

論文内容要旨

題 目： 破骨細胞の形成と活性に及ぼす

Transforming growth factor- β_1 の影響について

著 者：上岡 寛

内容要旨（和文約1,500字）

Transforming growth factor- β_1 (以下TGF- β_1 と略記する)は、各種細胞の分化、増殖を調節する多機能な性格を備えたサイトカインである。しかし、破骨細胞の分化、形成に対するこのサイトカインの役割はいまだに明らかになっていない。

そこで、TGF- β_1 の破骨細胞による骨吸収に対する影響を調べるため、新生マウス長管骨より採取した骨組織中の全ての細胞（以下、全前骨細胞と略記する）を象牙片上で培養した。TGF- β_1 は0.04-5 ng/mlの濃度で、破骨細胞による骨吸収を抑制することがわかった。電子顕微鏡による観察では、ミトコンドリアが減少し、波状縁、明帯の形成が弱いことから破骨細胞の骨吸収活性の低下が示唆された。

全骨細胞を用いた破骨細胞形成系では、 10^{-8} Mの1,25-dihydroxyvitamin D_3 [以下、1,25-(OH) $_2$ D $_3$ と略記する]とともにTGF- β_1 を添加すると0.2-1 ng/mlの濃度で破骨細胞形成を促進することがわかった。次に破骨細胞の形成過程に異種細胞の混入を除いた血液芽球細胞からの破骨細胞形成系を用いてTGF- β_1 の破骨細胞形成に対する直接作用について検討した。意外なことにTGF- β_1 は、0.2 ng/mlより高濃度の群において破骨細胞形成を抑制した。

近年、破骨細胞の形成には、骨芽細胞が関与していると報告されている。そこで骨芽細胞を介した間接的な影響を検討するために、骨芽細胞として骨芽細胞様細胞MC3T3-E1細胞を用い、この細胞を1 ng/mlのTGF- β_1 で処理した後に得られる培養上清、細胞外基質の塩化ナトリウム抽出液を用いて破骨細胞に対する影響を検討したところ、 10^{-8} Mの1,25-(OH) $_2$ D $_3$ 共存下で破骨細胞形成を促進した。

これらのことから、TGF- β_1 は破骨細胞の活性に対しては、抑制を示す。しかし、破骨細胞形成に対しては、直接、破骨細胞の形成を抑制するが、間接的には骨芽細胞を介して促進することが示唆された。

2

破骨細胞の形成と活性に及ぼす
Transforming growth factor- β_1 の
影響について

上岡 寛

Effects of transforming growth factor- β_1
on formation and activation of osteoclast

Hiroshi Kamioka

徳島大学大学院歯学研究科
歯科矯正学講座（指導：河田照茂教授）

Department of Orthodontics,
Graduate School of Dentistry,
The University of Tokushima
(Director: Prof. Terushige Kawata)

破骨細胞の形成と活性に及ぼす
Transforming growth factor- β_1 の
影響について

上岡 寛

Effects of transforming growth factor- β_1
on formation and activation of osteoclast

Hiroshi Kamioka

徳島大学大学院歯学研究科
歯科矯正学講座（指導：河田照茂教授）

Department of Orthodontics,
Graduate School of Dentistry,
The University of Tokushima
(Director: Prof. Terushige Kawata)

破骨細胞の形成と活性に及ぼす
Transforming growth factor- β_1 の
影響について

著者：上岡 寛

所属：徳島大学大学院歯学研究科

歯科矯正学講座

(指導：河田照茂教授)

Key words：骨吸収、破骨細胞、骨芽細胞、TGF- β_1

1. 原著
2. 英文抄録1枚、本文27枚、文献6枚、
図の説明5枚、図6枚、表1枚
3. 連絡先：徳島大学歯学部歯科矯正学講座

Abstract: The effects of transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1) on bone resorptive activities of osteoclast and differentiation of preosteoclasts to osteoclasts were investigated in vitro using unfractionated bone cells and preosteoclasts derived from mouse spleen. The results were summarized as follows:

1) In the unfractionated bone cells which contained osteoclasts, preosteoclasts, osteoblasts and other bone-derived cells, TGF- β_1 inhibited the bone resorptive activities of osteoclasts. TGF- β_1 alone did not increase the osteoclast formation but 1,25-dihydroxyvitamin D₃ [1,25-(OH)₂D₃]-dependent osteoclast formation was markedly enhanced by TGF- β_1 .

2) In the clonal preosteoclasts, the formation of osteoclast-like cells (tartarate-resistant acidic phosphatase-positive multinuclear cells) was also depressed by TGF- β_1 . On the other hand, 1,25-(OH)₂D₃-stimulated formation of osteoclast-like cells was further enhanced by the factor(s) present in the conditioned medium and 2M NaCl-extracted fraction of TGF- β_1 -treated osteoblastic MC3T3-E1 cells.

These results suggest that TGF- β_1 depresses both bone resorptive activity of osteoclast and differentiation of preosteoclast to osteoclast but stimulates osteoclast formation in the presence of 1,25-(OH)₂D₃ through the action on osteoblast.

緒言

Transforming growth factor- β_1 (以下TGF- β_1 と略記する)は、各種細胞の分化、増殖を調節する多機能な性格を備えたサイトカインである(1, 2)。このサイトカインは、造骨系細胞より潜在型TGF- β_1 として形成され(3-5)、骨中に多量に貯蔵されている(5, 6)。そして、破骨細胞の関与で活性型TGF- β_1 となって遊離され、骨代謝で重要な役割を果たすことが示唆されている(7)。すなわち、TGF- β_1 は骨誘導因子(bone morphogenetic protein)の一つとして骨芽細胞の増殖と分化および骨基質産生を介して骨形成を促進する(8-16)。しかし、これらTGF- β_1 の骨形成に対する作用の結果は実験条件によって必ずしも一定ではない。一方、骨吸収での役割についても数少ないながら報告されているが、その結果も一致していない。例えば Tashjianら(17)はマウス頭蓋骨の器官培養でプロスタグランジンを介するTGF- β_1 の骨吸収促進作用を観察して

いるのに反し、Pfeilschifterら⁽¹⁸⁾はラット胎仔の培養長管骨では逆に抑制作用を示すと報告している。このように骨代謝に対するTGF- β_1 の作用は用いた細胞の種類や起源や分化度あるいは他の細胞の混在などによって大きく左右されると考えられる。

そこで、本研究では、TGF- β_1 の骨吸収に及ぼす影響を二種類の培養系、すなわち全骨細胞培養系⁽¹⁹⁾と血液系芽球細胞からの破骨細胞形成系⁽²⁰⁾を用いて検討した。前者の培養系では破骨細胞を含む細胞を培養し、骨吸収活性および破骨細胞形成に対するTGF- β_1 の作用を観察した。しかし、この培養系では、骨芽細胞などの間質細胞が混在しているため、これらの細胞を介する間接作用も考慮しなければならない。これに対して後者は、未分化な破骨細胞のみからなる培養系で骨吸収活性に対する作用は観察できないが、他の細胞が介在しない破骨細胞形成に対する直接作用を測定しうる系である。

一方、Burgerら⁽²¹⁾、およびRodanら⁽²²⁾は、

破骨細胞形成は骨芽細胞を介し調節されていると報告している。またHiuraら⁽²³⁾はこの骨芽細胞による調節は骨芽細胞が骨細胞へと分化する過程で変化すると報告している。これらの結果からTGF- β_1 が骨芽細胞を介して、破骨細胞の形成に影響を与える可能性が考えられる。そこで、骨芽細胞としてマウス骨芽細胞様細胞株MC3T3-E1⁽²⁴⁾を用い、TGF- β_1 で処理したMC3T3-E1細胞から産生される生理活性物質の破骨細胞形成への作用についても検討した。

材料と方法

1) 試薬類

本研究で使用した試薬の入手先を()内に示す。

α -変法Eagle最小必須培地(以下 α -MEMと略記する、Flow Laboratories; Mclean, VA, U. S. A.)、胎仔牛血清(以下FBSと略記する、Bioproduct Inc; Walkviles, MD, U. S. A.)、TGF- β_1 (R&D system Inc; Mineapolis, MN, U. S. A.)、酸性ヘマトキシリン溶液(Sigma Chemical Co.; St. Louis, MO, U. S. A.)、1 α , 25-dihydroxyvitamin D₃(以下1, 25-(OH)₂D₃と略記する、帝人生物医学研究所; 東京)、5-フルオロウラシル(以下5-FUと略記する、協和醗酵; 東京)、牛血清アルブミン(Fraction V, Sigma)、遺伝子組換え型マウスインターロイキン-3(以下rmIL-3と略記する、バイオマテリアル研究所; 横浜)、遺伝子組換え型ヒトインターロイキン-6(以下rhIL-6と略記する、味の

