

学位論文

Doctoral Thesis

クラス A スカベンジャー受容体による RANK 発現増強を介した
破骨細胞分化制御

(Macrophage scavenger receptor type-A (SR-A) promotes osteoclast differentiation via
enhanced expression of receptor activator of NF- κ B (RANK))

竹村 健一

Kenichi Takemura

熊本大学大学院医学教育部博士課程臨床医科学専攻運動骨格病態学

指導教員

水田 博志 教授

熊本大学大学院医学教育部博士課程臨床医科学専攻運動骨格病態学

竹屋 元裕 教授

熊本大学大学院医学教育部博士課程病態制御学専攻細胞病理学

2010年3月

学位論文

Doctoral Thesis

論文題名: クラス A スカベンジャー受容体による RANK 発現増強を介した破骨細胞
分化制御
(Macrophage scavenger receptor type-A (SR-A) promotes osteoclast
differentiation via enhanced expression of receptor activator of NF- κ B
(RANK))

著者名: 竹村 健一
Kenichi Takemura

指導教員名: 水田 博志 教授
竹屋 元裕 教授

審査委員名: 分子病理学担当教授 山本 哲郎
機能病理学担当教授 伊藤 隆明
免疫識別学担当教授 西村 泰治
予防開発学担当教授 岡田 誠治

2010年3月

目次

要旨	1
SUMMARY	2
発表論文リスト	3
謝辞	4
略語一覧	5
第1章:研究の背景と目的	6
第2章:実験方法	
2-1. 実験動物	12
2-2. 破骨細胞培養	12
2-3. Reverse transcription polymerase chain reaction(RT-PCR)	13
2-4. リアルタイム RT-PCR	14
2-5. ウェスタンブロット法	14
2-6. 免疫染色	14
2-7. マウス大腿骨 TRAP 染色	15
2-8. マウス大腿骨骨密度測定	16
2-9. 統計学的解析	16
第3章:実験結果	
3-1. 破骨細胞分化における SR-A 発現	17
3-2. in vitro における破骨細胞評価	18
3-3. 破骨細胞分化因子の発現量	19
3-4. 破骨細胞分化因子の発現に対する SR-A リガンドの効果	20
3-5. in vivo における破骨細胞評価	21
3-6. 大腿骨骨密度評価	23
第4章	
考察	24
結語	27
第5章:参考文献	28

要 旨

[目的] 破骨細胞は、単球／マクロファージ系の細胞が細胞融合し多核成熟化する。クラス A スカベンジャー受容体(SR-A)は、細胞の接着などマクロファージの細胞機能に深く関与していることが報告されており、破骨細胞分化においても何らかの働きを担うことが想定されるが、その詳細については未解明である。本研究では破骨細胞分化過程における SR-A の役割を明らかにすることを目的とした。

[方法] SR-A 欠損(SR-A^{-/-})マウスと野生型(SR-A^{+/+})マウスの骨髓細胞より破骨細胞を培養し、成熟度について比較した。更に分化因子の発現について検討した(in vitro)。大腿骨における破骨細胞の比較を行い、更にマウス用 CT を用いて大腿骨骨密度の測定を行った(in vivo)。

[結果] 3 核以上の成熟破骨細胞の数は、SR-A^{-/-} が SR-A^{+/+} に比べ有意に少なかった。分化因子 RANK 及び MITF の発現は、SR-A^{+/+} が SR-A^{-/-} に比し有意に高かった。SR-A リガンドである AcLDL を加えると、その発現は更に増加した。大腿骨の破骨細胞でも同様に、単位面積辺り 3 核以上成熟破骨細胞の数は、SR-A^{-/-} が SR-A^{+/+} に比し有意に低下していた。60 週齢の高齢マウスにおける大腿骨骨密度は SR-A^{-/-} が SR-A^{+/+} に比し有意に高値であった。

[考察] SR-A による RANK 発現増強機序は明らかではないが、SR-A 存在による前駆破骨細胞の基質への接着増強、及びリガンド作用による細胞内シグナル伝達経路の存在が可能性として考えられた。

[結論] SR-A 欠損マウスにおいて、破骨細胞の分化低下が認められた。SR-A は RANK 発現とその下流に存在する分化制御因子の発現を活性化することにより破骨細胞の分化・成熟に促進的に作用していることが示唆された。

SUMMARY

Osteoclasts originate from bone marrow monocyte/macrophage lineage cells, and their differentiation depends on macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) and receptor activator nuclear factor kappa B (RANK) ligand. Class A scavenger receptor (SR-A) is one of the principal functional molecules of macrophages, and its level of expression declines during osteoclast differentiation. To investigate the role of SR-A in osteoclastogenesis, we examined pathological changes in femoral bone and the expression levels of osteoclastogenesis-related molecules in SR-A^{-/-} mice. The femoral osseous density of SR-A^{-/-} mice was higher than that of SR-A^{+/+} mice, and the number of multinucleated osteoclasts was significantly decreased. An *in vitro* differentiation assay revealed that the differentiation of multinucleated osteoclasts from bone marrow-derived progenitor cells is impaired in SR-A^{-/-} mice. Elimination of SR-A did not alter the expression level of the M-CSF receptor, c-fms; however, the expression levels of RANK and RANK-related osteoclast differentiation molecules such as nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 1 (NFATc1) and microphthalmia-associated transcription factor (MITF) significantly decreased. Furthermore, acetylated low-density lipoprotein (AcLDL), an SR-A ligand, significantly increased the expression level of RANK and MITF during osteoclast differentiation. These data indicate that SR-A promotes osteoclastogenesis via augmentation of the expression level of RANK and its related molecules.

発表論文リスト

参考論文

①関連論文

Takemura, T., Sakashita, N., Fujiwara, Y., Komohara, Y., XiaoFeng Lei,

Ohnishi, K., Suzuki, H., Kodama, T., Mizuta, H., Takeya, M. Class A scavenger receptor

promotes osteoclast differentiation via the enhanced expression of receptor activator of

NF- κ B (RANK). *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 391: 1675–1680, 2010

②その他の論文

竹村健一，薬師寺俊剛，佐藤広生，岡潔，平井泰博，上川将史，川添泰弘，

水田博志．化学・放射線療法が著効した骨盤発生

Ewing/PNETの一例．整形外科と災害外科，56: 443–447, 2007

Komohara, Y., Takemura, K., XiaoFeng Lei, Sakashita, N., Suzuki, H., Kodama, T.,

Takeya, M. Delayed growth of EL4 lymphoma in SR-A-deficient mice is due to

upregulation of nitric oxide and interferon- γ production by

tumor-associated macrophages. *Cancer Sci*. 100: 2160–2166, 2009

謝 辞

本研究は熊本大学大学院医学研究科細胞病理学分野、竹屋元裕教授、同運動骨格病態学分野、水田博志教授のご指導の下に行いました。研究においては勿論のこと、多面にわたり多くのご指導をいただきましたことに深く感謝いたします。

研究全般において、直接のご指導とご助言をいただきました熊本大学大学院医学研究科細胞病理学分野、坂下直実准教授、菰原義弘助教、藤原章雄助教に深く感謝いたします。また同時期に私と同じSR-Aに関する研究を行ってきました熊本大学大学院医学研究科細胞病理学分野、大西紘二、雷小峰医師にも多くのご助言をいただきました。

熊本大学大学院医学研究科細胞病理学分野の中川 雄伸技官、中村 治技師、清田 恵美技師、吉田淳一技師、井村純子教授秘書、その他教室員の皆様には日頃から多くのご助言、ご協力をいただきました。

皆様に心より感謝し、御礼申し上げます。

略語一覽

DAB: 3,3'-diaminobenzidine

FBS: fetal bovine, serum

EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid

GAPDH : : glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

mRNA: messenger ribonucleic acid

NF- κ B: nuclear factor-kappa B

PBS: phosphate-buffered saline

RT-PCR: Reverse transcription polymerase chain reaction

LPS: Lipopolysaccharide

LDL: Low Density Lipoprotein

AGE: Advanced Glycation Endproducts

SR-A: Class A scavenger receptor

M-CSF: macrophage colony-stimulating factor

GM-CSF: Granulocyte macrophage colony-stimulating factor

RANK: receptor activator nuclear factor kappa B

RANKL: receptor activator nuclear factor kappa B ligand

TRAF6: tumor necrosis factor receptor-associated factor 6

TNF- α : tumor necrosis factor-t alpha

MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinase

NFATc1: nuclear factor of activated T-cells c1

MITF: macrophthalmia-associated transcription factor

TRAP: tartrate resistant acid phosphatase

第 1 章 研究の背景と目的

破骨細胞は骨組織を破壊・吸収する唯一の細胞として知られている。造血幹細胞由来の単球／マクロファージ系の前駆細胞が、骨芽細胞との細胞間接着を介して分化因子を受け取ることで、細胞融合を繰り返し多核の巨細胞である破骨細胞へと分化する [1,2]。成熟破骨細胞は骨吸収のために特徴的な形態を有し、酸を分泌して無機質を溶解し、またタンパク質分解酵素を分泌して骨基質タンパク質を消化する。分解した骨基質は骨吸収面で取り込み、細胞内を輸送して外側基底膜から放出する。この破骨細胞分化及び活性化に関わる因子の同定は、骨吸収メカニズムの理解をはじめ、骨疾患の理解、更には治療法の確立に貢献するものと考えられる。

