

RANKL による RAW264.7 細胞の 破骨細胞分化に伴うアポトーシスの誘導

学位論文内容の要旨

緒言

骨組織は破骨細胞による吸収と骨芽細胞による形成とを繰り返すことで一定の骨量を維持している。この機能バランスが崩れると様々な病的な骨変化をもたらすことが知られている。1998 年、破骨細胞の分化と機能を調節する破骨細胞分化因子 receptor activator of nuclear factor κ B ligand (RANKL) が同定された。破骨細胞前駆細胞は RANKL を認識し、colony-stimulating factor-1 (CSF-1) の存在下で破骨細胞に分化する。破骨細胞前駆細胞から分化した単核の破骨細胞は融合して多核の巨細胞を形成して骨を吸収する。破骨細胞による骨吸収の亢進は、破骨細胞あたりの骨吸収活性が亢進すること、破骨細胞の数が増加することおよび破骨細胞の寿命が長くなることによると考えられるが、破骨細胞の寿命については不明な点が多い。そこで未だよく理解されていない破骨細胞の分化と細胞死の関係について検索した。

材料と方法

RT-PCR法でRANKL細胞外ドメインの遺伝子をプラスミド pGEXに導入し、pGEX-RANKLを作成し、BL21 pLysS に可溶性RANKL (sRANKL) を発現させて回収した。マウスマクロファージ様細胞株であるRAW264.7 (RAW) 細胞は、 1×10^4 個/cm²になるように調整して10 %FBSおよび各種濃度のsRANKLを添加した α MEMを用いて通法に従い培養した。一定の期間培養した細胞を10 %中性ホルマリン溶液にて固定し、通法により酒石酸耐性酸性ホスファターゼ (TRAP) 染色を行った。2核以上のTRAP陽性多核細胞を破骨細胞とした。マンモス牙由来の象牙質切片上にRAW細胞を同様の条件で、sRANKL 200 ng/mlを加えて培養し、培養8日後に象牙質切片を回収後、走査型電子顕微鏡で観察した。培養液にsRANKL 200 ng/mlを加えた添加群と非添加群で、培養2、4、6日目にCell Counting Kit-8を用いて生

存細胞数、CytoTox-One™ Homogeneous Membrane Integrity Assayを用いて乳酸脱水素酵素(LDH) 活性およびCaspase-Glo™3/7 Assayを用いてCaspase3/7活性を測定した。同様な条件下で、培養2、4、6日目にそれぞれの細胞から通法に従ってDNAを回収し、臭化エチジウム含有1%アガロースゲルで電気泳動した。また、培養2、4、6日目に細胞を10 %中性ホルマリン溶液にて固定後、Apop Tag®ペルオキシダーゼを用いて、TUNEL染色およびTRAP染色の二重染色を行った。

結果

今回精製したsRANKLはRAW細胞をTRAP染色陽性多核細胞に分化させることを確認した。さらに、誘導されたTRAP陽性多核細胞は象牙質切片上に多数の吸収窩を形成し、骨の吸収能を有することから、これらの細胞は破骨細胞であることが確認された。sRANKLの濃度依存的な効果を評価するために、sRANKL濃度を0～2000 ng/mlで培養液に添加し、培養6日目にTRAP陽性多核細胞数を測定した。0～5 ng/mlではTRAP陽性多核細胞は確認できなかったが、20 ng/mlより確認され、sRANKLの濃度依存的にその数が増加した。また、sRANKL濃度を200 ng/mlと500 ng/mlで10日間培養し、TRAP陽性多核細胞数を測定した。両条件ともにTRAP陽性多核細胞数は6日目をピークに増加した後減少し、10日目にはほとんど確認できなかった。このTRAP陽性多核細胞数の減少について調べるために、生存細胞数、LDH活性、Caspase活性を測定した。sRANKL濃度を200 ng/mlで培養液に添加し、培養2、4、6日目のそれぞれにおけるsRANKL非添加群を100 %として、RANKL添加群の生存細胞数を比較した。培養2日目の生存細胞数はRANKL非添加群とほぼ同じであったが、培養4日目で約70 %、培養6日目で約45 %と減少していた。LDH活性の測定結果では、2日目、4日目においてsRANKL添加群と非添加群ともに有意な差は認められなかったが、6日目において非添加群に比べ添加群で上昇傾向を示した。Caspase3/7活性の測定結果では、sRANKL添加群におけるCaspase3/7活性は4日目に上昇し、6日目にはさらに増加した。これらの結果より、アポトーシスの誘導が推測されたので、同様な条件下でDNAの断片化を確認した。sRANKL非添加群ではDNAの断片化を認めなかったが、sRANKL添加群の6日目よりDNAのラダーが確認された。TUNEL染色とTRAP染色の2重染色を行ったところ、sRANKL非添加群ではTRAP陽性細胞、TUNEL陽性細胞はともに認めなかった。sRANKL添加群の4日目にはTRAP陽性多核細胞を認めたが、TUNEL陽性細胞は認めなかった。しかし、培養6日目のTRAP陽性多核細胞にTUNEL染色陽性を認めた。