素；川崎) メチルセルロース (Ardrich Chemical Co.; Milwaukee, WI, U. S. A.), 遺伝子組換え型マウス顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子 (以下rmGM-CSFと略記する、住友製薬；大阪)、プロナーゼE (科研製薬；東京)、エチレンジアミン四酢酸ナトリウム (以下EDTAと略記する、和光純薬；大阪)、N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid (以下HEPESと略記する、和光純薬)、グルタルアルデヒド (ナカライテスク；京都)、カコジル酸 (ナカライテスク)

2) 象牙片上で培養した全骨細胞の骨吸収活性の測定

全骨細胞培養は、Takadaらの方法⁽¹⁹⁾に従って行った。すなわち、13日齢ICR系マウス(チャールスリバー・ジャパン；東京)の大腿骨および脛骨を無菌的に取り出し、軟組織を除去した後に5% (v/v) FBSを含む α -MEM中でハサミを用いて十分に細切した。細切した骨片は電動モーターを

用いて、攪拌し、骨片より破骨細胞を含む細胞を培養液中に遊離させた。その後、約4分間静置し、骨片を沈殿させ、上清を集め、全骨細胞浮遊液とした。この採取した全骨細胞を、5% (v/v) FBSを含む α -MEMで 2×10^6 個/mlの細胞密度に調製し、その250 μ lを96穴平底プレート (Falcon Labware; Oxnard, CA, U. S. A.) 中の象牙片 (新日本象牙; 東松山) 上で培養を開始した。2時間後に、各濃度のTGF- β_1 および5% (v/v) FBSを含む α -MEM 250 μ lに交換し、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂/95% 空気の気相下でさらに4日間培養した。ついで、象牙片上に存在する破骨細胞に、Van de Wijngaertらの方法⁽²⁵⁾に従い破骨細胞のマーカー染色である酒石酸耐性酸フォスファターゼ (以下TRAPと略記する) 染色を行い、3核以上のTRAP陽性の破骨細胞数を顕微鏡下で算定した。破骨細胞によって形成された吸収窩は、細胞をブラシで除去した後に、酸性ヘマトキシリン溶液で染色した。吸収窩の面積は、接眼レンズに組み込まれたグリッド (基盤目盛) より算定した。

3) 象牙片上での全骨細胞からの破骨細胞形成の測定

上記のようにして採取された全骨細胞を、5% (v/v) FBSを含む α -MEMの中で 2×10^5 個/mlの細胞密度になるように調製し、その250 μ lを96穴プレートの象牙片上に播き培養を開始した。7日後に、培養開始時に存在していた破骨細胞が消失したのをTRAP染色で確認し、5% (v/v) FBSとTGF- β_1 を含む培養液に交換し、5日間培養した後、上記と同様な方法で破骨細胞数を算定した。

4) 芽球細胞の調製

芽球細胞はKuriharaらの方法⁽²⁰⁾に従って調製した。すなわち、6週齢雌BDF₁マウス(チャールスリバー・ジャパン)の尾静脈に5-FUを注射し、S期の細胞に障害を与え脾臓における造血幹細胞の占める割合を選択的に増大させた。4日後脾臓を無菌的に摘出し、この脾臓より得た脾細

胞を、 1.8×10^6 個/mlの濃度に調製した。この時
用いた培養液は、30% (v/v) FBS、1% (w/v) 牛
血清アルブミン、50U/ml rmIL-3、30 ng/ml rh
IL-6、1.2% (w/v) メチルセルロースを含む α -MEM
である。この細胞浮遊液を、35mm径細胞用プラ
スチックペトリ皿 (Falcon Labware) に播き込み
37°C、5%CO₂/95%空気の気相下で培養した。培養
7日後、形成された脾臓由来の芽球コロニーを
顕微鏡下で、マイクロピペットで採取し、5% (v/
v) FBS、100U/ml rmGM-CSFを含む α -MEM中に分散
した。以後この細胞を芽球細胞と呼ぶ。

5) 骨芽細胞の培養

骨芽細胞として骨芽細胞様細胞株MC3T3-E1を
用いた⁽²⁵⁾。細胞を100mm径プラスチックペ
トリ皿中 (Falcon Labware) で、10% (v/v) FBSを
含む α -MEM中で37°C、5%CO₂/95%空気の気相下で
培養した。その後3日おきに、Ca²⁺とMg²⁺を除
いた10mMリン酸緩衝生理食塩水 (pH7.4) に0.001

% (w/v) プロナーゼE、0.02% (w/v) EDTAを加えた溶液で10分間室温で処理して細胞を分散し、継代培養を行った。

6) 培養上清の調製

培養上清(以下CMと略記する)は以下に述べる方法で調製した。すなわち、100mm径プラスチックペトリ皿上で密に増殖した単層細胞(3×10^6 個/皿)の培養液(10%FBSを含む α -MEM)を1 ng/ml TGF- β_1 を添加した新しい培養液と交換し、さらに24時間培養した。その後 α -MEMで3回洗浄してTGF- β_1 を除去し、血清を含まない α -MEM 10mlを加えさらに24時間培養した。培養液中の細胞を、 $1,000 \times g$ 、5分間遠心して除去した上清をCMとした。CMは使用時まで -80°C で保存した。

7) 細胞抽出液の調製

細胞抽出液はFullerらの方法⁽²⁶⁾に準じて調製した。すなわち、上記のCMを調製したMC3T3-E1細胞(3×10^6 個/皿)を更に α -MEMで3回洗浄した後、ラバーポリスマンにて細胞を採取し遠沈管に回収した。これを10mM HEPES を含んだ2mlの 2M NaCl (pH 7.4) 中に浮遊させ、室温で30分間放置した後、 $3,000 \times g$ で5分間遠心して不溶成分を沈殿させ上清を回収した。この上清を、Sep-pak C18 ミニカラム (Waters; Milford, MA, U. S. A.) に通して脱塩し、80% (v/v) アセトニトリル溶出画分を得た。次に、これを減圧濃縮し、簡易微量濃縮器 (セントリコン30; Amicon Japan Co., 東京) で限外濾過を行って得た分子量30,000以上の画分を蒸留水で再び2mlとし、NaCl抽出液の原液として用いた。

8) 芽球細胞からのTRAP陽性多核細胞形成の測定

800個の芽球細胞を含む細胞浮遊液150 μ lを96

穴プラスチックマイクロプレート (BioTec; 東京) の各穴に植え込み、37℃、5%CO₂/95%空気の気相下で7日間培養した。以後この時点での細胞を未分化破骨細胞と呼ぶことにする。この培養液を5%(v/v)FBS、100U/ml rmGM-CSF、10⁻⁸M 1,25-(OH)₂D₃と被検標品を含む新しい培養液に交換した。さらに3日間培養した後、3核以上でTRAP陽性の多核細胞数を顕微鏡下で算定した。

9) 透過型電子顕微鏡による破骨細胞の観察

象牙片上で全骨細胞を4日間培養した後、0.1M カコジル酸緩衝液 (pH 7.4) で培養細胞を洗浄し、2.5% グルタルアルデヒドを含む0.1Mカコジル酸緩衝液で4℃、2時間の前固定を行った。その後、0.1Mカコジル酸緩衝液で一晩洗浄した後、0.1M EDTA で15日間脱灰を行った。次いで、この細胞標品を0.25M 蔗糖を含む0.1Mカコジル酸緩衝液で2日間洗浄した後、2% オスミウム酸を含む0.1Mカコジル酸緩衝液で4℃、4時間の後

固定を行い、通法にしたがいアルコール系列による脱水を行った。脱水後、エポン包埋し、さらに超薄切片を作成した後、酢酸ウラニール、クエン酸鉛で2重染色を施し透過型電子顕微鏡（日立H800；日立製作所，東京）を用いて観察した。

10) 統計学的解析法

実験データの有意差検定は、Student's t-testにより行った。

結果

1. 培養マウス全骨細胞に存在する破骨細胞への TGF- β_1 の影響

培養マウス全骨細胞に存在する破骨細胞の骨吸収活性に対するTGF- β_1 の影響について検討した。骨吸収活性は、象牙片上でマウス全骨細胞を4日間培養し、破骨細胞によって形成される吸収窩の面積により評価した。なおTakadaら⁽¹⁹⁾は全骨細胞を4日間培養しても破骨細胞の核内への5-ブロモデオキシウリジンの取り込みがみられないと報告している。そこで本実験では培養マウス全骨細胞に存在する破骨細胞の影響のみを観察するため、破骨細胞の新生がみられない実験条件として培養4日までを選んだ。まず最初に、TGF- β_1 の存在下での破骨細胞数および吸収窩の面積の経時変化を検索した。破骨細胞数は培養4日間では、1 ng/mlのTGF- β_1 添加群、未処理対照群において、ともに減少傾向が認め

られたものの、両者の間に有意差は認められなかった(図. 1A)。しかし吸収窩の形成は、培養3日目よりTGF- β_1 添加群において著明な抑制が認められた(図. 1B)。さらに、表. 1に示すように吸収窩の形成はTGF- β_1 の濃度に比例して抑制され、その抑制効果はTGF- β_1 0.2 ng/mlより高濃度で有意差を認めた。しかし、破骨細胞数においては、どの濃度でも有意差が認められなかった。すなわち、TGF- β_1 は破骨細胞あたりの骨吸収活性を抑制することが示唆された。