破骨細胞の欠損または機能障害は、骨吸収の低下により骨量が増加し骨髓腔が形成されない大理石骨病を引き起こすことが知られている。破骨細胞研究は、大理石骨病を自然発症するマウス及び、遺伝子改変マウスの解析に緒を發した。macrophage colony stimulating factor (M-CSF) をコードする遺伝子に変異を持つ *op/op* マウスの解析により、M-CSF が破骨細胞前駆細胞の生存に必須であることが示された [3]。更に、1988 年に破骨細胞分化因子として receptor for activation of nuclear factor kappa B ligand (RANKL) が同定された [4,5]。それまで *in vitro* における破骨細胞分化には骨髓細胞(破骨細胞前駆細胞)と骨芽細胞との細胞接触が必須であり、両細胞の細胞間相互作用を担う分子の存在が示唆されていたが、その本体が RANKL であった。RANKL は活性型ビタミン D₃、プロスタグランジン E₂、副甲状腺ホルモンなどの骨吸収因子により骨芽細胞上に発現誘導され、破骨細胞分化を促進する。このように、RANKL の発見により、骨髓細胞単独での *in vitro* 破骨細胞分化系が確立し、RANKL による破骨細胞分化を制御するシグナル伝達の研究が飛躍的に進歩した [6](図 1-1)。

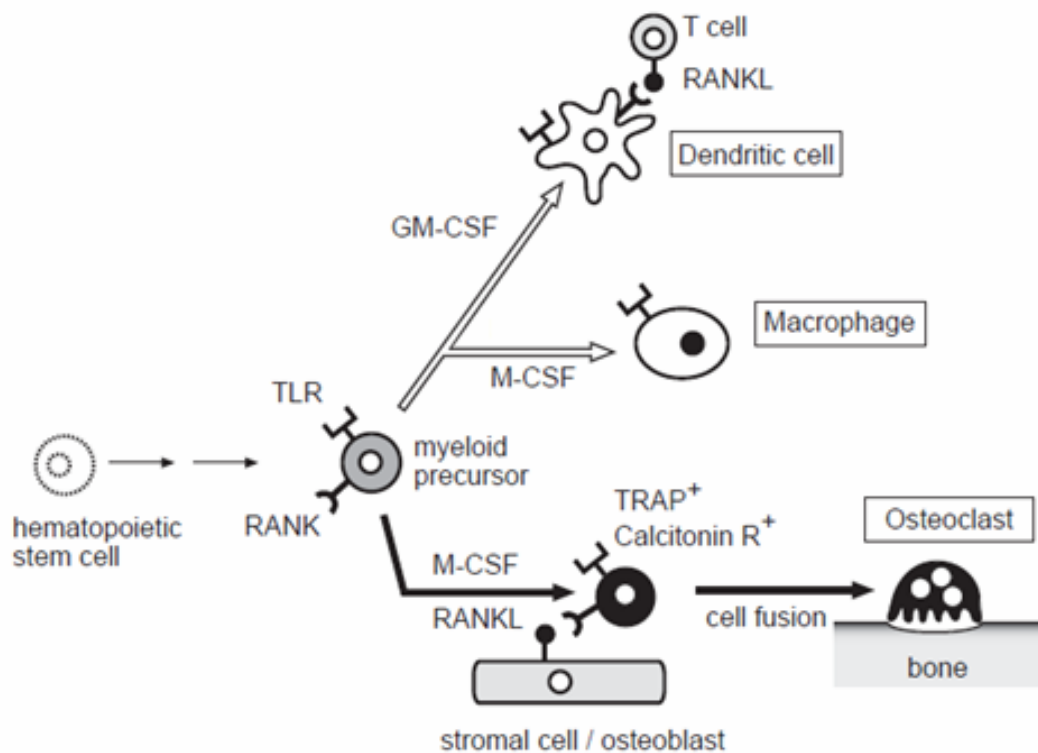


図 1-1. 破骨細胞分化機構（文献[7]を改変）

骨芽細胞より分泌される M-CSF は、破骨細胞上のレセプター c-fms と結合する。その下流では、転写因子 microphthalmia-associated transcription factor (MITF) が活性化され、前駆破骨細胞の生存に重要な働きを示す [8]。また RANKL は前駆破骨細胞表面の RANK と結合し、分化・成熟を担っている [9]。RANK は TNF 受容体ファミリーに属する受容体であり [10]、tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6) と結合しシグナルを細胞内に伝え、TRAF6 は三量体を形成し、NF- κ B、Akt、及び ERK (extracellular signal-regulated kinase)、JNK (Jun-N-terminal kinase)、p38 などの MAPK 経路を活性化する。しかし、JNK ノックアウトマウスは完全な大理石骨病は示さず、代償機構が存在することが示唆されている。また RANKL/RANK シグナルは AP-1 を活性化する。更に nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 1 (NFATc1) などの核転写因子の活性化を行う [11]。転写誘導された NFATc1 は自ら NFATc1 の転写を活性化して増幅し、高い発現レベルに達する

と、tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) や Cathepsin K などの、骨吸収に関わる破骨細胞特異的遺伝子の発現を誘導する [12]。NFATc1 を欠損する ES 細胞は破骨細胞分化が完全に傷害される。一方、レトロウイルスを用いて NFATc1 を過剰発現した破骨細胞前駆細胞は RANKL 非存在下でも多核・成熟化することが知られている。また MITF も同様に、それら特異的遺伝子発現への関与が報告されている [13](図 1-2)。

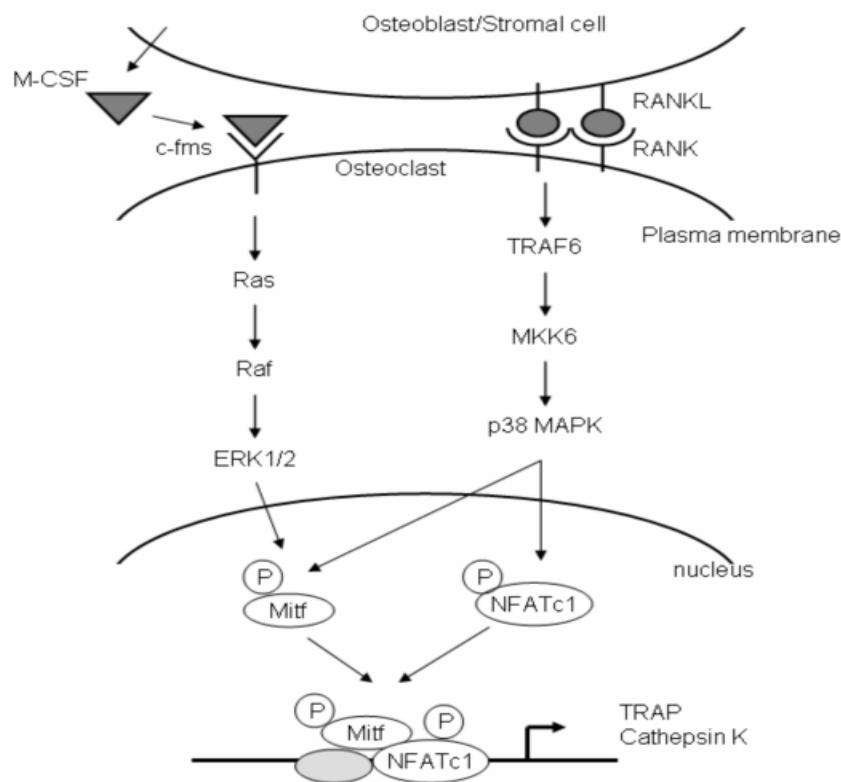


図 1-2. 破骨細胞内シグナル伝達経路(文献[14]を改変)

破骨細胞は骨基質に接着することで、骨吸収能を持つ吸収面と外側基底膜からなる極性を持った構造をとる。吸収面にはアクチンがリング状に配列したアクチンリング(明帯)と多数のひだ状の突起を持った波状縁と呼ばれる構造を形成する。アクチンリングはポドソームと呼ばれる接着機構により骨基質に接着し、その内部では波状縁から酸やタンパク質分解酵素が分泌され骨吸収を行う。骨基質への接着には、インテグリンによるオステオポンチンなどの骨基

