



Title	内在性TGF- $\beta$ の産生はRANKLとM-CSFとによって誘導される破骨細胞形成に必須である
Author(s)	金田, 利夫
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.11501/3184474">https://doi.org/10.11501/3184474</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

氏名	かね だ とし お 金 田 利 夫
博士の専攻分野の名称	博 士 (学 術)
学位記番号	第 1 5 8 9 7 号
学位授与年月日	平成13年2月28日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文名	内在性 TGF- $\beta$ の産生は RANKL と M-CSF とによって誘導される破骨細胞形成に必須である
論文審査委員	(主査) 教授 栗栖浩二郎  (副査) 教授 米田 俊之 教授 森崎市治郎 講師 島袋 善夫

#### 論 文 内 容 の 要 旨

[背景/目的] 骨粗鬆症は骨形成と骨吸収の不調和、すなわちリモデリングの異常によって引き起こされると考えられている。骨のリモデリングに重要な生理活性物質は数多く存在するが、その中でも生体の発生段階から多岐に渡る生物活性をもち、かつ、骨基質に含まれリモデリングサイクルに深く関わると考えられるサイトカインとして TGF- $\beta$  が知られている。

これまで TGF- $\beta$  は強力な骨形成因子として位置付けられてきた。一方、TGF- $\beta$  の骨吸収への作用としては骨芽細胞/ストローマ細胞を介した破骨細胞形成の抑制が広く知られている。しかし、TGF- $\beta$  2 トランスジェニックマウスでは骨粗鬆症様の病態が認められることが報告されており、これは TGF- $\beta$  が骨吸収を促進することを示唆するものである。このように、TGF- $\beta$  の破骨細胞形成への作用に関する知見は、未だなお混沌とした状態にあると言える。

本研究では、従来、破骨細胞形成抑制因子として考えられてきた TGF- $\beta$  が M-CSF、RANKL (ODF/TRANCE/osteoprotegerin ligand) 存在下に強く破骨細胞形成を促進することを示し、さらに、TGF- $\beta$  の破骨細胞形成促進作用の詳細を解析するものである。

[方法] マウス全骨細胞を低濃度の PGE<sub>2</sub> 存在下に高密度で培養した。6日後、ストローマ等間質系細胞はコンフルエントに達し厚い細胞層を形成する。一方、モノサイト/マクロファージ系細胞 (M/M $\phi$ ) は培養シャーレの最下層に強く接着する。このような状態では上層のストローマ細胞層は軽い機械的刺激を与えるだけで自発的に剥離し、培養シャーレには M/M $\phi$  のみが残る。トリプシン/EDTA にてわずかに残存するストローマ細胞を除き、最下層の M/M $\phi$  のみを単離した。これらの M/M $\phi$  細胞はフローサイトメトリーによる表面抗原の解析と貪食能により同定した。

成熟破骨細胞への分化は、単離した M/M $\phi$  に M-CSF, RANKL を添加することにより誘導し、この過程における TGF- $\beta$  1 の作用を詳細に検討した。分化過程におけるマーカー遺伝子の変化は RT-PCR により確認した。破骨細胞は TRAP 染色と骨吸収能から同定し、核染色からフェュージョンインデックス (F.I.) を算出した。RANKL 受容体である RANK の発現は RT-PCR とウェスタンブロッティングにて確認し、RANKL 刺激による AP-1、NF- $\kappa$ B の核移行はゲルシフトアッセイにより検出した。

[結果/考察] 純度99.9%以上で単離した M/M $\phi$ 細胞は Mac-1, F4/80 陽性であり、ほぼ全ての細胞が蛍光ラテックスビーズを貪食した。この M/M $\phi$ 細胞の生存は M-CSF 依存性であった。これらの M/M $\phi$ 細胞の一部は M-CSF (10ng/ml) と RANKL (40ng/ml) の添加により 5-6 日で各種分化マーカー陽性の成熟破骨細胞に分化した。この条件下で形成された破骨細胞は骨吸収能を示したが、TRAP 強陽性細胞の率は約12%、F.I.は約6%と分化率は低いものだった。M-CSF は濃度依存的に M/M $\phi$ 細胞の分化を促進したが、高濃度 (100ng/ml) においても F.I.は約15%に留まった。

