

# 学位論文内容の要旨

愛知学院大学

論文提出者

関谷健夫

論文題目

ヒト骨髄由来破骨細胞形成の  
個体差を生じる要因の解析

## I. 緒言

近年、矯正歯科治療に伴う歯の移動や歯根吸収など生体反応に関する基礎的研究が行われているが、そのメカニズムはいまだ未解明な部分が多い。矯正歯科治療では、多数の患者に同様の治療を行っても、歯の移動速度が異なったり、歯根吸収や歯槽骨吸収などの副作用の頻度や程度に大きな個人差が起こったりすることが知られている。これらは、生体内において破骨細胞の発現と関連があると報告されている。そこで、本研究では、破骨細胞分化について、個体差を生じる要因の解析を行うこととした。

骨代謝は、骨芽細胞と破骨細胞が、それぞれ骨形成と骨吸収を繰り返すことにより、バランスを常に保ち、骨量を一定に保っている。骨芽細胞は破骨細胞分化に必要な Receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand (RANKL) と Macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) という二つの重要なサイトカインを発現する。この二つのサイトカインと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と報告されている。その中でも Tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ ) は骨吸収を促進する炎症誘発性のサイトカインであり、骨周囲の炎症部位において多くの発現が認められる。一方、生体内での低酸素状態も破骨細胞形成を促進させ、すでに我々は、低酸素刺激がマウスの骨髄から破骨細胞への分化を促進することを見出し、低酸素が骨吸収を引き起こす機構の一つとなる可能性を示した。さらに Nomura らは、マウス骨髄とヒト骨髄とを比較して破骨細胞形

成が誘導される条件が異なると報告しており、過去の破骨細胞誘導実験においてもヒトとマウスでは異なった結果が示されている。そこで本研究では、より臨床に反映されやすい知見を得るため、ヒト骨髄を用いて研究を行うこととした。

## II. 対象および方法

### 1. 被検者および試薬

骨髄は、変形性股関節症のため、名古屋市立大学病院整形外科において大腿骨頭置換術を受けた13人の患者より得た。なお骨髄の研究使用については名古屋市立大学の倫理委員会の承認を得ている。

### 2. ヒト骨髄からの培養

大腿骨頭置換術の際に漏出する骨髄を採取し、リンパ球層を回収し、無血清培地を用い、以下の研究に使用した。

### 3. In vitro における破骨細胞培養と TRAP 染色

リンパ球層から抽出した細胞を播種し培養した。薬物処理および低酸素刺激は播種より24時間後に行った。薬物処理には100ng/ml RANKL、50ng/ml M-CSF、10ng/ml TNF $\alpha$ を用いた。低酸素刺激は、5%二酸化炭素、5%酸素、

90%窒素の混合ガスを15分間流した。3週間の培養の後、細胞を固定し、Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) 染色を行った。3～9個の核を持つ細胞を小型細胞とし、10個以上の核を持つ細胞を大型細胞としてカウントした。

#### 4. リンパ球層からの RNA 抽出と定量的 RT-PCR (qRT-PCR) 解析

破骨分化関連遺伝子について、qRT-PCR を行った。リンパ球層を回収し、Total RNA を抽出、逆転写を行い、cDNA を作成した。その後、定量的 PCR を行った。

#### 5. 統計的処理

統計的な有意差検定はすべての対照群に ANOVA (Bonferroni) 分析か Pearson の相関係数分析を用いて検定した。P<0.05 をもって有意差とした。

### III. 結果

#### 1. 酸素濃度別、TNF $\alpha$ 有無の環境下でのヒト骨髄からの破骨細胞形成

初めにヒト骨髄由来破骨細胞形成に最適となる条件を確認するため、低酸素刺激および TNF $\alpha$  刺激が TRAP 陽性破骨細胞数に及ぼす影響を調べた。

3人の骨髄提供者の骨髄を RANKL と M-CSF の存在下で、5%酸素と 20%酸

素、TNF  $\alpha$  (+)群と(-)群にわけ3週間培養した。3人の骨髄提供者別に細胞をカウントし比較すると、大型の破骨細胞は5%酸素/TNF  $\alpha$  (+)群においてすべての検体で形成が確認された。小型の破骨細胞はTNF  $\alpha$  (+)において5%と20%酸素においても認められた。他の群に比べ20%酸素/TNF  $\alpha$  (-)群では、破骨細胞形成が少なかった。

## 2. 患者別の破骨細胞形成の差異

ヒト骨髄にRANKL、M-CSFを添加し、さらに5%酸素下、TNF  $\alpha$ を添加するという条件下で、安定して破骨細胞分化が確認されたので、この条件において、13人の骨髄提供者別に破骨細胞培養を行い、3週間培養後、破骨細胞総数、大型破骨細胞数、小型破骨細胞数をそれぞれ計測した。しかし、すべての細胞数において、検体による破骨細胞への分化の差が大きく、一定の傾向は認められなかった。