質タンパクの認識が重要である。分解された骨基質は波状縁でエンドサイトーシスによって取り込まれ、外側基底膜に輸送され、分泌される（図 1-3）。

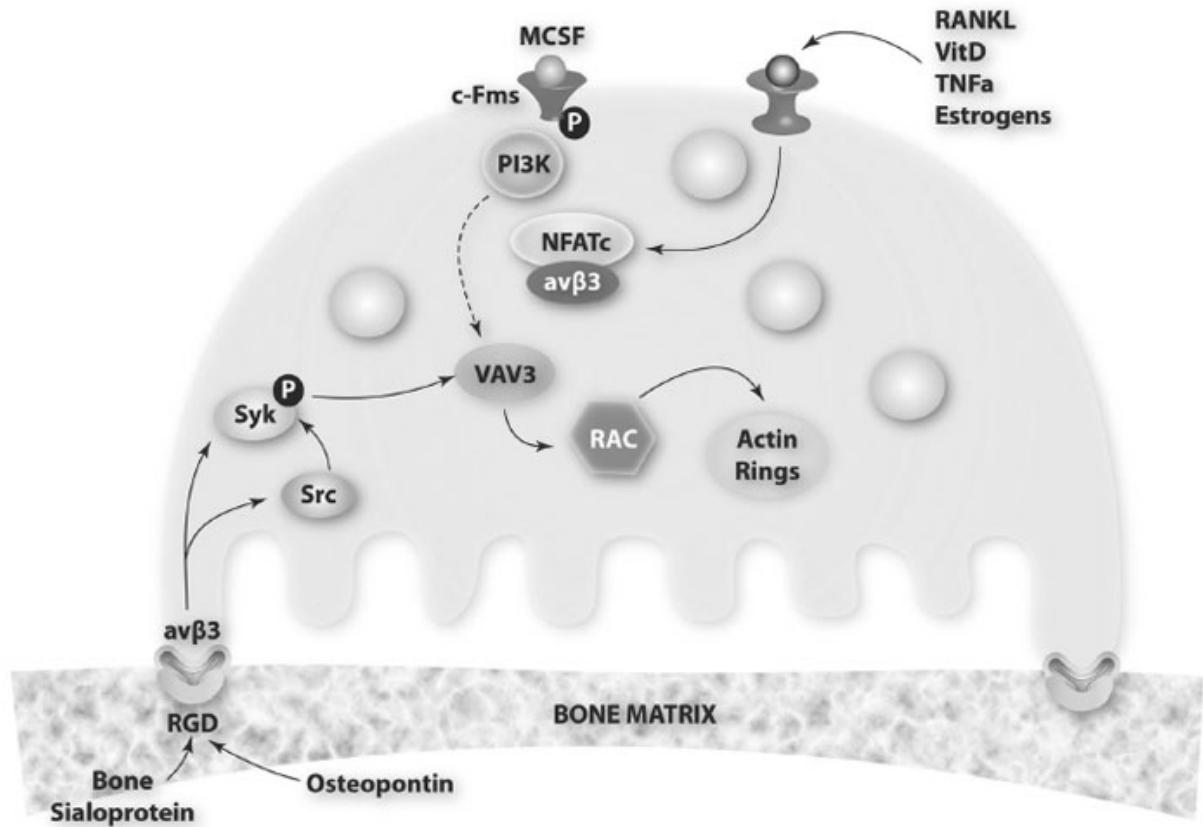


図 1-3. 破骨細胞の骨吸収機構(文献[15]を改変)

スカベンジャー受容体は、Fc 受容体や補体受容体と並んでマクロファージの主要な受容体の一つで、変性 LDL をリガンドとする受容体の総称であり、現在は分子構造や組織・細胞分布の違いから大きく 6 つに分類されている [16](図 1-4)。クラス A スカベンジャー受容体 I/II 型 (SR-A, CD204) は、1990 年 Kodama らによつてはじめて同定されたスカベンジャー受容体で [17]、分子量 220–250kD のホモ三量体からなる 1 回膜貫通型受容体である。これらの受容体は酸化 LDL やアセチル LDL などの変性 LDL の他に、糖化反応終末産物 (AGE, advanced glycation end products)、変性コラーゲン、Lipopolysaccharide (LPS) など多くの陰性荷電巨大

分子と結合する [18-20]。SR-A は多機能性を持ち、目的とするリガンドを除去するという主な機能の他に、細胞接着、宿主免疫、アポトーシス細胞の除去やサイトカイン産生などとの関係があることが報告されている [21]。

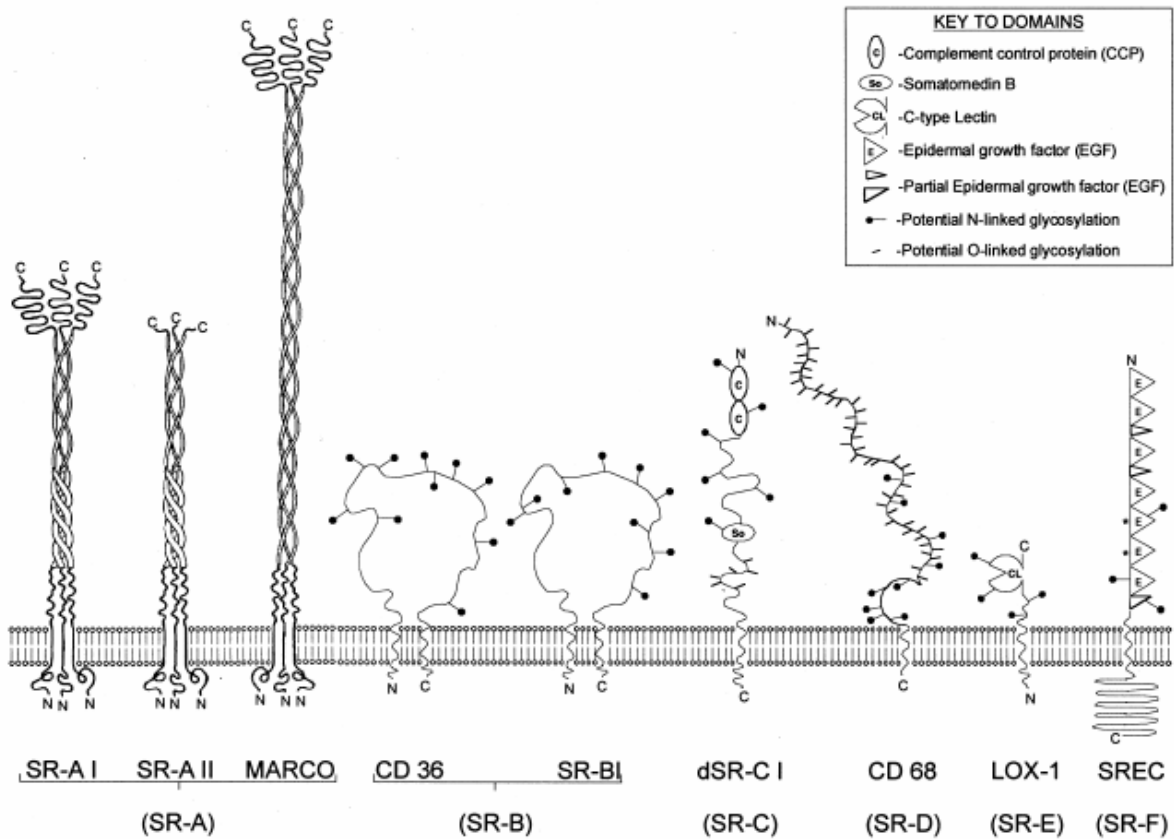


図 1-4. スカベンジャー受容体ファミリーの分子構造(文献[16]を改変)

本研究の目的は、SR-A の破骨細胞分化における働きについて検討することである。近年 SR-A が TNF- α をはじめとした炎症性サイトカインを調節することが報告されており、我々もまた、SR-A KO における M ϕ 由来の TNF α 産生が、様々な疾患モデルの炎症を増悪させることを発見した [22,23]。ところで、RANKL 及び RANK は TNF ファミリーに属し、TNF α は RANKL 非依存的に破骨細胞分化を促進することが知られている [10]。我々は SR-A の持つ特徴的な機能より、破骨細胞分化に対し抑制的な働きをしているのではないかと予想した。しかしなが

ら本実験の結果より、SR-A が欠損することによって、破骨細胞分化因子 RANK 及びその下流因子の発現が抑制され、破骨細胞分化が低下することがわかった。同時に SR-A が RANK の発現を介して破骨細胞分化を促進的に調節していることが示唆された。