次に、TGF- β_1 による破骨細胞の形態的变化を電子顕微鏡レベルで解析した。未処理対照群の破骨細胞には、象牙片に面して波状縁が伸展し、細胞辺縁には象牙片に密着した明帯がみられ、細胞内には多数のミトコンドリアが存在し細胞の形態は扁平であった(図. 2A)。しかし、TGF- β_1 添加群では波状縁は屈曲し、明帯の形成は非常に乏しく、また細胞の形態はTGF- β_1 添加群では丸みを帯びていた。またミトコンドリアの数および大きさの減少が認められた(図. 2B)。

これらの実験結果より、TGF- β_1 は破骨細胞の骨吸収活性を抑制する因子であることを示唆された。

2. 破骨細胞形成に対するTGF- β_1 の影響

象牙片上でマウス全骨細胞を5% (v/v) FBSのみを含む α -MEMで7日間培養して、全骨細胞の培養開始時に存在していた破骨細胞を消失させた後、1, 25-(OH) $_2$ D $_3$ あるいはTGF- β_1 を加えて5日間培養して誘導される破骨細胞数を算定した。図. 3 Aに示すように、1, 25-(OH) $_2$ D $_3$ は単独で破骨細胞形成を促進したが、TGF- β_1 の単独処理では破骨細胞の形成は認められなかった。しかし、1, 25-(OH) $_2$ D $_3$ と併用するとTGF- β_1 は1, 25-(OH) $_2$ D $_3$ の破骨細胞形成促進効果を増強した。このTGF- β_1 の増強効果は濃度に依存し、1 ng/mlで最大となったが、5 ng/mlではその効果がみられなくなった(図. 3B)。

この系には未分化破骨細胞以外の細胞も含ま

れているので、TGF- β_1 の効果がこれら共存する細胞を介する間接的なものである可能性が考えられる。そこでTGF- β_1 の破骨細胞形成に対する直接作用を検討するため、骨芽細胞などの異種細胞を含まない未分化破骨細胞からのTRAP陽性多核細胞への分化に及ぼす影響について検討した。その結果、TGF- β_1 は1,25-(OH) $_2$ D $_3$ によって誘導されるTRAP陽性多核細胞形成を1 ng/ml以上の濃度で抑制することが明らかになった(図.4)。

そこで次に、全骨細胞培養系でみられた1,25-(OH) $_2$ D $_3$ 存在下でのTGF- β_1 の破骨細胞形成促進作用に骨芽細胞が関与しているか否かについて検討した。この実験では、TGF- β_1 で24時間処理したMC3T3-E1細胞からCMと2M NaCl抽出液を調製した。その後、未分化破骨細胞を 10^{-8} M 1,25-(OH) $_2$ D $_3$ 存在下で各種濃度のCMあるいはNaCl抽出液を添加してTRAP陽性多核細胞の形成に及ぼす影響を検討した。その結果、このCMは81倍希釈でTRAP陽性多核細胞形成を促進することが明らかになった(図.5)。

近年のサイトカインに関する研究結果によれば、細胞より分泌された多くの生理活性物質は細胞表面や、細胞外基質に結合して存在しており、これらは高濃度のNaClで抽出されると報告されている⁽²⁸⁻³⁰⁾。そこで、CM中にみられたTRAP陽性多核細胞の形成促進作用をもつ物質は細胞表面や細胞外基質から遊離した可能性が考えられるのでNaCl抽出液のTRAP陽性多核細胞形成におよぼす影響について検討した。その結果NaCl抽出液を $1,25-(OH)_2D_3$ と同時に添加すると、125倍希釈から625倍希釈においてTRAP陽性多核細胞形成を促進することが判明した(図.6)。この促進作用には $1,25-(OH)_2D_3$ が必要であり、NaCl抽出液単独ではTRAP陽性多核細胞の形成を促進しなかった。

考察

骨吸収に対する $\text{TGF-}\beta_1$ の影響を明らかにするため、破骨細胞の吸収窩形成および破骨細胞形成に対する $\text{TGF-}\beta_1$ の作用について検討した。

本研究では、骨に存在する全ての細胞を含むと考えられるマウス全骨細胞培養系⁽¹⁹⁾のみならず異種細胞を含まない未分化破骨細胞のみからなる培養系⁽²⁰⁾を用いて、破骨細胞の機能と形成に対する $\text{TGF-}\beta_1$ の影響について検討した。

全骨細胞を用いた系では、培養開始時に存在する破骨細胞の骨吸収活性に対して $\text{TGF-}\beta_1$ が及ぼす影響を検討することができる。因に、骨吸収活性を測定する感度をこの全骨細胞培養系と従来の骨の器官培養系とを比較すると、前者の $1,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ による骨吸収促進は対照の4.3倍⁽¹⁹⁾であるのに対し ^{45}Ca をプレラベルした骨からの ^{45}Ca 放出量を測定した後者の器官培養系では対照の1.8倍⁽³¹⁾であった。この後者の器官培養系では、カルシウムの放出の全てが破骨細

胞によるものではなく、カルシウムの交換反応も含まれているため、未処理対照と検体との差が生じにくいと考えられる。しかし、全骨細胞を象牙片上で培養した前者では、破骨細胞によって形成された吸収窩の面積のみを、破骨細胞活性と評価したので、TGF- β_1 の骨吸収活性に対する影響を高感度に測定することができたと考えられる。

本研究で用いた実験系では、TGF- β_1 は、濃度依存的に吸収窩の形成を抑制した。しかし、この際、破骨細胞の数の減少がみられないことから、TGF- β_1 は、破骨細胞の骨吸収活性のみを抑制すると考えられる。一方、電子顕微鏡による観察から、TGF- β_1 で処理した破骨細胞では明帯の形成が乏しくなり、波状縁は骨面には伸展せず、ミトコンドリアの数も減少した。加えて、細胞全体の形態も丸みを帯び、活発な破骨細胞でよく見られるような扁平な形態ではなくなった。従って、電子顕微鏡レベルでの解析からもTGF- β_1 は破骨細胞の骨吸収活性を抑制している

といえる。

HattersleyとChambers⁽³²⁾は破骨細胞のみの系と破骨細胞と骨芽細胞が共存する培養系を用いて実験を行い、TGF- β_1 は後者でのみ骨吸収を促進すると報告している。しかし、本実験ではTGF- β_1 により骨吸収が抑制された。この矛盾した結果の原因は現在のところ明らかではないが、その原因の一つとして、骨芽細胞を含めた混在細胞の含有率や分化度の差による可能性が考えられる。

次に、この全骨細胞培養系を用いて、破骨細胞形成に対するTGF- β_1 の影響について検討した。Ohtaら⁽³³⁾やKellerら⁽³⁴⁾は、TGF- β_1 は血液系前駆細胞のG₁期に働き、細胞周期を調節していると報告している。またChenuら⁽³⁵⁾はマウス骨髄培養系では、TGF- β_1 は1,25-(OH)₂D₃で誘導される破骨細胞形成を抑制すると報告している。しかし、全骨細胞を用いた本実験において、TGF- β_1 は単独ではなんら作用を示さなかったが、1,25-(OH)₂D₃の破骨細胞形成能をさらに促進し

た。この全骨細胞には血液系細胞以外に、骨表面上に存在する骨芽細胞などの間質系細胞も含んでいる。よって、この系でみられたTGF- β_1 の効果はこれら混在する破骨細胞以外の細胞を介する間接的な作用である可能性が考えられる。従って、より詳細な検討には単一細胞からなる破骨細胞形成系を用いることが必要である。そこで、最近開発された血液系芽球細胞からの破骨細胞形成系⁽²⁰⁾を用いることにした。この系は骨芽細胞などの間質細胞を含まず、1,25-(OH) $_2$ D $_3$ 存在下で未分化破骨細胞から破骨細胞の特徴を備えたTRAP陽性多核細胞が形成される。その結果TGF- β_1 は、1,25-(OH) $_2$ D $_3$ によるTRAP陽性多核細胞形成を抑制することがわかった(図4)。この結果は、間質細胞の混在が少ない骨髄細胞を用いたChenuら⁽³⁵⁾の結果と一致する。

Burgerら⁽²¹⁾およびRodanら⁽²²⁾は、破骨細胞の形成には、骨芽細胞が必要であると報告している。さらに、Udagawaら⁽³⁶⁾は、骨髄から得た株化間質細胞も、脾細胞からの破骨細胞様

