The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	内在性TGF-β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	https://doi.org/10.11501/3184474
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

学位論文

内在性TGF-β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

2001 年 3 月

明海大学歯学部口腔解剖学第一講座

金 田 利 夫

要旨

骨組織は骨形成と骨吸収の動的平衡によって維持される器官である。この骨吸収を担う破骨細胞の分化は様々なホルモンやサイトカインによってコントロールされている。これらの因子の中でも、近年同定されたreceptor activator of NF-κB(RANK) ligand (RANKL)は破骨細胞形成に必須な因子であり、macrophage colony-stimulating factor（M-CSF）存在下において、骨髄細胞や脾臓細胞から成熟破骨細胞を誘導することが知られている。

本研究ではマウスの未分画骨由来細胞より、可溶性RANKL（sRANKL）とM-CSFとによって成熟破骨細胞へと分化し得るモノサイト／マクロファージlineageの細胞（M/Mφ様細胞）を、ストローマ細胞などの介在細胞を含まない状態で単離する方法を確立した。しかし、sRANKLとM-CSFとによる成熟破骨細胞の形成率は低く、これら以外にさらに他の因子が必要であることが示唆された。

単離したM/Mφ様細胞は、内在的にtransforming growth factor-β（TGF-β）1、2とI、II型のTGF-β受容体を発現していた。そこで本研究ではTGF-βの破骨細胞形成に対する作用を検討した。sRANKLとM-CSFとによる破骨細胞誘導系にTGF-βを加えると、単離したM/Mφ様細胞はすべて破骨細胞lineageへと分化した。また、TGF-βの中和抗体の添加によって、sRANKLとM-CSFとによる破骨細胞誘導が完全に抑制された。TGF-βの効果は、未分画骨由来細胞を用いた破骨細胞形成系でも認められ、TGF-β中和抗体は1,25-dihydroxyvitamin D_3の促進効果を抑制した。sRANKL刺激によって誘導されるAP-1とNF-κBの核移行は、TGF-β前処理したM/Mφ様細胞において強く促進されたが、sRANKLの受容体であるRANKの発現に対してTGF-βは影響しなかった。本研究の結果は、TGF-βが破骨細胞形成に必須なオートクラインファクターであることを示唆する。

緒言

骨吸収を担う破骨細胞は、血液幹細胞を起源とし、破骨細胞の前駆細胞はモノサイト／マクロファージ（M/Mφ）と共通の特性を有する（1, 2）。これまで、Parathyroid hormone、1,25-dihydroxyvitamin D_3［$1,25(OH)_2D_3$］などの全身性ホルモン、prostaglandin（PG）などのオータコイド、macrophage colony-stimulating factor（M-CSF）、interleukin（IL）-1、IL-6、IL-11、tumor necrosis factor（TNF）-αなどのサイトカインが破骨細胞の分化をそれぞれ制御することが知られている（3, 4）。最近、osteoclast differentiation factor/osteoprotegerin ligand/TNF-related activation-induced cytokine/receptor activator of NF-κB(RANK) ligand (RANKL)が破骨細胞の分化に重要、かつ決定的な因子として同定された(5, 6)。骨髄ストローマ細胞や骨芽細胞は各種の刺激によりこの分子をその細胞膜上に発現し、一方、破骨細胞前駆細胞はその受容体であるRANKを発現する。ごく最近、RANKL遺伝子を欠いたマウスは重篤な大理石病を呈することが報告された（7）。よって、RANK/RANKLの結合はストローマ細胞と破骨細胞前駆細胞との相互作用による破骨細胞分化に必須な機構であると考えられる。破骨細胞前駆細胞とストローマ細胞との相互作用と同様に、RANKLは活性化したT細胞上にも発現され、膜上にRANKを発現する樹状細胞とT細胞とが関わる免疫反応を制御する（7-9）。

最近、膜貫通部位と細胞内部位を欠いた可溶性RANKL(sRANKL)を用いることにより、破骨細胞の形成とその機能発現におけるRANKLの役割をより詳しく調べることが可能となった。これまで、脾臓細胞、非接着性骨髄細胞、末梢血由来のモノサイトなどがM-CSFとsRANKLとの刺激により、ストローマ細胞の非存在下において破骨細胞へと分化することが知られている（5, 6, 10, 11）。また、マクロファージ様の株細胞はM-CSFとsRANKLとの存在下で破骨細胞へと分化し得るとされている（12）。しかしながら、

前述の培養系における破骨細胞への分化率は、さほど高いものとは言えず、さらなる因子の必要性が示唆される。さらに、前述の培養系ではすべての破骨細胞前駆細胞が同調して分化しないことから、破骨細胞形成を制御する詳細な分化メカニズムは未だ明らかになったとは言えない。

Transforming growth factor-β(TGF-β)は、多岐にわたる生理活性を持つサイトカインであり、上皮系、間葉系細胞を含む各種の細胞の増殖、分化を広く制御している（13, 14）。これまで、骨領域の数多くの研究において、TGF-βは骨原性細胞の増殖と分化を刺激し、骨基質産生能を有する細胞への分化を促進することが示されてきた（15, 16）。よって、TGF-βは骨形成の促進因子である。しかしながら、骨吸収におけるTGF-βの作用に関する知見は、依然として混沌とした状態にあると言える。マウス頭蓋骨の器官培養においてTGF-βは骨吸収を促進し（17）、反対にラットの長管骨を用いた器官培養ではTGF-βは骨吸収を抑制することが報告されている（18）。さらに、Hughesら（19）は、未分画の骨髄細胞においてTGF-βが破骨細胞のアポトーシスを誘導することを示している。

破骨細胞形成に関しては、TGF-βの抑制作用はストローマ細胞を含む骨髄細胞の培養系、骨髄細胞あるいは脾臓細胞とストローマ細胞との共培養系において報告されている（20, 21）。一方、TGF-βはヒトの白血病細胞株 FLG29.1 における破骨細胞様細胞の形成をオートクライン様式で促進することが報告されている（22）。また、TGF-β２を強制発現するトランスジェニックマウスは骨粗鬆症様の病態を示すことが報告されている（23, 24）。さらに、ドミナントネガティブ型のII型TGF-β受容体（TβR）を発現するトランスジェニックマウスでは骨吸収が減少していることが示されている（25）。これらの報告は、TGF-βが骨吸収に対し促進的に関与することを示唆する。

TGF-βの多様な生物活性は、骨組織においては骨芽細胞、破骨細胞、血球系細胞、ストローマ細胞などに影響を与えると考えられる（26-28）。したがって、これまでの*in*

*vitro*のストローマ細胞を含む培養系や、多くの異なった細胞から構成される培養系では、前駆細胞であるM/Mφから成熟破骨細胞への分化過程における、TGF-βの直接的な作用を詳細に検討することは困難であった。本研究では、新しく破骨細胞前駆細胞の単離方法を確立し、この手法により得られた高純度のM/Mφ様細胞を用いた。これらの純化した細胞群を使用することにより、本研究ではTGF-βの破骨細胞形成に対する直接的な作用とその作用機序を探ることが可能となった。

実験方法および材料

抗体

抗TGF-β1, -2 , -3 モノクローナル抗体 (clone 1D11) 、アイソタイプコントロール抗体（mouse IgG1）は R & D Systems Inc. (Minneapolis, MN, U.S.A.) より購入した。ポリクローナル ウサギ 抗RANK 抗体 は雪印乳業（株）（栃木）より御供与頂いた。非標識 抗CD16/32 抗体 (clone 2.4G2) 、 ビオチン化 抗CD11b抗体 (Mac-1 α chain ; clone M1/70)、抗CD11a 抗体 (LFA-1 αchain; clone 2D7)、抗CD44抗体 (clone IM-7) 、 抗CD61 抗体(integrin β_3; clone C9.G2) 、PE標識抗CD14抗体 (clone rmC5-3) はPharMingen International (San Diego, CA, U.S.A.)より購入した。ビオチン化抗F4/80抗体 (clone A3-1)、 FITC標識抗integrin α_v抗体、非標識抗DEC-205 抗体 (clone NLDC-145) はそれぞれSerotec.Co. (Kidlington, U.K.)、住友電工（株）（大阪）、 BMA Biomedicals AG(Augst, Switzerland) より購入した。NF-κBの electrophoretic mobility shift assayにおける、ポリクローナル抗p50 (sc-114X) 、 抗 p65 (sc-109X) 抗体 はSanta Cruz Biotechnology, Inc. (San Diego, CA, U.S.A.)より購入した。

未分画骨由来細胞からのM/Mϕ様細胞の単離方法

４週齢から５週齢の雄性ICRマウス（静岡実験動物, 静岡）から未分画骨由来細胞を調製した。頚椎脱臼による屠殺後、速やかに大腿骨、脛骨を摘出した。軟組織を除去後、大腿骨、脛骨を10％ fetal bovine serum (FBS, Intergen, NY, U.S.A.)と100 U/mlペニシリンを含むα-minimam essential medium (α-MEM, ICN Biomedicals, Aurora, OH , U.S.A.）中にて細切した。ボルテックスミキサーにより骨片より遊離させた細胞をポアサイズ70μmのメッシュでろ過し、これを未分画骨由来細胞浮遊液とした。採取した未

分画骨由来細胞（10^8 細胞）を10％FBSと10 nMのPGE_2 (Sigma, St. Louis, MO, U.S.A.)を含むα-MEMにて100 mmカルチャープレートに播き込み、5％CO_2の条件下で6日間培養した。培養液の交換は培養開始後4日目に行なった。未分画骨由来細胞に含まれるストローマ細胞は6日間の培養により増殖し、プレートの底面に厚い細胞層を形成した。培養6日後に弱い機械的刺激（プレートを振動する、もしくは細胞層の端をピペットの先端で突く）を与えることにより、形成したストローマ細胞層は自発的に剥離した。この際に底面に残存するM/Mφ様細胞を回収し実験に使用した。未分画骨由来細胞を高濃度のPGE_2（1 μM）存在下に培養した場合、従来の報告通り（29）、多数の酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ（TRAP）陽性の多核細胞、すなわち破骨細胞が形成されるが、本実験での低濃度PGE_2 (10 nM）で培養した場合、培養6日目に得られるほとんどの細胞は形態的にM/Mφ様細胞であり、わずかに混入する細胞はストローマ細胞とTRAP陽性の単核細胞であった。剥離した細胞層を除去後、残存する血球系細胞をphosphate-buffered saline（PBS）にて洗い流した。さらに、0.25% trypsin/0.5% EDTA処理することによって、わずかに残存するストローマ細胞を除いた。その後、底面に強く接着するM/Mφ様細胞をピペッティングにて回収した。

破骨細胞形成の評価

採取したM/Mφ様細胞は1×10^4あるいは2.5×10^4 細胞/cm^2の細胞密度でカルチャープレートに播き込み、各種サイトカインと10％FBSを含むα-MEMで培養した。培養液の交換は3日おきに行った。培養終了後、細胞を10％ホルマリンで固定し、leukocyte acid phosphatase kit (Sigma)を用いてTRAP染色を行った。総細胞数、TRAP陽性単核細胞数、TRAP陽性多核細胞数は顕微鏡下でカウントした。この染色によるTRAP強陽性の単核細胞および多核細胞は破骨細胞lineageに入った細胞と考えられる。続いて、0.1％クエ

ン酸に溶解したpropidium iodide（50 μg/ml）にて核を染色し、蛍光顕微鏡下に全細胞の核数およびTRAP陽性多核細胞に含まれる核数をカウントした。融合率（フュージョンインデックス, F. I.）はTRAP陽性多核細胞に含まれる核数のすべての細胞に含まれる核数に対するパーセンテージであり、破骨細胞の成熟度の指標として用いた。

$$\text{F. I.}\ (\%) = \frac{(\text{TRAP陽性多核細胞に含まれる核数})}{(\text{TRAP陽性多核細胞に含まれる核数}) + (\text{単核細胞に含まれる核数})} \times 100$$

Pit formation assay

採取したM/Mφ様細胞を10 ng/ml M-CSF（Chemicon Internatinal, Temecula, CA, U.S.A.）、40 ng/ml sRANKL（PeproTec EC, Ltd., London, U.K.）と各種濃度のTGF-β1（Austral Biologicals, San Ramon, CA, U.S.A.）を含む10%FBS／α-MEMで5日間培養した。Trypsin/EDTA処理後、ピペッティングにて細胞を回収し、象牙片上に800 細胞/ 象牙片の密度で播き込み、1日間インキュベートした。培養終了後、細胞の生存を確認する為、各象牙片上の細胞をTRAP染色し、続いて酸ヘマトキシリン（Sigma）で吸収窩を染色した。吸収窩の数は顕微鏡下でカウントした。

