

# 学位論文内容の要約

愛知学院大学

甲 第 677 号	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、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。

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。

破骨細胞の生体における研究の多くは骨髄細胞から培養を行うため、多様な細胞が混在する混合培養であり、RANKL/RANK 経路以外にも多くの液性因子や細胞間相互作用による影響が加わり、破骨細胞分化形成に必須な細胞間相互作用や分子メカニズムが不明瞭であった。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、細胞集団自身がお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

7週齢オス ddy マウスを Shizuoka Laboratories Animal Center(静岡)から購入した。すべての動物実験は、The Animal Care and Use Committee of Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences の倫理規定に則って行われた。Recombinant human macrophage colony-stimulating factor (recombinant human M-CSF, Leukoprol)は、協和発酵キリン株式会社(大阪)から得た。Recombinant human RANKL (sRANKL)は和光純薬工業株式会社(大阪)から得た。

### 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 (clone 30-F11), APC Rat Anti-Mouse CD11b (clone M1/70), BV421 Rat Anti-Mouse CD184 (clone 2B11/CXCR4), PE Rat Anti-Mouse Ter-119/Erythroid Cells (TER-119)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、培養と TRAP 染色

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 FACS Aria™ II と FACSDiva option (BD Biosciences) を用いて回収した。回収した骨髄細胞を 48well 培養 plate (Corning Life Sciences, Lowell, MA) に  $1.0 \times 10^6$  cells/well で播種し、10% fetal bovine serum (FBS, Gibco, Grand Island, NY) 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 and 100 ng/ml sRANKL を加えた。3日毎に培養液の半分を新鮮な培養液に交換した。14日間培養後、細胞を固定し tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) 染色を行った。多核 TRAP 陽性細胞は、オリンパス社の倒立顕微鏡を用いて40倍の拡大率で観察しカウントした。核数が 3-5 個の TRAP 陽性細胞を Small、核数 6-9 個の TRAP 陽性細胞を Medium、核数が 10 個以上の TRAP 陽性細胞を Large とした。

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

破骨分化関連遺伝子について 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems、Foster City、USA) を用い、qRT-PCR を行った。Total RNA は、Torizol 試薬 (Invitrogen、Carlsbad、USA) 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、Carlsbad、USA) を用いて行った。増幅は 95°C で 10 分間 Ampli Taq Gold ポリメラーゼの活性化を行い、その後、増幅は 60°C を 1 分間と 95°C を 15 秒で 40 サイクル行った。RNA 量は GAPDH と各遺伝子 mRNA 比率の相対的標準曲線で算出した。GAPDH の基準化は、RT 効率と同様に、サンプルのクオリティーチェックと total RNA の濃度を補正するために使用した。

#### 5. 統計的処理

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 を用いて骨髄細胞を赤血球、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、骨髄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、マウス骨髄細胞集団から 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、FACSAria™ 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

FACSAria™ 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. 考察

骨髓内では、多様な細胞や因子の相互作用が存在する微小環境において破骨細胞の分化および形成が生じていると考えられる。本研究ではフローサイトメーターを用いることで、特異的な細胞集団が破骨細胞分化形成に与える影響を検討できるため、破骨細胞分化形成のための微小環境を構成する細胞をより正確に同定する一助になると考えた。

我々はまず、骨髓細胞を赤血球 (Ter-119<sup>+</sup> cells)、白血球 (CD45<sup>+</sup> cells)、その他の非血球系細胞 (Ter-119<sup>-</sup>CD45<sup>-</sup> cells) の 3 つの分画に分けた。CD45<sup>+</sup> cells を除いた骨髓細胞集団が M-CSF と RANKL 存在下で培養されると、破骨

細胞の形成が認められなかった。興味深い事に、骨髄細胞から非血球系細胞である Ter-119<sup>-</sup>CD45<sup>-</sup> cells を除いた集団を M-CSF と RANKL 存在下で培養すると、破骨細胞数が減少していた。このことから、CD45<sup>+</sup> cells は破骨細胞形成に必要不可欠であり、Ter-119<sup>-</sup>CD45<sup>-</sup> cells は破骨細胞形成に対して間接的に影響を与えていることが示唆された。