細胞の形成に関与していると報告している。また、Hiuraら⁽²³⁾は、骨芽細胞が骨細胞へ分化する段階により破骨細胞形成に対する影響が異なると報告している。そして、本研究結果も、間質細胞の含まない未分化破骨細胞からのTRAP陽性多核細胞形成系では、TGF- β_1 は多核細胞形成を抑制したが、対称的に骨芽細胞を含むと考えられる全骨細胞の系では、1,25-(OH) $_2$ D $_3$ の存在下で、逆に促進がみられた。そこで、次に後者での骨芽細胞の役割について検討した。骨芽細胞として、骨芽細胞様細胞株MC3T3-E1を用いた。この細胞は、骨芽細胞の特性、すなわち高いアルカリフォスファターゼ活性⁽²⁴⁾とI型コラーゲン産生能を有している⁽³⁷⁾上、骨代謝を調節する種々のホルモンやサイトカインに回答することが報告されている⁽³⁸⁻³⁹⁾。このMC3T3-E1細胞をTGF- β_1 で処理することによって得られたCMは未分化破骨細胞からのTRAP陽性多核細胞形成を1,25-(OH) $_2$ D $_3$ の存在下で促進した。Sumitaniら⁽⁴⁰⁾は、TGF- β_1 はMC3T3-E1細胞のプ

ロスタグランジン E_2 産生を促進すると報告している。またTashjianら⁽¹⁷⁾はTGF- β_1 による骨吸収促進にプロスタグランジン E_2 の介在があると示唆している。しかし、未分化破骨細胞からのTRAP陽性多核細胞形成系ではプロスタグランジン E_2 は多核細胞形成を抑制することから(著者ら、未発表)、このCM中には、プロスタグランジン E_2 以外のTRAP陽性多核細胞を促進するサイトカインの関与が考えられる。

また最近、PTHなどにより骨芽細胞様細胞から産生される破骨細胞の活性と形成を促進する生理活性物質が、細胞表面や細胞外基質のプロテオグリカンなどと結合していると報告されている⁽²⁶⁻³⁰⁾。そこでTGF- β_1 で処理したMC3T3-E1細胞のNaCl抽出画分について検討したところ、この画分にTRAP陽性多核細胞の形成を促進する物質が存在していた。この結果もTGF- β_1 の破骨細胞形成促進作用が骨芽細胞を介して発現していることを示唆している。更に、この因子が骨芽細胞表面に付着して存在することから、骨芽

細胞と未分化破骨細胞との接触を介して破骨細胞形成の調節に携わることが可能となるものと考えられる。

以上の結果から、 $TGF-\beta_1$ は、破骨細胞の骨吸収活性を抑制することが明らかになった。また、 $TGF-\beta_1$ は未分化破骨細胞に直接働き破骨細胞の形成を抑制するが、骨芽細胞を介して間接的に促進するということが判明した。今後は、 $TGF-\beta_1$ の作用で骨芽細胞から産生される生理活性物質について、詳しく研究していくことが必要である。

結 論

TGF- β_1 の骨吸収に対する作用を明らかにするため、象牙片上での破骨細胞の吸収窩形成および未分化破骨細胞の破骨細胞への分化に対するTGF- β_1 の作用について検討し次の結果を得た。

1. TGF- β_1 は破骨細胞の吸収窩形成を、濃度依存的に抑制した。

2. TGF- β_1 は骨芽細胞を含む全骨細胞培養系で、1, 25-(OH) $_2$ D $_3$ によって誘導される破骨細胞形成を促進した。

3. TGF- β_1 は脾臓由来の未分化破骨細胞に直接働き、破骨細胞への分化を抑制した。

4. TGF- β_1 で処理したマウス骨芽細胞様細胞株MC3T3-E1の培養上清とNaCl抽出画分に破骨細胞形成促進因子の存在が示唆された。

以上の結果より、TGF- β_1 は、破骨細胞の骨吸収活性と未分化破骨細胞の分化を抑制するが、骨芽細胞を介する間接作用では破骨細胞の形成を1,25-(OH) $_2$ D $_3$ 存在下で促進するという生理活性を保有することが示唆された。

稿を終えるにあたり、終始御指導、御校閲を賜りました徳島大学歯学部歯科矯正学講座河田照茂教授、ならびに口腔生化学講座井上秀夫教授、口腔外科学第二講座佐藤光信教授に心から感謝の意を表わしますとともに、本研究の遂行に際し、懇切丁寧な御助言を頂きました、明海大学歯学部口腔解剖学第一講座久米川正好教授ならびに徳島大学歯学部歯科矯正学講座住谷光治講師に深謝します。最後に本研究に終始御支援御協力を頂いた、徳島大学歯学部歯科矯正学講座の諸先生方に厚くお礼を申し上げます。

文献

- 1) Massague, J. :The TGF- β family of growth and differentiation factors. Cell 49:437-438,1987
- 2) Sporn, M.B., Roberts, A.B., Wakefield, L.M., de Crombrughe, B. :Some recent advances in the chemistry and biology of transforming growth factor-beta. J. Cell Biol. 105:1039-1045,1987
- 3) Sandberg, M., Autio-Hormainen, H., Vuorio, E. :Localisation of the expression of types I, II and IV collagen, TGF β 1, and c-fos expression in developing human calvarial bones. Dev. Biol. 130:324-334,1988
- 4) Sandberg, M., Vuorio, T., Hirvonen, H., Alitalo, K., Vuorio, E. :Enhanced expression of TGF β and c-fos mRNAs in the growth plates of the developing human long bones. Development 102:451,1988
- 5) Robey, P.G., Young, M.F., Flanders, K.C., Roche, N.S., Kondaiah, P., Reddi, A.H., Termine, J.D., Sporn, M.B., Roberts, A.B. :Osteoblasts synthesize and respond to transforming growth factor-type β in vitro. J. Cell Biol. 105:457-463,1987
- 6) Hauschka, P.V., Maurakos, A.E., Lafrati, M.D., Doleman, S.E., Klagbrun, M. :Growth factors in bone matrix. Isolation of multiple types by affinity chromatography on heparin-Sepharose. J. Biol. Chem. 261:12665-12674,1986
- 7) Pfeilschifter, J., Mundy, G.R. :Modulation of type β transforming growth factor activity in bone cultures by osteotropic hormones. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:2024-2028,1987
- 8) Noda, M., Rodan, G.A. :Types- β transforming growth factor inhibits proliferation and expression of alkaline phosphatase in murine osteoblast-like cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 140:56-65,1986
- 9) Guenther, H.L., Cecchini, M.G., Elford, P.R., Fleisch, H. :Effects of transforming growth factor

type beta upon bone cell populations grown either in monolayer or semisolid medium. J. Bone Miner. Res. 3:269,1988

- 10) Noda, M., Camiliere, J.J. :In vivo stimulation of bone formation by transforming growth factor- β . Endocrinology 124:2991-2994,1989
- 11) Antosz, M.E., Bellows, C.G., Aubin, J.E. :Effects of transforming growth factor β and epidermal growth factor on cell proliferation and the formation of bone nodules in isolated fetal rat calvaria cells. J. Cell Physiol. 140:386-395,1989
- 12) Hock, J.M., Canalis, E., Centrella, M. :Transforming growth factor- β stimulates bone matrix apposition and bone cell replication in cultured fetal rat calvariae. Endocrinology 126:421-426,1990
- 13) Cheifetz, S., Weatherbee, J.A., Tsang, M.L-S, Anderson, J.K., Mole, J.E., Lucas, R., Massague, J.:The transforming growth factor- β system , a complex pattern of cross-reactive ligands and receptors. Cell 48:409-415,1987
- 14) Heine, U.I., Munoz, E.F., Flanders, K.C., Ellingsworth, L.R., Lam, H-YP., Thompson, N.L., Roberts, A.B. Sporn, M.:Role of transforming growth factor- β in the development of the mouse embryo. J. Cell Biol. 105:2861-2876,1987
- 15) Ibbotson, K.J., Orcutt, C.M., Anglin, A-M., M.D'Souza S.M., :Effect of transforming growth factor β 1 and β 2 on a mouse clonal, osteoblastlike cell line MC3T3-E1. J. Bone Miner. Res. 4:37-45,1989
- 16) Centrella, M., McCarthy, T.L., Canalis, E.:Tranforming growth factor beta is a bifunctional regulator of replication and collagen synthesis in osteoblast-enriched cell cultures from fetal rat bone. J. Biol. Chem. 262:2869-2874,1987
- 17) Tashjian, A.H., Voelkel, E.F., Lazzaro, M., Singer, F.R., Roberts, A.B., Derynck, R., Winker, M.E.,

Levine L: α and β human transforming growth factors stimulate prostaglandin production and bone resorption in cultured mouse calvaria. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:4535-4538,1985

