

学 位 論 文 題 名

Effect of Extracellular Calcium Concentrations
on Osteoclast Differentiation *in Vitro*

(細胞外カルシウム濃度が破骨細胞の分化に与える影響)

学位論文内容の要旨

骨のリモデリングとは、骨形成と骨吸収は量的に平衡が保たれるように厳密にコントロールされていることであり、骨芽細胞が骨形成を、破骨細胞が骨吸収を担っている。破骨細胞は造血幹細胞に由来し、IL-6、1,25(OH)₂D₃などの作用によって制御され、単球・マクロファージ系列の細胞から分化すると考えられている。

申請者らは、低カルシウム環境下で生じる硬組織石灰化抑制機構の解明を目的に研究を行っているが、これまでに、低カルシウム環境下で培養した新生児ラットの大腿骨で骨頭部の肥大などの骨の形成障害が生じること、並びに、胎児頭蓋冠由来の骨形成系細胞で、硬組織石灰化のマーカー酵素であるアルカリ性ホスファターゼ活性の亢進が生ずることを見出している。この現象は、低カルシウム食で飼育されたラットにおいて破骨細胞の発現が亢進することからも極めて興味深い。各種サイトカインと同様にカルシウム濃度によっても破骨細胞の分化を制御しているのではないかと考えられるが、あまり知られていない。

今回、MC3T3-E1細胞とマウス骨髄との共存培養において、細胞外カルシウムが破骨細胞の分化にどのように関与しているかをみるため研究を行った。

(材料と方法)

間質系細胞は、骨芽細胞様細胞株MC3T3-E1細胞を通法に従い、10%牛胎児血清を加えた α MEMでコンフルエントまで培養し、その後、共存培養した。骨髄細胞は、4週齢のC57BL/6マウスの大腿骨から無菌的に採取し、1wellあたり、 10^5 個を加えた。共存培養に用いた α MEMは、培養液中のカルシウム濃度を0mM、1.2mM、通常の α MEMのカルシウム濃度である1.8mM、2.5mMの4種類を作製し、この培養液に10%牛胎児血清を加え実験に供した。培養液は、共存培養開始後、1日おきに交換した。

破骨細胞の発現の評価は、破骨細胞のマーカー酵素である酒石酸耐性酸性ホスファターゼを用いたTRAP染色を行い、陽性かつ多核の細胞を光学顕微鏡下

にてカウントして行った。

また、その破骨細胞が実際に硬組織に対して吸収能があるか否かを確認するためにpit assayを行った。

pit assayは、24穴プレート上に直径約10mm、厚さ約1mmまで研磨したウシ歯根象牙質切片を置き、6日間共存培養を行った後、軟組織を除去し、通常に従い走査型電子顕微鏡にて吸収窩を観察した。

(結果)

カルシウム濃度での破骨細胞発現の比較

カルシウム濃度が異なる4種類の培養液(0、1.2、1.8、2.5mM)で共存培養した結果、増殖期のMC3T3-E1細胞においては、いずれの群においても、破骨細胞は共存培養後4日目から発現して、5日目、6日目と有意に増加した。また、共存培養の日数で4種類の群を比較した場合、それぞれにおいて、培養液のカルシウム濃度が低くなるに従い、破骨細胞の発現が増加した。

E1の石灰化のステージによる破骨細胞発現の比較

骨芽細胞であるMC3T3-E1細胞は、培養していくに従い石灰化するが、それは、骨芽細胞からマトリックスが分泌され、そのうえにミネラル(リン酸カルシウム)が沈着するためである。このような細胞外基質の石灰化が、破骨細胞の分化に関係があるかを調べるため、増殖期(培養開始3日目)、分化期(14日目)、石灰化前期(21日目)、石灰化期(47日目)において、それぞれ共存培養を行った。細胞外基質の石灰化の程度が進むにつれて、対照群(1.8mM)と低カルシウム群(0mM)についてともに破骨細胞の数が減少した。また、それぞれの時期において、対照群に比べ、低カルシウム群の方が、有意に破骨細胞の数は多く見られた。以上の結果より、MC3T3-E1細胞における共存培養時の培養液のカルシウム濃度や細胞外基質の石灰化の程度が低下することにより、破骨細胞の数が有意に増加することが判明した。

