

Title	Cbfa1はRANKLの発現を誘導し、破骨細胞の分化を促進する
Author(s)	塩尻, 聡子
Citation	大阪大学, 2002, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43671
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	塩尻聡子
博士の専攻分野の名称	博士(歯学)
学位記番号	第 16948 号
学位授与年月日	平成14年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 歯学研究科歯学臨床系専攻
学位論文名	Cbfa1は RANKL の発現を誘導し、破骨細胞の分化を促進する
論文審査委員	(主査) 教授 高田 健治 (副査) 教授 米田 俊之 講師 飯田 征二 講師 鳥袋 善夫

論文内容の要旨

【目的】

成熟破骨細胞による石灰化基質の吸収は、内軟骨性骨化における石灰化軟骨への血管侵入の過程に重要と考えられている。Cbfa1のノックアウトマウスは、骨芽細胞の分化障害により骨形成を完全に欠損するが、それに加えて破骨細胞の分化障害も認められる。正常マウスの頭蓋冠より分離した間葉系細胞は *in vitro* において破骨細胞形成支持能を有するが、Cbfa1欠損マウスの頭蓋冠由来の細胞では破骨細胞形成支持能が低下していることも報告されており、Cbfa1が破骨細胞分化に対して促進的に作用することが *in vitro*、*in vivo* いずれからも示唆されている。さらにCbfa1のノックアウトマウスでは、破骨細胞分化誘導因子 RANKL の発現低下が報告されており、Cbfa1が骨芽細胞系列の細胞に RANKL を誘導し、そのシグナルを介して破骨細胞の分化を促進する可能性も示唆されている。

そこで本研究では、Cbfa1欠損マウスより樹立した頭蓋冠由来の細胞株に Cbfa1 を遺伝子導入し、Cbfa1 が破骨細胞形成に促進的に作用し得るか否かを *in vitro* で検討した。また Cbfa1 欠損状態に *in vitro* および *in vivo* で RANKL シグナルを与えて破骨細胞の分化へ及ぼす効果を調べ、Cbfa1 が RANKL のシグナルを介して破骨細胞の分化を促進する可能性についても検討した。

【方法】

(1)胎生18.5日の Cbfa1ノックアウトマウスの頭蓋冠より細胞株(120-4)を樹立し、正常マウスの骨髄細胞と共培養し、*in vitro* での破骨細胞形成能を検討した。またこの Cbfa1 を欠損する 120-4 細胞に対してアデノウイルスを用いて Cbfa1 を遺伝子導入し、RANKL と破骨細胞分化抑制因子 OPG の発現、および破骨細胞形成に与える効果を検討した。(2)120-4 と骨髄細胞との共培養に soluble RANKL (sRANKL) を加えて、Cbfa1 欠損状態において RANKL シグナルを与えて破骨細胞の成熟を引き起こせるかを *in vitro* で検討した。(3)sRANKL を強発現し、成獣で骨粗鬆症様の表現型を示すトランスジェニック (sRANKL Tg) マウスと Cbfa1ヘテロ変異マウスを交配させ、sRANKL Tg-Cbfa1ヘテロ変異マウスを得た。さらにこのマウスと cbfa1ヘテロ変異マウスとを交配させて sRANKL Tg-Cbfa1ホモ変異マウスを作成し、Cbfa1欠損状態での RANKL シグナルの低下を *in vivo* で補って破骨細胞の分化へ及ぼす効果を検討した。なお破骨細胞は組織切片を作製し、TRAP 染色によって同定した。また TRAP 陽性細胞の形態を顕微鏡で観察した。

【結果】

(1) Cbfa1のノックアウトマウスの頭蓋冠より樹立した細胞株(120-4)は、OPGを強く発現するがRANKLをほとんど発現せず、骨髓細胞との共培養によるin vitroでの破骨細胞形成を抑制した。この細胞株に対してCbfa1の遺伝子導入を行うと、RANKLの発現上昇とOPGの発現低下が認められ、骨髓細胞との共培養における破骨細胞形成の抑制は解除されてTRAP陽性細胞が出現した。

(2) 120-4と骨髓細胞との共培養の培養液中にsRANKLタンパクを加えるとTRAP陽性細胞の形成が回復した。すなわちRANKLシグナルによりCbfa1欠損状態においても破骨細胞形成が誘導された。

(3) Cbfa1ノックアウトマウスでは、四肢遠位骨の石灰化軟骨の周囲に局限して少数の単核で未熟なTRAP陽性細胞が見られるのみであった。これに対してsRANKL Tg-Cbfa1ホモ変異ではTRAP陽性細胞の増加が認められ、in vivoでもCbfa1欠損状態においてRANKLは破骨細胞形成の誘導能を示した。しかし、破骨細胞としての成熟・活性化は不十分で、骨吸収の場である波状縁の形成は明瞭でなく、石灰化軟骨への血管侵入もおこらなかった。

【結論】

In vitroの実験により、Cbfa1はRANKLを誘導し、破骨細胞分化に促進的に働くことが示された。またRANKLシグナルはCbfa1欠損状態においても破骨細胞形成を誘導した。したがってCbfa1により誘導されるRANKLシグナルが破骨細胞分化を促進すると考えられた。一方Cbfa1ノックアウトマウスにおいては、RANKLの強制発現によって破骨細胞の完全な成熟は誘導できなかった。これまでのin vitroの報告によれば、M-CSFとRANKLの共存下で破骨細胞の完全な成熟・活性化ができるとされている。Cbfa1ノックアウトマウスではM-CSFは正常レベルに発現しているため、in vitroとは異なり、生体内ではM-CSFとRANKLが存在しても破骨細胞としての成熟・活性化は不十分であると考えられる。

論文審査の結果の要旨

本研究は、Cbfa1ノックアウトマウスで破骨細胞分化障害が認められることに着目し、Cbfa1が破骨細胞の分化を促進させる因子として働く可能性をin vitroおよびin vivoで遺伝子工学的手法を応用して検討したものである。その結果、Cbfa1はRANKLの発現を誘導して破骨細胞の分化を促進させる機能を有することが示唆された。

以上の研究結果は破骨細胞の分化過程の解明に重要な知見を与えるものであり、博士(歯学)の学位を授与するに値するものと認める。