

# 骨芽細胞を介した破骨細胞形成系における カルシウムの役割解明に関する研究

昭和大学歯学部生化学 新 木 敏 正

## 要 約

骨の内部では、骨芽細胞と破骨細胞によって常に骨基質の吸収と形成が繰り返されている。本研究では、骨芽細胞と破骨細胞によって営まれる骨の代謝に骨の主成分であるカルシウムがどのような役割を果たしているのか解析した。マウスの骨髄細胞と骨芽細胞を共存培養すると、ごく少数の破骨細胞が形成された。しかし、高濃度のカルシウムや、細胞内カルシウム上昇剤であるイオノフォア (A23187) で処理すると、濃度依存的に破骨細胞の形成が増加した。骨芽細胞における破骨細胞分化因子 (RANKL) の遺伝子発現を調べたところ、培養液のカルシウム濃度の上昇に伴って発現レベルが上昇した。細胞内カルシウム上昇剤も同様にRANKLの発現を上昇させた。免疫抑制剤であるFK506は、カルシウムシグナルによって誘発されるRANKL遺伝子の発現とそれに伴う破骨細胞形成を強く抑制した。FK506はカルシウム依存的シグナル伝達物質であるカルシニューリンの活性化を抑えることから、RANKLの発現にはカルシウム-カルシニューリンを介したシグナル伝達経路が関与していることが示唆された。これらの結果は、骨代謝における破骨細胞形成調節にカルシウムとそれによって活性化されるカルシニューリンが非常に重要であることを意味する。

キーワード：骨、カルシウム、破骨細胞、骨芽細胞、遺伝子発現

## 1. 研究の背景と目的

### (1) 骨における破骨細胞の役割

骨は生体の支持組織として荷重を支える役割とともに、その構成成分であるカルシウムの貯蔵庫としての機能を果たしている。これらの役割を果たすために、骨組織は一生涯、形成と吸収を繰り返している。骨形成と骨吸収は、それぞれ間葉系細胞に由来する骨芽細胞と造血系細胞由来の破骨細胞が担っており、この一連の現象は骨の再構成 (リモデリング) と呼ばれている (Frost 1973, Athanason *et al.* 1996, Bilezikian *et al.* 1996)。リモデリングにより古い骨は新しい骨に置き換えられ、骨全体としての強度が保たれている。

近年の急激な高齢化社会への移行に伴い日本でも社会問題化している骨粗鬆症は、破骨細胞による過剰な骨吸収や骨芽細胞による骨形成の低下など、骨のリモデリングのバランスが崩れることにより引き起こされると考えられる (Oursler *et al.* 1991, Tobias *et al.* 1991)。

## (2) 破骨細胞の形態と機能

破骨細胞は骨組織のみに存在し、高度に石灰化された骨組織を破壊・吸収する唯一の細胞である。骨吸収能をもった破骨細胞 (Fig. 1) は極性を示し、骨表面に接した部分に波状縁 (ruffled border) という刷毛状の膜構造とそれを取り囲むアクチンに富んだ明帯 (clear zone) を形成する (Vaananen and Zhao 2002)。明帯により吸盤のように骨表面へ接着した破骨細胞は、波状縁からプロトン ( $H^+$ ) とプロテアーゼを分泌し、石灰化基質の脱灰と骨基質タンパクの分解を効率よく行う (Suda *et al.* 1997b, Baron *et al.* 1989, Vaananen and Zhao 2002)。プロトンは波状縁に多数存在する液胞型プロトンポンプにより分泌される (Blair *et al.* 1989, Vaananen *et al.* 1990)。また、カテプシンKなどのプロテアーゼは細胞内に多数存在するミトコンドリア、ゴルジ装置、ライソゾームにより合成、分泌される (Tezuka *et al.* 1994)。このように骨吸収を行うよう特殊化した破骨細胞は他の細胞には見られない形態的、機能的な特徴を有する。

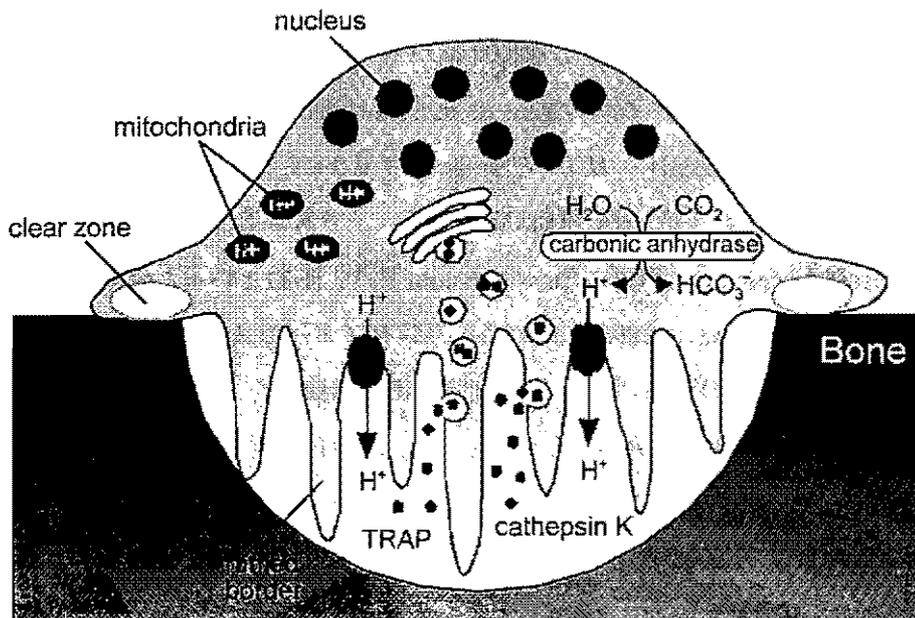


Fig. 1 破骨細胞の形態と機能

骨吸収をおこなう破骨細胞は骨表面に接した部分に波状縁 (ruffled border) とそれを取り囲むアクチンに富んだ明帯 (clear zone) を形成する。明帯により骨表面へ接着した破骨細胞は、波状縁からプロトン ( $H^+$ ) とプロテアーゼを分泌し、石灰化基質を脱灰し骨基質タンパクを分解をする。プロトン ( $H^+$ ) は波状縁にある液胞型プロトンポンプにより分泌され、カテプシンKなどのプロテアーゼは細胞内には多数存在するミトコンドリア、ゴルジ装置、ライソゾームにより合成、分泌される。

