

学 位 論 文 題 名

破骨細胞分化に対する
マクロファージ遊走阻止因子（MIF）の影響について

—マウス骨髄細胞ならびに骨芽細胞の
共存培養条件下における MIF の作用—

学位論文内容の要旨

骨組織は骨芽細胞による骨形成と破骨細胞による骨吸収のバランスにより、一定の骨量を維持している。骨吸収は破骨細胞によって担われているが、破骨細胞の発現と活性の調整には、RANKL や OPG の他に、活性型ビタミン D₃、副甲状腺ホルモンなどのカルシウム代謝調節ホルモンや TNF α 、IL-1 などのサイトカインも関与していることが明らかにされている。健常者では、破骨細胞の活性はこれらの分子によって厳密に調節されているが、リウマチや歯周疾患においては破骨細胞の活性が病的に亢進し、破壊が進行する。これらの疾患では、病変部での炎症性サイトカインや免疫細胞の関与が強く指摘されている。

マクロファージ遊走阻止因子 (macrophage migration inhibitory factor : MIF) は、炎症のメディエーターの 1 つであり、1966 年に活性化 T リンパ球から分泌される最初のサイトカインとして発見された。MIF は、細菌感染などにおいて、感染部位でのマクロファージの遊走を阻止し、炎症部位にマクロファージを停滞させることで炎症、免疫反応を促進させる作用を有している。MIF は、炎症性サイトカインとしての機能の他に、細胞の分化・増殖、免疫応答の調節因子および創傷治癒過程における重要な調節因子として働いていることが判明している。しかしながら、骨代謝における MIF の作用についての報告は極めて少なく、特に破骨細胞に関しての報告は存在しない。そこで、破骨細胞の分化・成熟過程における MIF の影響について以下の実験を行った。

C57BL/6 マウスの骨髄細胞とマウス新生仔頭蓋冠由来の骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 細胞 (E1 細胞) との共存培養によって破骨細胞を誘導した。C57BL/6 マウス的大腿骨から、骨髄細胞を採取し、1 穴あたり 1×10^5 個になるよう細胞数を調整し、

E1 細胞上に播種し、6 日間共存培養を行った。MIF を $0\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $0.01\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $0.1\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $1.0\ \mu\text{g}/\text{ml}$ になるように段階的に濃度を調節し培養液に添加した。培養 6 日後に 10% 中性ホルマリンにて固定を行い、酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ (TRAP) 染色を行い、各 MIF 濃度における TRAP 陽性多核細胞の発現数を比較した。共存培養 6 日後の、2 核以上の TRAP 陽性多核細胞の発現数は、MIF $0\ \mu\text{g}/\text{ml}$ では 86.3 ± 27.8 個、MIF $0.01\ \mu\text{g}/\text{ml}$ では 68.3 ± 11.7 個、MIF $0.1\ \mu\text{g}/\text{ml}$ では 26.3 ± 14.5 個、MIF $1.0\ \mu\text{g}/\text{ml}$ では 22.5 ± 11.7 個であり、MIF 濃度に依存して TRAP 陽性多核細胞の出現数が減少していることが判明した。次に、MIF が培養期間のどの時期に効果的に作用しているか検索する目的で、培養期間 6 日間を 3 期間（培養 1 日目と 2 日目を培養初期、3 日目と 4 日目を培養中期、5 日目と 6 日目を培養後期）に分割し、各期間に $0.1\ \mu\text{g}/\text{ml}$ の MIF を作用させた。それぞれの組み合わせにおいて TRAP 陽性多核細胞の出現数を計測したところ、培養中期に MIF を作用させた場合において有意に TRAP 陽性多核細胞の出現数が減少していることが確認された。培養中期は、破骨細胞の分化段階において、単核 TRAP 陽性細胞から多核 TRAP 陽性細胞に分化する期間に相当することから、MIF は破骨細胞の多核化に作用している可能性が示唆された。