考察

sRANKL 200 ng/ml、500 ng/ml の濃度において、培養 6 日目をピークに TRAP 陽性多核細胞数が減少した。TRAP 陽性細胞の融合の結果、細胞数が減少している可能性も考えられるが、生存細胞数の減少および TRAP 陽性多核細胞が認められなくなったことから細胞死が生じていることが考えられた。また、sRANKL 濃度が 200 ng/ml と 500 ng/ml の結果で TRAP 陽性多核細胞数に差が生じたが、その傾向に違いが認められなかったことから、sRANKL 濃度の違いによって TRAP 陽性多核細胞数の減少が早まる可能性は少ないと考えられた。培養 4 日目に Caspase3/7 活性の上昇が始まり、アポトーシスの誘導が開始していることを示唆した。TRAP 陽性多核細胞がピークとなる培養 6 日目には DNA の断片化を認め、いくつかの細胞の核は TUNEL 染色陽性を示した。これらの Caspase3/7 活性はさらに上昇し、LDH 活性も上昇傾向を示した。LDH は細胞膜破壊とともに上昇するためネクローシスによっても上昇するが、6 日目の LDH 上昇は培養 4 日目にアポトーシスが開始した細胞死によるものと推測される。以上の結果から、sRANKL が作用した RAW 細胞では破骨細胞に分化する過程ですでにアポトーシスの誘導が始まり、成熟した破骨細胞は速やかにアポトーシスを生じることが示唆された。

結語

1. GST (Glutathione-S-transferase) 融合タンパク質として作成した sRANKL は RAW 細胞を破骨細胞に分化させた。
2. sRANKL の濃度依存的に破骨細胞数が増加した。
3. sRANKL を加えて一定期間培養した破骨細胞の数は日数とともに増加しピークを迎えた後は減少した。
4. sRANKL により RAW 細胞は破骨細胞へ分化すると同時にアポトーシスを誘導した。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 北 川 善 政

副 査 教 授 鈴 木 邦 明

副 査 教 授 田 村 正 人

学 位 論 文 題 名

RANKL による RAW264.7 細胞の 破骨細胞分化に伴うアポトーシスの誘導

審査は、審査委員全員の出席の下に口頭試問の形式により行われた。申請者に対して提出論文とそれに関連した学科目について試問を行った。審査論文の概要は以下の通りである。

骨組織は破骨細胞による吸収と骨芽細胞による形成とを繰り返すことで一定の骨量を維持しているが、破骨細胞の寿命については不明な点が多い。本研究は、破骨細胞の基礎研究として、破骨細胞の分化と細胞死の関係について検討したものである。

初めに、単球系細胞を破骨細胞に分化させる重要な因子 receptor activator of nuclear factor κ B ligand (RANKL) を分子生物学的手法で大腸菌に作製させ精製した。次にこの RANKL はマクロファージ様細胞株である RAW 細胞を破骨細胞のマーカーである酒石酸耐性酸性ホスファターゼ (TRAP) 染色に陽性の多核細胞に分化させることを確認した。この TRAP 陽性多核細胞は象牙質切片上に多数の吸収窩を形成し、骨の吸収能を有することから、これらの細胞は破骨細胞であることが確認された。RANKL の濃度依存的な効果を評価するために、RANKL 濃度を 0~2000 ng/ml で培養液に添加し、培養 6 日目に TRAP 陽性多核細胞数を測定した。0~5 ng/ml では TRAP 陽性多核細胞は確認できなかったが、20 ng/ml より確認され、RANKL の濃度依存的にその数が増加した。また、RANKL 濃度を 200 ng/ml と 500 ng/ml で 10 日間培養し、TRAP 陽性多核細胞数を測定した。両条件ともに TRAP 陽性多核細胞数は 6 日目をピークに増加した後減少し、10 日目にはほとんど確認できなかった。