## (3) 破骨細胞の起源

破骨細胞は造血幹細胞 (pluripotent hematopoietic stem cell : PHSC) に由来することが明らかとなっている (Ash *et al.* 1980, Kurihara *et al.* 1989, Scheven *et al.* 1986, Udagawa *et al.* 1990)。多分化能を持つ造血幹細胞は様々なサイトカインの作用によりT細胞、B細胞、赤血球、顆粒球などに分化するが、破骨細胞への分化はIL (interleukin) -3やGM-CSF (granulocyte-macrophage colony

stimulating factor)、M-CSF (macrophage colony stimulating factor) などのサイトカインや骨芽細胞の支持により誘導される (Suda *et al.* 1992, 1995, Stanley *et al.* 1994)。破骨細胞の前駆細胞は非特異性エステラーゼやMac-1、Mac-2といったマクロファージの発現する表現型を示すことから、分化過程もマクロファージに近いと考えられている (Kurihara *et al.* 1990, Johnston *et al.* 1988)。破骨細胞の前駆細胞は単核破骨細胞へ分化し、融合して多核の破骨細胞を形成する過程において、TRAP (tartrate resistant acid phosphatase) やCTR (calcitonin receptor) などの破骨細胞特有の表現型を発現するとともに、いくつかのマクロファージの表現型が消滅する (Takahashi *et al.* 1994)。

#### (4) 骨芽細胞による破骨細胞形成の制御機構

破骨細胞の分化および機能発現は、骨芽細胞によって厳格に調節されている (Fig. 2) (Suda *et al.* 1999)。すなわち骨芽細胞は、破骨細胞分化の必須因子であるM-CSFと破骨細胞分化因子ODF/RANKL [osteoclast differentiation factor / receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand (以下RANKLと略す)] を産生し、破骨細胞形成を誘導する (Yasuda *et al.* 1998b, Lacey *et al.* 1998, Suda *et al.* 1999, Takahashi *et al.* 1999)。また一方で、分泌型タンパクとしてRANKLのデコイレセプターであるOPG/OCIF [osteoprotegerin / osteoclastogenesis inhibitory factor (以下OPGと略す)] を産生して、破骨細胞の形成を抑制する (Tsuda *et al.* 1997, Simonet *et al.* 1997, Yasuda *et al.* 1998a)。M-CSFは骨芽細胞により恒常的に産生されるが、RANKLは膜結合型因子であり活性型ビタミンD ( $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ) やPTH (parathyroid hormone)、 $\text{PGE}_2$  (prostaglandin  $\text{E}_2$ )、IL-11といった骨吸収因子の刺激により発現が促進される (Yasuda *et al.* 1998a)。RANKLのレセプターであるRANK (receptor activator of NF- $\kappa$ B) を発現する破骨細胞前駆細胞は、骨芽細胞と細胞間接触を介してRANKLを認識し破骨細胞に分化する (Suda *et al.* 1999)。また分化した破骨細胞もRANKを発現しており、RANKLからの刺激

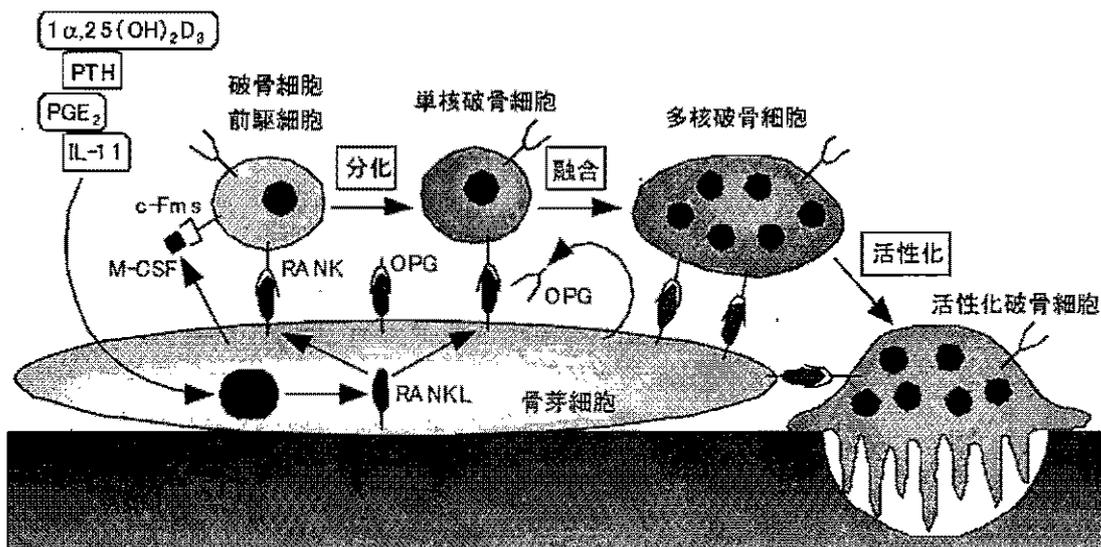


Fig. 2 骨芽細胞による破骨細胞形成の制御機構

骨吸収因子の刺激により骨芽細胞膜上にRANKLの発現が誘導される。RANKを発現する破骨細胞前駆細胞は骨芽細胞との細胞間接触を介して単核破骨細胞に分化する。さらにRANKLは単核破骨細胞の延命や融合、多核破骨細胞の活性化を誘導する。骨芽細胞から分泌されるOPGはRANKLのデコイレセプターとしてそれぞれの過程を阻害する。

により骨吸収活性が誘導される (Jimi *et al.* 1999a)。

骨芽細胞の非存在下においても、M-CSFと可溶性RANKLを造血細胞の単独培養系に添加すると破骨細胞が形成される (Yasuda *et al.* 1998a)。このときRANKLのデコイレセプターであるOPGを添加すると、破骨細胞形成は完全に抑制される。このように破骨細胞の分化や機能発現は骨芽細胞が産生するRANKLとOPGにより調節されていると考えられる。

#### (5) 骨芽細胞におけるRANKL発現の制御機構

先に述べたように、骨吸収因子である $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ やPTH、 $\text{PGE}_2$ 、IL-11などは骨芽細胞におけるRANKLの発現を促進することが知られている (Fig. 3) (Yasuda *et al.* 1998a)。 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ は $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ レセプター (VDR) を介し、IL-11やIL-6はgp130を介してRANKLの発現を上昇させる。また、PTHや $\text{PGE}_2$ のレセプターからのシグナルはcAMP (cyclic adenosine 3',5'-monophosphate) を介してRANKL発現を促進する。同時に $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ やPTH、 $\text{PGE}_2$ は骨芽細胞によるOPGの産生を抑制し、破骨細胞形成を促進する。