Flow cytometory

採取したM/Mφ様細胞は0.5%bovine serum albumin（BSA）、0.1%アジ化ナトリウム、1 mMグルコースを含む氷冷したPBSに懸濁した。各抗体による染色に先立ち、非特異的結合を抑える為に非標識抗CD16/32抗体あるいは過剰量のマウスIgG（Sigma）でブロッキングを行った。ブロッキング処理した細胞をビオチン化抗CD11b抗体、抗

CD11a抗体、抗CD44抗体、抗F4/80抗体、抗インテグリンβ_3抗体、FITC 標識抗インテグリンα_V抗体、PE標識抗CD14抗体、または抗DEC205抗体と30分間反応させた。ビオチン化抗体および非標識抗体と反応させた検体には、続いて抗CD16/32抗体あるいは過剰量のマウスIgGを含むアビジンFITC（Pharmingen）、FITC標識抗ラットIgG抗体（Pharmingen）を用いた二次反応を行った。これらの検体はFACStar(Becton Dickinson, San Jose, CA, U.S.A.)を用いて、ゲートをかけることなく解析した。

Reverse transcription-polymerase chain reaction（RT-PCR）

各種の処理を施した細胞をPBSにて洗浄後、アイソジェン（ニッポンジーン, 東京）1 mlを加え、RNAを含む細胞抽出液を回収し、クロロホルム200 μlを加えた。12,000 g、15分間の遠心後、水層500 μlを別のチューブに移し、イソプロパノール500 μl加え、RNAを沈澱させた。75 %エタノールにてRNAペレットを洗浄し、これを風乾させた。風乾させたRNAをDPEC処理水に溶解し、260 nmにおける吸光度を測定し定量した。Total RNA (1 μg)からSuperscript II preamplification system (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD, U.S.A.)を用いて下記の方法でcDNAを作成した。Total RNA を70℃、10分間の処理で変性させた後、急冷し、各種buffer、M-MLV由来の逆転写酵素を加えた。反応液を42℃で50分間インキュベートし、酵素反応は70℃、15分間の処理で終了させた。

PCRにおける各種 プライマーはGenbankに登録された配列に基づき、以下のようにデザインし、合成した。

TRAP forward, 5'-CACGATGCCAGCGACAAGAG-3'

TRAP reverse, 5'-TGACCCCGTATGTGGCTAAC-3'

TRAP PCR product : 466 bp

integrin α_V forward, 5'-GCCAGCCCATTGAGTTTGATT-3'

integrin α_V reverse, 5'-GCTACCAGGACCACCGAGAAG-3'

integrin α_V PCR product : 329 bp

integrin β_3 forward, 5'-TTACCCCGTGGACATCTACTA-3'

integrin β_3 reverse, 5'-AGTCTTCCATCCAGGGCAATA-3'

integrin β_3 PCR product : 459 bp

cathepsin K forward, 5'-GGAAGAAGACTCACCAGAAGC-3'

cathepsin K reverse, 5'-GTCATATAGCCGCCTCCACAG-3'

cathepsin K PCR product : 463 bp

calcitonin receptor forward, 5'-ACCGACGAGCAACGCCTACGC-3'

calcitonin receptor reverse, 5'-GCCTTCACAGCCTTCAGGTAC-3'

calcitonin receptor PCR product : 272 bp

CD14 forward, 5'-AAGTTCCCGACCCTCCAAGTT-3'

CD14 reverse, 5'-CTGCCTTTCTTTCCTTACATC-3'

CD14 PCR product : 557 bp

RANK forward, 5'-CTCTGCGTGCTGCTCGTTCC-3'

RANK reverse, 5'-TTGTCCCCTGGTGTGCTTCT-3'

RANK PCR product : 518 bp

TGF-β1 forward, 5'-GGACCGCAACAACGCCATCTA-3'

TGF-β1 reverse, 5'-CGCACACAGCAGTTCTTCTCT-3'

TGF-β1 PCR product : 546 bp

TGF-β2 forward, 5'-CATCCCGAATAAAAGCGAAGA-3'

TGF-β2 reverse, 5'-AAAACTCCCTCCCTCCTGTCA-3'

TGF-β2 PCR product : 630 bp

TGF-β3 forward, 5'-TTTTCCTCCCCCTTTCTACTG-3'

TGF-β3 reverse, 5'-GGTTCCATTTTTCTCCACTGA-3'

TGF-β3 PCR product : 509 bp

TβR-I forward, 5'-GAAGGGCTCATCACCACCAAT-3'

TβR-I reverse, 5'-AGGCAGCTAACCGTATCCAGA-3'

TβR-I PCR product : 416 bp

TβR-II forward, 5'-GGCATCGCTCATCTCCACAGT-3'

TβR-II reverse, 5'-GCCCTCGGTCTCTCAGCACAC-3'

TβR-II PCR product : 421 bp

β-actin forward, 5'-TCACCCACACTGTGCCCATCTAC-3'

β-actin reverse, 5'-GAGTACTTGCGCTCAGGAGGAGC-3'

β-actin PCR product : 538 bp

増幅反応は各遺伝子の増幅の程度に応じて20-32回行った。増幅サイクルは94 °C、30秒間；58 °C (TGF-β2, - β3のみ56 °C)、30 秒間；72 °C、1 分間を1サイクルとした。増幅反応は0.5 μlの各種 cDNA（total RNA 50 ng相当）、プライマー25 pmoles、0.2 mM dNTP、1 U Tap DNA polymerase (Qiagen, Inc., Valencia, CA, U.S.A.) を含む25 μlの容量で行い、増幅反応後、反応液15 μl をエチジウムブロマイドを含む1.5%アガロースゲル中で展開し、可視化した。

Western blotting

M-CSF単独、および M-CSF +TGF-β1で２日間前培養したM/MØ様細胞をPBSで洗浄後、各種プロテアーゼインヒビターを含むRIPA buffer [10 mM sodium phosphate (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 1 mM

EDTA, 1 mM aminoethyl-benzenesulfonyl fluoride, 10 μg/ml leupeptin, and 10 μg/ml aprotinin］を加え、cell lysate を回収し、15秒間超音波処理した。タンパク定量はbicinchoninic acid protein assay kit (Pierce Chemical Co., Rockford, IL, U.S.A.) にて行った。

等量のタンパク質を含むサンプルを10% SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)にて展開後、 PVDF膜に転写した。 転写後の PVDF膜を 5% のスキムミルクでブロッキング後、抗RANK 抗体あるいはコントロールウサギIgGと反応させた。二次抗体として パーオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG 抗体（Santa Cruz Biotechnology, Inc.）を使用し、抗原抗体複合体はWestern blot chemiluminescence reagents (DuPont New England Nuclear Products , Boston, MA, U.S.A.) を用いて可視化した。

Electrophoretic mobility shift assay（ゲルシフトアッセイ）

M/M φ様細胞をM-CSF単独あるいはM-CSF+TGF-β1存在下で2日間培養した後、核抽出液を調製した。核抽出液はSchreiberらの方法に従って調製した（30）。
[γ-^{32}P]ATPでラベルしたAP-1およびNF-κBの結合領域を含む2本鎖のオリゴDNA
(AP-1: 5'-CGCTTGATGAGTCAGCCGGAA-3' ;
NF-κB : 5'-AGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC-3')とタンパク質量1 μgの核抽出液を室温で20分間反応させた。オリゴDNAの標識およびbinding bufferはゲルシフトアッセイシステム（Promega, Corp. Madison, WI, U.S.A.）を用いて行った。反応の特異性は50倍の非標識のオリゴDNAを加えることによって確認した。DNA-タンパク質複合体は7.2%のポリアクリルアミドゲル中で0.5×TBEにて展開した。泳動後のゲルはゲルドライヤーで乾燥後、オートラジオグラフィーによってDNA-タンパク質複合体を可視化した。抗体を用いたスーパーシフトの実験では、室温でDNA-タンパク質複合体を形成させた後、反応液に1μgの抗NF-κB1（p50）抗体、抗Rel-A（p65）抗体を加え、氷上で30分

間インキュベートした後、ポリアクリルアミドゲルにて展開した。

統計解析

統計解析はDunnettの多重解析によって行った。

結果

マウス未分画骨由来細胞の培養から単離したM/Mφ様細胞の同定

4 - 5週齢の雄性ICRマウスから得た未分画骨由来細胞を低濃度のPGE_2存在下で培養すると、未分画骨由来細胞中のストローマ細胞は増殖し、6日後にはオーバーコンフルエントに達した。これらの細胞は厚い細胞層を形成し、弱い機械的刺激によりカルチャープレート底面より容易に剥離した。このストローマ細胞の下層には、カルチャープレート底面と強く接着した、形態的にマクロファージ様の細胞が多数存在していた。剥離したストローマ細胞層を取り除き、さらにわずかに残存する血球系細胞、ストローマ細胞を除いた後、カルチャープレート底面に残るM/Mφ様細胞を回収した。

Fig. 1Aに示すように、採取した細胞は外観上マクロファージの形態を示し、すべての細胞がラテックスビーズを貪食した（Fig. 1B）。単離したこれらの細胞群は、その生存にM-CSFを必要とし、M-CSFを加えない場合には3日以内に死滅した。これらの細胞が死滅した後に残るストローマ細胞のコロニー数から、単離した細胞群は少なくとも99.9%以上がM-CSF依存的なマクロファージであると考えられた（データ省略）。

フローサイトメーターにより単離した細胞群の表面抗原をゲートをかけること無く解析すると(Fig. 1C)、これらの細胞群はM-CSF依存的な骨髄マクロファージのマーカーであるF4/80が陽性であり、他にCD11b（Mac-1αchain）、CD11a（LFA-1αchain）、CD44が陽性であった。また、CD14、インテグリンα_Vは弱陽性であった。成熟破骨細胞のマーカーであるインテグリンβ_3、樹状細胞のマーカーであるDEC205は陰性であった。これらの結果から、単離した細胞群はM/Mφlineageに属する細胞であることが確認された。

In vivo、*in vitro*の研究から血液系細胞から破骨細胞への分化にはM-CSFとRANKLの存在が必須であることが示されている（5, 6）。上述の方法で単離したM/Mφ様細胞を

M-CSFとsRANKL 存在下で6日間培養すると、Fig. 2A、Bで示すように、それぞれの濃度に依存して、TRAP陽性の多核細胞が出現した。M-CSFの添加量に応じて増加した総核数は、これらの細胞がM-CSF依存的に増殖することを示す。また、M-CSFは濃度依存的に、破骨細胞lineageへのコミットメントを示すTRAP陽性細胞率および破骨細胞の成熟度に関わる率を示すF. I.を上昇させた。しかし、両指標を最大とする20 ng/ml M-CSF添加群(sRANKL は40 ng/mlの一定濃度)においても、TRAP陽性細胞率は28%、F. I.は7%に留まり、20 ng/ml以上のM-CSFの添加によっても、さらなる破骨細胞形成の促進は認められなかった。一方、sRANKLの添加は総核数に変化を与えないものの、TRAP陽性細胞率、F. I.を濃度依存的に増加させた。両指標が最大に達する濃度は40 ng/mlであった。M-CSF とsRANKLの添加によって出現する多核細胞を象牙片上に移した場合、これらの多核細胞は象牙片上に吸収窩を形成した(Fig. 2C、D)。

さらに半定量的PCRの解析(Fig. 3）から、M-CSFとsRANKL存在下で分化誘導した細胞では、破骨細胞に多く発現することが知られるTRAP、cathepsin K、integrin α_V、integrin β_3、calcitonin 受容体の各mRNAが増加していた。一方、CD14の発現は減弱していた。これらのM-CSFとsRANKLの作用は、単離したM/Mφ様細胞が潜在的に成熟破骨細胞へと分化し得る細胞群であることを示す。加えて、M-CSF とRANKLは破骨細胞前駆細胞であるM/Mφ様細胞の生存、増殖、分化に重要な役割を果たすといった本研究の結果は、これまでの知見と一致した（5, 6）。しかしながら、M-CSFとsRANKLで誘導したTRAP陽性細胞率、F. I. は決して高いものではなかった。これらの結果は、すべての細胞群が破骨細胞lineageには入っていないことを示している。