- 18) Pfeilschifter, J., Seyedin, S.M., Mundy GR :Transforming growth factor beta inhibits bone resorption in fetal rat long bone cultures. J. Clin. Invest. 82:680-685,1988
- 19) Takada, Y., Kusuda, M., Hiura, K., Sato, T., Mochizuki, H., Nagao, Y., Tomura, M., Yahiro, M., Hakeda, Y., Kawashima, H., Kumegawa, M. :A simple method to assess osteoclast-mediated bone resorption using unfractionated bone cells. Bone and Mineral 17:347-359,1992
- 20) Kurihara, N., Suda, T., Miura, Y., Nakauchi, H., Kodama, H., Hiura, K., Hakeda, Y., Kumegawa, M. :Generation of osteoclasts from isolated hematopoietic progenitor cells. Blood 74:1295-1302,1989
- 21) Burger, E.H., Van Der Meer, J.W.M., Nijweide, P.J. :Osteoclast formation from mononuclear phagocytes.:Role of bone forming cells. J. Cell Biol. 99:1901-1906,1984
- 22) Rodan, G.A., Martin, T.J. :The role of osteoblasts in hormonal control of bone resorption. Calcif. Tissue Int. 33:349-351,1981
- 23) Hiura, K., Sumitani, k., Kawata, T., Higashino, K., Okawa, M., Sato, T., Hakeda, Y., Kumegawa, M. :Mouse osteoblastic cells(MC3T3-E1) at different stages of differentiation have opposite effects on osteoclastic cell formation. Endocrinology 128:1630-1637,1991
- 24) Kodama, H., Amagai, Y., Sudo, H., Kasai, S., Yamamoto, S. :Establishment of a clonal osteogenic cell line from newborn mouse calvaria. Jpn. J. Oral Biol. 23:899-901,1981

- 25) Van de Wijngaert, F.P., Burger, E.H. :Demonstration of tartarate resistant acid phosphatase in un-decalcified, glycomethacrylate embedded mouse bone; A possible maker for (pre)osteoclast identification. J. Histchem. Cytochem. 34:1317-1323,1986
- 26) Fuller, K., Gallagher, C., Chambers, T.J. :Osteoclast resorption-stimulating activity is associated with the osteoblast cell surface and/or the extracellular matrix. Biochem. Biophys. Res. Commun. 181:67-73,1991
- 27) Shing, Y., Folkman, J., Sullivan, R., Butterfield, C., Murray, J., Klagsbrun, M. :Heparin affinity : Purification of a tumor-derived capillary endothelial cell growth factor. Science 223:1296-1299,1984
- 28) Klagsbrun, M., Shing, Y. :Heparin affinity of anionic and cationic capillary endothelial cell growth factors:Analysis of hypothalamus-derived growth factors and fibroblast growth factors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:805-809,1985
- 29) Vlodavsky, I., Folkman, J., Surrivan, R., Fridman, R., Ishai-Michael, R., Sasse, J., Klagsbrun, M. :Endothelial cell-derived basic fibroblast growth factor : Synthesis and deposition into subendothelial extracellular matrix. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:2292-2296,1987
- 30) Maciag, T., Hoover, G.A., Weinstein, R. :High and low molecular weight forms of endothelial cell growth factor. J. Biol. Chem. 257:5333-5336,1982
- 31) Raisz, L.G., Trummel, C.L., Holick, M.F., Deluca, H.F. :1,25-Dihydroxycholecalciferol: a potent stimulator of bone resorption in tissue culture. Science 175:768-769,1972
- 32) Hattersley, G., Chambers, T.J. :Effects of transforming growth factor β 1 on the regulation of osteoclastic development and function. J. Bone Miner. Res. 6:165-172,1991

- 33) Ohta, M., Greenberger, J.S., Ankleteria, P., Bassols, A., Massague, J. : Two forms of transforming growth factor- β distinguished by multipotential haematopoietic progenitor cells. Nature 329:539, 1987
- 34) Keller, J.R., McNiece, I.K., Sill, K.T., Ellingsworth, L.R., Quesenberry, P.J., Sing G.K., Rucetti, F.W. : Transforming growth factor β directly inhibits primitive murine hematopoietic cell proliferation. Blood 75:596-602, 1990
- 35) Chenu, C., Pfilschifer, J., Mundy, G.R., Roodman, G.D. : Transforming growth factor β inhibits formation of osteoclast-like cells in long-term human marrow cultures. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5683-5687 1988
- 36) Udagawa, N., Takahashi, N., Akatsu, T., Sasaki, T., Yamaguchi, A., Kodama, H., Martin, T.J., Suda, T. : The bone marrow derived stromal cell line MC3T3-G2/PA6 and ST 2 can be substituted for primary osteoblast rich populations in the formation of osteoclast-like cells in cocultures with mouse spleen cells. Endocrinology 125:1805-1813 1989
- 37) Hata, R., Hori, H., Nagai, Y., Tanaka, S., Kondo, M., Hiramatsu, M., Utsumi, N., Kumegawa, M. : Selective inhibition of type I collagen synthesis in osteoblastic cells by epidermal growth factor. Endocrinology 115:867-876 1984
- 38) Kurihara N, Ikeda E, Hakeda Y, Tsunoi M, Maeda N, Kumegawa M : Effect of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on alkaline phosphatase activity and collagen synthesis in osteoblast cells, clone MC3T3-E1. Biochem. Biophys. Res. Commun. 119:767-771 1984
- 39) Hakeda Y, Nakatani Y, Kurihara N, Ikeda E, Maeda N, Kumegawa M : Prostaglandin E2 stimulates collagen and noncollagen protein synthesis and prolyl hydroxylase activity in osteoblast clone MC3T3-E1 cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 126:340-345 1985

40) Sumitani, K., Kawata, T., Yoshimoto, T., Yamamoto, S., Kumegawa, M. : Fatty acid cyclooxygenase stimulated by transforming growth factor- β in mouse osteoblast cells. Arch. Biochem. Biophys. 270:588-595 1989

図の説明

(図1の説明)

全骨細胞培養系での破骨細胞数(A)および吸収窩面積(B)の経時的变化に及ぼすTGF- β_1 の影響

○ - ○ 未処理対照

● - ● 1 ng/ml TGF- β_1

実験方法2)に記載した方法で、全骨細胞を象牙片上で1~4日間培養した。経時的に象牙片を取りだし、破骨細胞数および吸収窩の面積を測定した。

各点は4検体の平均値および標準偏差を示す。

* : 未処理対照との間に有意差を認めた ($p < 0.05$)。

(図2の説明)

破骨細胞の透過型電子顕微鏡による観察

全骨細胞を象牙片上で4日間培養し、実験方法9)に記載した方法で標本を作製した。

A. 未処理対照群 : 象牙片に面して良く発

達した波状縁 (RB)、明帯 (CZ) がみられ、細胞内には多数のミトコンドリア (MT) が観察される。(×5000)

B. 1 ng/ml TGF- β_1 添加群 : 波状縁は屈曲し、明帯の形成は非常に弱い。(×5000)

(図3の説明)

(A) 全骨細胞培養系での破骨細胞形成に及ぼす TGF- β_1 と $1.25-(OH)_2D_3$ の影響

□ - □ 未処理対照

■ - ■ 1 ng/ml TGF- β_1

○ - ○ $10^{-8}M$ $1.25-(OH)_2D_3$

● - ● $10^{-8}M$ $1.25-(OH)_2D_3$ + 1 ng/ml TGF- β_1

実験方法3)に記載した方法で、全骨細胞を7日間培養して、破骨細胞を消失させた後、 $1.25-(OH)_2D_3$ あるいはTGF- β_1 を添加した培養液にて培養し、経時的に破骨細胞数を算定した。

各点は4検体の平均値および標準偏差を示す。

* : $10^{-8}M$ $1.25-(OH)_2D_3$ 添加群との間に有意差を認めた ($p < 0.05$)。

(B) 全骨細胞培養系での破骨細胞形成に及ぼすTGF- β_1 の効果(濃度依存性)

(A)と同様に全骨細胞を培養し、 $1.25-(OH)_2D_3$ とTGF- β_1 添加5日目に象牙片を取りだし破骨細胞数を測定した。各群は4検体の平均値および標準偏差を示す。* : 未処理対照との間に有意差を認めた($p < 0.05$)。

(図4の説明)

未分化破骨細胞のTRAP陽性多核細胞への分化に及ぼすTGF- β_1 の影響(濃度依存性)

実験方法8)に記載した方法で、未分化破骨細胞を $10^{-8}M$ $1.25-(OH)_2D_3$ と各種濃度のTGF- β_1 存在下で培養し、3日後に形成されたTRAP陽性多核細胞数を算定した。

各群は4検体の平均値および標準偏差を示す。
* : 未処理対照との間に有意差を認めた($p < 0.05$)。

(図5の説明)

TGF- β_1 で処理したMC3T3-E1細胞のCMによるTRAP陽性多核細胞形成

○ - ○ 未処理対照

● - ● 1 ng/ml TGF- β_1 で処理したMC3T3-E1細胞からのCM

未分化破骨細胞を 10^{-8} M $1,25-(OH)_2D_3$ および、実験方法6)で調製したCMを各種濃度添加した培養液で培養し、3日後に形成されたTRAP陽性多核細胞数を算定した。

各点は4検体の平均値および標準偏差を示す。

* : 未処理対照との間に有意差を認めた ($p < 0.05$)。

(図6の説明)