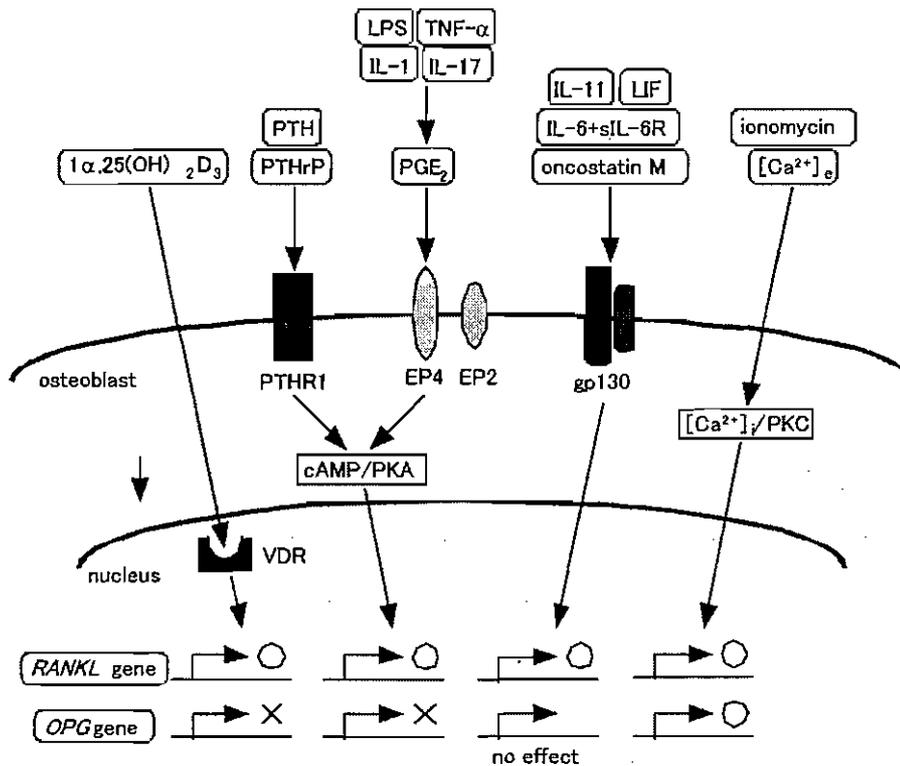


Fig. 3 骨芽細胞におけるRANKLおよびOPG遺伝子発現の調節機構

骨芽細胞におけるRANKL遺伝子の発現は、少なくとも4つの独立したシグナル伝達系 (VDR、cAMP/PKA、gp130、[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>/PKCを介した経路) により誘導される。LPS、TNF- $\alpha$ 、IL-1およびIL-17などは $\text{PGE}_2$ の産生を介してRANKLの発現を促進する。また $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ やPTH、 $\text{PGE}_2$ は骨芽細胞によるOPG遺伝子発現を抑制する。EP:  $\text{PGE}_2$ レセプター、LIF: 白血病細胞阻害因子、PTHrP: 副甲状腺ホルモン関連ペプチド、PTHR: 副甲状腺ホルモンレセプター

#### (6) 研究の目的

最近我々は、ionomycin処理や細胞外カルシウム (Ca) 濃度の上昇により、骨芽細胞の細胞内Ca

レベルが上昇するとPKC (protein kinase C) が活性化され、それを介してRANKLの発現が促進されることを報告した (Takami et al. 1997, 2000)。これらの4つのシグナル伝達経路は互いに独立して骨芽細胞におけるRANKLの発現を制御していると考えられる。

本研究では、骨代謝におけるカルシウムの重要性を明らかにすることを目的として、我々が見いだした第4のRANKL誘導シグナルであるカルシウムの役割についてさらに詳細に解析した。その結果、カルシウムシグナルの下流には、カルシウム依存性のシグナル伝達因子であるカルシニューリンがRANKLの発現を調節していることが示唆された。

## 2. 材料と方法

### (1) マウス

5-7週齢のddy系統クリーンマウス (雄) および同系統の哺乳1日齢クリーンマウス、5-7週齢のC3H/HeNおよびC3H/HeJクリーンマウス (雄) は三共ラボサービス (浜松) より購入した。

### (2) 試薬および酵素

ナフトールAS-MXリン酸、およびFast red violet LB saltはSigma Chemical (St. Louis, MO) より、 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ およびN,N-ジメチルホルムアミド、細胞分散用酵素コラゲナーゼは和光純薬工業 (大阪) より購入した。細胞凍結保存液セルバンカーは十慈フィールド (東京)、デイスパーゼは合同酒清 (東京) より、cell matrix type I-A コラーゲンゲルは新田ゼラチン (大阪) より購入した。Human M-CSF (ロイコブロール) は吉富製薬 (大阪) より、Recombinant human RANKLはPepro Tech LTD. (London, UK) より購入した。

### (3) 培地および緩衝液

$\alpha$  MEM ( $\alpha$  Minimum Essential Medium) : 液体Minimum Essential Medium Eagle Alpha Modification (Sigma Chemical, St. Louis, MO) 500mlに、200 mM L-Glutamine (Sigma Chemical, St. Louis, MO) を10ml、100,000U/ml penicillin G (萬有製薬、東京) を500 $\mu$ l、200mg/ml streptomycin (明治製薬、東京) を250 $\mu$ l 添加した。さらにFBS (fetal bovine serum, JRH Biosciences, Lenexa, KS) を $\alpha$ MEM培地に補追して実験に用いた (以下、 $\alpha$  MEMと略した)。

PBS (Phosphate-Buffered Saline) : NaCl (8 g)、KCl (0.2 g)、 $\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  (0.9 g) 及び  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0.2 g) を1リットルの精製水に溶かした。さらに120°C、20分間オートクレーブ滅菌して用いた。

### (4) TRAP (Tartrate resistant acid phosphatase) 反応液

基質 (ナフトールAS-MXリン酸; 1 mg) をN,N-ジメチルホルムアミド (150ml) に溶かした。これに50 mM酒石酸ナトリウムを含む0.1M酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0, 10ml) を加え、さらに色素 (Fast red violet LB salt; 6 mg) を加えて調製した。反応液は用時調製した。

### (5) 形成された破骨細胞の同定 (TRAP染色法)

TRAP (Tartrate resistant acid phosphatase) は破骨細胞に特徴的な酵素として知られており、この酵素活性を利用して *in vivo* または *in vitro* において形成された破骨細胞を特異的に染色することができる。

培養系より培養液を吸引除去し、10%ホルマリンを含むPBSで細胞を15分間固定し、除去後さらにエタノール/アセトン (1:1) で1分間再固定した。固定液を除去し風乾させた後、TRAP反応液を加え、室温で15~30分間染色した。染色後、流水により染色液を除去し反応を停止した。

#### (6) マウス骨髄細胞

ddyおよびC3H/HeN、C3H/HeJマウス (5-7週齢, 雄) を頸椎脱臼により屠殺し、70%エタノールで消毒した。大腿骨及び脛骨部分の皮膚を切開し、付着筋肉を剥離した。続いて脛骨遠心部を切断し、股関節を脱臼させて大腿骨及び脛骨を摘出した。これらの骨に付着していた筋肉を全て除去し、膝蓋骨を脱臼させて下肢長骨 (脛骨, 大腿骨) を得た。両骨端を少しずつ切り落とし、求心端から針付き2.5mlシリンジ (22G×1 1/4, TERUMO, 東京) で1-2mlの $\alpha$  MEM培地を吹き入れ、骨髄細胞を培地中に押し出し、15mlの遠沈管 (Corning Incorporated, NY) に回収した。この骨髄細胞含有の $\alpha$  MEM培地を遠心分離 (1,000 rpm, 5分間) し、沈殿物中の赤血球を0.83% NH<sub>4</sub>Cl含有Tris-HCl緩衝液 (pH 7.5) に懸濁することによりバーストさせた。再度遠心分離 (1,000 rpm, 5分間) し、新鮮な $\alpha$  MEM培地 (約10ml) に懸濁した後、有核細胞数を算定した。この操作により、マウス1匹から約 $5 \times 10^7$ 個の細胞が得られた。これら一連の操作はクリーンベンチ内で行った。