M-CSFとsRANKLによって誘導される成熟破骨細胞形成におけるTGF-βの形成促進作用について

M/Mφlineage の細胞は各種のサイトカインや成長因子をオートクライン、パラクライン的に産生し、その増殖や分化を制御している（31, 32）。これらの因子の中で、TGF-βはM/Mφだけでなく破骨細胞においても発現していることが過去に報告されている（33）。

RT-PCRによる解析（Fig. 4）では、単離したM/Mφ様細胞には２種類のTGF-β受容体（TβR-I, TβR-II）が発現していた。これらの結果は、単離したM/Mφ様細胞が潜在的にTGF-βに反応し得る細胞であることを示唆する。

Fig. 5A、Bで示すように、M-CSF(10 ng/ml) と sRANKL(40 ng/ml)に加えてTGF-β1を添加すると、TGF-β1の濃度に依存してTRAP陽性の多核細胞が増加した。高濃度のTGF-β1存在下（1.25-20 ng/ml）では、すべての細胞がTRAP陽性となり、F. I.は最高60％まで増加した。このF. I.はTGF-β1非存在下の12倍に相当した。また、100％の細胞がTRAP 陽性になったことは、単離したM/Mφ様細胞がすべて破骨細胞lineage に入ったことを意味する。しかし、単離したM/Mφ様細胞はTGF-β1とsRANKL存在下でもM-CSF無くしては生存することができず、TGF-β1はM-CSFに代わり得るものではなかった。また、TGF-β1とM-CSFとの添加は、M/Mφ様細胞の生存を維持することが可能であったが、この両因子だけではM/Mφ様細胞を多核細胞はもちろん、TRAP 陽性の単核細胞にまでも分化させることはできなかった（データ省略）。

破骨細胞の分化促進にともなって、TGF-β1はM-CSFとsRANKLとによるTRAP、cathepsin K、calcitonin 受容体、integrin α_V、β_3 の各mRNAの発現上昇とCD14mRNAの減少をさらに増強した(Fig. 3)。

M-CSF 、sRANKLにTGF-β1を加えて分化誘導した細胞群はTGF-β1非存在下に形成させた場合に比較して多くの吸収窩を形成し（Fig. 5C）、Fig. 6に示すように濃度依

存的 に骨吸収活性をもつ多核細胞、すなわち、破骨細胞を増加させた。

これらの結果より、TGF-βは単独で破骨細胞誘導活性を持たないものの、破骨細胞分化の強力な補助因子であることが明らかとなった。

内在性TGF-βの破骨細胞形成における寄与とTGF-βの作用機序について

Fig.4 に示すように単離したM/Mφ様細胞はTβR-I、-IIと共に、内在性のTGF-β1、TGF-β2を発現していたことから、内在性TGF-βがオートクライン様式でM/Mφ様細胞自身に作用する可能性が考えられた。そこで、内在性TGF-βの破骨細胞形成に対する関与を検討した。

Fig. 7に示すように、TGF-βの中和抗体はM-CSFとsRANKLとによって誘導される破骨細胞形成を完全に抑制した。また、TGF-β1存在下でもTGF-β中和抗体は有意に破骨細胞形成を抑制した。一方、アイソタイプコントロールであるIgG1は有意な抑制を示さなかった。この結果は、M-CSF とsRANKLによる破骨細胞の形成に、M/Mφ様細胞から産生される内在性TGF-βが必要であることを示唆する。

次に破骨細胞分化過程におけるTGF-βの作用時期、作用点を探る為に、M/Mφ様細胞をM-CSF単独あるいはM-CSF+TGF-β1で2日間前処理した後、改めてM-CSFとsRANKLにて破骨細胞分化を誘導した。また、この分化誘導過程でTGF-β中和抗体を添加時期を変えて加える実験を行った。

M-CSF+TGF-β1で２日間前処理することによって、M/Mφ様細胞はTGF-β1を加えなくとも、M-CSFとsRANKLのみで、TGF-β1を加えた群と同等の高いF. I.を示し、効率良く破骨細胞へと分化した（Fig.8-B; 左からlane2, lane3）。一方、M-CSFのみで前処理したM/Mφ様細胞においては、高い率の分化を誘導するにはM-CSFとsRANKLとに加えてTGF-β1の添加が必要であった（Fig.8-A; 左からlane2, lane3）。これらの結果

は、２日間のTGF-β1前処理がM/Mφ様細胞から破骨細胞 lineageへのプライミングを誘導することを示唆する。

このTGF-βの作用機序の一つとして、TGF-βがRANKLの受容体であるRANKの発現を上昇させることが考えられる。しかし、２日間のM-CSF前処理はRANKの発現をmRNAレベルおよびタンパク質レベルで上昇させるにもかかわらず、TGF-β1はRANKの発現に全く影響を与えなかった(Fig. 9)。一方、２日間のTGF-β1前処理の効果をゲルシフトアッセイにより検討したところ（Fig. 10）、TGF-β1前処理したM/Mφ様細胞ではsRANKL刺激後のAP-1、NF-κBの核移行が強く促進されていた。さらに、Fig. 9が示すように、M/Mφ様細胞をM-CSF+TGF-β1で２日間前処理した場合でも、M-CSFとsRANKLとで分化誘導する際に、経時的にTGF-βの中和抗体を加えると、添加時期に応じた分化の抑制が認められた（Fig. 8B）。この結果は、内在性TGF-βは前述の破骨細胞lineageへのプライミングだけでなく、その後の分化過程にも関与していることを示唆している。

最後に、未分画骨由来細胞を用いて、破骨細胞形成におけるTGF-β中和抗体の効果を検討した（Fig. 11）。未分画骨由来細胞をM-CSFとsRANKLとによって破骨細胞を形成させる培養系（Fig. 11A）においても、1,25$(OH)_2D_3$を用いた破骨細胞形成系（Fig. 11B）においても、TGF-β中和抗体は有意に破骨細胞形成を抑制した。この結果は、内在性TGF-βの重要性は、単離したM/Mφ様細胞に限ったものではないことを示している。

考察

単離した破骨細胞前駆細胞（M/Mφ様細胞）について

本研究において、未分画骨由来細胞より破骨細胞前駆細胞、すなわち、M/Mφ様細胞を単離する新しい方法を確立した。これらの前駆細胞は骨髄由来のM/Mφ様細胞の特徴を有していた。

本研究では、このストローマ細胞やM/Mφ様細胞以外の血球系細胞を含まない細胞群を用いて、TGF-βが直接的にM/Mφ様細胞に働きかけ、sRANKLとM-CSFとによって誘導される破骨細胞形成を促進することを示した。単離したM/Mφ様細胞はTβR-IとTβR-IIに加え、TGF-β1、TGF-β2を発現していた。この結果は、これらのM/Mφ様細胞がTGF-β産生細胞群であり、同時にTGF-β反応性の細胞群であることを示している。各種の血球系細胞は、TGF-βとその受容体を発現しており、それらの増殖や分化はTGF-βによって制御されている（34, 35）。破骨細胞も血液幹細胞を起源とすることから（36）、単離したM/Mφ様細胞がTGF-βとその受容体を発現していることは、これらの知見と一致している。事実、ニワトリの破骨細胞やヒトの巨細胞肉腫由来の破骨細胞様多核細胞では、TGF-βとその受容体の発現が既に報告されている（33, 37）。加えて、TGF-βの中和抗体は単離したM/Mφ様細胞から成熟破骨細胞への分化を強く抑制することから、内在性に産生されるTGF-βのオートクライン作用が破骨細胞の分化に必須であると考えられる。さらに、本研究から、TGF-βはM/Mφ様細胞から破骨細胞lineageへのプライミングとその成熟過程の両方を促進することが示唆された。

本研究では破骨細胞前駆細胞を低濃度のPGE_2処理した未分画骨由来細胞より単離した。これらのM/Mφ様細胞は、その生存と増殖にM-CSFを必要とした。加えて、これらの細胞は各種のM/Mφlineageの表面抗原を発現しており、貪食能を示した。granulocyte-macrophage colony-stimulating factor（GM-CSF）は、これらの細胞

の生存を助けたが、その増殖やsRANKLによる破骨細胞への分化には寄与しなかった（データ省略）。最近、M/Mφ様細胞の特徴を有するヒト由来の細胞はM-CSFとGM-CSFによって、各々、破骨細胞と樹状細胞へと分化し得ることが示された（38）。加えて、単離したM/Mφ様細胞にlipopolysaccharideを加えて培養した場合（39）、これらの細胞はsRANKL、TGF-β1存在下においても、破骨細胞の形成は抑制された（データ省略）。これらのことを考え合わせると、単離した細胞群は常在性マクロファージ、破骨細胞、樹状細胞に分化することが可能な未分化なM/Mφlineageの細胞であると考えられた。

TGF-βと骨吸収について

最近、Sells らは、骨芽細胞／ストローマ細胞をわずかに含む骨髄細胞と脾臓細胞においてTGF-βがM-CSFとsRANKL 存在下に破骨細胞形成を促進することを報告した（40）。また、この報告と同時期に、RANKLを発現するTリンパ球と脾臓細胞の共培養においてTGF-βが破骨細胞形成を促進することが示された（41）。これらの研究の結果は、用いた細胞群の不均質性によりTGF-βの標的細胞が明確に示されていないものの、本研究における結果と一致する（40, 41）。さらには、ごく最近、TGF-βスーパーファミリーに属するactivinがM-CSFとsRANKL 存在下に破骨細胞形成を促進すること（42）、また、ウサギの破骨細胞にはsmad 1およびsmad5が発現しており、bone morphogenetic protein (BMP)-2が骨吸収を調節すること（43）が報告された。これらの報告はTGF-βスーパーファミリーの各因子と破骨細胞形成には、これまで報告されてきた以上に密接な関わりがあることを示唆している。

本研究に用いた細胞群は、M/Mφの表現型をもつ均質な細胞から構成され、M-CSFとsRANKL、そしてTGF-β存在下でそのすべての細胞が破骨細胞へと分化した。よって、TGF-βは破骨細胞前駆細胞であるM/Mφ様細胞に直接的に働きかけ、破骨細胞への分化

を促進することが示された。本研究の結果と従来の共培養系での破骨細胞形成抑制に関する報告を考え合わせると、TGF-βの破骨細胞形成に対する総合的な作用は、破骨細胞形成に関わる細胞群の構成に依存すると言える。

本研究では、未分画骨由来細胞を用いた場合にも、M-CSFとsRANKLとで誘導される破骨細胞形成をTGF-βが促進することを示した。この培養系はストローマ細胞が含まれる。しかし、理由は判らないが、この培養条件ではストローマ細胞が旺盛に増殖することはなかった。したがって、TGF-βの抑制効果は数多くのストローマ細胞／骨芽細胞が同時に存在しなければ発揮されないと考えられる。最近、RANKLのデコイレセプターであり、RANKLの作用を強力に抑制するosteoprotegerin ／OCIFの発現をTGF-βが促進することが示された（44）。よって、osteoprotegerinは、ストローマ細胞を介したTGF-βの破骨細胞形成抑制作用を担う仲介物質の一つであると考えられる。本研究の結果は、骨吸収抑制におけるTGF-βとosteoprotegerinの関与を否定するものではない。しかし、Fig. 12のスキーマに示すように、内在性のTGF-βは破骨細胞形成に対し本質的に必要な因子であること。そして、ストローマ一細胞の存在が少ない環境下では外来性TGF-βも破骨細胞形成を促進し得る、といった本研究の結果は、従来の考え方に一石を投じるものである。

TGF-βの破骨細胞形成促進の機序について

最近、PGE_2 がM-CSFとsRANKLと協調し、血液系細胞からの破骨細胞の形成を促進することが報告された（45）。各種の細胞において、TGF-βはPGG/H synthase-2の発現を誘導することにより、PGs の産生を促すことが知られている（46, 47）。これらの報告は、本研究におけるTGF-βの破骨細胞形成促進が内在性PGsの産生によって仲介されている可能性を示唆する。しかし、PGG/H synthase-2の選択的阻害薬として知られるNS-398は、本研究でのTGF-βの破骨細胞形成作用に影響を与えなかった（データ

