

破骨細胞の分化制御の新しい考え方*

高橋直之

はじめに

破骨細胞は、単球・マクロファージ(M ϕ)系前駆細胞より分化する。培養系ではさまざまな単球・M ϕ 系細胞が破骨細胞に分化できるため、骨に存在するM ϕ 系細胞が破骨細胞前駆細胞であると考えられた。われわれは、破骨細胞前駆細胞は細胞周期が停止した細胞であることを見出し、静止期破骨細胞前駆細胞 QOP (quiescent osteoclast precursors) と名付けた。QOP は破骨細胞に分化することが決定された前駆細胞で、その一部は血流を介して骨組織に運ばれる。さらに骨組織において、QOP は RANK (receptor activator of NF- κ) の発現を高めた “RANK-abundant QOP” に分化し、RANKL (receptor activator of NF- κ ligand) の存在下で速やかに破骨細胞分化する。筆者は、2008 年に「骨吸収を調節する骨芽細胞の新しい役割」というタイトルの総説を日整会誌に執筆した¹⁾。本稿はその続編であり、QOP の性質と体内動態について解説するものである。

1. 破骨細胞前駆細胞(QOP)の同定

破骨細胞は単球・M ϕ 系前駆細胞から分化する。その分化は骨芽細胞、骨細胞および骨髄間質細胞(本稿では一括して骨芽細胞と記載する)により調節されている^{1),2)}。骨芽細胞は破骨細胞分化に必須な M-CSF (macrophage-colony stimulating factor) と RANKL を発現する。培養系において、未分化造血系細胞のみならず肺胞 M ϕ や末梢血単球も破骨細胞に分化する

ため、骨に存在する M ϕ 系細胞が破骨細胞前駆細胞であると考えられてきた。

マウスの骨髄細胞を M-CSF で処理して得られた骨髄 M ϕ を用い、破骨細胞への分化と細胞周期の関連を解析した³⁾。骨髄 M ϕ を、M-CSF と RANKL の存在下で培養すると、培養 2 日目に酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ (TRAP) 陽性の単核前破骨細胞が、培養 3 日目に多核破骨細胞が出現する。プロモデオキシウリジン (BrdU) は増殖する細胞の核に取り込まれる試薬である。骨髄 M ϕ の培養系に、RANKL 添加と同時に BrdU を添加すると、形成された破骨細胞の核は BrdU 陽性であった。一方、RANKL 添加の 1 日後に BrdU を加えると、3 日目に出現した破骨細胞の核は BrdU 陰性であった。以上より、骨髄 M ϕ は、RANKL 添加時は増殖期にあるが、RANKL 添加の 1 日後に静止期に移行する。われわれは、この細胞を静止期破骨細胞前駆細胞 (quiescent osteoclast precursors, QOP) と名付けた³⁾。QOP は、細胞周期が進行することなく破骨細胞に分化する前駆細胞と定義される。

In vivo における QOP の存在様式を、RANKL 欠損 (RANKL^{-/-}) マウスと M-CSF 産生不全マウスである op/op マウスを用いて解析した³⁾。RANKL^{-/-} マウスに BrdU を飲料水に添加して与えた。さらに、RANKL を腹腔投与し、誘導された破骨細胞の核への BrdU の取り込みを観察した。RANKL により誘導された破骨細胞のほとんどの核は BrdU 陰性であった。同様に、op/op マウスに M-CSF を注射して形成された破骨細胞を解析したところ、M-CSF により誘導された破骨細胞の核も BrdU 陰性であった。以上より、*in vivo* において破骨細胞は細胞周期の停止した前駆細胞 QOP から形成されることが明らかとなった。QOP は、RANKL 受容体である RANK と M-CSF 受容体である c-Fms を発現するが、増殖マーカーである Ki67 を発現していないと考えられる。破骨細胞が

Key words: Osteoclast, Osteoblast, Osteoclast precursor

*The new mechanism of osteoclast differentiation
松本歯科大学・総合歯科医学研究所。Naoyuki Takahashi: Division of Hard Tissue Research, Institute for Oral Science, Matsumoto Dental University
利益相反申告なし