#### (7) マウス骨芽細胞

哺乳1日齢のddyマウス約40匹を屠殺し、70%エタノールにより消毒した。頭蓋骨皮膚を剥離した後、頭蓋骨を摘出し、FBS-free  $\alpha$  MEM培地中で付着した筋肉及び血球を除去した。得られた頭蓋骨を50mlの遠沈管 (Corning Incorporated, NY) に回収し、酵素溶液 (0.1%コラゲナーゼ、0.2%ディスパーゼ/FBS-free  $\alpha$  MEM) 10mlを添加し、37°Cの恒温槽で5分間、100 min<sup>-1</sup>にて振とうさせた。この細胞浮遊画分は捨て、新しい酵素溶液10mlを添加して37°Cの恒温槽にて10分間振とうさせた。この操作を4回繰り返し、それぞれの細胞浮遊液を回収した。回収した細胞浮遊液を遠心分離 (1,000 rpm, 10分間) して細胞を回収し、20mlの $\alpha$  MEM培地を含む培養ディッシュ (直径100 mm, Corning Incorporated, NY) 中で6日間培養した。培養後PBS (pH 7.4) で洗浄し、0.02% trypsin-EDTAで10分間処理して細胞を回収した。得られた骨芽細胞は細胞凍結保存液セルバンカーに懸濁し (約 $4 \times 10^6$  cells/ml/vial)、-80°Cにて凍結保存した。

#### (8) Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

TRIzol reagent (Life Technologies Inc., Grand Island, NY) を用いて、MMacおよび破骨細胞からtotal RNAを抽出した。得られたRNA (3  $\mu$ g) よりSUPERScript II RNase H- Reverse Transcriptase (Life Technologies Inc., Grand Island, NY) を用いcDNAを合成した。RANKLおよびactin特異的プライマーとPfx DNA polymerase (Life Technologies Inc., Grand Island, NY) を用い、得られたcDNAを

鋳型としてPCRをおこなった。PCR産物を2%アガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイドにより染色した。

RANKL primer:

Sense: ccagccatttcacacctc

Antisense: agcaggggaagggttgaca

### 3. 結果

#### (1) カルシウム刺激による破骨細胞の分化誘導

培養液のカルシウム濃度が破骨細胞分化に与える影響について、マウスの骨髄細胞と骨芽細胞の共存培養法を用いて検討した (Fig. 4)。通常の培養液のカルシウム濃度 (1 mM) では、TRAP陽性細胞である破骨細胞がほとんど形成されなかった。しかし、3 mM以上のカルシウム濃度では濃度依存的に破骨細胞の形成が認められた (Fig. 4A, B)。一方、カルシウムと同じ2価イオンである $Mg^{2+}$ には破骨細胞の分化誘導活性は認められなかった (Fig. 4B)。このことから、カルシウムの刺激によって破骨細胞の形成が誘導されることがあきらかとなった。

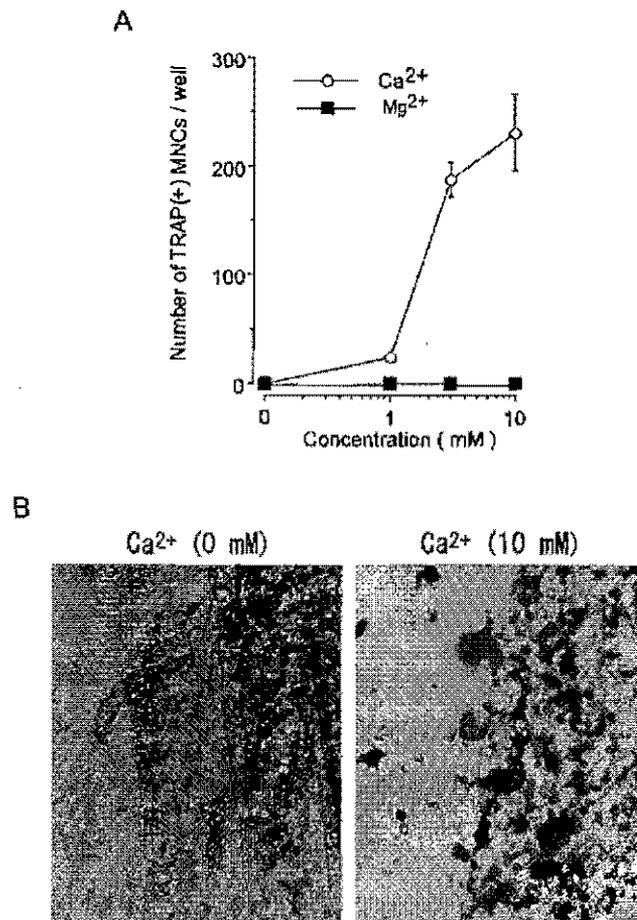


Fig. 4 高濃度のカルシウムによる破骨細胞の分化誘導

A,カルシウム濃度0, 1, 3, 10 mMの培養液中でマウスの骨髄細胞と骨芽細胞を6日間共存培養した。培養後、細胞を固定し、TRAP染色をおこなった。B, 赤く染まった細胞がTRAP陽性細胞 (破骨細胞) である。

## (2) 細胞内カルシウム上昇剤による破骨細胞の分化誘導

細胞外のカルシウム濃度上昇は、細胞内のカルシウムの上昇を引き起こすことから、A23187, CPAなどの細胞内カルシウム上昇剤を用いて細胞内カルシウムと破骨細胞形成の関係について検討した (Fig. 5)。その結果、A23187およびCPAは破骨細胞の分化を強力に誘導した。また、カルシウムによって活性化される細胞内シグナル伝達因子PKC (protein kinase C) をPMAによって強制的に活性化させたときも破骨細胞の分化が誘導された (Fig. 5)。以上の結果は、細胞内カルシウムレベルの上昇が破骨細胞の分化を誘導していることを示唆する。また、骨芽細胞存在下でのみこのような作用が認められたことから (データは示していない)、これらのカルシウム上昇剤のターゲットは、骨芽細胞であると予想された。