## 3. 患者年齢別の破骨細胞形成の差異

提供者全員が女性、疾患は変形性股関節症で、他に感染症などは併発していなかった。そこで、患者年齢と破骨細胞数の相関を調べた。破骨細胞総数、大型破骨細胞数、小型破骨細胞数と年齢との間には有意な相関は認められなかった。

#### 4. ヒト骨髄における遺伝子発現の確認

13人の患者のうち、無作為に抽出した5人に着目することにした。ヒト骨髄由来破骨細胞形成の個体差を生じる要因を解析するため、この5人の提供者から得た分離直後の骨髄から total RNA を抽出した。この total RNA を使用し qRT-PCR を行った。qRT-PCR の結果と破骨細胞総数、大型破骨細胞数、小型破骨細胞数との相関を調べた。破骨細胞総数、小型破骨細胞数との有意な相関は認められなかったが、興味深いことに大型破骨細胞数では Receptor activator of NF- $\kappa$ B (RANK)、Colony stimulating factor 1 receptor (CSF1R)、Tumor necrosis factor receptor 2 (TNFR2)、CD14 において有意な相関を示した。

#### IV. 考察

これまでの研究で、ヒト骨髄由来破骨細胞の分化・増殖には、提供患者別に個体差があることが分かってきた。そこで、我々は、このヒト骨髄由来破骨細胞形成の個体差を生じる要因を解析することを、本研究の目的とした。その要因を見出すことが出来れば、矯正歯科治療においても、個々における歯の動きやすさの予測や評価、また歯根吸収や歯槽骨吸収などの副作用の予測が可能になるのではないかと推測した。

まず初めに、安定的なヒト骨髄から破骨細胞を分化させるための細胞培養の最適条件を決定することにした。これまで、破骨細胞分化を誘導する

サイトカインとしては M-CSF と RANKL があげられ、破骨細胞前駆細胞はこれら 2 つのサイトカインがあれば破骨細胞へと分化することができると報告されていた。しかし、この 2 つのサイトカインだけでは個体差を判定するほどの TRAP 陽性細胞を確認することはできなかった。そこで、我々は先の 2 つのサイトカインに加え、低酸素環境におき、かつ TNF $\alpha$  を加えたところ、TRAP 陽性細胞が誘導されることが判明したので、この条件下で、実験を進めることとした。

次に、先の条件で細胞培養を行い、13 人の骨髄提供者別に TRAP 陽性の細胞総数、大型細胞数、小型細胞数を計測した。細胞総数、大型細胞数、小型細胞数とも、特に一定の傾向はなく非常に個体差が大きい結果となった。さらに、骨髄提供者の年齢とそれぞれの細胞数との相関を調べたが、有意な相関は確認できなかった。

そこで我々は、13 人の骨髄提供者の内、無作為に 5 人を抽出し、その個体差を生じる要因を解析するために qRT-PCR を用いて、骨髄採取直後における破骨細胞の増殖・分化に関わる遺伝子の mRNA 発現量を解析した。骨代謝に関連するといわれている RANK、CSF1R、Tumor necrosis factor receptor 1 (TNFR1)、TNFR2、CD14、Tyrosine-protein kinase (c-KIT)、Stem cell antigen-1 (Sca-1) の遺伝子を確認した。それぞれの遺伝子発現量と患者別の細胞総数、大型細胞数、小型細胞数との相関を調べた。細胞総数、小型細胞数と遺伝子発現量には、相関が確認できなかったが、大型細胞数と RANK、

CSF1R、TNFR2、CD14の4つの遺伝子発現量とは有意な相関が確認できた。すなわち、細胞培養前の段階における、ヒト骨髄から回収したリンパ球層内にRANK、CSF1R、TNFR2、CD14を発現している細胞が多く含まれていると、大型破骨細胞が形成されやすく、成熟破骨細胞へ分化が促進しやすい状況にあることを意味していると考えられた。

この4つの遺伝子の内、RANK、CSF1R、CD14は破骨細胞に分化する起源である造血幹細胞由来の細胞が発現している。一方、間葉系幹細胞に発現しているTNFR2との著しい相関も得られた。今回の結果は、破骨細胞形成能は造血幹細胞由来細胞のみならず、その周囲にある間葉系幹細胞由来細胞からも影響を受けると考えられた。ヒト骨髄から採取した細胞には、個人により含まれている破骨細胞形成に関連する造血幹細胞と間葉系幹細胞から構成される細胞集団の差が存在し、破骨細胞形成の個体差に影響を及ぼしていることが推測された。これらのことより、矯正歯科治療において、本実験で示したような破骨細胞分化と相関する遺伝子発現を調べることができれば、破骨細胞形成能の個体差がわかり、歯の移動制御の容易さ、困難さの予測が可能になることや、歯根吸収や歯槽骨吸収などの副作用の予測も可能になると推測され、事前にスクリーニングを行うことで、オーダーマイド治療が可能になると示唆された。