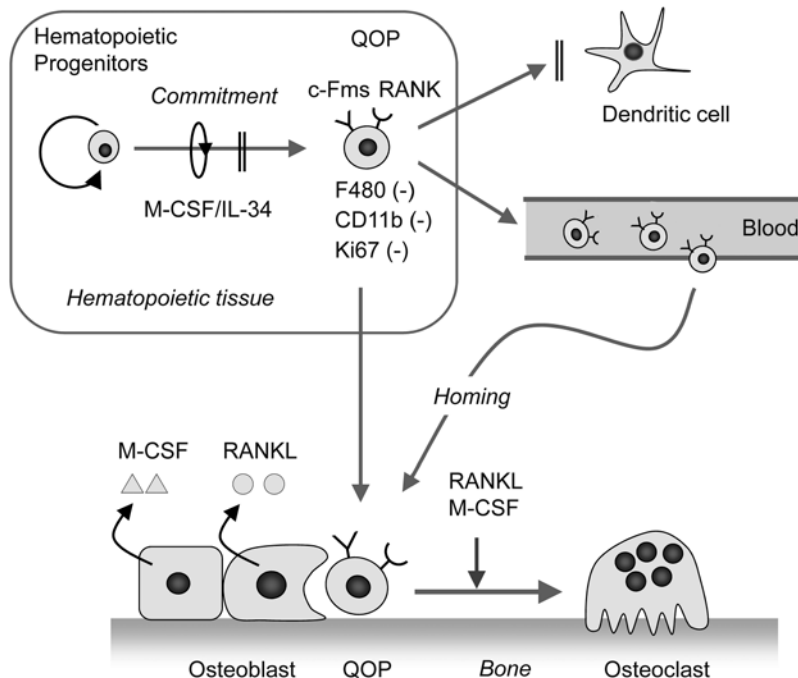


図1 破骨細胞前駆細胞 QOP の形成と性質. 造血組織に存在する造血系破骨細胞前駆細胞は、M-CSF あるいは IL-34 の存在下で増殖した後、細胞周期の停止した静止期前駆細胞 (quiescent osteoclast precursor, QOP) に分化する。QOP は RANK と c-Fms を発現しているが、他の Mφ マーカーである F4/80 や CD11b を発現していない。また、QOP は貪食能を示さず、M-CSF の存在下でも増殖しない。QOP は破骨細胞に分化するが、樹状細胞には分化できない。QOP は破骨細胞への分化が決定した前駆細胞である。QOP の一部は循環系を介して骨組織に運ばれ、そこで増殖することなく破骨細胞に分化する。QOP の骨組織へのホーミングには骨芽細胞が重要な役割を演じていると推定される。

存在しない RANKL^{-/-}マウスを用いて、骨組織における QOP の分布を解析した。c-Fms と RANK を共発現する細胞 (c-Fms⁺/RANK⁺細胞) が骨表面に沿って認められた³⁾。また RANK 陽性細胞は Ki67 陰性であった。

2. QOP の特徴と体内循環

セルソーターを用い骨髓細胞から RANK 陽性細胞を集め、その性質を解析した⁴⁾。RANK 陽性細胞は c-Fms を発現しているが、他の Mφ マーカーである F4/80 と CD11b を発現していなかった。また、RANK 陽性細胞は貪食能を示さず M-CSF の存在下でも増殖しなかった。RANK 陽性細胞は破骨細胞に分化したが、樹状細胞には分化しなかった⁴⁾。以上より、QOP は破骨細胞への分化が決定した前駆細胞であることが示された (図1)。

骨誘導因子 (bone morphogenetic protein, BMP) を含むコラーゲンスポンジをマウスの筋膜下に移植すると、異所性骨が誘導される。BMP を含むコラーゲンスポンジと対照コラーゲンスポンジを RANKL 欠損マウスに移植し、c-Fms⁺/RANK⁺細胞と F4/80⁺細胞の分布を解析した⁴⁾。c-Fms⁺/RANK⁺細胞は、BMP により誘導された骨組織に分布したが、対照スポンジにはほとんど存在しなかった。一方、F4/80⁺細胞は BMP スポンジと対照スポンジに同様に分布していた。これらのマウスに RANKL を腹腔投与すると破骨細胞は BMP スポンジにのみ誘導された⁵⁾。以上の知見は、QOP は血流を介して破骨細胞形成部位に運ばれることを示す。