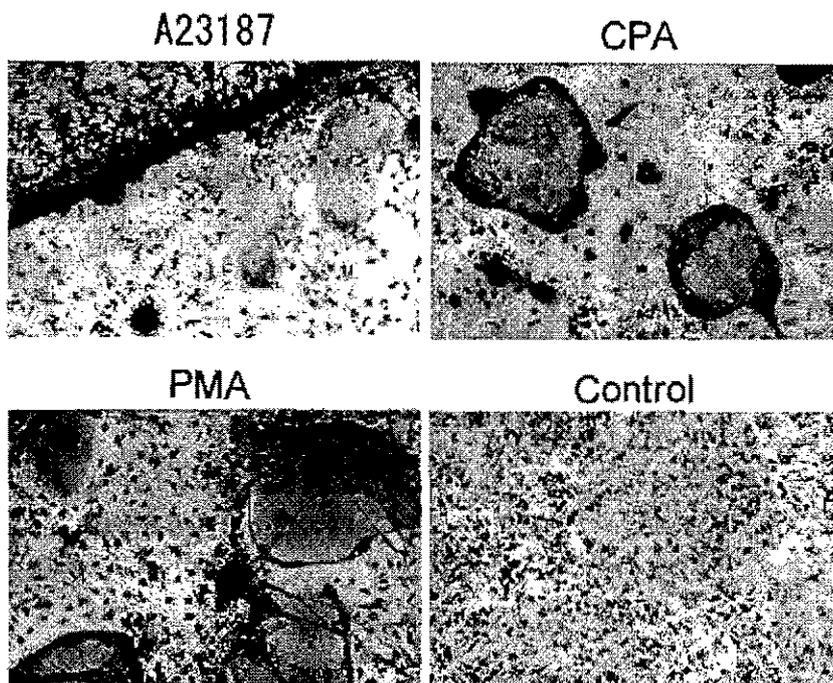


Fig. 5 細胞内カルシウム上昇剤による破骨細胞の分化誘導

共存培養3日目のマウスの骨髄細胞と骨芽細胞をA23187 (0.1  $\mu$ M), CPA (10  $\mu$ M), PMA (0.1  $\mu$ M) の存在下でさらに3日間共存培養した。培養後、細胞を固定し、TRAP染色をおこなった。赤く染まった細胞がTRAP陽性細胞 (破骨細胞) である。

## (3) 培養液中のカルシウムおよびA23187が細胞内カルシウムレベルに与える影響

細胞内カルシウムが破骨細胞分化誘導に関与していることを示唆する結果に基づき、骨芽細胞における細胞内カルシウムレベルの変化を解析した (Fig. 6)。骨芽細胞を細胞内カルシウム指示薬であるFluo-3 AMで前処理したあと、高濃度 (10 mM) のカルシウム溶液、またはA23187でさらに1分間処理した。細胞内カルシウム濃度の上昇は、フローサイトメトリーによって検出した。その結果、細胞内のカルシウムレベルは高濃度のカルシウム溶液やA23187の処理によって一過性に上昇した (Fig. 6)。これらの結果は、骨芽細胞において高濃度のカルシウムやカルシウム上昇剤が実際に細胞内カルシウムの上昇を引き起こしていることを意味する。

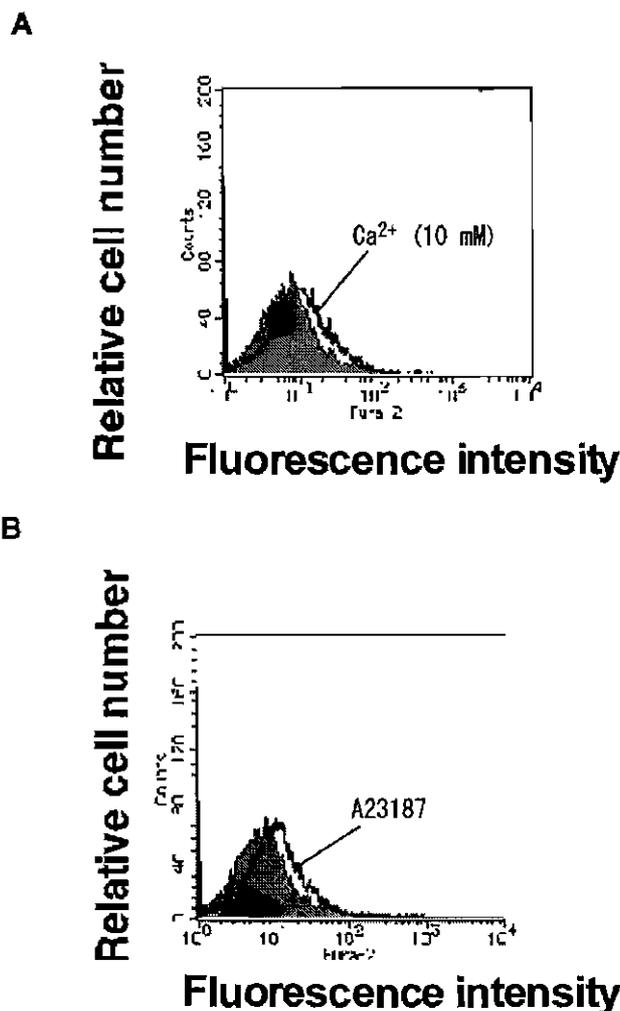


Fig. 6 高濃度の細胞外カルシウムおよびA23187処理による細胞内カルシウムレベルの変化  
 細胞内カルシウム指示薬Fluo3-AMで前処理した骨芽細胞を高濃度のカルシウム (10 mM) (A) あるいはA23187 (0.1  $\mu$ M) (B) で処理し、1分後フローサイトメトリーによって細胞内カルシウムレベルの変化を観察した。

#### (4) 骨芽細胞におけるRANKL mRNAの発現

破骨細胞の分化誘導因子であるRANKLの発現をRT-PCR法で解析した (Fig. 7)。高濃度のカルシウムで骨芽細胞を処理すると、RANKL mRNAの発現が上昇した (Fig. 7A)。同様に、A23187, CPA, PMAも骨芽細胞におけるRANKL mRNAの発現を誘導した (Fig. 7B)。これらの結果は細胞内カルシウムレベルの上昇やPKCの活性化は破骨細胞分化誘導因子であるRANKLの発現を介して破骨細胞形成を誘導していることを強く示唆する。

#### (5) カルシニューリン阻害剤による破骨細胞分化抑制

カルシウムシグナルに依存する経路としてカルシニューリン・カルモジュリン経路が知られている。このシグナル伝達経路の阻害剤であるFK506 (別名タクロリムス) およびサイクロスポリンAを用いてカルシウムシグナルの下流へのカルシニューリン経路の関与について検討した。FK506およびサイクロスポリンAで骨芽細胞を前処理し、高濃度のカルシウム溶液で処理すると、濃度に依存して破骨細胞形成は抑制された (Fig. 8)。同様に、A23187, CPA, およびPMAによって誘導される破