M/M $\phi$ 細胞は TGF- $\beta$  receptor 1, 2 を発現していたことから、上記培養条件 (M-CSF: 10ng/ml, RANKL: 40ng/ml) に TGF- $\beta$ 1 を加えると破骨細胞への分化効率は飛躍的に上昇した。この際の F.I.は約60%以上に達し、全ての細胞が TRAP 強陽性を示した。また、骨吸収、マーカー遺伝子の発現も TGF- $\beta$ 1 の分化促進に伴い上昇した。

RT-PCR による検討により、M/M $\phi$ 細胞には TGF- $\beta$  receptor1, 2 に加え、TGF- $\beta$ 1, 2, 3 が発現していることも判明した。TGF- $\beta$  の中和抗体は M-CSF+RANKL で誘導される破骨細胞形成を完全に抑制した。この中和抗体による破骨細胞形成の抑制はストローマ等を含む全骨細胞から M-CSF+RANKL あるいは 1, 25 (OH) $_2$ D $_3$  を用いて分化誘導した場合にも認められた。2 日間の TGF- $\beta$ 1 前処理後、TGF- $\beta$ 1 を培地から除去した M/M $\phi$ 細胞を M-CSF+RANKL で分化誘導した場合、これらの M/M $\phi$ 細胞は M-CSF+RANKL+TGF- $\beta$  添加群と同等の高い破骨細胞形成を示した。しかし、TGF- $\beta$ 1 前処理後の分化誘導過程においても TGF- $\beta$  中和抗体は M-CSF+RANKL の破骨細胞形成誘導を部分的に抑制した。

さらに TGF- $\beta$ 1 前処理は RANKL 受容体である RANK の発現量には変化を与えなかったものの、RANKL 依存性の NF- $\kappa$ B の核移行を強く促進した。これらの結果は TGF- $\beta$  と RANKL の情報伝達経路の間にクロストークが存在し、TGF- $\beta$  は M/M $\phi$ 細胞から破骨細胞 lineage への priming だけでなく maturation にも関与することを示すものである。

[結論] TGF- $\beta$  の前駆破骨細胞に対する本質的な作用は破骨細胞形成促進であることが明らかとなった。さらに TGF- $\beta$  は M-CSF、RANKL とともに破骨細胞形成に必要な因子であることが示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

本研究では、破骨細胞の分化過程における TGF- $\beta$  の作用機構の解析を目的として、マウス骨髄由来の破骨細胞前駆細胞の培養系を用いて実験を行い、以下の結果を得ている。

- (1) 未分化骨由来細胞より、破骨細胞前駆細胞である M/M $\phi$ 様細胞を高純度に単離する手法を確立した。
- (2) 単離した M/M $\phi$ 様細胞は TGF- $\beta$  受容体と内在的に TGF- $\beta$  を発現していた。
- (3) TGF- $\beta$  は、M-CSF と sRANKL による M/M $\phi$ 様細胞から破骨細胞への分化を著しく促進した。
- (4) TGF- $\beta$  中和抗体は各種の *in vitro* 破骨細胞誘導系において破骨細胞形成を抑制した。
- (5) TGF- $\beta$  は M/M $\phi$ 様細胞において、sRANKL による AP-1 と NF $\kappa$ -B の活性化を大きく促進した。

これらの結果より、破骨細胞分化が誘導される微小環境によっては、TGF- $\beta$  が破骨細胞形成を強く促進し得ること。また、TGF- $\beta$  は、M-CSF と RANKL によって誘導される破骨細胞形成に本質的に必要な因子であることが強く示唆された。本研究の結果は、骨代謝における TGF- $\beta$  の生理的意義に関して、新しい考え方を提示するものである。

以上の所見は関連する研究分野に新たな知見を加えるもので、論文は博士 (学術) の学位に値するものと認められる。