省略）。よって、TGF-βの破骨細胞形成促進効果は内在性PGs 産生に依存するものではないと考えられる。

最近、樹状細胞ならびに破骨細胞において、RANKLはその受容体であるRANKを介して、NF-κBと c-Jun N-terminal protein kinase (JNK)を活性化することが示されている（12, 48, 49）。最近の研究では、RANKLがRANKに結合すると、数種のTNF receptor-associated factors (TRAF)が召集され、その情報伝達カスケードからNF-κBが活性化することが示されている（48-50）。NF-κB1とNF-κB2のダブルノックアウトマウスおよびTRAF6ノックアウトマウスでは破骨細胞形成の欠陥により、重篤な大理石病様の病態を呈することが報告されている（51, 52）。同様にAP-1の構成タンパク質として知られるc-Fosノックアウトマウスにおいても大理石病様の病態が報告されており（53）、in vitroではAP-1の構成タンパク質であるFra-1の強制発現が破骨細胞形成を強く促進することが報告されている（54）。つまり、AP-1ならびにNF-κBのシグナル伝達系は破骨細胞形成に必須なシグナルであると考えられる。

本研究では、TGF-β1はM/Mφ様細胞におけるRANKの発現に影響を与えないにもかかわらず、TGF-β1前処理がsRANKL刺激に依存したAP-1およびNF-κBの核移行を強く促進することを示した。この結果は、TGF-βとRANKLの細胞内シグナルに、何らかの相互作用が存在することを示唆する。最近、TGF-β-activated kinase 1 (TAK1)は機能的にI-κB kinaseと結合し、NF-κBを活性化すること（55）、また、マクロファージの活性化に対するTGF-βの抑制作用はsmad3を介すること（56）が報告された。現在、TGF-βの破骨細胞形成促進シグナルにおける詳細な分子機構は判らないが、このようなTGF-β受容体下流のシグナリング分子とRANKシグナルに介在する分子の相互作用は、本研究におけるTGF-βの破骨細胞形成促進作用の一部を説明するかも知れない。

以前より、TGF-βが骨関連疾患の病態に関わることが示唆されてきた。リウマチ性関節炎における滑膜には、IL-1 、TNF-αのような炎症性サイトカインと共に、TGF-β産

生能を持つマクロファージ様細胞が多く存在することが知られている（57, 58）。また、変型性関節炎を含む他のタイプの関節炎においても、その関節液中に多量のTGF-βが検出されている（59）。加えて、最近では、血清中のTGF-βは骨粗鬆症の女性において上昇しており、骨量減少と高い相関を持つことが報告されている（60）。本研究の結果とこれらの報告を考え合わせると、TGF-βは*in vivo*においても骨形成と同様に骨吸収および骨破壊に関与している可能性が示唆される。

結論

（1）未分画骨由来細胞より、破骨細胞前駆細胞であるM/Mφ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/Mφ様細胞はTGF-β受容体と内在的にTGF-βを発現していた。

（3）TGF-β1は、M-CSFとsRANKLによるM/Mφ様細胞から破骨細胞への分化を著しく促進した。

（4）TGF-β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-β1の前処理は、M/Mφ様細胞において、sRANKL刺激によるAP-1とNF-κBの活性化を大きく促進した。

以上の結果より、破骨細胞分化が誘導される微小環境によっては、TGF-βが破骨細胞形成を強く促進し得ること。また、TGF-β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-β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。

謝辞

稿を終えるにあたり、本研究の実験について丁寧な御指導を賜りました、明海大学歯学部口腔解剖学第一講座、久米川正好教授、羽毛田慈之助教授に心よりお礼申し上げます。また、御校閲を賜りました大阪大学歯学部第一口腔解剖学講座、栗栖浩二郎教授に深く感謝致します。また、さらに、有益な御助言をいただきましたUniversity of Connecticut Health Center の L. G. Raisz 博士、抗RANK抗体を御供与いただきました雪印乳業（株）東尾侃二博士、フローサイトメーターを使用させていただきましたアベンティスファーマ（株）栗木武夫博士に心より感謝の意を表します。

最後に、本研究を進めるにあたり、多くの御助言、御協力をいただきました大阪大学歯学部第一口腔解剖学講座、明海大学歯学部口腔解剖学第一講座の教室員の方々に厚く御礼申し上げます。

引用文献

1. Felix, R., M. G.Cecchini, W. Hofstetter, P. R. Elford, A. Stutzer, and H. Fleisch. 1990. Impairment of macrophage colony-stimulating factor production and lack of resident bone marrow macrophages in the osteopetrotic op/op mouse. *J. Bone Miner. Res. 5:781.*

2. Kodama, H., A. Yamasaki, M. Nose, S. Niida, Y. Ohgame, M. Abe, M. Kumegawa, and T. Suda. 1991. Congenital osteoclast deficiency in osteopetrotic (op/op) mice is cured by injections of macrophage colony-stimulating factor. *J. Exp. Med. 173:269.*

3. Chambers, T. J. 1985. The pathobiology of the osteoclast. *J. Clin. Pathol. 38:241.*

4. Suda, T., N. Udagawa, I. Nakamura, C. Miyaura, and N. Takahashi. 1995. Modulation of osteoclast differentiation by local factors. *Bone 17:87S.*

5. Lacey, D. L., E. Timms, H. L. Tan, M. J. Kelley, C. R. Dunstan, T. Burgess, R. Elliott, A. Colombero, G. Elliott, S. Scully, H. Hsu, J. Sullivan, N. Hawkins, E. Davy, C. Capparelli, A. Eli, Y. X. Qian, S. Kaufman, I. Sarosi, V. Shalhoub, G. Senaldi, J. Guo, J. Delaney, and W. J. Boyle. 1998. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell 93:165.*

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

7. Kong, Y. Y., H. Yoshida, I. Sarosi, H. L. Tan, E. Timms, C. Capparelli, S. Morony, A. J. Oliveira-dos-Santos, G. Van, A. Itie, W. Khoo, A. Wakeham, C. R. Dunstan, D. L. Lacey, T. W. Mak, W. J. Boyle, and J. M. Penninger. 1999. OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature 397:315.*

8. Wong, B. R., J. Rho, J. Arron, E. Robinson, J. Orlinick, M. Chao, S. Kalachikov, E. Cayani, F. S. Bartlett, W. N. Frankel, S. Y. Lee, and Y. Choi. 1997. TRANCE is a novel ligand of the tumor necrosis factor receptor family that activates c-Jun N-terminal kinase in T cells. *J. Biol. Chem. 272:25190.*

9. Anderson, D. M., E. Maraskovsky, W. L. Billingsley, W. C. Dougall, M. E. Tometsko, E. R. Roux, M. C. Teepe, R. F. DuBose, D. Cosman, and L. Galibert. 1997. A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature 390:175.*

10. Shalhoub, V., J. Faust, W. J. Boyle, C. R. Dunstan, M. Kelley, S. Kaufman, S. Scully, G. Van, and D. L. Lacey. 1999. Osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand effects on osteoclast formation from human peripheral blood mononuclear cell precursors. *J. Cell. Biochem. 72:251.*

11. Faust, J., D. L. Lacey, P. Hunt, T. L. Burgess, S. Scully, G. Van, A. Eli, Y. Qian, and V. Shalhoub. 1999. Osteoclast markers accumulate on cells developing from human peripheral blood mononuclear precursors. *J Cell. Biochem. 72:67.*

12. Hsu, H., D. L. Lacey, C. R. Dunstan, I. Solovyev, A. Colombero, E. Timms, H. L. Tan, G. Elliott, M. J. Kelley, I. Sarosi, L. Wang, X. Z. Xia, R. Elliott, L. Chiu, T. Black, S. Scully, C. Capparelli, S. Morony, G. Shimamoto, M. B. Bass, and W. J. Boyle. 1999. Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:3540.*

13. Cashman, J. D., A. C. Eaves, E. W. Raines, R. Ross, and C. J. Eaves. 1990. Mechanisms that regulate the cell cycle status of very primitive hematopoietic cells in long-term human marrow cultures. I. Stimulatory role of a variety of mesenchymal cell activators and inhibitory role of TGF-ß. *Blood 75:96.*

14. Masui, T., L. M. Wakefield, J. F. Lechner, M. A. LaVeck, M. B. Sporn, and C. C. Harris. 1986. Type ß transforming growth factor is the primary differentiation-inducing serum factor for normal human bronchial epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:2438.*

15. Antosz, M. E., C. G. Bellows, and J. E. Aubin. 1989. Effects of transforming growth factor ß and epidermal growth factor on cell proliferation and the formation of bone nodules in isolated fetal rat calvaria cells. *J. Cell. Physiol. 140:386.*

16. Hock, J. M., E. Canalis, and M. Centrella. 1990. Transforming growth factor-ß stimulates bone matrix apposition and bone cell replication in cultured fetal rat calvariae. *Endocrinology 126:421.*

17. Lerner, U. H. 1996. Transforming growth factor-ß stimulates bone resorption in neonatal mouse calvariae by a prostaglandin-unrelated but cell proliferation-dependent pathway. *J. Bone Miner. Res. 11:1628.*

18. Hattersley, G. and T. Chambers. 1991. Effects of transforming growth factor ß1 on the regulation of osteoclastic development and function. *J. Bone Miner. Res. 6:165.*

19. Hughes, D. E., A. Dai, J. C. Tiffee, H. H. Li, G. R. Mundy, and B.F. Boyce. 1996. Estrogen promotes apoptosis of murine osteoclasts mediated by TGF-ß. *Nat. Med. 2:1132.*

20. Chenu, C., J. Pfeilschifter, G. R. Mundy, and G. D. Roodman. 1988. Transforming growth factor ß inhibits formation of osteoclast-like cells in long-term human marrow cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5683.*

21. Pfeilschifter, J., S. M. Seyedin, and G. R. Mundy. 1988. Transforming growth factor ß inhibits bone resorption in fetal rat long bone cultures. *J. Clin. Invest. 82:680.*

22. Fiorelli, G., R. T. Ballock, L. M. Wakefield, M. B. Sporn, F. Gori, L. Masi, U. Fredian, A. Tanini, P. A. Bernabei, and M. L. Brandi. 1994. Role for autocrine TGF-ß1 in regulating differentiation of a human leukemic cell line toward osteoclast-like cells. *J. Cell. Physiol. 160:482.*

23. Erlebacher, A. and R. Derynck. 1996. Increased expression of TGF-ß2 in osteoblasts results in an osteoporosis-like phenotype. *J. Cell Biol. 132:195.*

24. Erlebacher, A., E. H.Filvaroff, J. Q. Ye, and R. Derynck. 1998. Osteoblastic responses to TGF-ß during bone remodeling. *Mol. Biol. Cell 9:1903.*

25. Filvaroff, E., A. Erlebacher, J. Ye, S. E. Gitelman, J. Lotz, M. Heillman, and R. Derynck. 1999. Inhibition of TGF-ß receptor signaling in osteoblasts leads to decreased bone remodeling and increased trabecular bone mass. *Development 126:4267.*

26. Shinar, D. M. and G. A. Rodan. 1990. Biphasic effects of transforming growth factor-ß on the production of osteoclast-like cells in mouse bone marrow cultures: the role of prostaglandins in the generation of these cells. *Endocrinology 126:3153.*

27. Mundy, G. R. and L. F. Bonewald. 1990. Role of TGF-ß in bone remodeling. *Ann. N.Y. Acad. Sci. 593:91.*

28. Centrella,M., T. L. McCarthy, and E. Canalis. 1991. Transforming growth factor-ß and remodeling of bone. *J Bone Joint Surg. Am. 73:1418.*

29. Collins, D. A., and T. J. Chambers. 1991. Effect of prostaglandins E_1, E_2, and $F_{2\alpha}$ on osteoclast formation in mouse bone marrow cultures. *J. Bone Miner. Res. 6:157.*

30. Schreiber, E., P. Matthias, M. M. Muller, and W.Schaffner. 1989. Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells. *Nucleic Acids Res. 17:6419.*

31. Tushinski, R. J., I. T. Oliver, L. J. Guilbert, P. W. Tynan, J. R.Warner, and E. R. Stanley. 1982. Survival of mononuclear phagocytes depends on a lineage-specific growth factor that the differentiated cells selectively destroy. *Cell 28:71.*

32. Assoian, R. K., B. E. Fleurdelys, H. C. Stevenson, P. J. Miller, D. K. Madtes, E. W. Raines, R. Ross, and M. B. Sporn. 1987. Expression and secretion of type ß transforming growth factor by activated human macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:6020.*

33. Oursler, M. J. 1994. Osteoclast synthesis and secretion and activation of latent transforming growth factor β. *J. Bone Miner. Res. 9:443.*