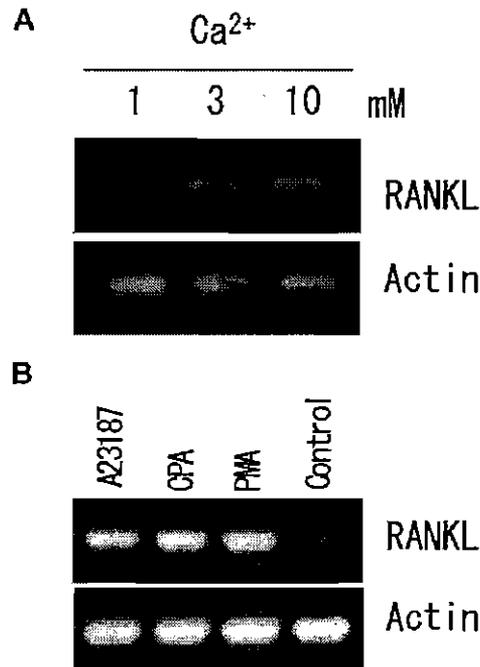


Fig. 7 細胞外カルシウム濃度および細胞内カルシウム上昇剤による骨芽細胞のRANKL mRNA発現の誘導  
骨芽細胞をカルシウム (1-3 mM) (A), A23187 (0.1  $\mu$ M), CPA (10  $\mu$ M), PMA (0.1  $\mu$ M) (B) で3時間処理し、RNAを抽出した。RANKLの発現レベルをRT-PCR法によって比較した。

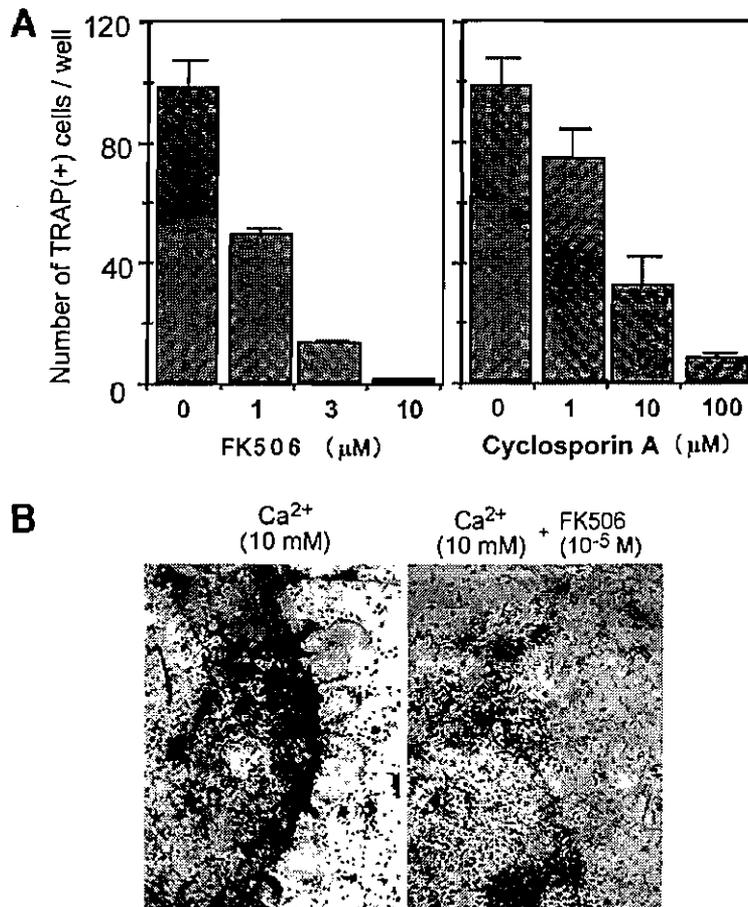


Fig. 8 高濃度のカルシウムによって誘導される破骨細胞形成に対するFK506およびサイクロスポリンAの作用  
FK506 (0-10  $\mu$ M), サイクロスポリンA (0-100  $\mu$ M) と10 mMのカルシウム存在下でマウスの骨髄細胞と骨芽細胞を培養した。6日後、細胞を固定し、TRAP染色をおこない、TRAP陽性多核細胞の数を数えた (A)。赤く染まっている細胞がTRAP陽性である (B)。

骨細胞形成もFK506によって強く抑制された (Fig. 9)。

さらに、骨芽細胞におけるRANKL mRNAの発現レベルについても検討した結果、FK506はカルシウムシグナルによって誘導されるRANKL mRNA発現レベルを強く抑えた (Fig. 10)。以上の結果は、カルシウム・PKCシグナルはカルシニューリン・カルモジュリン経路の活性化を介してRANKLの発現を誘導していることを示唆する。

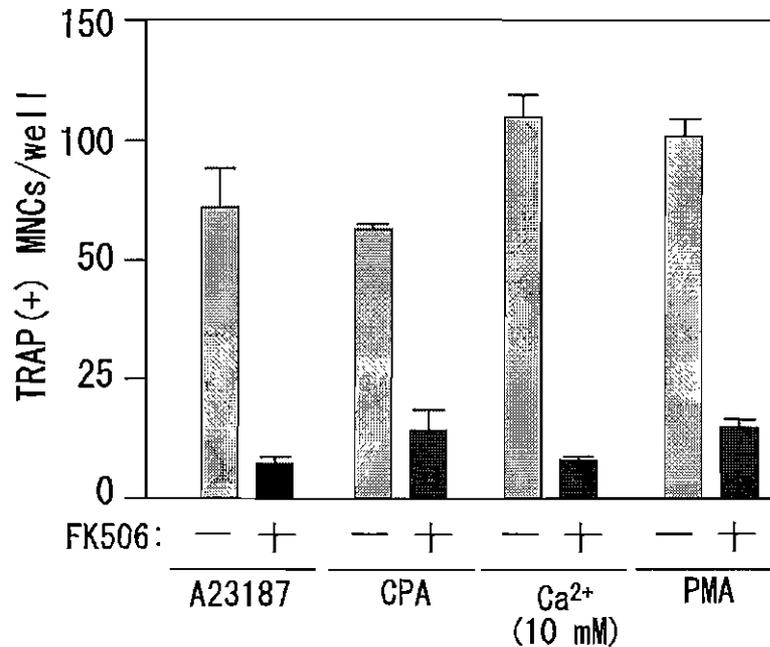


Fig. 9 細胞内カルシウム上昇剤によって誘導される破骨細胞形成に対するFK506の作用

共存培養3日目のマウスの骨髄細胞と骨芽細胞をFK506 (10 μM) および細胞内カルシウム上昇剤 [A23187 (0.1 μM), CPA (10 μM), PMA (0.1 μM)] の存在下でさらに3日間培養した。培養後、細胞を固定し、TRAP染色をおこない、TRAP陽性多核細胞の数を数えた。



Fig. 10 細胞内カルシウム上昇剤によって誘導されるRANKL mRNA発現に対するFK506の作用

骨芽細胞をFK506 (10 μM) で2時間前処理し、さらに細胞内カルシウム上昇剤 [A23187 (0.1 μM), CPA (10 μM), PMA (0.1 μM)] または高濃度のカルシウム (10 mM) で3時間処理した。RNAを回収後、RT-PCR法によってRANKL mRNAの発現レベルを比較した。

