

博士（歯学）竹山禎章

学位論文題名

Low calcium environment effects osteoprotegerin ligand/osteoclast differentiation factor

(低カルシウム環境における破骨細胞誘導因子の遺伝子発現について)

学位論文内容の要旨

【目的】

破骨細胞は骨吸収を担っている細胞で、由来は造血幹細胞であり、分化して形成された多核細胞である。その分化は、*in vitro*において、骨芽細胞などのストローマ細胞と、骨髄細胞との共存培養が必要であり、骨芽細胞をはじめとするストローマ細胞や骨髄の単核球などから分泌される各種のサイトカインによって制御されていることが報告されている。

我々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食飼育ラットの大腿骨骨形成不全、特に骨梁の脆弱化、骨密度の低下などを報告している。この現象は骨芽細胞の骨形成抑制や破骨細胞による骨吸収亢進を示唆している。そこで、低カルシウム環境における破骨細胞形成に及ぼす効果を最近報告された、破骨細胞誘導因子であるosteoprotegerin ligand/osteoclast differentiation factor (OPGL/ODF) の低カルシウム環境におけるmRNAの発現を検討した。また、甲状腺や腎臓に存在するカルシウムイオンを認識するカルシウムセンシングレセプターが骨芽細胞に存在することが報告されている。そこで、このレセプターと破骨細胞発現との関連についてもあわせて検討した。

【材料と方法】

破骨細胞の発現は共存培養系を使用した。細胞は骨芽細胞様細胞MC3T3-E1細胞 (E1細胞) を通法に従い、10%牛胎児血清を加えたαMEMで24穴プレートで培養した。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、 10^6 個を播種した。共存培養開始後培養液は、培養液中のカルシウム濃度を0.34mM (低カルシウム) 1.87mM (対照) と、100nMのデキサメサゾン (dex) と10nMの活性型ビタミンD3 (ビタミンD3) を加えた添加群と無添加群の4種類 (低カルシウム群、低カルシウム+添加群、対照群、対照+添加群) の培養液で培養した。培養液は、共存培養開始後、1日おきに交換を行った。

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ーゼを用いた、TRAP染色にて陽性でかつ多核細胞を破骨細胞とし、その数をカウントした。

破骨細胞形成因子であるOPGL/ODF mRNAの発現をRT-PCRにて検討した。E1細胞を共

存培養と同様のスケジュールで培養しtotal RNA回収後逆転写、PCRを行った。

カルシウムセンシングレセプターの発現はE1細胞をlysis bufferにて回収後80 μgを特異的抗カルシウムセンシングレセプター抗体で免疫沈降を行い、10%アクリルアミドゲルにて電気泳動後、PVDF膜に転写した。検出はenhanced chemiluminescence法にて行った。

また、dexとビタミンD3の存在下でカルシウムセンシングレセプターのアゴニストであるガドリニウムとネオマイシンを50 μMまたは100 μMの最終濃度で刺激し、OPGL/ODF mRNAの発現と破骨細胞の発現を検討した。OPGL/ODF mRNAはアゴニストで24時間刺激後上記と同様に行った。共存培養はアゴニストを添加し上記方法と同様に行つた。

【結果・考察】

破骨細胞の発現はdexとビタミンD3の添加群にのみ認められた。低カルシウム+添加群で 139 ± 33 個/well (n=3)、対照+添加群で 88 ± 27 個/well (n=3)であり、この発現した2群を比較すると低カルシウム環境のほうが破骨細胞形成を有意に増加していた ($p < 0.05$)。

OPGL/ODF mRNAはdexとビタミンD3の添加群にのみ発現していた。この発現していた2群を比較すると低カルシウム環境の方がより強く発現していた。また、破骨細胞抑制因子であるosteoprotegerin/osteoclastogenesis inhibitory factor (OPG/OCIF) mRNAの発現はdexとビタミンD3の添加群で減少し、この2群を比較すると低カルシウム環境の方がより発現が減少していた。これら結果から、少なくとも骨芽細胞には細胞外カルシウムを認識する機構が存在し、OPG/OCIFとOPGL/ODF mRNAをコントロールして、破骨細胞の発現を制御していると推測できる。

細胞外カルシウムを認識する機構のひとつにカルシウムセンシングレセプターが報告されている。そこで、このレセプターと破骨細胞発現について検討した。カルシウムセンシングレセプターはグリコプロテインであり、分子量は約150kDaと報告されている。全ての群にカルシウムセンシングレセプターの発現は認められ、発現には有意な差が認められなかった。E1細胞の細胞膜には細胞外の環境に関係なく同程度のカルシウムセンシングレセプターが存在していたため、この結果は破骨細胞の発現は細胞外カルシウムイオンの量がこのレセプターを介した情報伝達に相違を生じている可能性を示唆している。

そこでカルシウムセンシングレセプターのアゴニストであるガドリニウムとネオマイシンで刺激しOPGL/ODF mRNAと共存培養にて破骨細胞の発現を検討した。カルシウムセンシングレセプターのアゴニストで刺激することでカルシウムイオンの代わりとなり、細胞外カルシウムのカルシウムイオンが増加した状態、つまり、細胞外カルシウム濃度が上がった状態と同じ環境になるとえたためである。