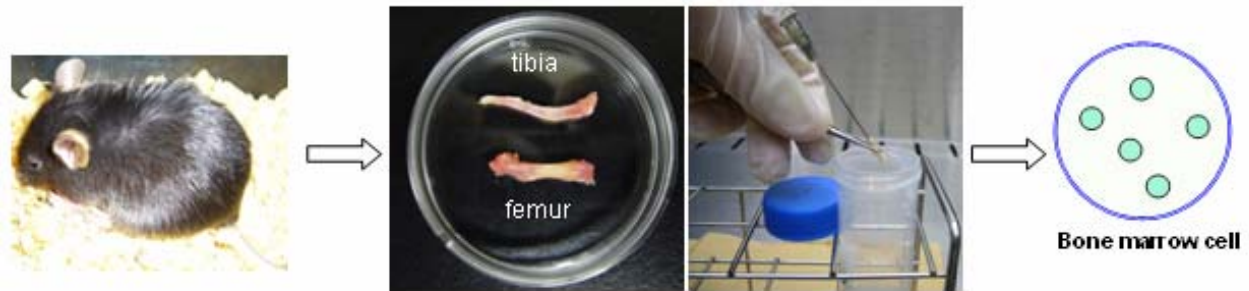
第 2 章 実験方法

2-1. 実験動物

SR-A^{-/-} マウスは Suzuki らにより作製され、野生型マウス(C57BL/6J, SR-A^{+/+})と 7 回以上の逆交配を行った。SR-A^{-/-} マウスと SR-A^{+/+} マウスは熊本大学動物資源開発研究センターで飼育された。実験に関する動物の取扱いは熊本大学動物実験指針に定められた方法を用い、また熊本大学動物資源開発研究センター使用心得に従った。若年マウスとして 10-12 週齢、高齢マウスとして 60 週齢の雄のマウスを使用した。また抗 SR-A 抗体 2F8 (Serotec 社)を用いた SR-A 検出には、Balb/c マウス (Clea 社)を使用した。

2-2. 破骨細胞培養

10-12 週齢の SR-A^{-/-}、SR-A^{+/+}マウスを頸椎脱臼によりサクリファイスし、軟部組織を除いた大腿骨及び脛骨を用いた。両断端を切除後、21 ゲージ針を用いて骨髓内に PBS をフラッシュし細胞を採取し、ACK lysate バッファーにて溶血した後、70 μ m ナイロンメッシュを通して細胞を分離した。10%FBS を加えた α MEM 培地(GIBCO 社)を使用し 10cm dish 上で 1 日経過後、非接着細胞を骨髓由来造血幹細胞として用いた。8well PMX slide chamber (Sigma 社)に 2×10^5 /well を撒き、50ng/ml の M-CSF (TAKARA 社)で 3 日間刺激した後、50ng/ml の M-CSF 及び RANKL (R&D 社)を加え 6 日間培養し成熟破骨細胞に分化させた。培地交換は 3 日毎に行った。破骨細胞は 4%PFA で固定後、TRAP 染色を行い、3 核以上の TRAP 陽性細胞を成熟破骨細胞として評価した。また破骨細胞分化因子の発現に対する SR-A リガンドの影響を見るために acetylated LDL (100 μ g/ml)を用いた。RANKL 投与直前の前駆破骨細胞 (Day 0)、RANKL 投与後 3 日 (Day 3)、RANKL 投与後 6 日 (Day 6)における評価を行った。



2-3. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

前駆破骨細胞における破骨細胞分化関連因子の発現をみるため、RT-PCR を行った。500ng の RNA を Primescript RT kit (Qiagen 社) を用いて逆転写反応を行い、cDNA を作成した。PCR プライマーの作成は、Invitrogen 社に依頼した。これらのプライマーのシーケンスは次の通りである。

c-fms: sense 5' -CCCTAGGACAAAGCAAGCAG-3'

antisense 5' -TTGTAGGGCAACTGGGTAGG-3'

RANK: sense 5' -AAACCTTGGACCAACTGCAC-3'

antisense 5' -ACCATCTTCTCCTCCCGAGT-3'

NFATc1: sense 5' -CTCGAAAGACAGCACTGGAGCAT-3'

antisense 5' -CGGCTGCCTTCCGTCTCATAG-3'

MITF: sense 5' -GCTATGCTCACTCTTAACTCCAAC-3'

antisense 5' -TTGGGGATCAGAGTACCTAGCTCC-3'

PCR 反応はサーマルサイクラー (Bio-Rad 社) を用いて、98°C10 秒、55°C30 秒、72°C1 分を 30 サイクル行った。2.0%アガロースゲルで電気泳動を行い、エチジウムブロマイドで染色し、

Gel Doc 2000 analyzer(Bio-Lad 社)でスキャンした。

2-4. リアルタイム RT-PCR

SR-A^{+/+} マウス骨髄由来破骨細胞分化における、SR-A リガンド: acetylated LDL の影響を評価するためにリアルタイム RT-PCR を行った。上述のとおり RNA を抽出し、cDNA を作成した後、TAKARA Premix Ex Taq(タカラバイオ社)を用いて試料を調整し、ABI PRISM 7300 (Applied Biosystems 社)で解析を行った。PCR 反応は、95°C10 秒の後に、95°C5 秒、60°C31 秒を 40 サイクルまで行った。解析結果は、GAPDH RNA に対する比で算出した。

2-5. ウェスタンブロット法

骨髄由来培養破骨細胞を、プロテアーゼ阻害剤カクテル(ナカライテスク社)を添加した 10mM Tris-HCl(pH 7.4), 150 mM NaCl, 1mM EDTA, 1%Triton-X 100 からなる細胞溶解液でホモジナイズした。溶解液を 1500rpm, 30min, 4°Cで遠心分離後、上清を回収し、Micro BCA Protein Assay Kit(Pierce 社)を用いて、タンパク濃度を測定した。1 試料あたり 20ng のタンパク量を 10%SDS-PAGE ゲルで電気泳動を行い、polyvinylidene fluoride membranes(Millipore 社)に転写した。抗原抗体反応は、抗 SR-A 抗体(2F8)と抗 RANK 抗体(R&D systems)を用いた。抗原抗体反応の検出には、SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate(Pierce 社)を用いた。

2-6. 免疫染色

Balb/c マウス骨髄由来培養破骨細胞のスライドガラスを 4%PFA で 3 分間固定した後、PBS

溶液で洗浄後、内因性ペルオキシダーゼ阻害を行った(0.3% H_2O_2 加メタノール、30 分)。続いて非特異反応阻害を 5%正常ヤギ血清で 20 分間行い、2F8 を一次抗体として反応させた(overnight, 4°C)。PBS 洗浄後、適切な動物種の 2 次抗体(horseradish peroxidase-labeled anti-immunoglobulin(ニチレイ)あるいは Alexa488-labeled anti-mouse IgG(ニチレイ))を用いて反応させた(60 分、室温)。3,3'-diaminobenzidine (DAB)にて発色させ、ヘマトキシリンで核染を行い、マリノールで封入した。

2-7. マウス大腿骨 TRAP 染色

10-12 週齢及び 60 週齢の SR-A^{-/-}、SR-A^{+/+} マウスより大腿骨を採取し、10%中性緩衝ホルマリンで 24 時間固定後、EDTA にて 7 日間脱灰した。EDTA は 3 日毎に交換した。パラフィンブロックに包埋後、3 μ m に薄切。脱パラフィン後、TRAP 染色及び、ヘマトキシリンによる核染を行い、3 核以上の TRAP 陽性細胞を成熟破骨細胞として評価した。TRAP 染色液の作製法は次の通りである。

A液: 0.1M 酢酸緩衝液 (pH5.0)
酢酸ナトリウム 4.79g + 氷酢酸 0.86ml + D.W 500ml

B液: 基質液
ナフトール AS-BI リン酸 100mg + N,N-ジメチルホルムアミド 10ml

C液: New Fuchsine 液
New Fuchsine 1g + 2N 塩酸 25ml

D液: 4%亜硝酸ナトリウム水溶液

E液: 0.5M L-酒石酸水溶液
L-酒石酸 7.5g + D.W 50ml を4N NaOH で pH5.0 に調整

ジアゾ化 New Fuchsine 液を作製(C液 0.5ml + D液 0.5ml)し、A液、B液を加え 1N NaOH で pH5.1 に調整する。ろ過後、この溶液 40ml に E液 10ml を加え、使用液とする。

2-8. マウス大腿骨骨密度測定

10-12 週齢及び 60 週齢の SR-A^{-/-}、SR-A^{+/+} マウスより大腿骨を採取し、10%ホルマリンで固定後、実験動物用 X 線 CT 装置 LCT-100 (ALOKA 社) を用いて 1mm 間隔でスキャンニングし、その平均値より大腿骨総骨密度、及び骨梁部骨密度を算出した。