#### 4. 考 察

活性型ビタミンDやPTHなどの骨吸収因子と呼ばれる一連の生体内因子は、骨芽細胞を介して破骨細胞の分化を誘導することが知られている。しかしながら、どの因子が実際に破骨細胞の分化調節に関与しているのかほとんど明らかにされていない。我々は、既知の骨吸収因子とは異なる機序で破骨細胞の分化を調節する因子としてカルシウムを見いだした。今回の研究結果は、我々が最初に発見した破骨細胞の分化調節因子としてのカルシウムの重要性を示すとともに、カルシニューリンの関与を新たに示唆した。カルシニューリンはこれまで免疫細胞の機能発現において重要視されていた因子である。これはカルシニューリンが免疫調節だけでなく、骨代謝にも深く関与する因子であることを意味する。

カルシニューリンの活性化には細胞内のカルシウムレベルの上昇が必要である。これに伴って、転写因子であるNF-ATが脱リン酸化され、細胞質から核内へ移行する。免疫抑制剤として用いられているFK506は、カルシニューリンの活性化を阻害することが知られている。一方、PKCが活性化されると、AP-1が新規に合成・修飾され、NF-ATと複合体を形成して機能する。サイクロスポリンAはこの複合体の核内への移行を阻害する [Jain et al. 1992]。我々は、カルシウムシグナルと同様に、PKCの活性化もRANKLの発現を誘導すること、そして、FK506がRANKLの発現を抑制することを示した。このことは、カルシウムシグナルとPKCの活性化の下流に、カルシニューリンの活性化が存在することを示唆するとともに、RANKLの遺伝子発現がAP-1/NF-AT複合体によって転写制御されていることを強く示唆する。

最近、骨髄細胞に由来する破骨細胞の前駆細胞においても破骨細胞への分化の過程でNF-ATが必須であることが報告された [Takayanagi et al. 2002]。今回の我々の実験結果は、破骨細胞の前駆細胞ではなく、骨芽細胞を対象としたものであるため細胞は異なる。しかし、前駆細胞においても骨芽細胞においてもカルシニューリンが破骨細胞分化において重要な役割を担っているということは非常に興味深い。これまでの骨粗鬆症治療薬は破骨細胞の骨吸収機能を阻害するものが主で、分化を阻害するものはまだ開発されていない。したがって、FK506は現在免疫抑制剤として用いられているが、破骨細胞の分化を阻害することによって骨粗鬆症を改善する作用があるかもしれない。

今回の我々の結果は、細胞外のカルシウム濃度の上昇が破骨細胞の分化を誘導することを示唆した。しかしながら、一般に細胞内カルシウムシグナルは細胞外カルシウムの上昇だけでなく、下降によっても引き起こされ、同様の遺伝子発現調節がなされることが知られている [Jorgensen et al. 1997]。また、いくつかのサイトカインやホルモンは細胞内カルシウムレベルを上昇させることも報告されている。さらに、骨芽細胞がメカニカルストレスを受けると、骨芽細胞間のギャップジャンクションを介してカルシウムシグナルが誘発される [Jorgensen et al. 1997]。このように、骨芽細胞の細胞内カルシウムシグナルが誘発される条件はいくつも想定することができる。特に骨芽細胞や破骨細胞が存在する骨基質はカルシウムを多く含んでいることから、骨基質自身が破骨細胞の分化誘導に関与している

可能性もある。今後、カルシウムシグナルがどのような刺激によって引き起こされているのか判明すれば、骨代謝におけるカルシウムの重要性和位置づけがより明確なものになるであろう。

## 5. 参考文献

Akatsu T, Tamura T, Takahashi N, Udagawa N, Tanaka S, Sasaki T, Yamaguchi A, Nagata N, Suda T. 1992. Preparation and characterization of a mouse osteoclast-like multinucleated cell population. *J Bone Miner Res* 7 : 1297-1306.

Arai F, Miyamoto T, Ohneda O, Inada T, Sudo T, Brasel K, Miyata T, Anderson DM, Suda T. 1999. Commitment and differentiation of osteoclast precursor cells by the sequential expression of c-Fms and receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B (RANK) receptors. *J Exp Med* 190 : 1741-1754.

Ash P, Loutit JF, Townsend KM. 1980. Osteoclasts derived from haematopoietic stem cells. *Nature*. 1980 283 : 669-670.

Athanasou NT. 1996. Cellular biology of bone-resorbing cells. *J Bone Joint Surg* 78-A : 1096-1112.

Baron R. 1989. Molecular mechanisms of bone resorption by the osteoclast. *Anat Rec* 224 : 317-324.

Bilezikian JP, Raisz L G, Rodan GA. 1996. Principles of Bone Biology. Academic Press. San Diego, CA, USA. pp. 87-102.

Blair HC, Teitelbaum SL, Ghiselli R, Gluck S. 1989. Osteoclastic bone resorption by a polarized vacuolar proton pump. *Science*. 245 : 855-857.

Darnay BG, Haridas V, Ni J, Moore PA, Aggarwal BB. Characterization of the intracellular domain of receptor activator of NF- $\kappa$ B (RANK). 1998.

Frost HM. 1973. Metabolism of bone. *N Engl J Med*. 289 : 864-865

Fuller K, Owens J M, Jagger C J, Wilson A, Moss R, Chambers T J. 1993. Macrophage colony-stimulating factor stimulates survival and chemotactic behavior in isolated osteoclasts. *J Exp Med*. 178 : 1733-1744.

- Hofbauer LC, Lacey DL, Dunstan CR, Spelsberg TC, Riggs BL, Khosla S. 1999. Interleukin-1 $\beta$  and tumor necrosis factor- $\alpha$ , but not interleukin-6, stimulate osteoprotegerin ligand gene expression in human osteoblastic cells. *Bone* 25 : 255-259.
- Jain J, McCaffrey PG, Valge-Archer VE, Rao A. 1992. Related Articles, Nuclear factor of activated T cells contains Fos and Jun. *Nature*. 30; 356(6372): 801-4.
- Jimi E, Akiyama S, Tsurukai T, Okahashi N, Kobayashi K, Udagawa N, Nishihara T, Takahashi N, Suda T. 1999a. Osteoclast differentiation factor acts as a multifunctional regulator in murine osteoclast differentiation and function. *J Immunol* 163:434-442.
- Jorgensen NR, Geist ST, Civitelli R, Steinberg TH. 1997 ATP- and gap junction-dependent intercellular calcium signaling in osteoblastic cells. *J Cell Biol.* Oct 20; 139(2): 497-506.
- Kahn AJ, Simmons DJ. 1975. Investigation of cell lineage in bone using a chimaera of chick and quail embryonic tissue. *Nature* 258:325-327.
- Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, Elliott R, Colombero A, Elliott G, Scully S, Hsu H, Sullivan J, Hawkins N, Davy E, Capparelli C, Eli A, Qian YX, Kaufman S, Sarosi I, Shalhoub V, Senaldi G, Guo J, Delaney J, Boyle WJ. 1998. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 93 : 165-176.
- Nakashima T, Kobayashi Y, Yamasaki S, Kawakami A, Eguchi K, Sasaki H, Sakai H. 2000. Protein expression and functional difference of membrane-bound and soluble receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand: modulation of the expression by osteotropic factors and cytokines. *Biochem Biophys Res Commun* 275 : 768-775.
- O'Brien CA, Gubrij I, Lin SC, Saylor RL, Manolagas SC. 1999. STAT3 activation in stromal/osteoblastic cells is required for induction of the receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand and stimulation of osteoclastogenesis by gp130-utilizing cytokines or interleukin-1 but not 1,25-dihydroxyvitamin D $_3$  or parathyroid hormone. *J Biol Chem* 274 :19301-19308.
- Scheven B A, Visser J W, Nijweide P J. 1986. In vitro osteoclast generation from different bone marrow fractions, including a highly enriched haematopoietic stem cell population. *Nature* 321 : 79-81.

