The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Dynamic visualization of RANKL and Th17-mediated osteoclast function
Author(s)	菊田, 順一
Citation	大阪大学, 2013, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/59715
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、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

【59】

氏　　名	菊　田　順　一（きく　た　じゅん　いち）
博士の専攻分野の名称	博　士（医学）
学　位　記　番　号	第　２５８８５　号
学位授与年月日	平成 25 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当 医学系研究科予防環境医学専攻
学　位　論　文　名	Dynamic visualization of RANKL and Th17-mediated osteoclast function （RANKL および Th17 細胞による破骨細胞の骨吸収制御機構の可視化）
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　石井　　優 （副査） 教　授　吉川　秀樹　　教　授　大薗　恵一

論　文　内　容　の　要　旨

〔目　的(Purpose)〕

破骨細胞は、単球系血液細胞から分化・成熟する多核巨細胞であり、「骨吸収」という特殊な機能を持つ。骨髄から採取した単球系細胞をM-CSFやRANKLの刺激下で*in vitro*で培養すると破骨細胞様の多核巨細胞が形成され、中には100核以上の巨細胞も観察される。しかしながら、硬い石灰質に囲まれた骨組織内部は生きたままでの観察が困難であったため、「*in vitro*で観察された多核巨細胞が、生体内の破骨細胞と同一のものであるのか」、「生体骨組織内で破骨細胞がどのように骨吸収を行っているのか」はこれまで不明であった。そこで、本研究では、二光子励起顕微鏡を駆使して生体骨組織内での成熟破骨細胞の動態を可視化するイメージング系を確立し、成熟破骨細胞の骨吸収制御機構について明らかにした。

〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕

成熟破骨細胞は、骨吸収するためにV-type H^+ ATPaseと呼ばれるH^+ポンプを発現している。V-type H^+ ATPaseは様々なsubunitで構成されているが、成熟破骨細胞ではa3 subunitが特異的に発現している。そこで、V-type H^+ ATPaseのa3 subunitの遺伝子座にa3 subunitとGFPの融合蛋白質をknock-inしたマウス（以下「a3-GFPマウス」）を作製し、その骨組織内を生体二光子励起顕微鏡で観察することにより、骨表面上での生きた成熟破骨細胞を可視化することに成功した。このマウスでは、GFP標識された成熟破骨細胞の動態だけでなく、H^+ポンプの破骨細胞内局在も同時に観察することが可能である。結果、骨表面で骨吸収を行っている成熟破骨細胞には、「骨表面で止まっていて今まさに骨吸収をしている細胞」と「骨表面を移動していて骨吸収を行っていない細胞」の少なくとも2種類が存在することが明らかとなった。

次に、a3-GFPマウスに各種薬剤を投与して、成熟破骨細胞の動態変化を検討した。まず、RANKL誘導骨粗鬆症モデルを作成した結果、骨表面上の成熟破骨細胞数が増加し、しかも、そのほとんどが「骨吸収をしている細胞」となった。一方、RANKL誘導骨粗鬆症モデルマウスに、骨粗鬆症の治療薬であるビスフォスホネートを投与して破骨細胞の機能を抑制させた結果、骨表面での成熟破骨細胞数が減少し、しかも生き残った細胞の多くが、「骨吸収をしていない細胞」であった。このように、本イメージング技術により、成熟破骨細胞の絶対数のみならず、成熟破骨細胞の骨吸収の変化も同時に評価することができるようになった。

さらに、RANKLの短期的効果を検討するため、a3-GFPマウスにRANKLを急速に静脈内投与した。結果、投与直後より、成熟破骨細胞が「骨吸収をしていない状態」から「骨吸収をしている状態」へと速やかに変化していく様子が観察され、RANKLが破骨細胞の分化誘導のみならず、成熟破骨細胞に作用して骨吸収を促進する役割も担っていることが示唆された。

最後に、関節リウマチの病態に関わるTh17細胞と破骨細胞の相互作用機序について検討するため、a3-GFPマウスに蛍光標識したTh17細胞を投与して、マウスの骨組織内を生体二光子励起顕微鏡で観察した。結果、Th17細胞が破骨細胞に直接接触して作用することにより、破骨細胞が「骨吸収をしていない状態」から「骨吸収をしている状態」へと変わっていく様子が観察された。さらに、Th17細胞と破骨細胞の相互作用がRANKL中和抗体によって阻害されたことから、Th17細胞は、その膜上に発現するRANKLを介して破骨細胞の骨吸収を促進することが明らかとなった。

〔総　括(Conclusion)〕

二光子励起顕微鏡を用いて生体骨組織内での成熟破骨細胞の動態を可視化することにより、成熟破骨細胞の機能を*in vivo*で評価することが可能となった。本イメージング系を用いて、破骨細胞の分化誘導因子であるRANKLは、成熟した破骨細胞にも作用し、骨吸収を促進する役割も担っていることが分かった。さらには、これまで関節リウマチにおける骨破壊に深く関与していると示唆されてきたTh17細胞は、その細胞膜上に発現するRANKLを介して破骨細胞の骨吸収を促進することが明らかとなった。このように、骨組織の生体二光子励起イメージングは、今後、骨粗鬆症や関節リウマチなどの骨吸収性疾患の病態解明や新規薬剤の開発において強力な手段となり得ると考えられる。

論文審査の結果の要旨

従来の破骨細胞の骨吸収に関する研究のほとんどは、固定した骨組織を切り出して行われたものであるため、生きた細胞の動的な情報を得ることが困難であった。本研究では、生体二光子励起イメージング系を独自に改良することで、*in vivo*で破骨細胞を可視化する系を開発し、骨表面上での破骨細胞による骨破壊過程をリアルタイムで観察することに成功した。その結果、破骨細胞には、機能（骨吸収）期と休止期があること、さらに関節リウマチの病因に関わるTh17細胞が、その細胞膜上に発現するRANKLを介して、休止期の破骨細胞に直接作用して、骨吸収期へと移行させることにより、骨吸収を誘導することを明らかにした。今回確立したライブイメージング系は、骨粗鬆症や関節リウマチなどの骨吸収性疾患の理想的な治療薬を今後開発していく上で、極めて重要な研究成果である。

以上より、本研究は学位に値すると考える。