34. Bursuker, I., K. M. Neddermann, B. A. Petty, B. Schacter, G. L. Spitalny, M. A. Tepper, and R. D. Pasternak. 1992. In vivo regulation of hemopoiesis by transforming growth factor ß1: stimulation of GM-CSF- and M-CSF-dependent murine bone marrow precursors. *Exp. Hematol. 20:431.*

35. Zhang, Y., Y. Y. Zhang, M. Ogata, P. Chen, A. Harada, S. Hashimoto, and K. Matsushima. 1999. Transforming growth factor-ß1 polarizes murine hematopoietic progenitor cells to generate Langerhans cell-like dendritic cells through a monocyte/macrophage differentiation pathway. *Blood 93:1208.*

36. Ash. P., J. F. Loutit, and K. M. Townsend. 1980. Osteoclasts derived from haematopoietic stem cells. *Nature 283:669.*

37. Zheng, M. H., Y. Fan, S. J. Wysocki, A. T. Lau, T. Robertson, M. Beilharz, D. J. Wood, and J. M. Papadimitriou. 1994. Gene expression of transforming growth factor-ß1 and its type II receptor in giant cell tumors of bone. Possible involvement in osteoclast-like cell migration. *Am. J. Pathol. 145:1095.*

38. Akagawa, K. S., N. Takasuka, Y. Nozaki, I. Komuro, M. Azuma, M. Ueda, M. Naito, and K. Takahashi. 1996. Generation of $CD1^{+}RelB^{+}$ dendritic cells and tartrate-resistant acid phosphatase-positive osteoclast-like multinucleated giant cells from human monocytes. *Blood 88:4029.*

39. Hailman, E., T. Vasselon, M. Kelley, L. A. Busse, M.C. Hu, H. S. Lichenstein, P. A. Detmers, and S. D. Wright. 1996. Stimulation of macrophages and neutrophils by complexes of lipopolysaccharide and soluble CD14. *J. Immunol. 156:4384.*

40. Sells, R. J. Galvin, C. L. Gatlin, J. W. Horn, and T. R. Fuson. 1999. TGF-ß Enhances Osteoclast Differentiation in Hematopoietic Cell Cultures Stimulated with RANKL and M-CSF. *Biochem. Biophys. Res .Commun. 265:233.*

41. Horwood, N. J., V. Kartsogiannis, J. M. Quinn, E. Romas, T. J. Martin, and M. T. Gillespie. 1999. Activated T lymphocytes support osteoclast formation in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun. 265:144.*

42. Fuller, K., K. E. Bayley, T. J. Chambers. 2000. Activin A is an essential cofactor for osteoclast induction. Biochem Biophys Res Commun. *268:2-7.*

43. Kaneko, H., T. Arakawa , H. Mano , T. Kaneda , A. Ogasawara , M. Nakagawa , Y. Toyama , Y. Yabe , M. Kumegawa , Y. Hakeda . 2000. Direct stimulation of osteoclastic bone resorption by bone morphogenetic protein (BMP)-2 and expression of BMP receptors in mature osteoclasts. Bone. *27:479-86.*

44. Takai, H., M. Kanematsu, K. Yano, E. Tsuda, K. Higashio, K. Ikeda, K. Watanabe, and Y. Yamada. 1998. Transforming growth factor-ß stimulates the production of osteoprotegerin/ osteoclastogenesis inhibitory factor by bone marrow stromal cells. *J. Biol. Chem. 273:27091.*

45. Wani, M. R., K. Fuller, N. S. Kim, Y. Choi, and T. Chambers. 1999. Prostaglandin E_2 cooperates with TRANCE in osteoclast induction from hemopoietic precursors: synergistic activation of differentiation, cell spreading, and fusion. *Endocrinology 140:1927.*

46. Pilbeam, C., Y. Rao, O. Voznesensky, H. Kawaguchi, C. Alander, L. G. Raisz, and H. Herschman. 1997. Transforming growth factor-ß1 regulation of prostaglandin G/H synthase-2 expression in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Endocrinology 138:4672.*

47. Diaz, A., K. P. Chepenik, J. H. Korn, A. M. Reginato, and S. A. Jimenez. 1998. Differential regulation of cyclooxygenases 1 and 2 by interleukin-1ß, tumor necrosis factor-α, and transforming growth factor-ß1 in human lung fibroblasts. *Exp. Cell Res. 241:222.*

48. Wong, B. R., R. Josien, S. Y. Lee, M. Vologodskaia, R. M. Steinman, and Y. Choi. 1998. The TRAF family of signal transducers mediates NF-κB activation by the TRANCE receptor. *J. Biol. Chem. 273:28355.*

49. Darnay, B. G., V. Haridas, J. Ni, P. A. Moore, and B. B. Aggarwal. 1998. Characterization of the intracellular domain of receptor activator of NF-κB (RANK). Interaction with tumor necrosis factor receptor-associated factors and activation of NF-κB and c-Jun N-terminal kinase. *J. Biol. Chem. 273:20551.*

50. Darnay, B. G., J. Ni, P. A. Moore, and B. B. Aggarwal. 1999. Activation of NF-κB by RANK requires tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 6 and NF-κB-inducing kinase. Identification of a novel TRAF6 interaction motif. *J. Biol. Chem. 274:7724.*

51. Franzoso, G., L. Carlson, L. Xing, L. Poljak, E. W. Shores, K. D. Brown, A. Leonardi, T. Tran, B. F. Boyce, and U. Siebenlist. 1997. Requirement for NF-κB in osteoclast and B-cell development. *Genes. Dev. 11:3482.*

52. Lomaga, M. A., W. C. Yeh, I. Sarosi, G. S. Duncan, C. Furlonger, A. Ho, S. Morony, C. Capparelli, G. Van, S. Kaufman, A. van der Heiden, A. Itie, A. Wakeham, W. Khoo, T. Sasaki, Z. Cao, J. M. Penninger, C. J. Paige, D. L. Lacey, C. R. Dunstan, W. J. Boyle, D. V. Goeddel, and T. W. Mak. 1999. TRAF6 deficiency results in osteopetrosis and defective interleukin-1, CD40, and LPS signaling. *Genes. Dev. 13:1015.*

53. Johnson, R.S., B.M.Spiegelman, and V. Papaioannou. 1992. Pleiotropic effects of a null mutation in the c-fos proto-oncogene. *Cell* 71:*577-86.*

54. Owens, J. M., K. Matsuo , G. C. Nicholson, E. F. Wagner, and T.J. Chambers. 1999. Fra-1 potentiates osteoclastic differentiation in osteoclast-macrophage precursor cell lines. *J Cell. Physiol. 179:170-8.*

55. Sakurai, H., H. Miyoshi, W. Toriumi, and T. Sugita. 1999. Functional interactions of transforming growth factor ß-activated kinase 1 with IκB kinases to stimulate NF-κB activation. *J. Biol. Chem. 274:10641.*

56. Werner, F., M. K.Jain, M. W. Feinberg , N. E. Sibinga , A. Pellacani, P. Wiesel, M. T. Chin , J. N. Topper, M. A. Perrella, M. E. Lee. 2000. Transforming growth factor-beta 1 inhibition of macrophage activation is mediated via smad3. J Biol Chem. *275:36653-8.*

57. Cutolo, M., A. Sulli, A. Barone, B. Seriolo, and S. Accardo. 1993. Macrophages, synovial tissue and rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Rheumatol. 11:331.*

58. van den Berg W. B. 1999. The role of cytokines and growth factors in cartilage destruction in osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Z. Rheumatol. 58:136.*

59. Gravallese, E. M., Y. Harada, J. T. Wang, A. H. Gorn, T. S. Thornhill, and S. R. Goldring. 1998. Identification of cell types responsible for bone resorption in rheumatoid arthritis and juvenile rheumatoid arthritis. *Am. J. Pathol. 152:943.*

60. Grainger, D. J., J. Percival, M. Chiano, and T. D. Spector. 1999. The role of serum TGF-ß isoforms as potential markers of osteoporosis. *Osteoporos. Int. 9:398.*

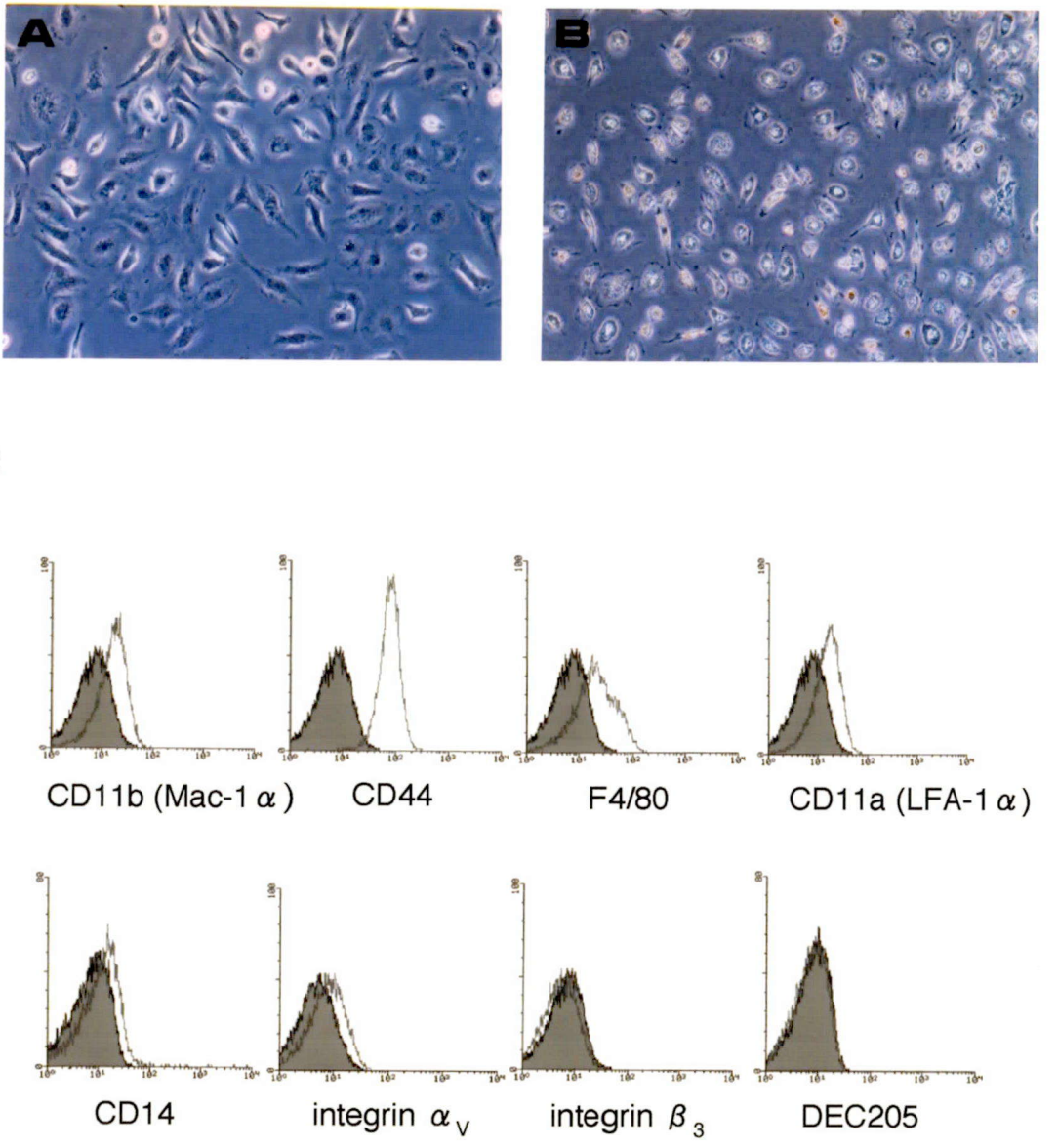


Fig. 1：単離したM/Mφ様細胞の位相差顕微鏡写真およびフローサイトメーターによるM/Mφ様細胞の表面抗原の解析。

ストローマ細胞層を除去した後、培養ディッシュの底面に残る細胞群を採取し、10%FBSを含むα-MEM培地にて、新しい培養ディッシュに移した（A：３時間後）。単離した細胞は形態的にM/Mφlineageに属する細胞群であった。単離した細胞に0.2%のラテックスビーズを与え培養し、３時間後、細胞に取り込まれていないビーズをPBSにて洗い流した。すべての細胞が貪食能を示した（B）。各写真内の棒線は100 μmを示す。単離した細胞の表面抗原をフローサイトメーターにより解析した（C）。非標識抗CD16/32抗体、あるいは過剰量のマウスIgGで非特異的結合をブロッキングした後、各種抗体で染色した。影のついた領域はavidin-FITC、FITC標識抗ラットIgG抗体、各種標識アイソタイプ抗体によるコントロール染色を示す。

