

# 山下 恭徳 論文内容の要旨

## 主 論 文

RANKL pretreatment plays an important role in the differentiation of pit-forming osteoclasts induced by TNF- $\alpha$  on murine bone marrow macrophages

(RANKL 前刺激はマウス骨髄マクロファージにおいて TNF- $\alpha$  刺激による吸収活性を持つ破骨細胞の分化に重要な役割を持つ)

(山下恭徳、鵜飼 孝、中村弘隆、吉永泰周、小林弘樹、高森雄三、野口恵司、吉村篤利、原 宜興)

(Archives of Oral Biology in press)

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科医療科学専攻  
(主任指導教員：原 宜興 教授)

## 緒 言

破骨細胞は骨破壊において中心的な役割をする細胞であり、骨髄マクロファージ (BMM) を macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) 存在下で receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL) で刺激すると、刺激を受けた BMM は単核の破骨細胞前駆細胞に分化し、これが融合して多核の吸収能を持った破骨細胞になる。24 時間の RANKL 刺激を受けた BMM は、破骨細胞のマーカーの一つである酒石酸耐性酸ホスファターゼ (TRAP) 陰性の単核の破骨細胞前駆細胞であるが、破骨細胞に分化する細胞となることが報告されており、24 時間の RANKL 刺激であっても破骨細胞の分化に重要であると考えられている。一方、炎症性サイトカインの一つである tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) は、RANKL 存在下で破骨細胞形成を促進するが、RANKL 非存在下では TRAP 陽性の多核細胞は形成されるものの、この細胞は吸収能を有さない。TNF- $\alpha$  は歯周病や関節リウマチなどにおける炎症性骨破壊を促進するとされており、吸収活性を有する破骨細胞形成への RANKL と TNF- $\alpha$  刺激の影響の詳細を明らかにすることは重要と考えられる。そこで今回我々は、マウス BMM を種々の濃度の RANKL で 24 時間刺激した後、RANKL を除去し、TNF- $\alpha$  刺激による RANKL 非存在下での破骨細胞形成の条件を検討した。

## 対象と方法

7 週齢の CB17 マウスから採取した BMM に 0,  $10^{-2}$ ,  $10^{-1}$ , 1, 10 ng/mL の濃度で

24 時間 RANKL で刺激した後にメディアムを交換し、0, 1, 10 ng/mL の濃度の TNF- $\alpha$  で細胞を刺激した。そして TNF- $\alpha$  添加後、24 時間毎に TRAP 陽性多核細胞 (3 核以上) 数を調べた。これにより TNF- $\alpha$  刺激による破骨細胞形成を促進させるための、RANKL 前刺激と TNF- $\alpha$  の濃度を調べた (実験 1)。

Calcium phosphate コートしたプレートで培養した BMM を上記の破骨細胞形成が促進される RANKL 前刺激条件で刺激した後、TNF- $\alpha$  添加して 96 時間後に吸収窩が形成されるかどうかを検討した。この時、RANKL のデコイレセプターである osteoprotegerin (OPG) を TNF- $\alpha$  と同時に添加して、破骨細胞の形成数と吸収窩の面積を、OPG が添加されていない場合と比較することで培養細胞から産生される RANKL の影響を検討した (実験 2)。

次に実験 1 で決定した RANKL の濃度が、破骨細胞形成に与える影響を検討した。BMM を RANKL 刺激して経時的に TRAP 活性キットを用いて TRAP 活性を計測し、また細胞を TRAP 染色して陽性細胞数と破骨細胞数を調べた (実験 3)。

## 結 果

RANKL 前刺激のない群と比較して、 $10^{-1}$ , 1, 10 ng/mL の RANKL 24 時間刺激を与えた群では、48 時間の 10ng/mL の TNF- $\alpha$  刺激により有意に破骨細胞形成が促進された。同前刺激条件でも 1ng/mL の TNF- $\alpha$  刺激では形成促進は見られなかった (実験 1)。

TNF- $\alpha$  のみの刺激では吸収活性を持つ破骨細胞は形成されないが、10 ng/mL の RANKL の 24 時間前刺激で、TNF- $\alpha$  刺激 96 時間後に吸収活性を認めた。この吸収活性は TNF- $\alpha$  と同時に OPG を添加しても、変化しなかった (実験 2)。

前刺激として用いた吸収活性を発現させた 10ng/mL の RANKL で BMM を刺激した場合には 72 時間後に破骨細胞が形成され、吸収窩の認められなかった 1ng/ml では TRAP 活性ならびに TRAP 陽性単核細胞は検出されるものの、破骨細胞はほとんど形成されなかった (実験 3)。

## 考 察

今回の実験系では RANKL が共存せず TNF- $\alpha$  刺激によって吸収活性を持った破骨細胞が形成されるには、破骨細胞前駆細胞が破骨細胞を形成しうる濃度の RANKL の前刺激を受けていることが重要であることが示された。

RANKL の刺激で Tumor necrosis factor Receptor-Associated Factor 6 (TRAF6) が活性化されることが破骨細胞の吸収活性に関与することが報告されている。また TNF- $\alpha$  で刺激される TRAF 2 を過剰発現した場合でも吸収活性を持った破骨細胞が形成されることが報告されている。今回、確認はしていないが、RANKL の前刺激並びに TNF- $\alpha$  の刺激によりこれらの経路が活性化されて吸収活性を持つ破骨細胞が形成されたのではないかと考えられる。

データに示していない実験において、我々は、0, 1, 10 ng/mL の濃度の RANKL で 24 時間刺激した BMM では細胞マーカーに変化が現れることは確認しているが、今回の研究では RANKL 前刺激後の細胞状態を同定するまでには至らなかった。しかし今回の実験で TNF- $\alpha$  による吸収活性を持った破骨細胞形成条件の一つを明らかにすることができた。現在関節炎などの炎症性骨吸収や骨粗鬆症などの骨疾患において RANKL や TNF- $\alpha$  を標的とした治療が進んでいるが、今後骨破壊局所における RANKL や TNF- $\alpha$  が破骨細胞形成に関与するメカニズムを理解することは、効率の良い治療法の開発に有用と思われる。