最近、c-Fms に結合する第2のリガンドとして IL-34 が発見された⁶⁾。IL-34 の発現は、骨組織では低く脾臓で高い。一方、M-CSF は骨組織で高く発現す

る。そこで、op/op マウスにおける QOP の局在を解析した⁷⁾。RANKL^{-/-} マウスとは異なり、QOP は骨組織には存在せず脾臓に存在していた。op/op マウスに M-CSF を投与すると骨組織に破骨細胞が出現したが、脾臓を摘出すると、破骨細胞は出現しなかった。すなわち、M-CSF 投与により、脾臓で維持されていた QOP は血流を介して骨組織に運ばれる可能性が示された。また、造血組織における QOP の形成には M-CSF あるいは IL-34 が関わる可能性、ならびに骨芽細胞が QOP の骨へのホーミングに関わる可能性が示された(図 1)。

3. QOP の寿命とプールサイズ

QOP の寿命を明らかにするため、さまざまな週齢のマウスに BrdU を投与した⁸⁾。妊娠マウスに 1 週間 BrdU を投与したところ、新生児マウスの骨の破骨細胞の 50% の核は BrdU を取り込んでいた。同様に、3 週齢のマウスに 1 週間 BrdU を投与したところ、破骨細胞の 30% の核は BrdU を取り込んだ。一方、7 週齢マウスに BrdU を 1 週間投与したところ、破骨細胞の核は BrdU はほとんど取り込んでいなかった。破骨細胞の寿命が数週間であることを考慮すると、QOP の寿命はきわめて長いと考えられた⁹⁾。さらに QOP のプールサイズは、成長に伴い大きくなることが示唆された。

1962 年 Fishman と Hay は、イモリを用いた破骨細胞の前駆細胞の形質に関する興味深い実験結果を報告した。イモリは、前肢を切断しても再形成される⁸⁾。切断後 5 日目に骨芽細胞が出現し、骨形成が開始する。一方破骨細胞は 10 日目に再生芽に出現する。³H-チミジンをさまざまな時期に投与して、再生肢に出現する骨芽細胞と破骨細胞の核に取り込まれた ³H-チミジンを、オートラジオグラフィ法で検出した。前肢の切断前に ³H-チミジンを投与しても骨芽細胞の核は ³H-チミジンを取り込まない。骨芽細胞に ³H-チミジンを取り込ませるには、前肢の切断後に ³H-チミジンを投与する必要がある。一方、破骨細胞の核を ³H-チミジンでラベルするには、切断前に ³H-チミジンを投与する必要がある。これらの結果は、再生肢に出現する破骨細胞も QOP から形成されることを示唆する。さらに、イモリの QOP のプールサイズは大きいことが示唆された。マウスを用いた実験結果は、イモリの再生肢の実験結果と一致するものであった。

4. QOP における RANK 発現の調節

c-Fos は破骨細胞分化に必須な転写因子である²⁾。われわれは、c-Fos が造血細胞から QOP への分化にも必須か否かを解析した⁹⁾。胸腺髄質上皮細胞¹⁰⁾ や小腸パイエル板の M 細胞 (Microfold cell)¹¹⁾ は RANK を高く発現することが知られている。そこで、c-Fos^{-/-} マウスにおける RANK⁺ 細胞の分布を解析した。胸腺上皮細胞組織と腸管パイエル板には多数の RANK⁺ 細胞が見出されたが、骨組織や脾臓組織には RANK⁺ 細胞は見出されなかった⁹⁾。この知見は、RANK の発現調節は細胞間で異なることを意味する。M-CSF は造血系細胞の RANKL 発現を誘導することが報告されている。正常 Mφ を M-CSF で処理すると RANK の発現は誘導されたが、c-Fos^{-/-} マウスより得られた Mφ (c-Fos^{-/-} Mφ) では誘導されなかった⁹⁾。c-Fos^{-/-} Mφ に c-Fos 遺伝子を発現させると、RANK の発現は上昇した。以上の知見は、破骨細胞前駆細胞における RANK の発現誘導は c-Fos 依存性であることを示す。しかし、c-Fos^{-/-} Mφ に RANK を強制発現させても、c-Fos^{-/-} Mφ は RANKL に反応して破骨細胞に分化できなかったことから、c-Fos は造血細胞から QOP の分化とともに QOP から破骨細胞への分化にも必要な転写因子であることが示唆された⁹⁾。