低カルシウム群、対照群ともアゴニストで刺激した群は、刺激していない群よりOPGL/ODF mRNAの発現は減少をしていた。さらに、共存培養においては低カルシウム群、対照群ともにアゴニストによる刺激群は刺激しない群に比較し、破骨細胞の発現は有意に減少していた。

【結論】

骨芽細胞は細胞外のカルシウムをカルシウムセンシングレセプターで認識し、その情報を細胞内に伝え、破骨細胞形成因子のOPGL/ODFを調節することにより破骨細胞発現を制御していることが示唆された。

学位論文審査の要旨

主　査　教　授　福　田　博
副　査　教　授　久保木　芳　徳
副　査　教　授　松　本　章

学　位　論　文　題　名

Low calcium environment effects osteoprotegerin ligand/osteoclast differentiation factor

(低カルシウム環境における破骨細胞誘導因子の遺伝子発現について)

提出論文の概要は以下の通りである。

<目的>

低カルシウム環境下で生じる硬組織石灰化抑制機構を明らかにする目的で、低カルシウム環境が破骨細胞形成に及ぼす効果を破骨細胞誘導因子である osteoprotegerin ligand / osteoclast differentiation factor (OPGL/ODF) の mRNA の発現について検討した。また、骨芽細胞に存在するカルシウムセンシングレセプターと破骨細胞発現との関連についても検討した。

<材料と方法>

破骨細胞の発現は、骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 細胞 (E1 細胞) とマウス骨髄細胞との共存培養系を使用した。共存培養開始後、培養液は培養液中のカルシウム濃度を 0.34mM (低カルシウム) 1.87mM (対照) と、100nM のデキサメサゾン (dex) と 10nM の活性型ビタミンD3 (ビタミンD3) を加えた添加群と無添加群の 4 種類の培養液で培養した。破骨細胞の発現の評価は、TRAP 陽性で、かつ多核細胞を破骨細胞とし、その数をカウントした。OPGL/ODF mRNA の発現を RT-PCR にて検討した。

カルシウムセンシングレセプターの発現は免疫沈降-western blot 法にて行った。また、dex と ビタミンD3 の存在下でカルシウムセンシングレセプターのアゴニストであるガドリニウムとネオマイシンを $50 \mu M$ または $100 \mu M$ で刺激し、OPGL/ODF mRNA の発現と破骨細胞の発現を検討した。

<結果と考察>

- 1) 破骨細胞の発現は dex と ビタミンD3 の添加群にのみ認められ、この発現した 2 群を比較すると低カルシウム環境の方が破骨細胞形成は有意に増加していた ($p < 0.05$) 。
- 2) OPGL/ODF mRNA は dex と ビタミンD3 の添加群にのみ発現しており、発現していた 2 群を比較すると、低カルシウム環境の方がより強く発現していた。1) 2) の結果か

ら、少なくとも骨芽細胞には細胞外カルシウムを認識する機構が存在し、OPGL/ODF mRNAをコントロールして、破骨細胞の発現を制御していると推測できる。

3) 細胞外カルシウムを認識する機構にカルシウムセンシングレセプターがあり、このレセプターと破骨細胞発現について検討した。全ての群でカルシウムセンシングレセプターの発現には有意な差が認められなかった。この結果は細胞外カルシウムイオンの量によるレセプターを介した情報伝達に相違が生じている可能性を示唆している。

4) そこで、アゴニストで刺激することでカルシウムイオンの代わりとなると考え、カルシウムセンシングレセプターのアゴニストで刺激し、OPGL/ODF mRNAと共に培養にて破骨細胞の発現を検討した。低カルシウム群、対照群ともアゴニストの刺激群は、非刺激群よりOPGL/ODF mRNAの発現は減少していた。さらに、共存培養においては低カルシウム群、対照群ともにアゴニストによる刺激群は非刺激群に比較し、破骨細胞の発現が有意に減少していた。

<結論>

骨芽細胞は細胞外のカルシウムをカルシウムセンシングレセプターで認識し、OPGL/ODFを調節することで破骨細胞発現を制御している経路が明らかになった。

審査は、まず、論文提出者から提出論文の概要の説明を受けた。続いて、本研究の背景、実験法および実験結果に関する詳細について質問した他、破骨細胞に関する基礎的事項、カルシウム代謝に関する情報伝達機構について、さらに、がんや炎症による骨吸収など臨床との関連など、本論文を中心に、種々口頭で試問した。論文提出者はそれらの質問に対してそれぞれ明解に回答した。さらに、後日、久保木副査により、一般的知識について筆記試験が行われ、成績が優秀であった。

本論文提出者は本論文を中心に広い学識を有し、また、本論文の内容も高く評価され、博士（歯学）の授与に値するものと判断された。

なお、本論文は、Biochemical and Biophysical Research Communications 276: 524~529, 2000. に掲載されている。