細胞が破骨細胞形成に与える影響

FACSAria™ II を用いて骨髓細胞を赤血球、白血球、その他の非血球系細胞の 3 つの集団 (Ter-119<sup>+</sup> cells, CD45<sup>+</sup> cells, Ter-119<sup>-</sup>CD45<sup>-</sup> cells) に分類し、骨髓細胞の中からこれらの集団を除去した場合に破骨細胞形成に与える影響について検討した。その結果、マウス骨髓細胞集団から CD45<sup>+</sup> cells を除去すると破骨細胞数が明らかに減少したが、Ter-119<sup>+</sup> cells を除去しても破骨細胞形成に影響を与えなかった。また、Ter-119<sup>-</sup>CD45<sup>-</sup> cells を除くと大きな破骨細胞数のみ減少した。

### 2. CD11b 陽性細胞が破骨細胞形成に与える影響

フローサイトメーターを用いた解析の結果、破骨細胞前駆細胞の一つである CD11b<sup>+</sup> cells のほとんどすべてが CD45<sup>+</sup> cells に含まれていることを確認した。CD11b<sup>+</sup> cells を除いた集団を培養すると破骨細胞数が減少する傾向があるものの、有意差をもって減少することはなかった。

### 3. CXCR4 陽性細胞が破骨細胞形成に与える影響

SDF-1/CXCR4 経路が破骨細胞形成に与える影響について検討するため、FACS Aria™ II を用いて CXCR4<sup>+</sup> cells もしくは CXCR4<sup>-</sup> cells を回収・培養し、破骨細胞形成の違いを検討したところ、CXCR4<sup>-</sup> cells 由来の破骨細胞数が CXCR4<sup>+</sup> cells 由来の破骨細胞数を上回る結果が得られた。さらに CXCR4<sup>-</sup> cells が持つ性質を調べたところ、CXCR4<sup>+</sup> cells と比較して CXCR4<sup>-</sup> cells には破骨細胞前駆細胞の 1 つである CD11b<sup>+</sup> cells が多く含まれていた。

### 4. 破骨細胞形成における CXCR4 陽性 CD45 陰性細胞の重要性

破骨細胞形成において SDF-1/CXCR4 経路に関連する CXCR4<sup>+</sup> cells の役割を詳しく検討するために、CXCR4<sup>+</sup> cells 中の非血球系集団である CD45<sup>-</sup> cells に注目することにした。フローサイトメーターを用いた解析の結果、CXCR4<sup>+</sup> CD45<sup>-</sup> cells が骨髓細胞から除かれると有意差をもって大きな破骨細胞数が減少することが確認された。

### 5. CXCR4 陽性 CD45 陰性細胞における遺伝子発現の特徴

FACS Aria™ II を用いて CXCR4<sup>+</sup> CD45<sup>-</sup> cells を骨髓細胞から回収し、qRT-PCR 解析を行った。その結果、CXCR4<sup>+</sup> CD45<sup>-</sup> cells は RANK と RANKL を発現していなかったが、SDF-1, CX3CL1, CXCL7 などのケモカインや幹細胞因子である KITL (kit-ligand) を高発現していた。

## IV. 結論

骨恒常性は多様な細胞によって形成される適切な微小環境によって維持されている。本研究はこの微小環境を構成する細胞集団を同定し、破骨細胞と非破骨細胞間の相互作用を明確にすることを目的として、破骨細胞分化を担う骨髄内微小環境を構成する細胞群をフローサイトメーターによって除去することで生じる影響について検討した。その結果、CXCR4 陽性かつ非血球系細胞である CXCR4<sup>+</sup> CD45<sup>-</sup> cells は RANK および RANKL を発現せず、この細胞集団自身は破骨細胞分化能をもたないが、破骨細胞分化・形成に間接的に影響を与えていることが確認された。さらに、CXCR4<sup>+</sup> CD45<sup>-</sup> cells は、細胞の遊走・集積を促すと報告されているケモカインや、幹細胞因子の遺伝子発現が高いことが示された。すなわち、CXCR4<sup>+</sup> CD45<sup>-</sup> cells はこれらのケモカインや幹細胞因子に感受性をもつ細胞の遊走、集積、生存を促進することで、破骨細胞分化・形成に関与する微小環境を作り出す重要な細胞の一つである可能性が示唆された。