TGF- β_1 で処理したMC3T3-E1細胞のNaCl抽出液による多核細胞形成

○ - ○ 未処理対照

● - ● 1 ng/ml TGF- β_1 で処理したMC3T3-E1細胞からのNaCl抽出液

未分化破骨細胞を 10^{-8} M $1,25-(OH)_2D_3$ および、実験方法7)で調製したNaCl抽出液を各種濃度添加した培養液で培養し、3日後に形成されたTRAP陽性多核細胞数を算定した。

各点は4検体の平均値および標準偏差を示す。

* : 未処理対照との間に有意差を認めた ($p < 0.05$)。

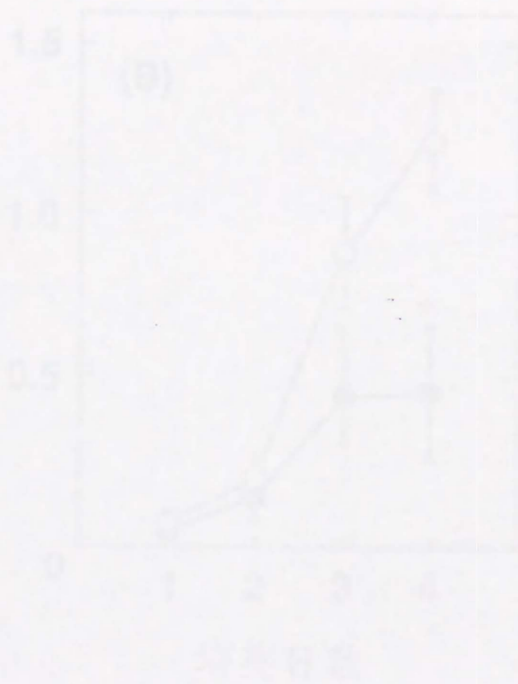


図. 1

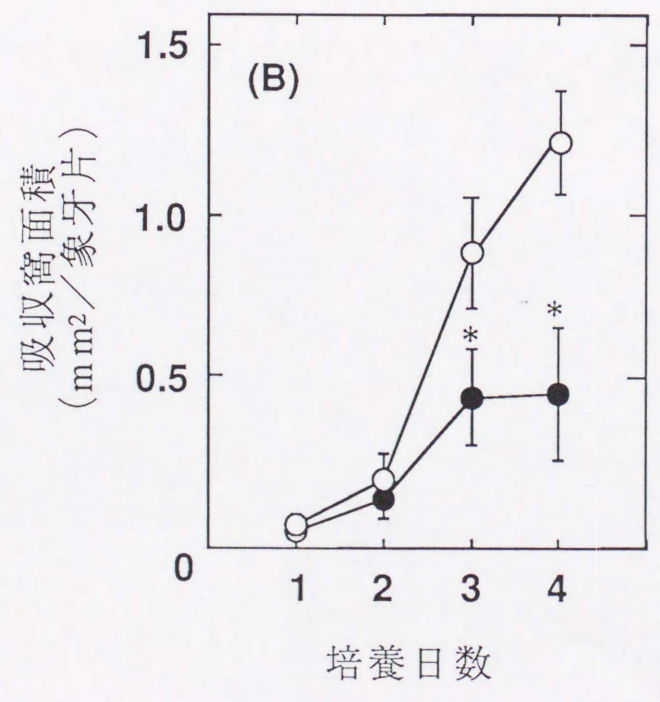
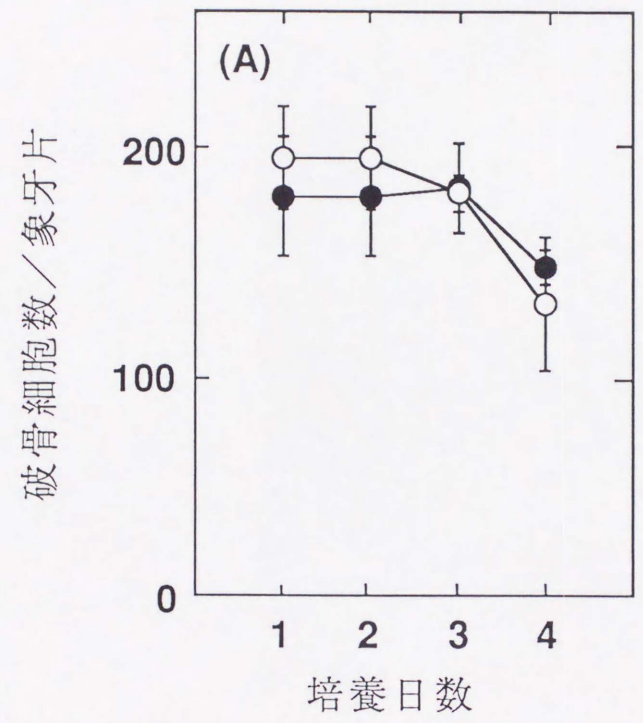
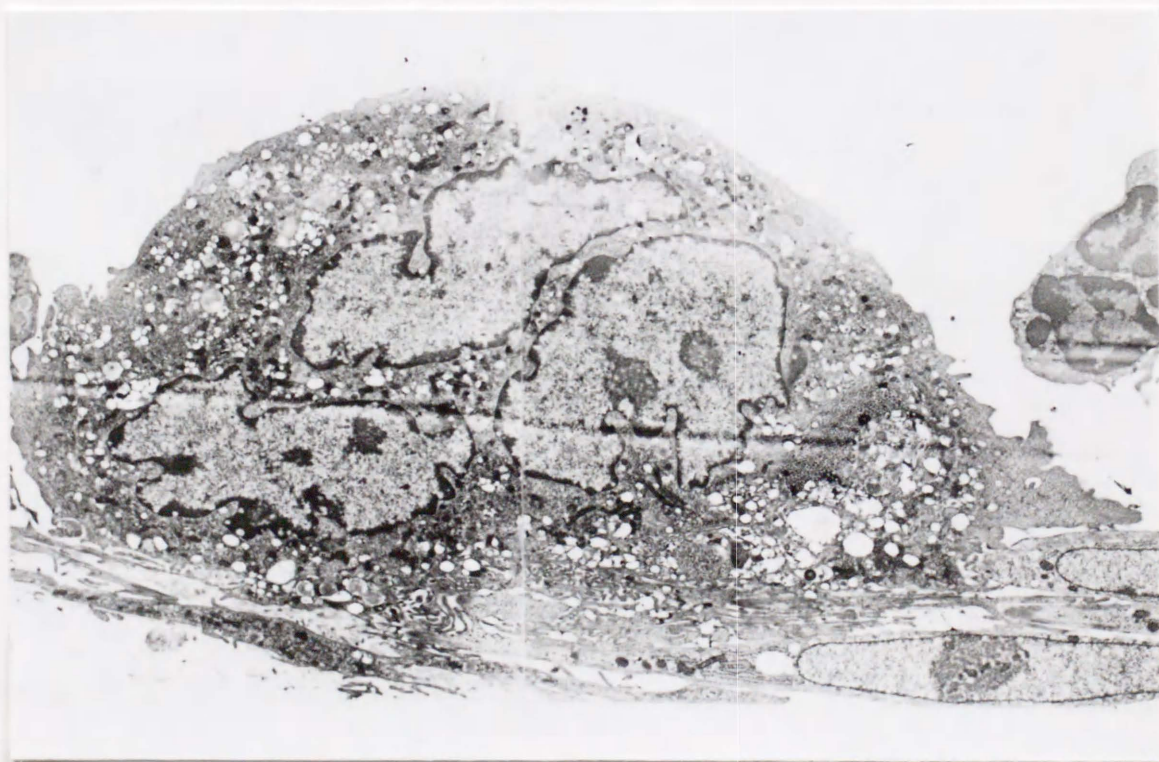