過去の報告によって破骨細胞の前駆細胞である単球・マクロファージ系細胞が CD11b を発現していることが知られている。その後の研究によって破骨細胞前駆細胞の分画はさらに詳しく調べられており、CD11b は分化の過程によって発現強度が変わり、CD11b を発現するにつれ破骨細胞前駆細胞の分化が進行すると推測される。我々が CD11b<sup>+</sup> cells を骨髄細胞から除去し培養したところ、破骨細胞形成に明らかな差を認めなかったのは、CD11b<sup>+</sup> cells を除去した集団においても細胞の分化・成熟によって CD11b を発現する細胞が出現してきた可能性が考えられる。

骨髄間質細胞は SDF-1 を分泌し、CXCR4 を発現する細胞が SDF-1 濃度勾配に従って血液循環の中から骨髄へ移動、遊走、集積を起こすということが一般的に知られている。我々は、マウス骨髄細胞の中の非破骨細胞分画が、SDF-1/CXCR4 経路を介して破骨細胞形成を刺激するという過去の報告をもとに、CXCR4<sup>+</sup> cells が破骨細胞形成に与える影響について解析した。まず、CXCR4<sup>+</sup> cells もしくは CXCR4<sup>-</sup> cells が M-CSF と RANKL 刺激によって破骨細胞へ分化するかどうかを調べた。当初の予想とは逆に CXCR4<sup>-</sup> cells におけ



る破骨細胞数の方が CXCR4<sup>+</sup> cells を上回っていた。その理由を調べるために CXCR4<sup>+</sup> cells と CXCR4<sup>-</sup> cells に含まれる細胞集団を比較した結果、破骨細胞前駆細胞の 1 つである CD11b<sup>+</sup> cells は CXCR4<sup>-</sup> cells に多く含まれていることが確認された。したがって、破骨細胞形成における CXCR4<sup>+</sup> cells と CXCR4<sup>-</sup> cells の差異は、CD11b<sup>+</sup> cells の影響によるものであると推測された。

破骨細胞形成における SDF-1/CXCR4 経路についてさらに深く調べるために、CXCR4 陽性の非血球系細胞である CXCR4<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup> cells を骨髓細胞から除いて M-CSF と RANKL 存在下で培養した。この CXCR4<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup> cells は多能性間葉系間質細胞としての性質をもつことが知られており、血管新生や血管内皮の修復を行うと報告されている。また未分化な CXCR4<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup> cells は心筋細胞へと分化誘導できることが報告されているが、破骨細胞分化誘導における役割については検討されていない。そこで我々は、CXCR4<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup> cells が破骨細胞形成に与える影響について検討することとした。全骨髓細胞培養と比較して CXCR4<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup> cells を除いた細胞集団では破骨細胞形成が低下していた。また、CXCR4<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup> cells 自身には CD11b<sup>+</sup>破骨細胞前駆細胞が含まれないため、破骨細胞形成を間接的に誘導している可能性が示唆された。

そこで、その間接的な役割における分子メカニズムを解明するために qRT-PCR 解析を用いて各遺伝子の mRNA の発現量を解析した。その結果 CXCR4<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup> cells では SDF-1, CX3CL1, CXCL7 といったケモカインや KITL のような幹細胞因子を強力に発現しており、RANK および RANKL の発現は明

らかに低いことが確認された。つまり、CXCR4<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup> cells は RANKL/RANK 経路に直接的には関与しない非血球系の細胞であり、細胞の移動と集積を担うケモカインや幹細胞因子を分泌することによって破骨細胞形成に関与する微小環境を構成し、間接的に破骨細胞の分化と活性化を促進していることが予想された。

## V. 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<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・集積を担うケモカインや、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。