2-9. 統計学的解析

全ての統計学的な結果は mean±S.E で表した。2 群間の比較は student T-test を用いて検定を行った。p<0.05 の場合に統計学的に有意差ありと判断した。

第3章 実験結果

3-1. 破骨細胞分化における SR-A 発現

破骨細胞分化における SR-A の経時的発現について調べるため、Balb/c マウス骨髄由来培養破骨細胞を用いて、免疫染色法及びウエスタンブロット法にて検討した。Day 0、Day 3 の未成熟な単核破骨細胞においては SR-A の発現が見られたが、Day 6 の成熟多核破骨細胞では SR-A 発現は認められなかった(図 3-1A)。蛋白量は Day 0 で最大であり、分化の進行に従い徐々に減少し、Day 6 においてはほとんど発現が見られなかった(図 3-1B)。

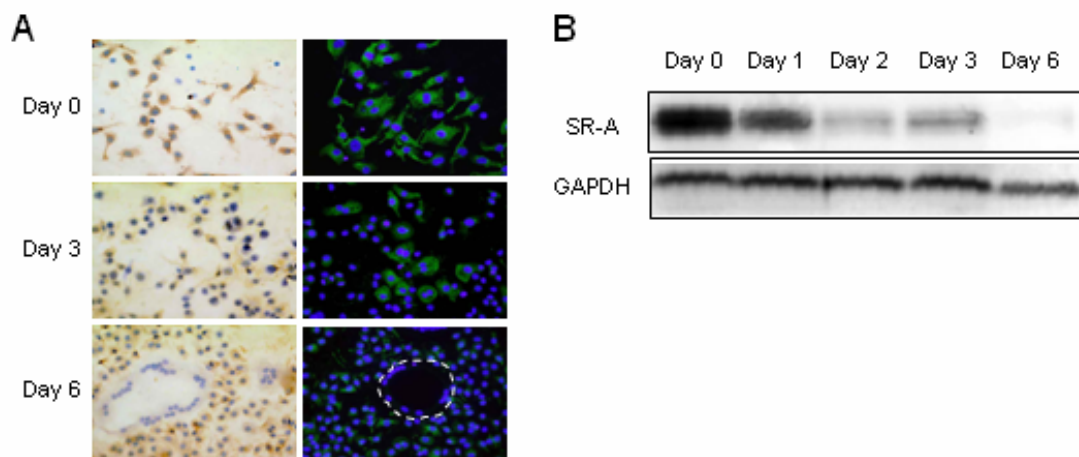


図 3-1. 破骨細胞分化における SR-A の経時的発現

A. 左: 2F8(SR-A)免疫染色

右: 蛍光免疫染色(白点線: 成熟破骨細胞)

B. ウエスタンブロット

3-2. in vitro における破骨細胞評価

破骨細胞分化における SR-A の働きについて調べるため、10-12 週齢の SR-A^{-/-}、SR-A^{+/+} マウス骨髄由来培養破骨細胞の TRAP 染色を行った。Day 3 において、SR-A^{+/+} マウスでは半数以上の単核細胞が TRAP 陽性であるのに対し、SR-A^{-/-} マウスではほとんどの細胞が TRAP 陰性であった(図 3-2A 左)。Day 6 においては、SR-A^{+/+} マウスで多核の TRAP 陽性細胞が多く見られたのに対し、SR-A^{-/-} マウスでは多核化がほとんど起こっていなかった(図 3-2A 右)。Day 6 における 3 核以上の TRAP 陽性細胞数は、SR-A^{+/+} において有意に多かった(図 3-2B)。

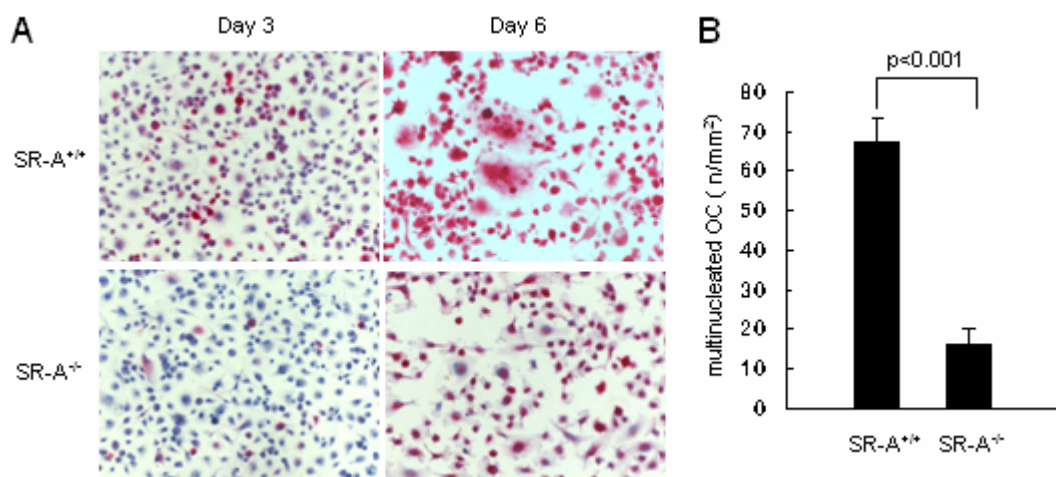


図 3-2. in vitro における破骨細胞分化

A. TRAP 染色(赤: TRAP 陽性)

B. 成熟破骨細胞数(3 核以上 TRAP 陽性, 各群 n=10)

3-3. 破骨細胞分化因子の発現量

SR-A^{-/-} マウスにおける破骨細胞分化抑制効果のメカニズムを探るために、RT-PCR 法及びウエスタンブロット法を用いて、Day 3 における破骨細胞分化因子の発現について調べた。M-CSF レセプター: c-fms は、SR-A^{-/-}、SR-A^{+/+}両者で差は認めなかったが、RANK, NFATc1, MITF の発現は SR-A^{-/-} で明らかな低下を認めた(図 3-3A)。RANK については蛋白レベルにおいても SR-A^{-/-} で発現低下が見られた(図 3-3B)。