图. 2 A



B



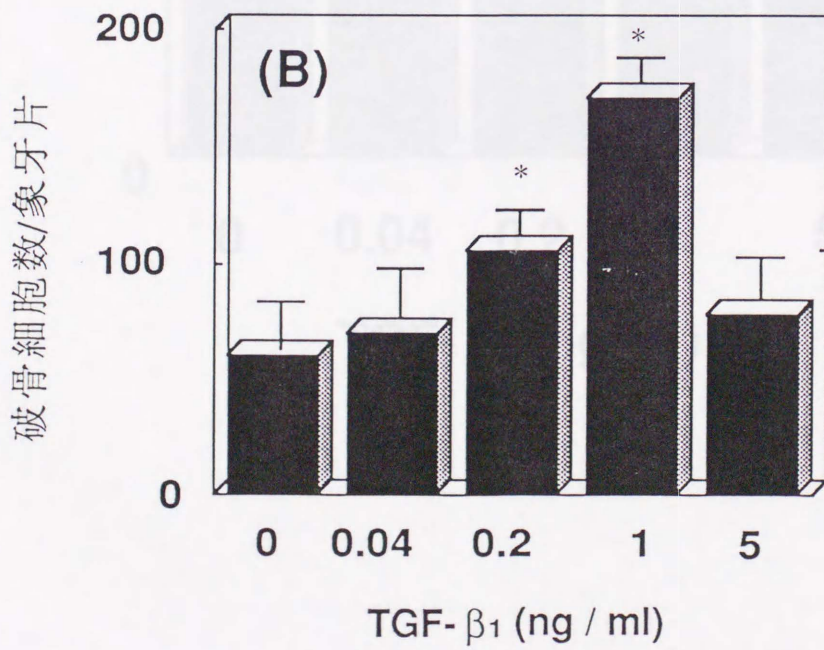
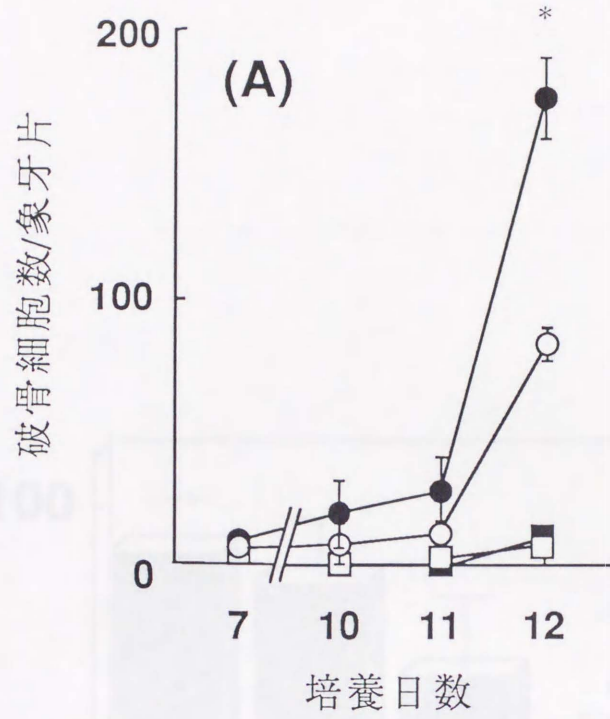


図.4

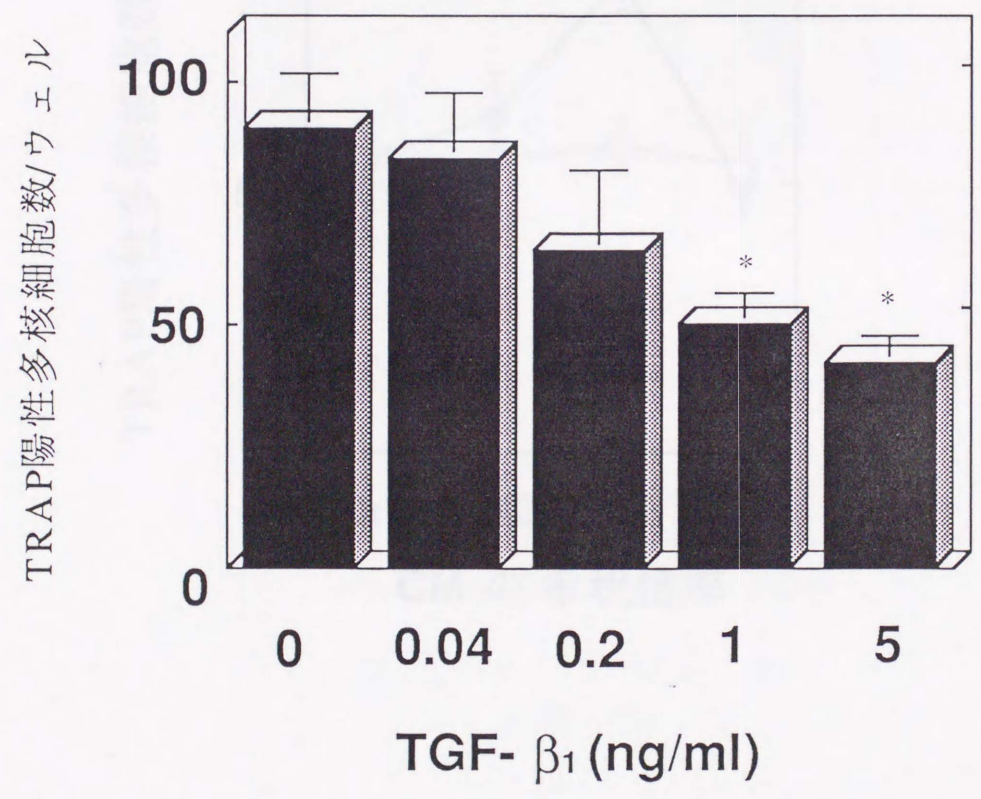
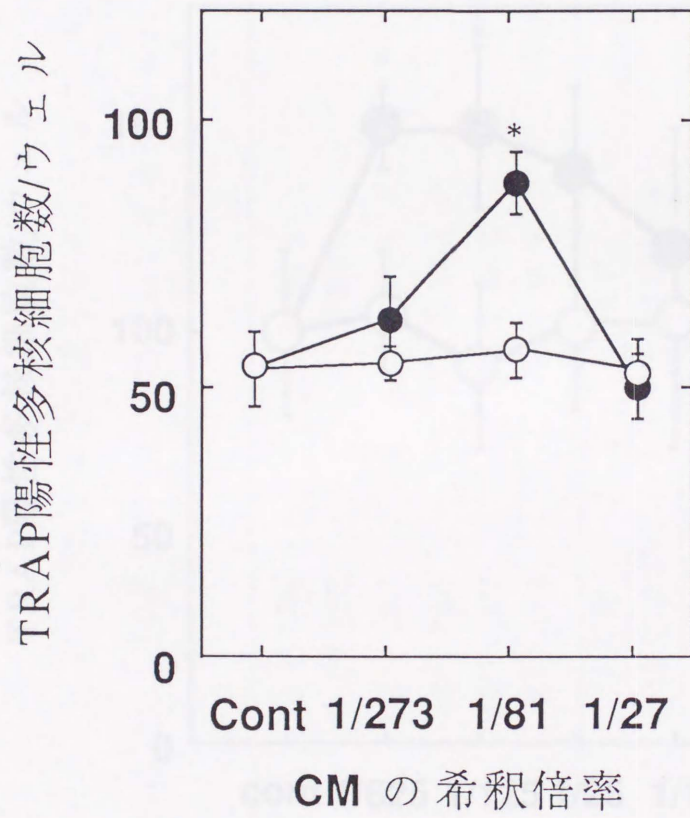