RANK の免疫染色において、脾臓の RANK⁺ 細胞を検出するためには、骨の RANK⁺ 細胞の検出に比較して長い露光時間を必要とする。すなわち、骨組織の QOP の RANK の発現量は、脾臓や末梢血の QOP のそれよりも高い。このことは、骨組織に QOP の RANK 発現を誘導する因子が存在することを意味する。Wnt は β catenin 依存性古典経路と、 β catenin 非依存性非古典経路を活性化する。われわれは、骨芽細胞が産生する Wnt5 は Wnt 非古典経路を介して破骨細胞前駆細胞の RANK 発現を誘導することを見出した¹²⁾。Ror2 (receptor tyrosine kinase orphan receptor 2) は Wnt5a の共受容体として作用する。Wnt5a^{-/-} マウスと Ror2^{-/-} マウスはともに骨吸収が低下した症状を呈する。われわれは、骨芽細胞特異的 Wnt5a^{-/-} マウス、および QOP 特異的 Ror2^{-/-} マウスを作製し、破骨細胞形成を解析した。その結果、骨芽細胞が産生する Wnt5a は QOP が発現する Ror2 を介して破骨細胞分化を促進することを示した¹²⁾。さらに、Wnt5a-Ror2 相互作用は c-Jun N-terminal kinase (JNK) の活性化を介して、RANK の発現を誘導する

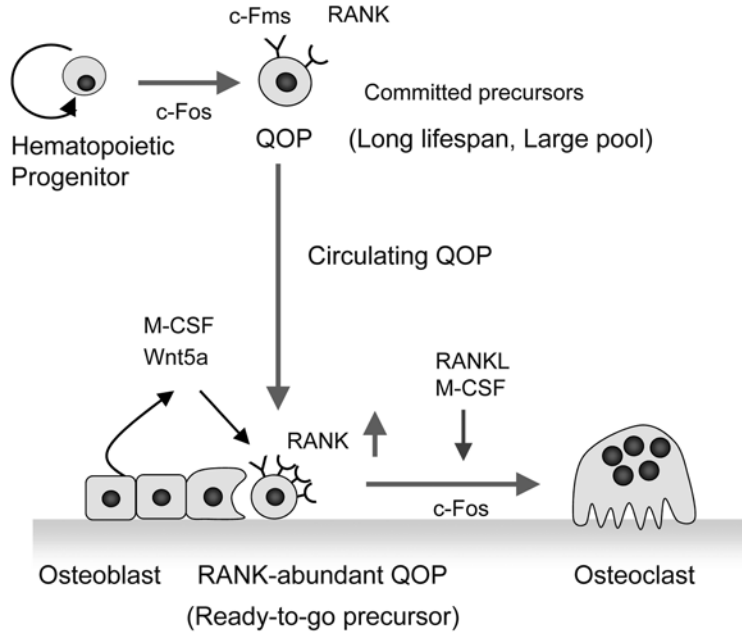


図2 破骨細胞前駆細胞 QOP の体内動態. 破骨細胞前駆細胞である QOP は骨髄や脾臓で形成される. QOP は長い寿命と大きなプールサイズを持つ. QOP の一部は循環性 QOP として骨組織に運ばれる. 骨芽細胞が産生する Wnt5a や M-CSF は, QOP の RANK の発現をさらに誘導し, RANK-abundant QOP へと分化誘導する. QOP はさまざまな組織や末梢血に存在するが, RANK-abundant QOP のみが生理量の RANKL に反応して破骨細胞に分化する. そのような意味で, RANK-abundant QOP は準備完了前駆細胞 (Ready-to-go precursor) と考えられる. この RANK-abundant QOP の分布が骨組織に限局されるために, 骨組織にのみ破骨細胞は誘導される.