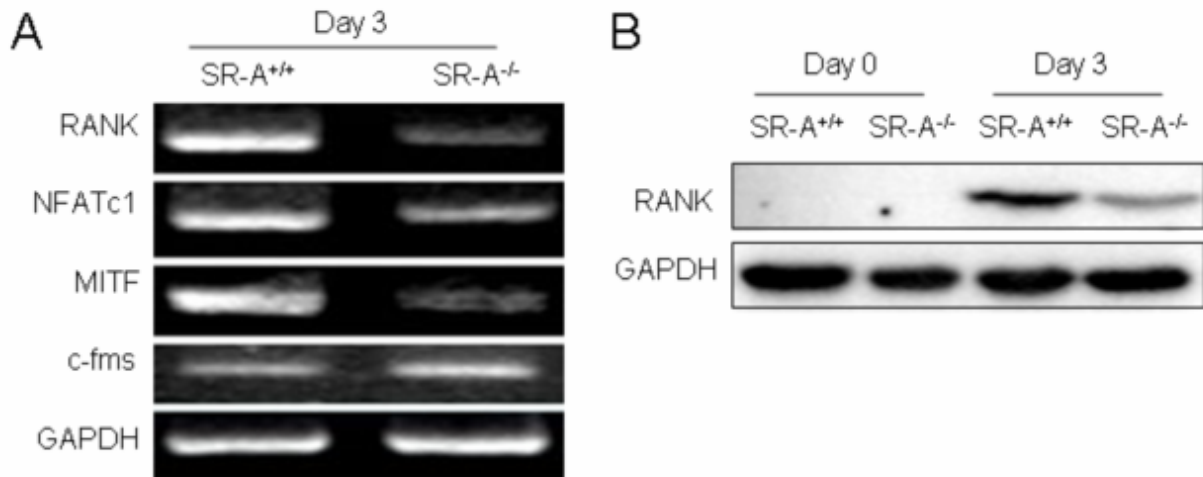


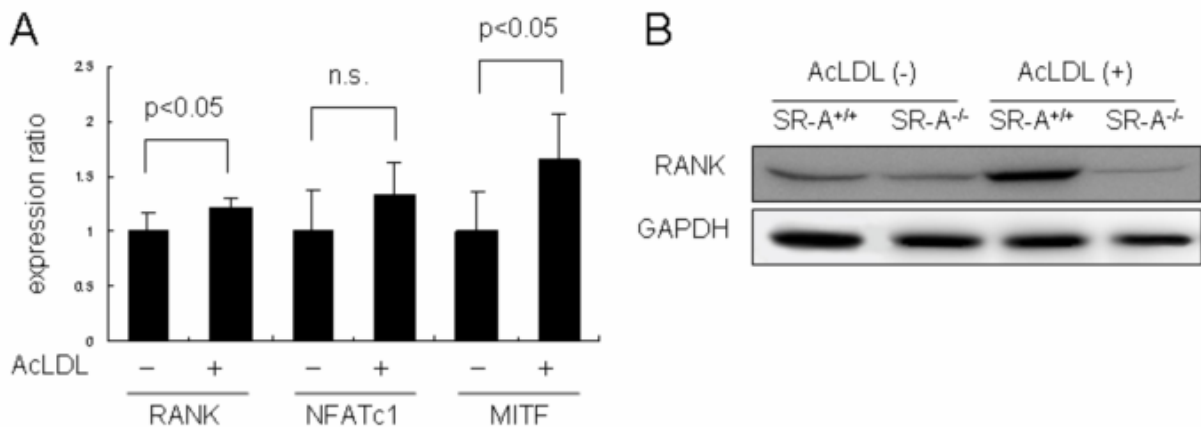
図 3-3. 破骨細胞分化因子の発現量

A. RT-PCR

B. ウエスタンブロット

3-4. 破骨細胞分化因子発現に対する SR-A リガンドの効果

破骨細胞分化における SR-A リガンドの影響を調べるために、代表的な SR-A 特異的リガンドである acetylated LDL を用いて分化因子の発現を見た。リアルタイム RT-PCR 法を用いた検定において、SR-A^{+/+} マウス骨髄由来細胞に acetylated LDL を加えた培養破骨細胞では、Day 3 での RANK, MITF の発現が有意に上昇した(図 3-4A)。更に蛋白レベルにおいても RANK の発現上昇が見られた(図 3-4B)。以上の結果が、AcLDL と SR-A の結合によるものであることを確認するために、分化初期の 0-24h, 24-48h, 48-72h の 3 期(それぞれ 24h 刺激)に分けて AcLDL を加えた。すると、最も SR-A 発現が高いと思われる 0-24h に AcLDL を加えた時に、RANKL 及び MITF の発現の有意な上昇が見られた(図 3-4C)。



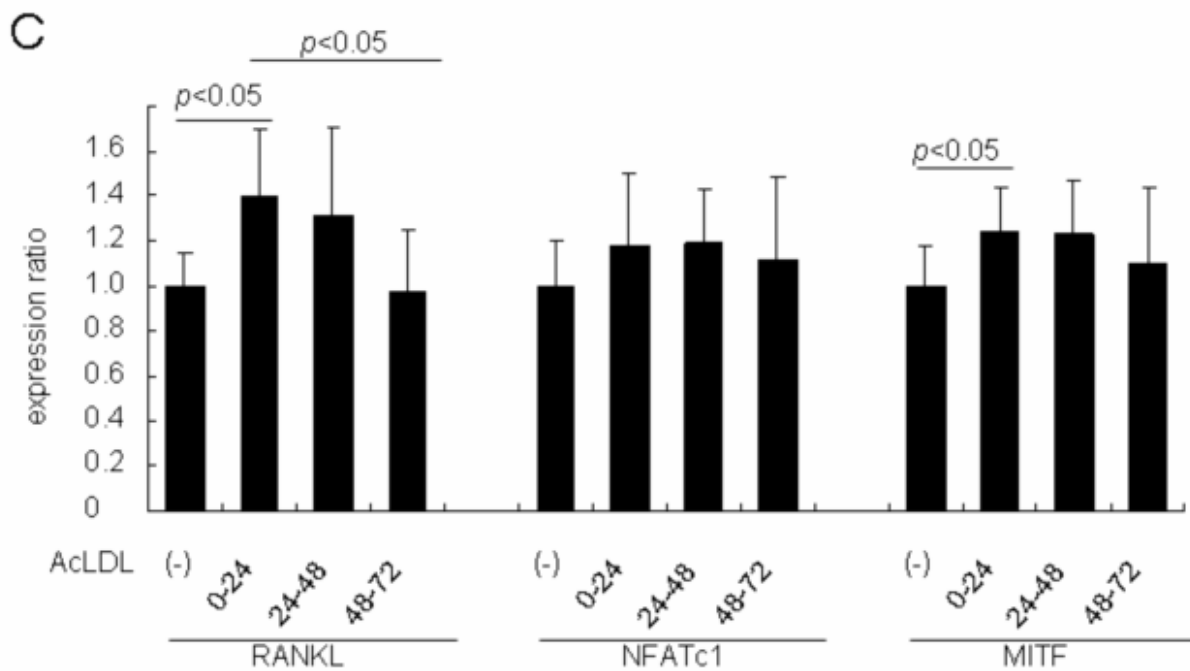


図 3-4. AcLDL 付加における分化因子発現量

- A. リアルタイム RT-PCR
- B. ウェスタンブロット
- C. リアルタイム RT-PCR

3-5. in vivo における破骨細胞評価

生体においても破骨細胞分化に対する SR-A の影響が見られるかを調べるため、10-12 週齢及び 60 週齢の SR-A^{-/-}、SR-A^{+/+} マウス大腿骨遠位端の TRAP 染色を行い、破骨細胞数の検討を行った。10-12 週齢マウスにおいて、SR-A^{+/+} の陽性細胞は多核で細胞質豊かなものが多かったが(図 3-5A 上段)、SR-A^{-/-} では扁平で核が少数なものが目立った(図 3-5A 下段)。TRAP 陽性細胞の単位面積辺りの数を両者で比較したところ、3 核以下では差は認めなかったが、3 核以上のものでは SR-A^{+/+} が 43.06、SR-A^{-/-} が 24.65 と SR-A^{-/-} が有意に少なく、また

破骨細胞総数も SR-A^{+/+} が 71.94、SR-A^{-/-} が 54.21 と SR-A^{-/-} で低かった(図 3-5B,C 上段)。
 60 週齢マウスにおいても、同様の結果が得られた。TRAP 陽性細胞の単位面積辺りの数は、3 核以下では差は認めず、3 核以上では SR-A^{+/+} が 21.99、SR-A^{-/-} が 8.33 と SR-A^{-/-} が有意に少なく、また破骨細胞総数も SR-A^{+/+} が 41.32、SR-A^{-/-} が 25.34 と SR-A^{-/-} で低く、いずれも 10-12 週齢マウスにおける差よりも顕著であった(図 3-5B,C 下段)。

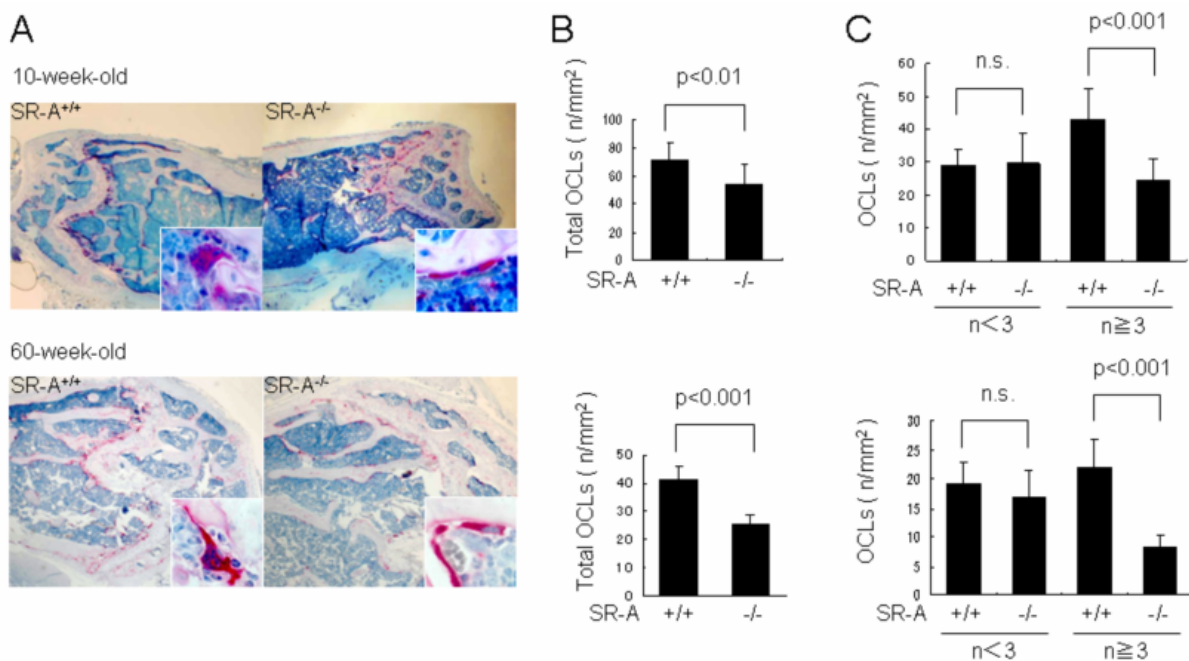


図 3-5. in vivo (大腿骨)における破骨細胞分化

- A. TRAP 染色(上: 10 週齢, 下: 60 週齢)
- B. 破骨細胞総数(TRAP 陽性, 各群 n=15)
- C. 成熟破骨細胞数(TRAP 陽性 3 核以上, 各群 n=15)