図. 5



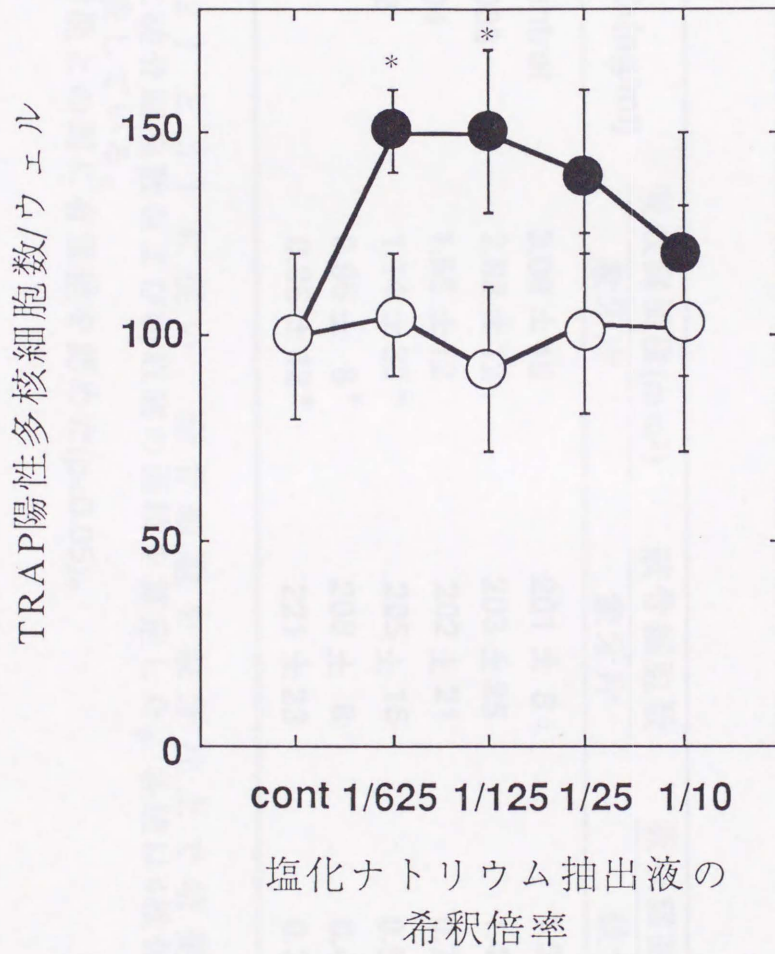
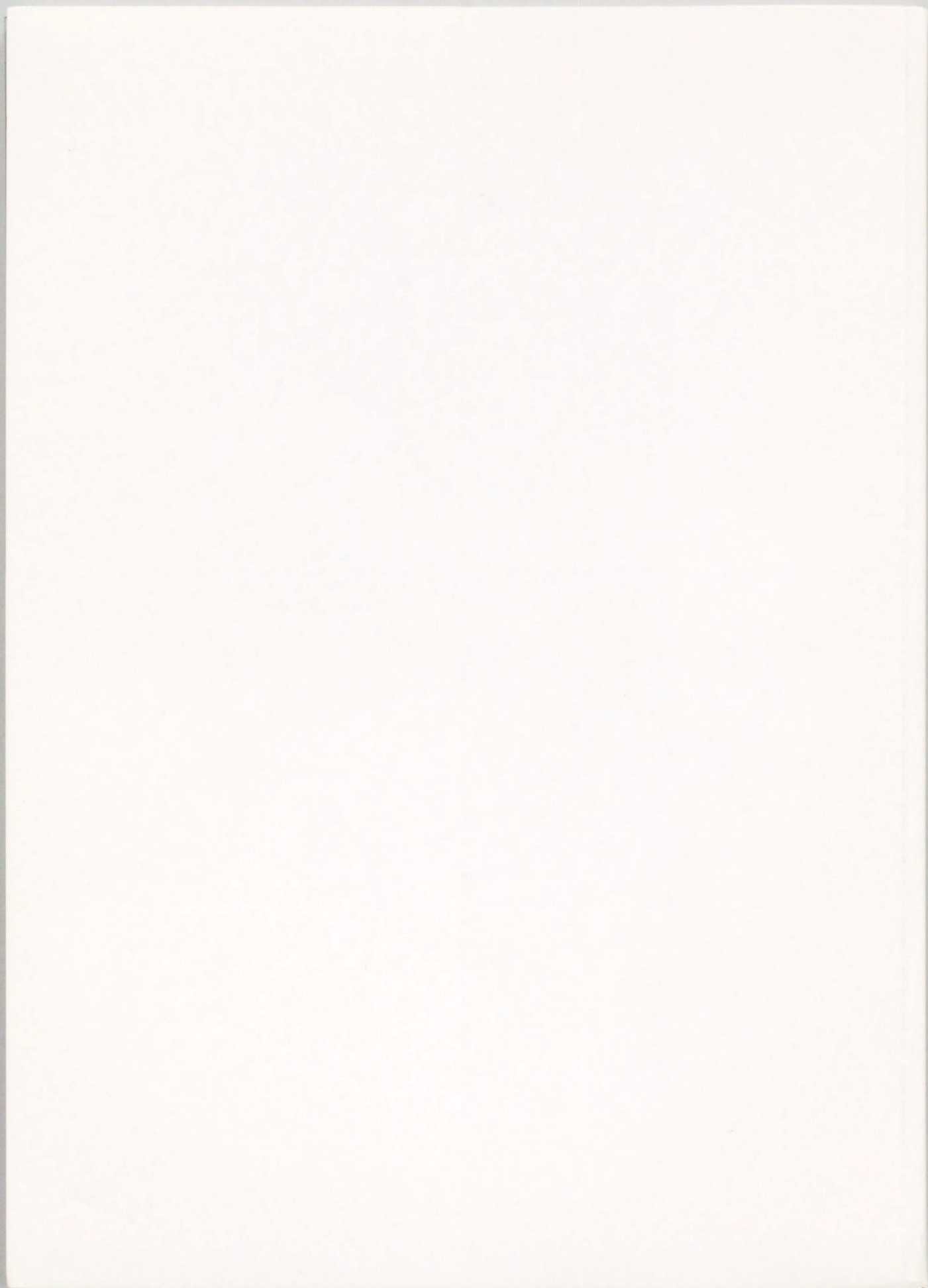


表. 1 培養全骨細胞の骨吸収能と破骨細胞数に及ぼすTGF-β₁の影響

TGF-β ₁ (ng/ml)	象牙片		象牙片	
	吸収窩面積(mm ²)	破骨細胞数	吸収窩面積(x1.02 mm ²)	破骨細胞数
Control	3.08 ± 15	201 ± 8	1.54 ± 0.04	
0.008	2.88 ± 12	203 ± 25	1.48 ± 0.26	
0.04	1.55 ± 12	202 ± 21	0.77 ± 0.08	
0.2	1.14 ± 30 *	205 ± 16	0.56 ± 0.18 *	
1	0.96 ± 8 *	208 ± 8	0.46 ± 0.04 *	
5	0.86 ± 12 *	221 ± 23	0.39 ± 0.15 *	

実験方法(2)と(3)に従い、全骨細胞を象牙片上で培養し、TGF-β₁添加4日後に破骨細胞数および吸収窩の面積を算定した。各値は4検体の平均値および標準偏差を表している。
*：未処理対照との間に有意差を認められた(p<0.05)。



論文審査の結果の要旨

報告番号	① 乙	歯第	68	号	氏名	上岡 寛
審査委員		主 査	河田 照茂			
		副 査	井上 秀夫			
		副 査	佐藤 光信			

題 目

破骨細胞の形成と活性に及ぼす

Transforming growth factor- β_1 の影響について

要 旨

TGF- β_1 は、各種細胞の分化、増殖を調節する多機能的な性格を備えたサイトカインである。しかし、破骨細胞の分化、形成に対するこのサイトカインの役割はいまだに明らかになっていない。

そこで、本研究ではTGF- β_1 の破骨細胞による骨吸収に対する影響を調べるため、新生マウス長管骨より採取した骨組織中の全ての細胞（以下、全骨細胞と略記する）を象牙片上で培養した。TGF- β_1 は0.04-5 ng/mlの濃度で、破骨細胞による骨吸収を抑制することがわかった。電子顕微鏡による観察では、ミトコンドリアが減少し、波状縁、明帯の形成が弱いことから破骨細胞の骨吸収活性の低下が示唆された。

全骨細胞を用いた破骨細胞形成系では、 10^{-8} Mの活性型ビタミンD₃とともにTGF- β_1 を添加すると0.2-1 ng/mlの濃度で破骨細胞形成を促進することがわかった。次に破骨細胞の形成過程に異種細胞の混入を除いた血液芽球細胞からの破骨細胞形成系を用いてTGF- β_1 の破骨細胞形成に対する直接作用について検討した。意外なことにTGF- β_1 は、0.2 ng/mlより高濃度の群において破骨細胞形成を抑制した。

近年、破骨細胞の形成には、骨芽細胞が関与していると報告されている。そこで骨芽細胞を介した間接的な影響を検討するために、骨芽細胞として骨芽細胞様細胞MC3T3-E1細胞を用い、この細胞を1 ng/mlのTGF- β_1 で処理した後に得られる培養上清、細胞外基質の塩化ナトリウム抽出液を用いて破骨細胞に対する影響を検討したところ、 10^{-8} Mの活性型ビタミンD₃共存下で破骨細胞形成を促進した。

これらのことから、TGF- β_1 は破骨細胞の活性に対しては、抑制を示す。しかし、破骨細胞形成に対しては、直接、破骨細胞の形成を抑制するが、間接的には骨芽細胞を介して促進することが示唆された。

上記の結果はTGF- β_1 の骨吸収におけるメカニズムを解析するのに有用であり、また矯正力の作用機構の解明にも寄与すると考えられる。

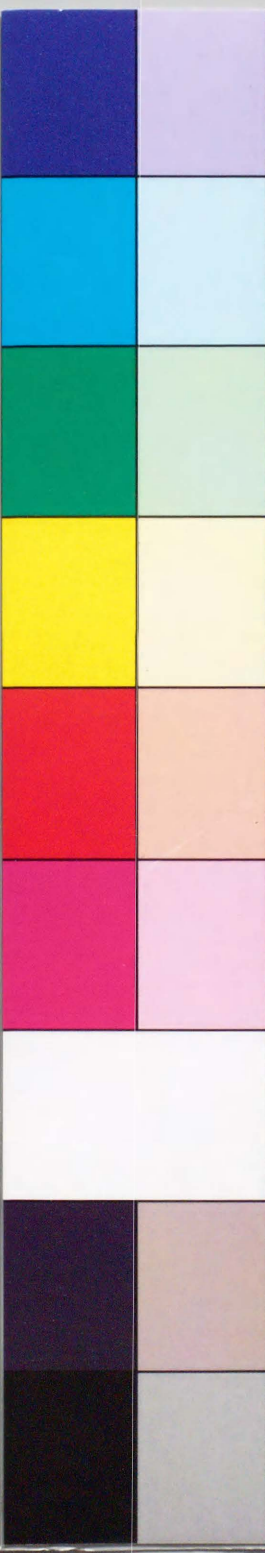
従って、本研究は歯科医学の発展に貢献することが極めて大であり、本論文は博士(歯学)の学位記に値するものとする。

inches 1 2 3 4 5 6 7 8
cm 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak

Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black



Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