この TRAP 陽性多核細胞数の減少について調べるために、生存細胞数、LDH 活性、Caspase 活性を測定した。RANKL 濃度を 200 ng/ml で培養液に添加し、培養 2、4、6 日目のそれぞれにおける RANKL 非添加群を 100 % として、RANKL 添加群の生存細胞数を Cell Counting Kit-8 を用いて比較した。培養 2 日目の生存細胞数は RANKL 非添加群とほぼ同じであったが、培養 4 日目で約 70 %、培養 6 日目で約 45 % と減少していた。CytoTox-One™ Homogeneous Membrane Integrity Assay を用いた LDH 活性の測定結果では、2 日目、4 日目において RANKL 添加群と非添加群ともに有意な差は認められなかったが、6 日目において非添加群に比べ添

加群で上昇傾向を示した。Caspase-GloTM3/7 Assay を用いた Caspase3/7 活性の測定結果では、RANKL 添加群における Caspase3/7 活性は4日目に上昇し、6日目にはさらに増加した。これらの結果より、アポトーシスの誘導が推測されたので、同様な条件下で DNA の断片化を確認した。RANKL 非添加群では DNA の断片化を認めなかったが、RANKL 添加群の6日目より DNA のラダーが確認された。TUNEL 染色と TRAP 染色の2重染色を行ったところ、RANKL 非添加群では TRAP 陽性細胞、TUNEL 陽性細胞はともに認めなかった。RANKL 添加群の4日目には TRAP 陽性多核細胞を認めたが、TUNEL 陽性細胞は認めなかった。しかし、培養6日目の TRAP 陽性多核細胞に TUNEL 染色陽性を認めた。

この実験の結果より、RANKL200 ng/ml、500 ng/ml の濃度において、培養6日目をピークに TRAP 陽性多核細胞数が減少した。TRAP 陽性細胞の融合の結果、細胞数が減少している可能性も考えられるが、生存細胞数の減少および TRAP 陽性多核細胞が認められなくなったことから細胞死が生じていることが考えられた。また、RANKL 濃度が 200 ng/ml と 500 ng/ml の結果で TRAP 陽性多核細胞数に差が生じたが、その傾向に違いが認められなかったことから、RANKL 濃度の違いによって TRAP 陽性多核細胞数の減少が早まる可能性は少ないと考えられた。培養4日目に Caspase3/7 活性が上昇することから、アポトーシスの誘導が開始していることが示唆され、TRAP 陽性多核細胞がピークとなる培養6日目には DNA の断片化を認め、いくつかの細胞の核は TUNEL 染色陽性を示した。これらの Caspase3/7 活性はさらに上昇し、LDH 活性も上昇傾向を示した。LDH は細胞膜破壊とともに上昇するためネクロシスによっても上昇するが、6日目の LDH 上昇は培養4日目にアポトーシスが開始した細胞死によるものと推測される。よって RANKL が作用した RAW 細胞では破骨細胞に分化する過程ですでにアポトーシスの誘導が始まり、成熟した破骨細胞は速やかにアポトーシスを生じることが示唆された。

論文審査にあたって、論文申請者による研究要旨の説明後、本研究ならびに関連する研究について口頭試問を行った。主な質問事項は、1)細胞増殖と分化の違い、2)DNA の断片化の機序、3)単球/マクロファージから破骨細胞が誘導される機序、4) 可溶性 RANKL の性質と RANKL の作成方法、等であった。これらの質問に対して申請者から適切かつ明快な回答、説明が得られ、研究の立案と遂行、結果の収集とその評価について申請者が十分な能力を有していることが確認された。本研究は、RANKL による破骨細胞への分化と同時にアポトーシス誘導の可能性を示したものであり、その内容が高く評価された。申請者は、関連分野にも幅広い学識を有していると認められ、さらに発展的研究へのモチベーションも高く将来性についても評価された。本研究業績は再生治療のみならず関連領域にも寄与すること大であり、博士（歯学）の学位に値するものと認められた。