3-6. 大腿骨骨密度評価

SR-A 欠損による骨密度への影響を見るために、10-12 週齢及び 60 週齢の SR-A^{-/-}、SR-A^{+/+} マウス大腿骨を、実験動物用 X 線 CT を用いて骨密度測定した。60 週齢 SR-A^{-/-} マウスの大腿骨遠位部の断層画像では、骨梁高輝度部の増加が認められた(図 3-6A)。総骨密度及び骨梁部骨密度は共に、10-12 週齢では差を認めなかったが、60 週齢では SR-A^{-/-} マウスで有意に骨密度が高かった(図 3-6B)。

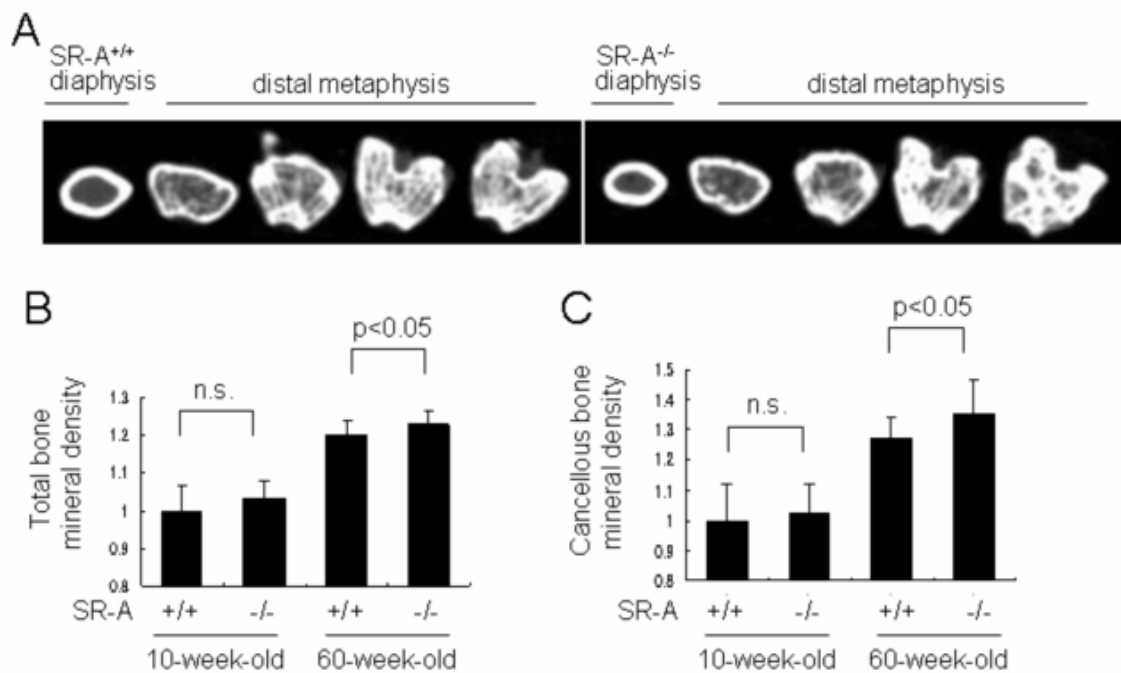


図 3-6. マウス大腿骨骨密度

- A. マウス大腿骨 CT 断面像
- B. 総骨密度(各群 n=8)
- C. 骨梁部骨密度(各群 n=8)

第4章 考察

SR-A は多機能受容体であり、アテローム硬化、生体防御、組織修復、アポトーシス細胞の貪食、細胞接着など、マクロファージの細胞機能に広く関わっている [18]。これは、SR-A が細胞内シグナル伝達に関わっている可能性をも示唆する [24,25]。今回我々は、破骨細胞分化サイクルにおける SR-A の経時的発現について明らかにした。分化初期つまり RANKL を加える直前の前駆破骨細胞から、単核の破骨細胞においては、SR-A の発現が豊富に認められるのに対し、多核の成熟破骨細胞に分化すると SR-A の発現は低下、もしくはほとんど発現が認められなかった。これはサルコイドーシスなどに見られる、多核巨細胞における SR-A の発現様式と一致していた。次に、SR-A が RANK とその関連因子の増強を介して破骨細胞分化を促進していることを示した。更に、SR-A に作用する代表的リガンドの一つである acetylated LDL が、前駆破骨細胞における RANK と MITF の発現を増強した。Lin らは過去の報告 [26]で、SR-A の欠損がマウス生体において破骨細胞分化の低下をもたらすことを示したが、RANK を含む、破骨細胞分化因子への SR-A リガンドの効果・役割については触れていなかった。我々の観察では、マウス用 CT を用いて大腿骨骨密度を測定したところ、60 週齢の高齢マウスにおける骨密度は SR-A^{-/-} が SR-A^{+/+} に比べ高かった。これは SR-A が、破骨細胞分化だけでなく骨リモデリングにも関わっていることを示唆している。しかし SR-A^{-/-} マウス大腿骨の組織学的評価においては、大理石骨病様の骨梁変化は示しておらず、両者間の明らかな差は認めなかった。

SR-A は細胞間接着及び、細胞の基質への接着に重要な働きをしていることが知られている [27,28]。前駆破骨細胞の基質への接着は、遊走能の観点から破骨細胞の多核化及び成熟化に不可欠であり [2]、本研究で見られた SR-A^{+/+} と SR-A^{-/-} における破骨細胞分化の違いや、SR-A^{+/+} での RANK 発現の増加は、前駆破骨細胞の基質への接着、及び遊走能の違いに SR-A が関与していることが一因であると考えられる。また acetylated LDL を加えた培養

実験において、RANK 及び MITF といった分化因子の発現亢進が起こったことより、SR-A がリガンドと結合することで、破骨細胞の分化因子発現を促進する何らかのシグナル伝達が起こっていることが想定される。他の SR-A リガンドと破骨細胞分化との関連を見ると、LPS は破骨細胞分化ならびに骨吸収を促進することが報告されている [29,30]。また、高脂肪食を与えた LDL 受容体欠損マウスにおいて生成される大量のリポ蛋白質は SR-A リガンドと成りうるが、高脂血症は骨軟化を促進することが知られている [31]。更に AGE は、破骨細胞分化因子として働くことが報告されているが [32]、その機構は主にインテグリンを介した細胞接着によるシグナル伝達により行われるというものであった [33]。しかし今回の結果より、AGE においても SR-A 由来の破骨細胞分化促進が見られる可能性が考えられる。

TNF α は重要な破骨細胞分化促進因子である [10]。我々は過去に、様々な疾患モデルにおける SR-A の働きについて研究し、SR-A がマクロファージ由来の TNF α 分泌に抑制的に作用することを示した [22,23]。よって SR-A 欠損により、TNF α 産生が促進されることで、破骨細胞分化が増強するという結果が想定された。しかし今回その影響が認められなかった理由として、SR-A^{-/-} と SR-A^{+/+} 由来の前駆破骨細胞における TNF α 産生には差がないこと、また今回のように通常の破骨細胞培養系においては、TNF α 産生が起こらないことが挙げられる。しかし今後の課題として、炎症を励起した状態での破骨細胞分化に対する検討も必要である。

SR-A 由来破骨細胞分化においては、通常の破骨細胞分化同様、前駆破骨細胞における RANK 発現が重要な因子である。Arai らは M-CSF が初期の破骨細胞分化における RANK 発現を誘導し、M-CSF 単独では破骨細胞分化が進行しないことを示した [34]。今回、SR-A 欠損によって c-fms の発現に影響は見られなかった。これらは SR-A 由来 RANK 発現が M-CSF/c-fms 経路とは無関係であることを示す。また RANKL が SR-A のリガンドと成り得る可能性も想定されたため、免疫沈降法を用いて検討したところ、RANKL と SR-A の直接の結合は認められなかった。本研究において、SR-A と破骨細胞分化には密接な関係があることがわかった。しかし SR-A 誘導による RANK 発現促進、及び RANK を介した破骨細胞分化増強

の背後にある詳細なメカニズムについては未だ明らかではない。今後これらのメカニズムを解明していくことで、の骨粗鬆症などの骨代謝疾患への治療応用の一助と成り得ることが示唆された。

