



Title	顎骨におけるマクロファージ-破骨細胞系譜の制御機構
Author(s)	菊池, 堇
Citation	大阪大学, 2026, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/105333
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏 名 (菊 池 堇)

論文題名

顎骨におけるマクロファージ-破骨細胞系譜の制御機構

論文内容の要旨

【緒言】

ヒトの骨格は、部位によって発生学的起源や骨化様式、生体力学的・生理学的環境が大きく異なり、形態や機能が高度に多様化した組織群である。この骨組織多様性は、各骨の微小環境が骨代謝制御に及ぼす影響によってもたらされる。特に、マクロファージ系譜から分化する破骨細胞は、骨吸収を通じて骨代謝の恒常性維持に中心的役割を果たしており、その分化は局所環境に強く依存する。例えば、炎症性サイトカインが豊富な環境下では、活性化マクロファージからの破骨細胞分化が促進され、骨吸収が亢進することが知られている。

多くの骨組織が無菌的で安定した環境下にある一方、顎骨は歯を植立し、薄い歯肉にのみ覆われており、常に口腔内微生物叢からの持続的な抗原刺激と咀嚼などによる機械的刺激に曝露されている。このような環境下で、顎骨マクロファージは自然免疫の最前線として機能すると同時に、破骨前駆細胞として骨代謝を制御し、連続的な機能スペクトラム上に存在する。すなわち、顎骨では自然免疫応答と骨代謝が密接に関連し、口腔環境に適応した独自のマクロファージ-破骨細胞系譜の分化制御機構が存在することが示唆される。しかしながら、顎骨マクロファージの特性や、破骨細胞分化過程における転写制御ネットワーク、口腔環境因子による制御メカニズムなど、顎骨特異的な分子制御基盤は未解明である。

本研究の目的は、顎骨と他の骨組織における組織マクロファージおよび破骨細胞の遺伝子発現プロファイルを包括的に比較することで、顎骨特有のマクロファージ-破骨細胞系譜の制御機構を明らかにすることである。

【方法・結果】

顎骨マクロファージの特異な遺伝子発現プロファイルとエピジェネティック制御機構

C57BL/6Jマウスの上顎骨、下顎骨、大腿骨、椎体、腸骨からF4/80陽性マクロファージを回収し、比較検討した。フローサイトメトリー解析により分離したF4/80陽性マクロファージを用いて、RANKL (Receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand) による破骨細胞分化誘導を行い、TRAP (Tartrate-resistant acid phosphatase) 染色により破骨細胞分化能を評価した。各骨組織由来F4/80陽性マクロファージにおいて、TRAP陽性多核破骨細胞への分化が確認され、破骨前駆細胞としての機能が示された。

各骨組織のF4/80陽性マクロファージからRNAを抽出し、Bulk RNA-sequence (RNA-seq) 解析を実施した。主成分分析の結果、上顎骨および下顎骨由来F4/80陽性マクロファージの遺伝子発現プロファイルが類似し、他の骨組織とは明確に区別されることが明らかとなった。さらに、顎骨マクロファージで有意に高発現する遺伝子18個、低発現する遺伝子6個を同定した。顎骨で高発現する遺伝子群には、免疫応答および食食機能に関連する遺伝子群が複数存在した。さらに、Ingenuity Pathway Analysis (IPA) によるパスウェイ活性化予測では、Toll様受容体 (TLR) シグナル伝達経路が有意に活性化している可能性が示された。特に、TLR2は、顎骨マクロファージにおいて、TLRファミリーの中で最も高い発現を示し、他の骨組織と比較して有意に高発現していた。

顎骨および大腿骨由来F4/80陽性マクロファージのATAC-sequence (ATAC-seq) 解析により、クロマチンアクセシビリティを比較検討した。顎骨マクロファージは特異的なオープンクロマチン領域を有し、転写制御の基盤が異なることが示された。RNA-seqとATAC-seqデータの統合解析により、*Tnfrsf9*はATAC-seqとRNA-seqいずれにおいても、顎骨では、大腿骨と比較して高いFold Changeを有していることが明らかとなった。*Tnfrsf9* (CD137L、4-1BBL) 遺伝子座において、顎骨特異的なピーク領域が同定された。この領域は大腿骨では検出されず、顎骨マクロファージにおける*Tnfrsf9*の高発現に寄与していると考えられた。さらに、両解析で顎骨優位性を示した遺伝子群のKEGG pathwayデータベースに基づくpathway enrichment解析により、Osteoclast differentiation経路が上位の経路として位置づけられ、