破骨細胞の分化誘導は、骨芽細胞における RANKL の発現と OPG 産生の相互バランスにより制御されていることが知られている。そこで、MIF が E1 細胞における RANKL と OPG の発現にどのような影響を及ぼしているのか検証を行った。RANKL の発現は、リアルタイム PCR 装置を用いて定量した。各 MIF 濃度における RANKL の発現量は、MIF $0\ \mu\text{g}/\text{ml}$ を 100% と換算した場合、MIF $0.01\ \mu\text{g}/\text{ml}$ では $88.6 \pm 29.4\%$ 、MIF $0.1\ \mu\text{g}/\text{ml}$ では $113.2 \pm 33.0\%$ 、MIF $1.0\ \mu\text{g}/\text{ml}$ では $115.6 \pm 15.9\%$ であり、各 MIF 濃度間における RANKL 発現量に有意差は認められなかった。E1 細胞から産生された OPG 量は、培養液を回収し免疫酵素測定法によって、定量を行った。全ての MIF 濃度群で、経時的に OPG 量が増加していることが確認された。しかし、各測定時間における OPG 産生量は、各 MIF 濃度間に有意差は確認されなかった。以上の結果から、MIF によって多核 TRAP 陽性細胞の出現が抑制された期序は、RANKL-RANK を介したシグナル経路とは別の期序が関与していることが判明した。つまり、MIF の標的細胞は、骨髄細胞である可能性が示唆された。

破骨細胞は、硬組織吸収能を有する多核の細胞であり、単核の破骨細胞同士が融合し多核の破骨細胞へと成熟することが知られている。そこで、TRAP 陽性細胞 1 個に含まれている核の数を測定し分類した結果、2 核以上の TRAP 陽性細胞の割合は、MIF を投与しない場合には 14.6% であったのに対し、 $0.1\ \mu\text{g}/\text{ml}$ の MIF を投与した場合では 9.5% であった。また、対照群では存在していた 6 核以上の TRAP 陽性細胞は、MIF を投与した群では存在していなかった。即ち核数の分布について、MIF 投与群で

は明らかに破骨細胞の多核化が抑制されている傾向が見られた。一方、単核の TRAP 陽性細胞も含めた全ての破骨細胞の核数を合計した場合、対照群が 529.0 ± 73.5 個であるのに対し、MIF 投与群では 538.7 ± 10.5 個であり、両者に差は認められなかった。以上の結果より、MIF は単核の破骨細胞までの分化過程には影響しないことが判明した。つまり、MIF 投与群で多核破骨細胞の出現数が減少した理由は、MIF が単核の破骨細胞同士の融合過程に作用し、多核の破骨細胞への成熟を阻害したためと推測された。

破骨細胞は融合して多核化するがその生理的意義は不明である。しかしながら象牙質切片上の吸収窩を観察した所、MIF 作用群では形成された吸収窩の大きさが明らかに小さかったことから、破骨細胞の多核化は、硬組織吸収効率と深く関連していることが示唆された。MIF は炎症性サイトカインとしての作用を有している一方で、細胞周期・分化・細胞増殖など細胞における重要な調節因子としての作用していることが判明している。今回の実験結果からも、MIF は、炎症部位における骨吸収因子ではなく、むしろ骨代謝の調節因子として作用しているものと考えられた。

MIF がどのような作用機序を介して破骨細胞の成熟を阻害するかは現在のところ不明であるが、生体内において MIF が破骨細胞の成熟を阻害することで骨吸収を抑制している可能性があることが示唆された。

本研究は、骨代謝における MIF の影響を検索した始めてのものである。本研究により、MIF が破骨細胞の分化・成熟段階に作用し、破骨細胞同士の融合過程を阻害することで破骨細胞の成熟を抑制していることが明らかになった。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 口 春 久

副 査 教 授 向 後 隆 男

副 査 教 授 鈴 木 邦 明

学 位 論 文 題 名

破骨細胞分化に対する

マクロファージ遊走阻止因子 (MIF) の影響について

—マウス骨髓細胞ならびに骨芽細胞の
共存培養条件下における MIF の作用—

審査は向後審査委員と鈴木審査委員が一同に会して、小口審査委員が個別に実施し、学位申請者に対し提出論文の内容とそれに関連する学科目について口頭試問の形式によって行われた。以下に、提出論文の要旨と審査の内容を述べる。