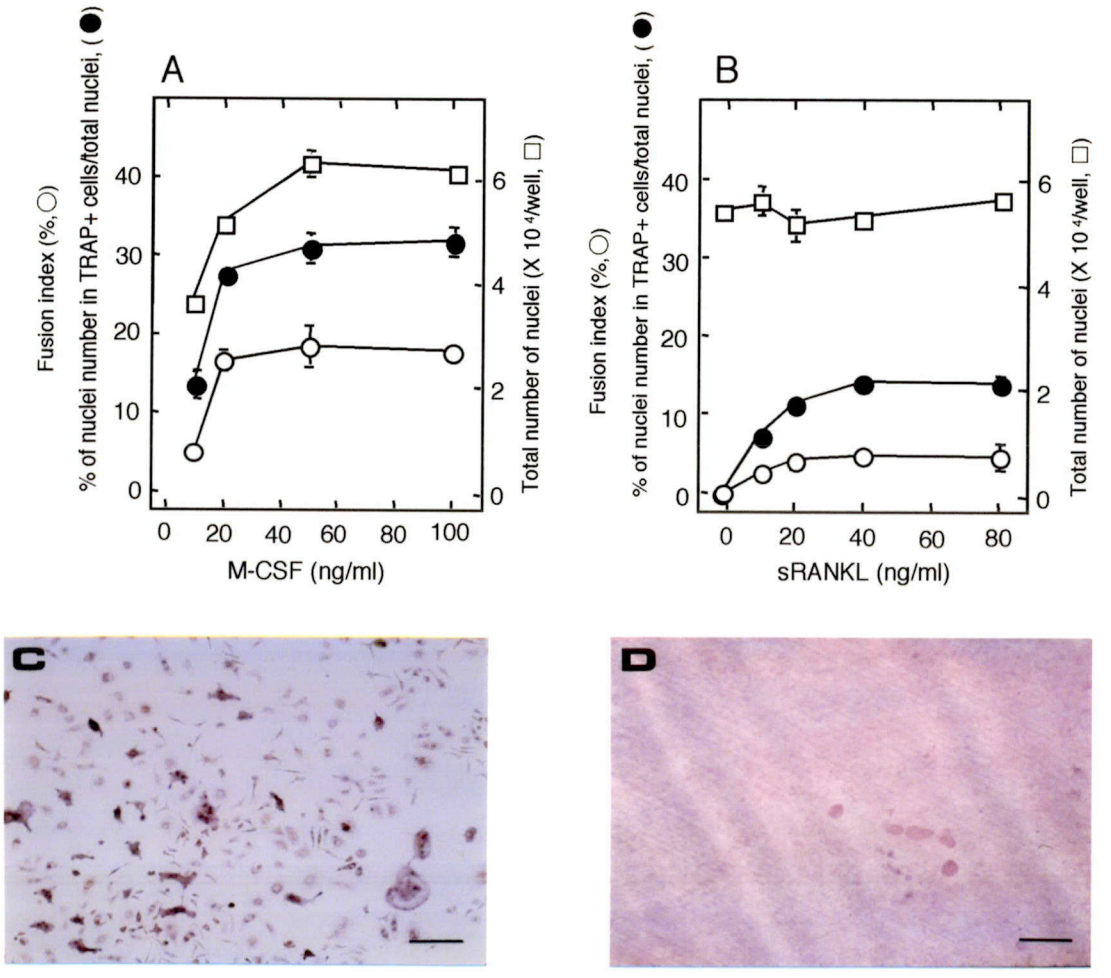


Fig. 2：M-CSFとsRANKLによるM/Mφ様細胞からの破骨細胞分化誘導。

M/Mφ様細胞が破骨細胞へと分化する際のM-CSF（A）とsRANKL（B）への依存性。単離したM/Mφ様細胞（1 X 10^4 細胞/cm^2）に各種濃度のM-CSFとsRANKL(40 ng/ml)を添加して6日間培養した（A）。単離したM/Mφ様細胞（2.5 X 10^4 細胞/cm^2）に各種濃度のsRANKLとM-CSF(10 ng/ml)を添加し、6日間培養した（B）。各培養終了後、TRAP染色、プロピジウムアイオダイドによる核染色を行い、全細胞およびTRAP陽性単核細胞とTRAP陽性多核細胞のそれぞれの核数をカウントした。総核数（□）は培養中の細胞の増殖を表す。総核数に対するTRAP陽性単核細胞とTRAP陽性多核細胞とに含まれる核数のパーセンテージ（●）はM/Mφ様細胞の破骨細胞lineage への分化率を示す。F. I.（◯）は成熟破骨細胞に至る細胞融合に関わったTRAP陽性の破骨細胞前駆細胞の全細胞に対するパーセンテージを示す。各値は代表する実験の3 ウェルの平均値±標準誤差で示した。M-CSF(10 ng/ml)とsRANKL(40 ng/ml)によって誘導された破骨細胞のTRAP染色像；6日目（C）。M-CSF(10 ng/ml)とsRANKL(40 ng/ml)を添加して培養したM/Mφ様細胞を5日目に象牙片上に移し、1日間で形成された吸収窩（D）。象牙片上に形成された吸収窩は酸ヘマトキシリンで染色された。各写真内の棒線は100 μmを示す。

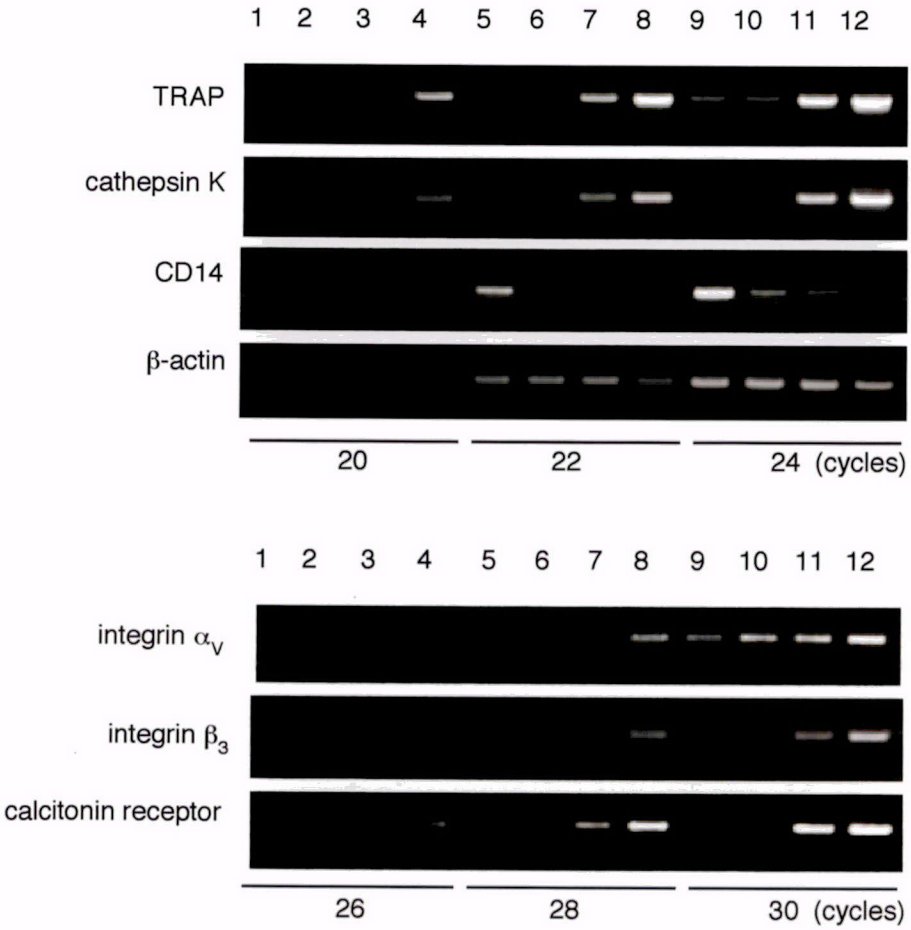


Fig. 3：半定量的RT-PCRによる各種mRNA発現の解析。

単離した直後のM/Mφ様細胞から得たtotal RNA（lanes 1, 5, 9）。M-CSF（10 ng/ml）のみを加え6日間培養したM/Mφ様細胞から得たtotal RNA（lanes 2, 6, 10）。M-CSFとsRANKL（40 ng/ml）を加え6日間培養し、M/Mφ様細胞と一部破骨細胞へと分化した細胞群から得たtotal RNA（lanes 3, 7, 11）。M-CSF、sRANKLとTGF-β1（10 ng/ml）を加え6日間培養し、破骨細胞へと分化した細胞群から得たtotal RNA（lanes 4, 8, 12）。用いたプライマーはマウスTRAP、cathepsin K、CD14、integrin α_V、integrin β_3、calcitonin受容体およびβ-actin遺伝子からデザインされた。写真下の数字はPCRの増幅回数を示す。

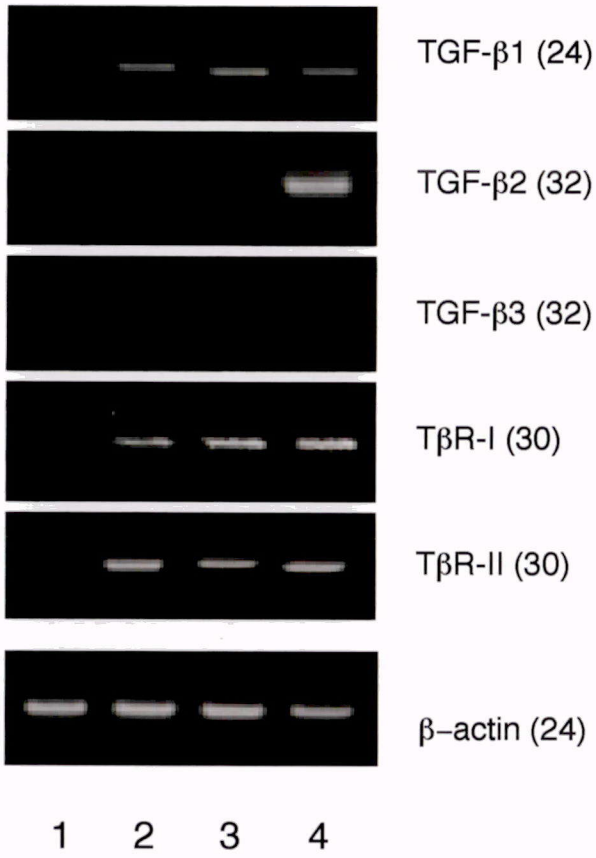


Fig. 4：TGF-βsとTGF-β受容体の発現。

単離した直後のM/Mφ様細胞から得たtotal RNA（lane 1）。M-CSF（10 ng/ml）のみを加え6日間培養したM/Mφ様細胞から得たtotal RNA（lane 2）。M-CSFとsRANKL（40 ng/ml）を加え6日間培養し、M/Mφ様細胞と一部、破骨細胞へと分化した細胞群から得たtotal RNA（lane 3）。M-CSF、sRANKLとTGF-β1（10 ng/ml）を加え6日間培養し、破骨細胞へと分化した細胞群から得たtotal RNA（lane 4）。括弧内はPCRの増幅回数を示す。