- Schwartz Z, Goultschin J, Dean DD, Boyan BD. 1997. Mechanisms of alveolar bone destruction in periodontitis. *Periodontol* 2000 14 : 158-172.
- Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Luthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T, Shimamoto G, DeRose M, Elliott R, Colombero A, Tan HL, Trail G, Sullivan J, Davy E, Bucay N, Renshaw-Gegg L, Hughes TM, Hill D, Pattison W, Campbell P, Sander S, Van G, Tarpley J, Derby P, Lee R, Amgen EST program, Boyle WJ. 1997. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 89:309-319.
- Stanley E, Lieschke G J, Grail D, Metcalf D, Hodgson G, Gall J A, Maher D W, Cebon J, Sinickas V, Dunn A R. 1994. Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor-deficient mice show no major perturbation of hematopoiesis but develop a characteristic pulmonary pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91 : 5592-5596.
- Suda T, Takahashi N, Martin T J. 1992. Modulation of osteoclast differentiation. *Endocr Rev* 13 : 66-80.
- Suda T, Jimi E, Nakamura I, Takahashi N. 1997a. Role of  $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin  $D_3$  in osteoclast differentiation and function. *Methods Enzymol* 282:223-235.
- Suda T, Nakamura I, Jimi E, Takahashi N. 1997b. Regulation of osteoclast function. *J Bone Miner Res* 12 : 869-879.
- Suda T, Takahashi N, Udagawa N, Jimi E, Gillespie M T, Martin T J. 1999. Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr Rev* 20:345-357.
- Takahashi N, Udagawa N, Suda T. 1999. A new member of tumor necrosis factor ligand family, ODF/OPGL/TRANCE/RANKL, regulates osteoclast differentiation and function. *Biochem Biophys Res Commun* 256 : 449-455.
- Takahashi N, Udagawa N, Tanaka S, Murakami H, Owan I, Tamura T, Suda T. 1994. Postmitotic osteoclast precursors are mononuclear cells which express macrophage-associated phenotypes. *Dev Biol* 163 : 212-221.

- Takami M, Takahashi N, Udagawa N, Miyaura C, Suda K, Woo JT, Martin TJ, Nagai K, Suda T. 2000. Intracellular calcium and protein kinase C mediate expression of receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand and osteoprotegerin in osteoblasts. *Endocrinology* 141 : 4711-4719.
- Takami M, Woo JT, Nagai K. 1999. Osteoblastic cells induce fusion and activation of osteoclasts through a mechanism independent of macrophage-colony-stimulating factor production. *Cell Tissue Res* 298:327-334.
- Takami M, Woo JT, Nagai K. 1998. Requirement of osteoblastic cells for the fusion of osteoclasts. *J Bone Mineral Metab* 16:151-157.
- Takami M, Woo JT, Takahashi N, Suda T, Nagai K. 1997.  $Ca^{2+}$  inhibitors and  $Ca^{2+}$  ionophore induce osteoclast like cell formation in the cocultures of mouse bone marrow cells and calvarial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 237:111-115.
- Takayanagi H, Kim S, Koga T, Nishina H, Isshiki M, Yoshida H, Saiura A, Isobe M, Yokochi T, Inoue J, Wagner EF, Mak TW, Kodama T, Taniguchi T. 2002 Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts. *Dev Cell*. Dec; 3(6): 889-901
- Tezuka K, Nemoto K, Tezuka Y, Sato T, Ikeda Y, Kobori M, Kawashima H, Eguchi H, Hakeda Y, Kumegawa M. 1994. Identification of matrix metalloproteinase 9 in rabbit osteoclasts. *J Biol Chem* 269 : 15006-15009.
- Tsuda E, Goto M, Mochizuki S, Yano K, Kobayashi F, Morinaga T, Higashio K. 1997. Isolation of a novel cytokine from human fibroblasts that specifically inhibits osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 234 : 137-142.
- Udagawa N, Takahashi N, Akatsu T, Tanaka H, Sasaki T, Nishihara T, Koga T, Martin T J, Suda T. 1990. Origin of osteoclasts: mature monocytes and macrophages are capable of differentiating into osteoclasts under a suitable microenvironment prepared by bone marrow-derived stromal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87 : 7260-7264.

Udagawa N, Takahashi N, Katagiri T, Tamura T, Wada S, Findlay DM, Martin TJ, Hirota H, Taga T, Kishimoto T, Suda T. 1995. Interleukin (IL)-6 induction of osteoclast differentiation depends on IL-6 receptors expressed on osteoblastic cells but not on osteoclast progenitors. *J Exp Med* 182:1461-1468.

Vaananen H K, Karhukorpi E K, Sundquist K, Wallmark B, Roininen I, Hentunen T, Tuukkanen J, Lakkakorpi P. 1990. Evidence for the presence of a proton pump of the vacuolar H(+)-ATPase type in the ruffled borders of osteoclasts. *J Cell Biol* 111 : 1305-1311.

Wong BR, Besser D, Kim N, Arron JR, Vologodskaja M, Hanafusa H, Choi Y. 1999. TRANCE, a TNF family member, activates Akt/PKB through a signaling complex involving TRAF6 and c-Src. *Mol Cell* 4:1041-1049.

Wong BR, Josien R, Lee SY, Vologodskaja M, Steinman RM, Choi Y. 1998. The TRAF family of signal transducers mediates NF- $\kappa$ B activation by the TRANCE receptor. *J Biol Chem* 273 : 28355-28359.

Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Mochizuki SI, Yano K, Fujise N, Sato Y, Goto M, Yamaguchi K, Kuriyama M, Kanno T, Murakami A, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K. 1998a. Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): a mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis in vitro. *Endocrinology* 139:1329-1337.

Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, Mochizuki S, Tomoyasu A, Yano K, Goto M, Murakami A, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K, Udagawa N, Takahashi N, Suda T. 1998b. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 : 3597-3602.