学位申請者は、破骨細胞の誘導過程において、炎症性サイトカインの1つであるマクロファージ遊走阻止因子 (MIF) がどのように作用するかについて検索を行った。MIF は、細菌感染などにおいて、感染部位でのマクロファージの遊走を阻止し、炎症部位にマクロファージを停滞させることで炎症、免疫反応を促進させる作用を有している。また MIF は、細胞の分化・増殖、免疫応答の調節因子および創傷治癒過程における重要な調節因子として働いていることが判明している。一方、破骨細胞は、骨代謝において重要な役割の一旦を担っている細胞であり、骨髓細胞由来のマクロファージ様細胞から分化することが知られている。しかし、MIF が破骨細胞にどのような作用を及ぼすか報告されていないため、学位申請者は以下の実験を行った。C57BL/6 マウスから骨髓細胞を採集し、マウス新生仔頭蓋冠由来の骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 細胞 (E1 細胞) 上に播種し、破骨細胞を誘導した。0.01 から 1.0 μ g/ml までの各濃度の MIF を培養液に添加し、細胞に作用させた。培養 6 日後に 10% 中性ホルマリン固定後に、酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ (TRAP) 染色を行い、多核 TRAP 陽性細胞を破骨細胞とし、各 MIF 濃度における TRAP 陽性多核細胞の発現数を計測した。また、破骨細胞の分化促進因子である RANKL と分化抑制因子である OPG の発現量をそれぞれ、リアルタイム PCR 法および酵素結合免疫測定法を用いて

測定した。この他、走査型電子顕微鏡を用いて、象牙質切片上に形成された吸収窩を観察し、誘導した破骨細胞の硬組織吸収能を評価した。

以上の方法によって得られた結果は次のとおりである。多核 TRAP 陽性多核破骨細胞の出現数は MIF 濃度に依存して減少していた。また、培養期間 6 日間を 3 分割しそれぞれの 2 日間に MIF を作用させたところ、培養中期に MIF を作用させた群において明らかに多核 TRAP 陽性細胞の発現数が減少していることが判明した。以上のことから、以下のことが考えられた。培養中期にあたる 3、4 日目は、単核破骨細胞同士が融合し、多核破骨細胞と成熟する期間に相当する。このことから、MIF は破骨細胞の融合過程に作用し、多核 TRAP 陽性細胞の発現を抑制している可能性が示唆された。一方、破骨細胞の分化誘導は、支持細胞である E1 細胞が発現する破骨細胞誘導調節因子である RANKL と OPG によって制御されている。そこで、E1 細胞における RANKL と OPG の発現を検索した。その結果、E1 細胞における RANKL の mRNA 発現量および OPG の産生量に、MIF の影響は確認されなかった。すべての単核・多核も含めた TRAP 陽性細胞総てに含まれている細胞数と核数について測定したところ、MIF 投与群では多核の TRAP 陽性細胞が少なくなる傾向がみられ、特に 5 核以上の TRAP 陽性細胞は存在していなかった。MIF 投与群では明らかに多核傾向が抑制されていた。しかし、全ての破骨細胞の核数を総計すると、対照群および MIF 投与群では核の総数に有意差は確認されなかった。以上の実験結果から、MIF は、単核の破骨細胞同士の融合過程に直接作用し、多核の破骨細胞への成熟を阻害すると考えられた。破骨細胞は融合して多核化するがその生理的意義は不明である。しかしながら象牙質切片上の吸収窩を観察した所、MIF 作用群では形成された吸収窩の大きさが明らかに小さかったことから、破骨細胞の多核化は、硬組織吸収効率と深く関連していることが示唆された。

学位申請者に対して論文内容に関連する質問が行われた。主な質問事項は以下のとおりである。1) MIF のレセプターについての最新の知見、2) 臨床応用に対する可能性について、3) 破骨細胞の成熟の定義と生理的意義について、4) MIF の作用機序がどこまで解明されているか、以上の質問に対しそれぞれ適切な回答が得られた。

本研究は、破骨細胞の分化過程における MIF の影響を検索した初めてのものであり、破骨細胞の成熟のメカニズムの解明の一端を明らかにした。本研究は、MIF の破骨細胞の分化・成熟段階における作用について明瞭にした点が評価された。さらに、学位申請者は破骨細胞の融合過程における機構について、さらなる詳細な解析の準備を進めており、将来の展望についても評価された。

したがって、学位申請者は博士（歯学）の学位授与に相応しい者と認められた。