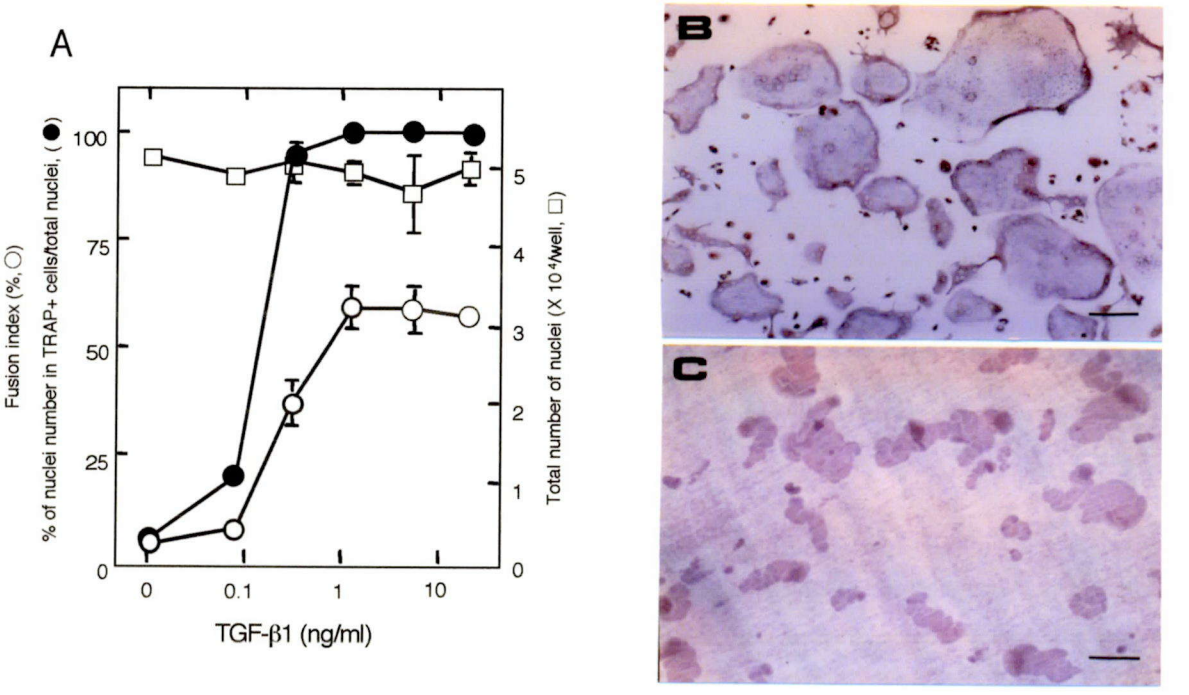


Fig. 5：破骨細胞形成のTGF-βに対する依存性。

単離したM/Mφ様細胞（2.5 X 10^4 細胞/cm^2）に各種濃度のTGF-β1とM-CSF（10 ng/ml）、sRANKL(40 ng/ml)を添加し6日間培養した（A）。各培養終了後、TRAP染色とプロピジウムアイオダイドによる核染色を行い、総核数（□）、TRAP陽性細胞率（●）、およびF. I.（○）を測定した。各値は代表する実験の3ウェルの平均値±標準誤差で示す。M-CSF(10 ng/ml)、sRANKL(40 ng/ml)にTGF-β1（10 ng/ml）を加えて誘導された破骨細胞のTRAP染色像；6日目（B）。M-CSF(10 ng/ml)、sRANKL(40 ng/ml)にTGF-β1（10 ng/ml）を加え培養した細胞群を5日目に象牙片上に移し、1日後に形成された吸収窩（C）。象牙片上に形成された吸収窩を酸ヘマトキシリンにより染色した。各写真内の棒線は100 μmを示す。

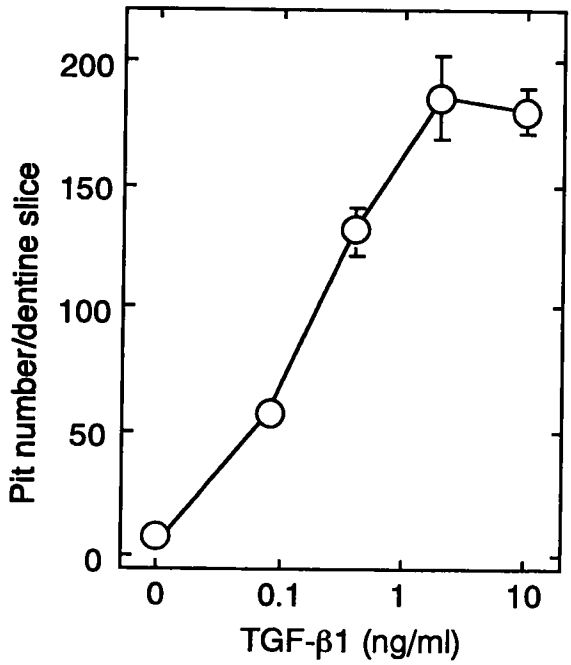
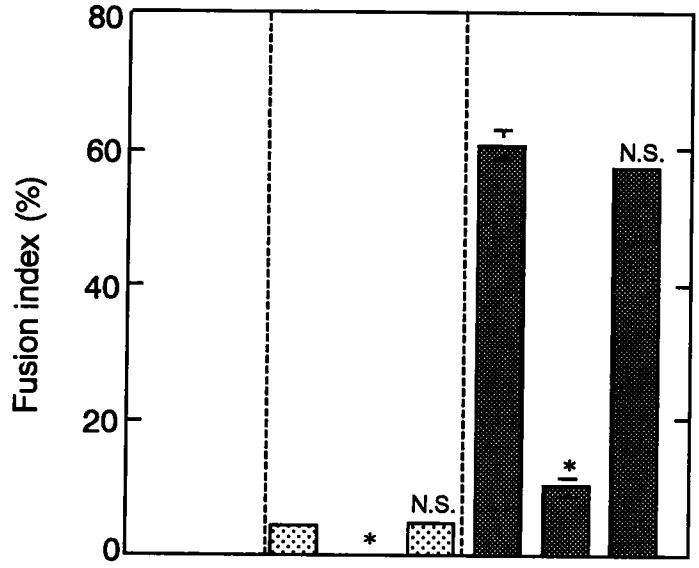


Fig. 6：M/Mφ様細胞にM-CSF、sRANKLと各種濃度のTGF-β1を加えて培養した細胞群の吸収窩形成能。

M-CSF(10 ng/ml)、sRANKL(40 ng/ml)と各種濃度のTGF-β1（0 - 10 ng/ml）を加えて培養した細胞群を5日目にtrypsin/EDTAにより採取し、800細胞/象牙片の細胞密度で象牙片上に移した。1日後、象牙片上の細胞群を剥ぎ取り、形成された吸収窩を酸ヘマトキシリンで染色し、顕微鏡下でその数をカウントした。各値は代表する実験の4ウェルの平均値±標準誤差で示す。



M-CSF	+	+	+	+	+	+	+	+
TGF-β1	-	+	-	-	-	+	+	+
sRANKL	-	-	+	+	+	+	+	+
anti-TGF-β-Ab.	-	-	-	+	-	-	+	-
control IgG1	-	-	-	-	+	-	-	+

Fig. 7： M-CSFとsRANKLによる破骨細胞形成に対するTGF-β中和抗体の抑制効果。

単離したM/Mφ様細胞をM-CSF(10 ng/ml)、sRANKL(40 ng/ml)、TGF-β1（10 ng/ml）の各種組み合わせに、それぞれTGF-β中和抗体(20μg/ml)、アイソタイプコントロールIgG1(20μg/ml)を添加し、6日間培養後のF. I.を算出した。各値は代表する実験の3ウェルの平均値±標準誤差で示す。
*p<0.01：Dunnettの多重比較による。

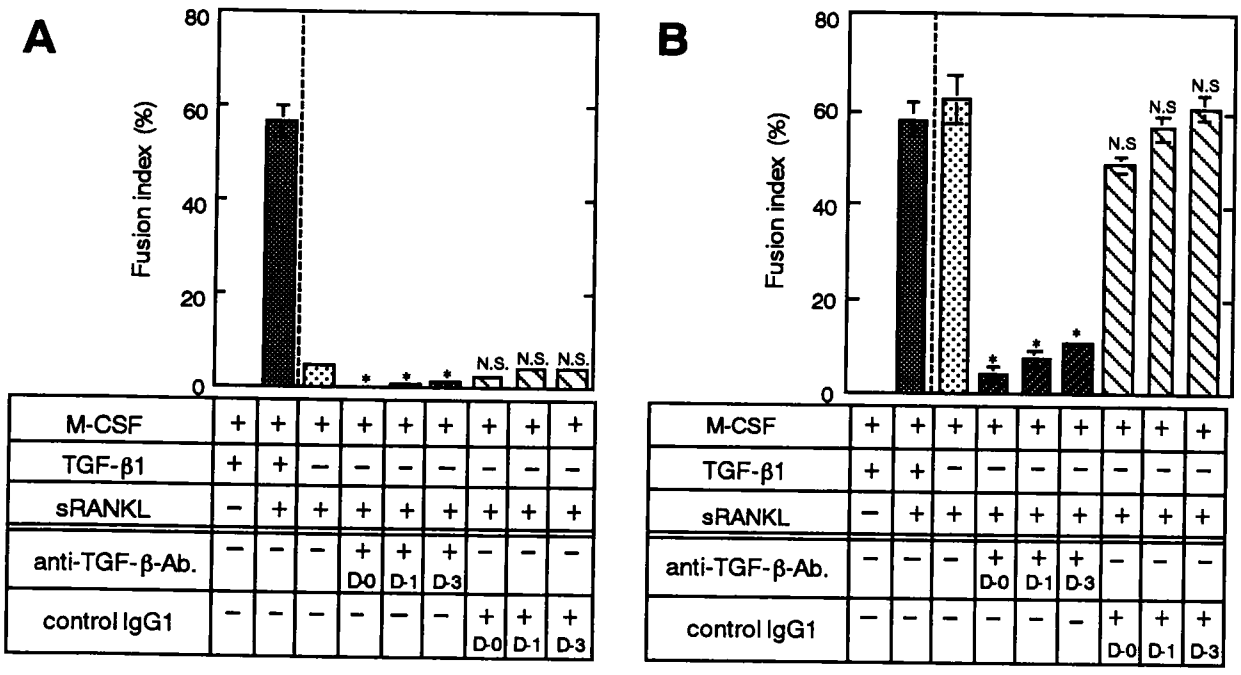


Fig. 8：破骨細胞分化過程のプライミングと成熟に対するTGF-β中和抗体の抑制効果。

単離したM/Mφ様細胞をM-CSF(10 ng/ml)単独（A）、もしくはM-CSFとTGF-β1（10 ng/ml）（B）を加え、2日間前培養した。前培養後、培養液を除き各ウェルを洗浄した後、M-CSF、sRANKL(40 ng/ml)、TGF-β1の各種組み合わせにより破骨細胞形成を誘導し、経時的にTGF-β中和抗体(20μg/ml)、アイソタイプコントロールIgG1(20μg/ml)を添加し、6日後（計8日後）のF. I.を算出した。TGF-β中和抗体とアイソタイプコントロールIgG1は、それぞれ前培養後、day 0 (D-0)、day 1 (D-1)、day 3 (D-3)に加えた。各値は代表する実験の3ウェルの平均値±標準誤差で示す。

*$p<0.01$：Dunnettの多重比較による。

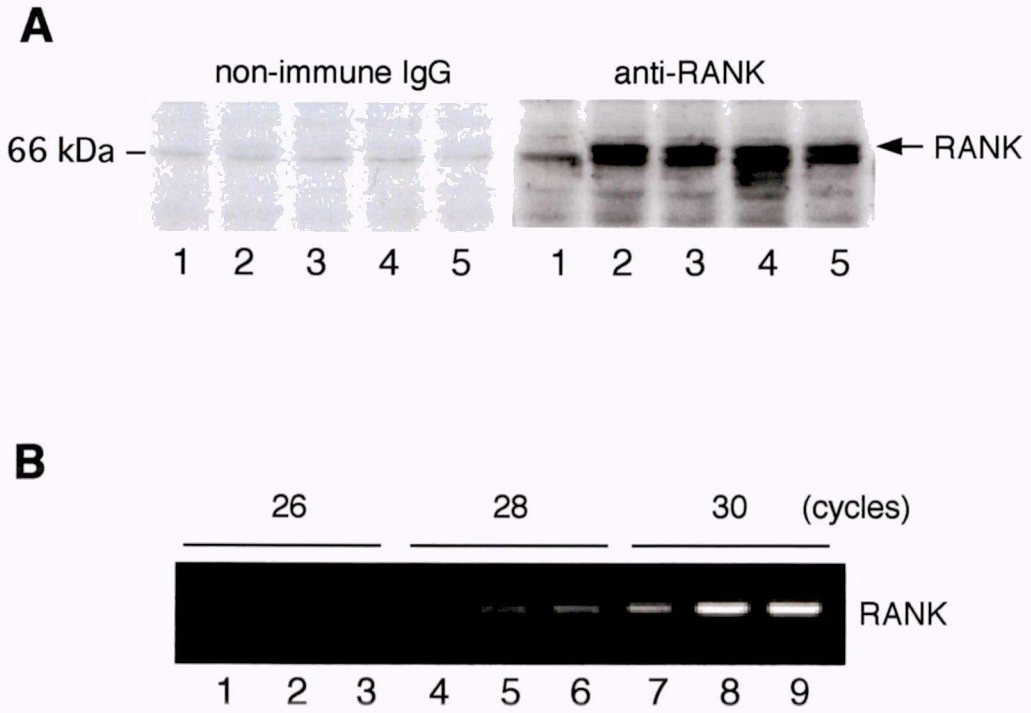


Fig. 9：M/Mφ様細胞のRANKL受容体（RANK）発現に対するTGF-β1の効果。

抗RANK抗体によるウエスタンブロッティング（A）。マウスRANKプライマーを用いたRT-PCR（B）。単離した直後のM/Mφ様細胞から得たタンパク質とtotal RNA（A: lane 1 ; B: lanes 1, 4, 7）。M-CSF（10 ng/ml）のみを加え2日間培養したM/Mφ様細胞から得た、タンパク質とtotal RNA（A: lane 2 ; B: lanes 2, 5, 8）。M-CSFとTGF-β1（10 ng/ml）を加え6日間培養したM/Mφ様細胞から得た、タンパク質とtotal RNA（A: lane 3 ; B: lanes 3, 6, 9）。M-CSF（100 ng/ml）のみを加え2日間培養したM/Mφ様細胞から得たタンパク質と（A: lane 4）。M-CSF（100 ng/ml）とTGF-β1（10 ng/ml）を加え6日間培養したM/Mφ様細胞から得たタンパク質（A: lane 5）。