顎骨マクロファージの破骨細胞分化能が転写およびエピジェネティックレベルで制御されていることが示唆された。

TLR2刺激に対する顎骨マクロファージの応答

TLR2の刺激に対するF4/80陽性マクロファージの応答を検討するため、TLR2/TLR1のアゴニストであるPam3CSK4 (細菌由来トリアシルリポペプチドの合成アナログ) を用いて、顎骨と大腿骨から回収したF4/80陽性マクロファージをin vitroで刺激し、リアルタイムPCRによって*Tnfrsf9*および破骨細胞関連遺伝子の発現を検討した。Pam3CSK4によってTLR2を刺激することで、顎骨および大腿骨で*Tnfrsf9*の発現が上昇した。破骨細胞関連遺伝子である*Acp5*や*Ctsk*、*Atp6v0d2*の発現も、顎骨および大腿骨で上昇した。口腔環境からの持続的なTLR2刺激が、エピジェネティック基盤を形成し、顎骨マクロファージの特異的な遺伝子発現と機能的特性を規定している可能性が示された。

TNFSF9-TNFRSF9軸を介した破骨細胞分化制御

RANKLによって骨髄マクロファージを刺激し、破骨細胞へと分化誘導した。その後、TNFSF9の受容体であるTNFRSF9 (CD137, 4-1BB) について、リアルタイムPCRにより遺伝子発現解析を行った。RANKL刺激群では、受容体*Tnfrsf9*の発現が約487倍上昇した。次に、受容体TNFRSF9を発現する破骨細胞に対して、リガンドのTNFSF9で刺激する実験を行った。RANKLにより破骨細胞へ分化誘導中にリコンビナントTNFSF9を添加し、リアルタイムPCRで破骨細胞関連遺伝子の発現変動を検討した。その結果、TNFSF9刺激によって、破骨細胞のマスター転写因子である*Nfatc1*の発現が上昇した。したがって、受容体TNFRSF9を発現する破骨細胞は、リガンドであるTNFSF9の刺激によって、さらに破骨細胞分化が促進されることが示唆された。

生体破骨細胞を標的とした遺伝子発現解析

生体における顎骨と大腿骨の破骨細胞の遺伝子発現の差異を検討するため、生体破骨細胞を標的とした遺伝子発現解析を行った。破骨細胞のマーカーである*Acp5*と*Ctsk*が同時に発現した細胞でのみCreが活性化する、破骨細胞特異的な遺伝子操作が可能なマウス*Acp5^{cCre}; Ctsk^{nCre}*を用いた。本マウスとmRNA-リボソーム複合体を標識できる*Rpl22^{HA}*マウスを交配し、*Acp5^{cCre/+}; Ctsk^{nCre/+}; Rpl22^{HA/+}*マウスを作成した。本マウス系統では、Creを発現する破骨細胞内のmRNA-リボソーム複合体がHA-tagで標識される。本マウス系統から回収した骨組織を処理し、anti-HA抗体を利用した免疫沈降を行うことにより、*Acp5*陽性かつ*Ctsk*陽性破骨細胞のmRNAを抽出できる。本手法を用いて、顎骨と大腿骨から、培養を介さず、生体組織から破骨細胞のmRNAを抽出し、リアルタイムPCRにより破骨細胞関連遺伝子とTNFSF9の受容体*Tnfrsf9*の遺伝子発現解析を行った。顎骨破骨細胞は、大腿骨破骨細胞と比較して、破骨細胞関連遺伝子である*Acp5*と*Ctsk*を有意に高発現していた。また、TNFSF9の受容体*Tnfrsf9*も大腿骨に対して有意に高く発現していた。

【結論】

顎骨マクロファージは、独自の転写プロファイルとエピジェネティック制御機構を有しており、TLR2-TNFSF9-TNFRSF9軸を介した破骨細胞分化制御機構が存在することが明らかとなった。TLR2シグナルを介したTNFSF9の発現誘導により、TNFRSF9高発現破骨細胞との相互作用を通じて破骨細胞分化が促進されると考えられた。また、口腔環境からの恒常的なTLR2刺激が、エピジェネティックリプログラミングを介して顎骨マクロファージの機能的特性を規定し、破骨細胞への分化閾値を調節している可能性が示された。この知見は、顎骨特有の骨代謝制御機構の理解に貢献し、顎骨疾患の新規治療標的の開発につながる事が期待される。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (菊池 董)			
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	教授	鶴澤 成一
	副 査	教授	久保庭 雅恵
	副 査	教授	波多 賢二
	副 査	講師	佐藤 淳

論文審査の結果の要旨

本研究は、顎骨特有のマクロファージ-破骨細胞系譜の誘導機構を明らかにすることを目的に、顎骨とその他の骨に由来する組織常在マクロファージを単離し、その遺伝子発現プロファイルの網羅的解析を行った。その結果、顎骨 F4/80 陽性マクロファージは、他の骨組織と異なる遺伝子発現とクロマチンプロファイルを有し、顎骨におけるマクロファージ-破骨細胞系譜の誘導機構として、TLR2-TNFSF9-TNFRSF9 軸を同定した。

以上の研究結果は、顎骨特異的骨代謝機構の解明に寄与するだけでなく、マクロファージ-破骨細胞系譜の組織適応性の理解にもつながり、組織特異的な細胞分化制御を標的とした顎骨疾患の新規治療戦略の構築に貢献することが期待される。

よって、本研究は博士（歯学）の学位論文として価値のあるものと認める。