交換実験における破骨細胞発現の比較

増殖期において、通常の培養液と低カルシウム培養液とを用いて、6日間の共存培養期間の、どの時期が破骨細胞の発現に最も影響があるのかを調べることを目的として交換実験を行った。この結果、6日間、低カルシウム培養液で共存培養を行った群で最も多数の発現が確認された。次いで、最初4日間低カルシウム培養液で共存培養し、その後2日間通常の培養液で共存培養を行った群と最初2日間低カルシウム培養液で共存培養し、その後4日間通常の培養液で共存培養を行った群は、対照群に比べ、有意な増加が認められた。しかし、最初2日間は低カルシウム培養液で、次の2日間は通常の培養液で、そして最後の2日間低カルシウム培養液で共存培養を行った群は、トータルで同じ4日間低

カルシウムで培養したにもかかわらず、有意な増加が認められなかった。また、2日間低カルシウム培養液で共存培養を行った群では、いずれも対照群に比べ、有意な増加が認められなかった。以上の結果より、破骨細胞の発現が増加するためには、連続する4日間低カルシウム培養液で共存培養を行う必要があることが判明した。

pit assay による吸収窩の確認

実際に吸収窩が確認され、ウシ歯根切片の象牙質を吸収していることが確認された。

(考察)

破骨細胞は、多核巨細胞で造血幹細胞に由来し、前駆細胞が分化・融合することにより形成される。この過程には、分化因子としてM-CSF、c-fos、c-jun、osteoprotegerin、IL-3、IL-6、LIFなどのホルモン、サイトカインなどが関与していると考えられている。このなかでも、M-CSF欠乏によるop/opマウスを用いた実験では、M-CSFの投与により破骨細胞が劇的に増加し、骨吸収を開始することから、破骨細胞の分化に対して間質系細胞由来のM-CSFが必要であることが明らかにされた。このように各種サイトカインが破骨細胞の発現に対し制御していることは、現在までにかなり研究されているが、カルシウム濃度自身がどのように関与しているかは、余りよく知られていない。

今回、申請者らの実験では、MC3T3-E1細胞とマウス骨髄との共存培養において、培養液中のカルシウム濃度を変えたとき、濃度が低いほど破骨細胞の発現が顕著に見られた。また、MC3T3-E1細胞の石灰化のステージにおいては、石灰化が進む、つまり細胞外カルシウム基質が増えるに従い破骨細胞の発現は減少した。MC3T3-E1細胞と破骨細胞には、カルシウムセンシングレセプターがあることは知られている。細胞外カルシウムがそのリガンドとして直接働くかどうかは明らかでないが、少なくとも骨芽細胞もしくは骨髄細胞のどちらかもしくは両方が細胞外カルシウムの濃度を認識する部位を持ち、不足している場合には破骨細胞をより分化させることにより不足分を補い、逆に、過剰の場合にはその分化を抑制していることがわかる。また、カルシウム濃度刺激は、4日連続で低カルシウムの刺激にさらされなければ有意差のない緩やかなものであることがわかる。低カルシウム環境下で培養された破骨細胞の方が吸収能が高いことはわかったが、それが、数によるものかそれとも個々の破骨細胞の能力が高いのかは明らかでない。今後の課題として、TEMによって、個々の破骨細胞の能力を調べる必要があると思われる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 口 春 久
副 査 教 授 松 本 章
副 査 教 授 久 保 木 芳 徳

学 位 論 文 題 名

Effect of Extracellular Calcium Concentrations on Osteoclast Differentiation *in Vitro*

(細胞外カルシウム濃度が破骨細胞の分化に与える影響)

申請者らは、低カルシウム環境下で生じる硬組織石灰化抑制機構の解明を目的に研究を行っているが、これまでに、低カルシウム環境下で培養した新生児ラットの大腿骨で骨頭部の肥大などの骨の形成障害が生じること、並びに胎児頭蓋冠由来の骨形成系細胞で、硬組織石灰化のマーカーク酵素であるアルカリ性ホスファターゼ活性の亢進が生ずることを見出している。この現象は、低カルシウム食で飼育されたラットにおいて破骨細胞の発現が亢進することからも極めて興味深い。各種サイトカインと同様にカルシウム濃度によっても破骨細胞の分化を制御しているのではないかと考えられるが、詳細はあまり知られていない。