結 語

本研究では、SR-A が破骨細胞の分化及び多核化に促進的に作用しており、生体においても影響を及ぼしていることを報告した。SR-A の破骨細胞分化制御作用には、分化必須因子である RANK の発現増強が関与しており、更に SR-A にリガンドが作用することで破骨細胞分化制御作用がより増加する可能性が示唆された。SR-A が RANK 発現を増加させる機構については未だ不明であり、今後更なるメカニズムの解明が必要であると考えられた。

第 5 章 参考文献

1. Yagi T, Miyamoto T, Toyama Y, Suda T, Role of DC-STAMP in cellular fusion of osteoclasts and macrophage giant cells, *J Bone Miner Metab* 24 (2006) 355–358.
2. Miyamoto T, Arai F, Ohneda O, Takagi K, Anderson DM, Suda T, An adherent condition is required for formation of multinuclear osteoclasts in the presence of macrophage colony-stimulating factor and receptor activator of nuclear factor kappa B ligand, *Blood* 15 (2000) 4335–4343.
3. Yoshida H, Hayashi S, Kunisada T, Ogawa M, Nishikawa S, Okamura H, Sudo T, Shultz LD, Nishikawa S. The murine mutation osteopetrosis is in the coding region of the macrophage colony stimulating factor gene. *Nature* 31 (1990) 442–444.
4. Suda T, Takahashi N, Udagawa N, Jimi E, Gillespie MT, Martin TJ. Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families, *Endocr Rev.* 20 (1999) 345–357
5. Theill LE, Boyle WJ, Penninger JM. RANKL and RANK: T cells, bone loss, and mammalian evolution, *Annu Rev Immunol* 20 (2002) 795–823
6. Takayanagi H. Mechanistic insight into osteoclast differentiation in osteoimmunology, *J Mol Med* 83 (2005) 170–179
7. Matsuo K, Ray N, Osteoclasts, mononuclear phagocytes, and c-Fos: new insight into osteoimmunology, *Keio J Med* 53 (2004) 78–84

8. Weilbaecher KN, Motyckova G, Huber WE, Takemoto CM, Hemesath TJ, Xu Y, Hershey CL, Dowland NR, Wells AG, Fisher DE. Linkage of M-CSF signaling to Mitf, TFE3, and the osteoclast defect in Mitf(mi/mi) mice. *Mol Cell* 8 (2001) 749–758
9. Teitelbaum SL, Bone resorption by osteoclasts, *Science* 289 (2000) 1504–1508.
10. Kobayashi K, Takahashi N, Jimi E, Udagawa N, Takami M, Kotake S et al, Tumor necrosis factor alpha stimulates osteoclast differentiation by a mechanism independent of the ODF/RANKL–RANK interaction, *J Exp Med* 191 (2000) 275–286.
11. Lee J, Kim K, Kim JH, Jin HM, Choi HK, Lee SH et al, Id helix–loop–helix proteins negatively regulate TRANCE–mediated osteoclast differentiation, *Blood* 107 (2006) 2686–2693.
12. Ikeda F, Nishimura R, Matsubara T, Tanaka S, Inoue J, Reddy SV et al, Critical roles of c–Jun signaling in regulation of NFAT family and RANKL–regulated osteoclast differentiation, *J Clin Invest.* 114 (2004) 463–465.
13. Luchin A, Purdom G, Murphy K, Clark MY, Angel N, Cassady AI et al, The microphthalmia transcription factor regulates expression of the tartrate–resistant acid phosphatase gene during terminal differentiation of osteoclasts, *J Bone Miner Res.* 15 (2000) 451–460.
14. Hershey CL, Fisher DE. Mitf and Tfe3: members of a b–HLH–ZIP transcription factor family essential for osteoclast development and function. *Bone.* 34 (2004) 689–696
15. M.P. Yavropoulou, J.G. Yovos, Osteoclastogenesis – Current knowledge and future perspectives, *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 8(2008) 204–216

16. Gough PJ, Gordon S, The role of scavenger receptors in the innate immune system, *Microbes Infect.* 2 (2000) 305–311
17. Kodama T, Freeman M, Rohrer L, Krieger M, Type 1 macrophage scavenger receptor contains alpha-helical and collagen-like coiled coils, *Nature* 343 (1990) 531–535
18. Suzuki H, Kurihara Y, Takeya M, Kamada N, Kataoka M, Jishage K, Sakaguchi H, Kruijt JK, Higashi T, Suzuki T, Berkel TJC, Horiuchi S, Takahashi K, Yazaki Y, Kodama T: The multiple roles of macrophage scavenger receptors (MSR) in vivo: resistance to atherosclerosis and susceptibility to infection in MSR knockout mice. *J Atheroscler Thromb* 4 (1997) 1–11
19. Sakaguchi H, Takeya M, Suzuki H, Hakamata H, Kodama T, Horiuchi S, Gordon S, Ishibashi S, Kitamura N, Takahashi K. Role of macrophage scavenger receptors in diet-induced atherosclerosis in mice. *Lab Invest* 78 (1998) 423–434
20. Mori T, Takahashi K, Higashi T, Takeya M, Kume S, Kawabe Y, Kodama T, Horiuchi S. Localization of advanced glycation end products of Millard reaction in bovine tissues and their endocytosis by macrophage scavenger receptors. *Exp Mol Pathol* 63 (1995) 135–152
21. Platt N, Haworth R, Darley L, Gordon S, The many roles of the class A macrophage scavenger receptor, *Int Rev Cytol.* 212 (2002) 1–40.
22. Tsujita K, Kaikita K, Hayasaki T, Honda T, Kobayashi H, Sakashita N et al, Targeted deletion of class A macrophage scavenger receptor increases the risk of cardiac rupture after experimental myocardial infarction, *Circulation* 115 (2007) 1904–1911.
23. Kobayashi H, Sakashita N, Okuma T, Terasaki Y, Tsujita K, Suzuki H et al, Role of SR-A in hyperoxic lung injury, *J Pathol.* 212 (2007) 38–46.

24. Coller SP, Paulnock DM, Signaling pathways initiated in macrophages after engagement of type A scavenger receptors, *J Leukoc Biol.* 70 (2001) 142–148.
25. Cotena A, Gordon S, Platt N, The class A macrophage scavenger receptor attenuates CXC chemokine production and the early infiltration of neutrophils in sterile peritonitis, *J Immunol.* 173 (2004) 6427–6432.
26. Lin YL, de Villiers WJ, Garvy B, Post SR, Nagy TR, Safadi FF et al, The effect of class A scavenger receptor deficiency in bone, *J Biol Chem* 282 (2007) 4653–4660.
27. Fraser I, Hughes D, Gordon S, Divalent cation-independent macrophage adhesion inhibited by monoclonal antibody to murine scavenger receptor, *Nature.* 364 (1993) 343–346.
28. Kosswig N, Rice S, Daugherty A, Post SR: Class A scavenger receptor-mediated adhesion and internalization require distinct cytoplasmic domains. *J Biol Chem.* 278 (2003) 34219–34225
29. Haworth R, Platt N, Keshav S, Hughes D, Darley E, Suzuki H et al, The macrophage scavenger receptor type A is expressed by activated macrophages and protects the host against lethal endotoxic shock, *J Exp Med.* 186 (1997) 1431–1439.
30. Mörmann M, Thederan M, Nackchbandi I, Giese T, Wagner C, Hänsch GM, Lipopolysaccharides (LPS) induce the differentiation of human monocytes to osteoclasts in a tumour necrosis factor (TNF) alpha-dependent manner: a link between infection and pathological bone resorption, *Mol Immunol* 45 (2008) 3330–3337.
31. Tintut Y, Morony S, Demer LL, Hyperlipidemia promotes osteoclastic potential of bone marrow cells ex vivo, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24 (2004) 6–10.

32. Miyata T, Notoya K, Yoshida K, Horie K, Maeda K, Kurokawa K et al, Advanced glycation end products enhance osteoclast-induced bone resorption in cultured mouse unfractionated bone cells and in rats implanted subcutaneously with devitalized bone particles, *J Am Soc Nephrol.* 8 (1997) 260–270.
33. Zhou Z, Immel D, Xi CX, Bierhaus A, Feng X, Mei L et al, Regulation of osteoclast function and bone mass by RAGE, *J Exp Med* 203 (2006) 1067–1080.
34. Arai F, Miyamoto T, Ohneda O, Inada T, Sudo T, Brasel K et al, Commitment and differentiation of osteoclast precursor cells by the sequential expression of c-Fms and receptor activator of nuclear factor kappaB (RANK) receptors, *J Exp Med* 190 (1999) 1741–1754.