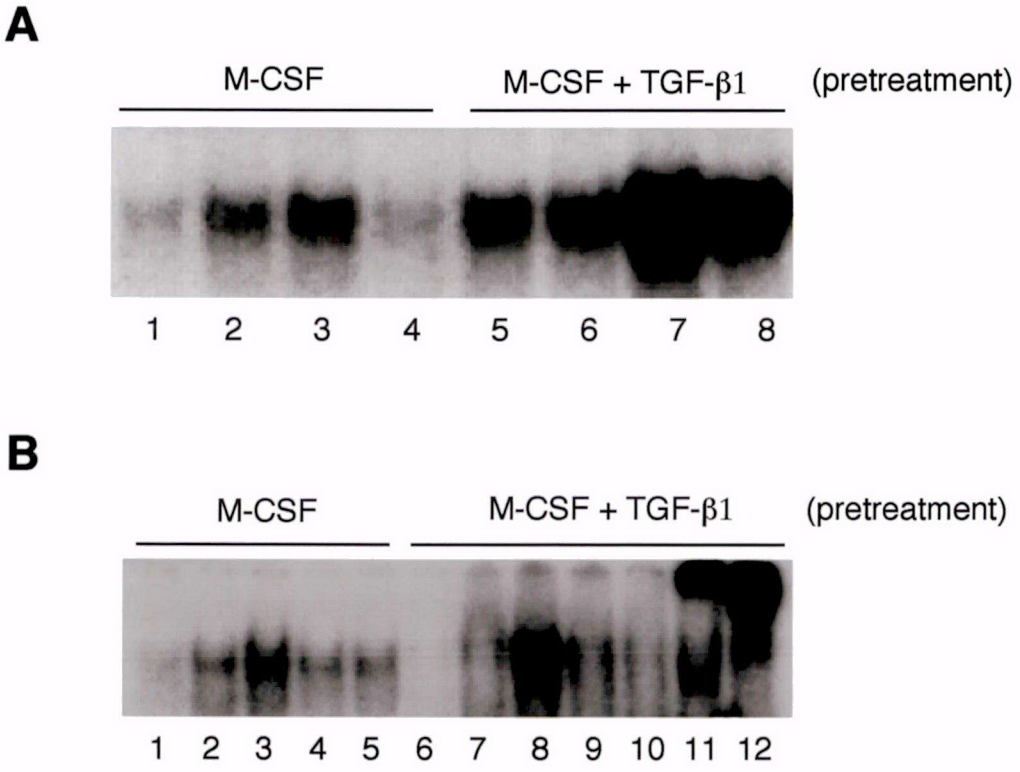


Fig. 10：M/Mφ様細胞のsRANKL刺激によるAP-1、NF-κB活性化に対するTGF-βの効果。

M-CSF（10 ng/ml）添加群、M-CSF＋TGF-β1（10 ng/ml）添加群を、それぞれ2日間前培養した後、sRANKL(40 ng/ml)で刺激した。刺激後、経時的に核抽出液を採取し、ゲルシフトアッセイに供した。 A: AP-1；0 h（lanes 1, 5）、0.5 h（lanes 2, 6）、1 h（lanes 3, 7）、3 h（lanes 4, 8）、B: NF-κB；0 h（lanes 1, 6）、0.5 h（lanes 2, 7）、1 h（lanes 3, 8, 11, 12）、2 h（lanes 4, 9）、4 h（lanes 5, 10）；lane 11およびlane 12はlane 8に用いたサンプルを標識オリゴDNAと結合させた後、それぞれ抗p50抗体、抗65抗体と反応させ、スーパーシフトさせた。

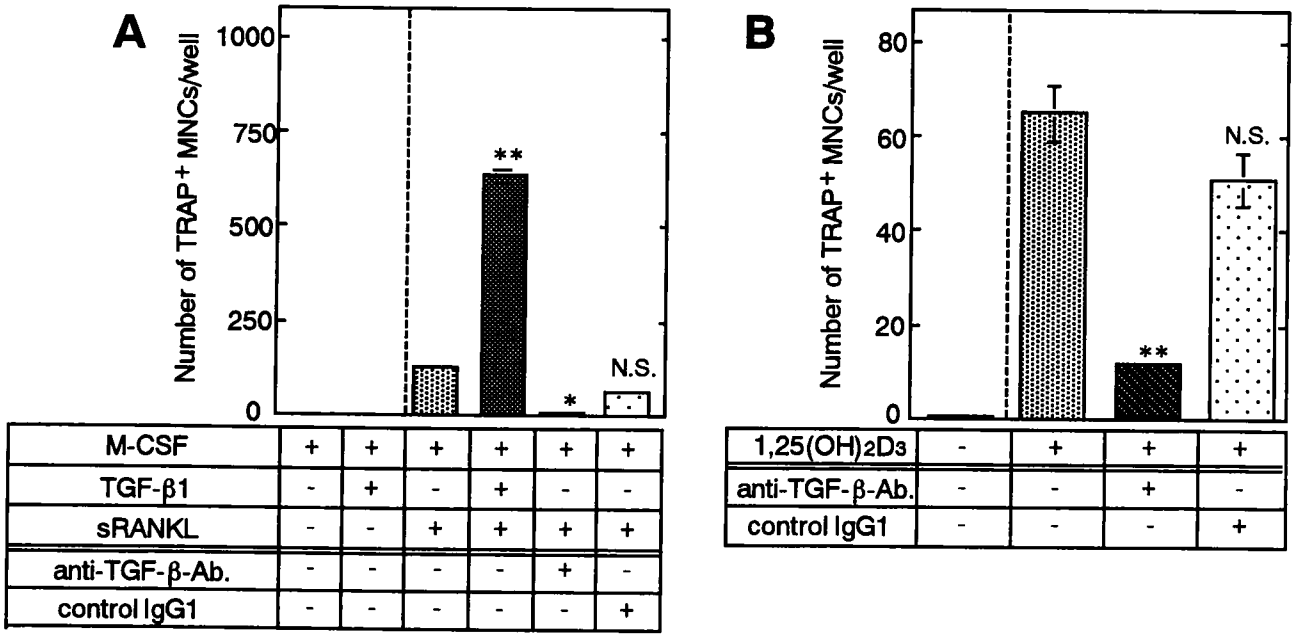


Fig. 11：未分画骨由来細胞における破骨細胞形成に対するTGF-β1とTGF-β中和抗体の効果。

（A）：未分画骨由来細胞（1 X 10^5細胞）を96 穴プレートの各ウェルに播き込み、M-CSF(10 ng/ml)、sRANKL(40 ng/ml)、TGF-β1（10 ng/ml）の各種組み合わせとTGF-β中和抗体(20μg/ml)、アイソタイプコントロールIgG1(20 μg/ml) を添加した。5日後にTRAP染色を行い、3核以上を含むTRAP陽性多核細胞の数を顕微鏡下でカウントした。

（B）：未分画骨由来細胞（5 X 10^5細胞）を96穴プレートの各wellに播き込み、$1,25(OH)_2D_3$（10 nM）とTGF-β中和抗体(20μg/ml)、アイソタイプコントロールIgG1(20μg/ml) を添加した。7日後にTRAP染色を行い、3核以上を含むTRAP陽性多核細胞の数を顕微鏡下でカウントした。各値は代表する実験の3ウェルの平均値±標準誤差で示す。

(A)： $^{**}p<0.01$, $^{*}p<0.05$

(B)： $^{**}p<0.01$

Dunnettの多重比較による。

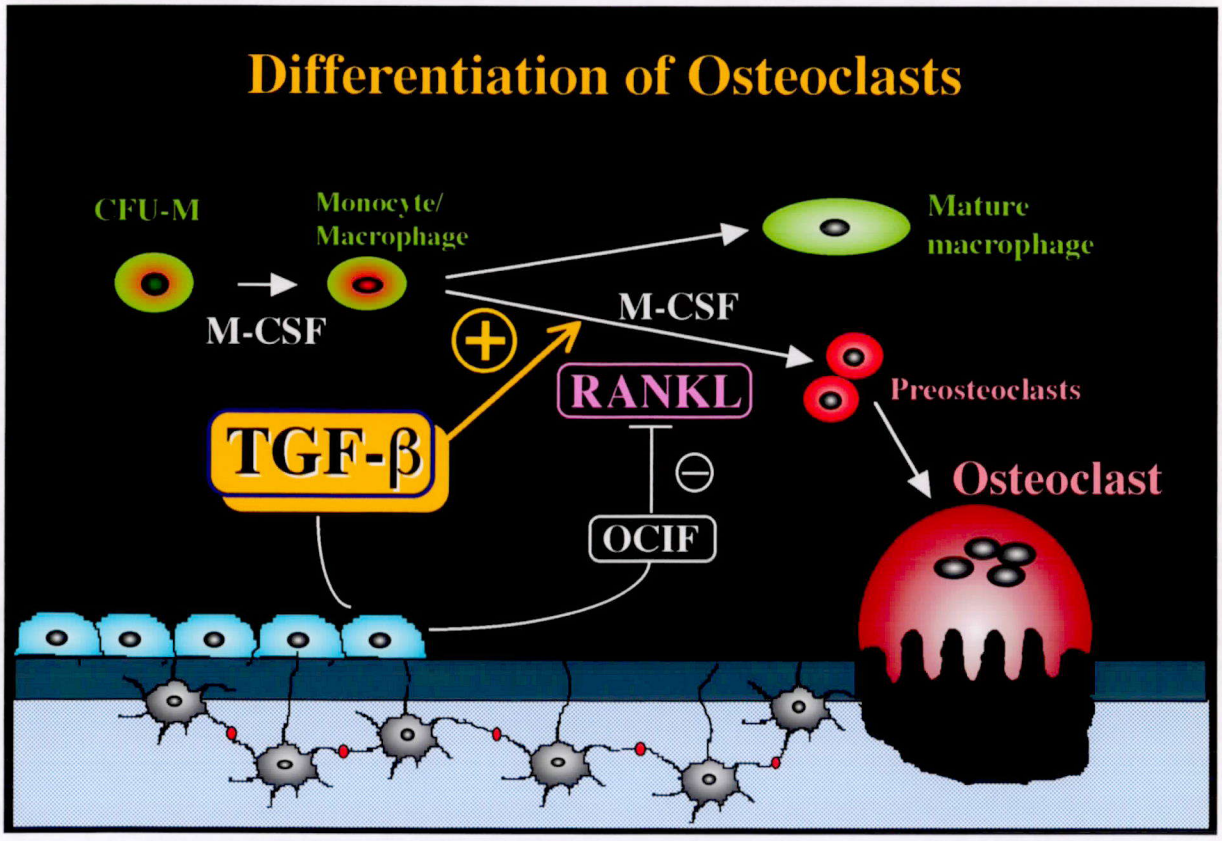


Fig.12：破骨細胞の分化過程におけるTGF-βの作用機構