本研究は、骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 細胞とマウス骨髄との共存培養において、細胞外カルシウムが破骨細胞の分化に関与していることを明らかにしたものである。

(方法と結果)

骨髄細胞は、マウスの大腿骨から無菌的に採取し、E1 細胞と培養した。培養液中のカルシウム濃度を、0mM、1.2 mM、1.8 mM、2.5 mM の4種類を作製し、この培養液に10%牛胎児血清を加えた。培養液は、共存培養開始後、1日おきに交換した。破骨細胞の発現の評価は、破骨細胞のマーカーク酵素である酒石酸耐性酸性ホスファターゼを用いた TRAP 染色を行い、陽性かつ多核の細胞をカウントして行った。また、その破骨細胞が実際に硬組織に対して吸収能があるか否かを確認するためにウシ歯根象牙質切片を用いて、pit assay を行った。

カルシウム濃度が異なる4種類の培養液(0、1.2、1.8、2.5 mM)で共存培養した結果、増殖期のE1細胞においては、いずれの群においても、破骨細胞は共存培養後4日目から発現して、5日目、6日目と有意に増加した。また、共存培養の日数で4種類の群を比較した場合、それぞれにおいて培養液のカルシウム濃度が低くなるに従い破骨細胞の発現が増加した。骨芽細胞であるE1細胞は、培養していくに従い石灰化するが、

それは、骨芽細胞からマトリックスが分泌され、そのうえにミネラル（リン酸カルシウム）が沈着するためである。このような細胞外基質の石灰化が、破骨細胞の分化に関係があるか否かを調べるため、増殖期（培養開始3日目）、分化期（14日目）、石灰化前期（21日目）、石灰化期（47日目）において、それぞれ共存培養を行った。その結果、E1細胞における共存培養時の培養液のカルシウム濃度や細胞外基質の石灰化の程度が低下することにより、破骨細胞の数が有意に増加することが判明した。また、6日間の共存培養期間の、どの時期が破骨細胞の発現に影響があるのかを調べることを目的として交換実験を行った。この結果、影響のある時期を特定することはできなかったが、破骨細胞の発現が増加するためには、4日間低カルシウム培養液で共存培養を行う必要があることが判明した。さらに pit assay により、実際に吸収窩が確認され、ウシ歯根切片の象牙質を吸収していることが確認された。

（考察と結果）

破骨細胞は、多核巨細胞で造血幹細胞に由来し、前駆細胞が分化・融合することにより形成される。この過程には、各種サイトカインが破骨細胞の発現に対し制御していることは、現在までにかかなり研究されているが、カルシウム濃度自身がどのように関与しているかはあまりよく知られていない。

今回、申請者らの実験では、E1細胞とマウス骨髄との共存培養において培養液中のカルシウム濃度を変えたとき、濃度が低いほど破骨細胞の発現が顕著に見られた。また、E1細胞の石灰化のステージにおいては、石灰化が進む、つまり細胞外カルシウム基質が増えるに従い破骨細胞の発現は減少した。E1細胞と破骨細胞には、カルシウムセンシングレセプターがあることは知られている。細胞外カルシウムがそのリガンドとして直接働くかどうかは明らかでないが、少なくとも骨芽細胞もしくは骨髄細胞のどちらかあるいは両方が細胞外カルシウムの濃度を認識する部位を持ち、不足している場合には破骨細胞をより分化させることにより不足分を補い、逆に、過剰の場合にはその分化を抑制していることがわかる。また、カルシウム濃度刺激は4日連続で低カルシウム刺激にさらされなければ有意差のでない緩やかなものであることがわかる。低カルシウム培養液環境下で培養された破骨細胞の方が吸収能が高いことは判明したが、それが、数によるものかそれとも個々の破骨細胞の能力が高いのかは明らかではない。今後の課題として、個々の破骨細胞の能力を調べる必要がある。

論文審査は、主査、副査とも個別に行った。学位申請者による研究の要旨の説明後、本研究ならびに関連する研究について各審査担当者より質問が行われた。いずれの質問についても、論文申請者からそれぞれ適切かつ明快な回答が得られた。また将来の研究の方向性についても具体的に示された。今回の実験方法ならびに結果が細胞外カルシウム濃度と破骨細胞の分化の関係に、貴重な情報を提供するものであると高く評価された。以上のことから本学位申請者は博士（歯学）の学位授与に値するものと認められた。