ことを明らかにした.

RANKL^{-/-}マウスにおいて, QOP は骨組織以外に造血組織や末梢血に見出される. しかし, RANKL を投与すると破骨細胞は骨組織にのみ誘導される. これをどのように説明するのか. QOP の RANK 発現量が重要であると考え. 最近, Mochizuki ら¹³⁾ は, 骨髄 Mφ をメチルセルロースの上で培養すると, 骨髄 Mφ は破骨細胞に分化できないため, 接着シグナルが RANK 誘導に必要であると報告した. さらに RANK を骨髄由来 Mφ に強制発現させると, メチルセルロース上でも破骨細胞に分化できることを示した. このことは, RANK を高発現した QOP であれば, たとえ末梢血中でも RANKL に反応して破骨細胞に分化できることを意味する. われわれは, 骨組織にのみ存在する RANK を高発現した QOP を “RANK-abundant QOP” と名付けた. QOP が骨組織で RANK 発現を上昇させ, RANKL を利用しやすくするのでないかと考える.

われわれは, 骨髄 Mφ の培養系で, RANKL に替わって TNFα も破骨細胞の分化を促進することを報告した¹⁴⁾. すなわち, RANKL 以外に TNFα も破骨細胞の分化を誘導することができる. それにもかかわらず, RANKL 欠損マウスに TNFα を投与してもわずかな数の破骨細胞が誘導されるだけであった¹⁵⁾. われわれは, Mφ の培養系に M-CSF を添加すると, RANKL が誘導されるが, TNFα 受容体は誘導されないことを確認した. この知見は, 破骨細胞の前駆細胞は RANK を発現することで, 自らの分化因子として TNFα ではなく RANKL を選択することを意味する. それゆえ, われわれは, 破骨細胞前駆細胞における RANK の発現上昇は破骨細胞分化におけるきわめて重要なイベントであると考え.

おわりに

破骨細胞形成に関するわれわれの考え方を図2にまとめた. 破骨細胞は細胞周期の停止した前駆細胞

QOP からのみ形成される。QOP は破骨細胞への分化が決定した前駆細胞細胞であり、造血組織で作られる。M-CSF あるいは IL-34 がその形成に関わると考えられる。また、QOP のプールサイズは成長に伴い大きくなる。QOP の一部は循環系を利用して骨組織に運ばれる。骨芽細胞は QOP のホーミングにも関わると想定される。QOP は骨髄、脾臓そして末梢血にも存在するが、骨表面の QOP のみ RANKL に反応して破骨細胞に分化する。それは、骨表面の QOP は他の組織の QOP よりも RANK の発現量がずっと高いためであると想定する。骨芽細胞が発現する Wnt5a や M-CSF が QOP の RANK 発現を誘導する。このようにして形成された RANK-abundant QOP のみが RANKL に反応して破骨細胞に分化する。そのような意味で、“RANK-abundant QOP” は用意完了前駆細胞 (ready-to-go precursor) ということができる。このような破骨細胞前駆細胞の動態解析が、さまざまな骨疾患の病態の解明や治療指針の確立に寄与することを期待した。

文 献

- 1) 高橋直之. 骨吸収を調節する骨芽細胞の新しい役割. 日整会誌 2008; 82: 999-1007.
- 2) Suda T, Takahashi N, Udagawa N, et al. Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr Rev* 1999; 20: 345-57.
- 3) Mizoguchi T, Muto A, Udagawa N, et al. Identification of cell cycle-arrested quiescent osteoclast precursors in vivo. *J Cell Biol* 2009; 184: 541-54.
- 4) Muto A, Mizoguchi T, Udagawa N, et al. Lineage-committed osteoclast precursors circulate in blood and settle down into bone. *J Bone Miner Res* 2011; 26: 2978-90.
- 5) Yamamoto Y, Udagawa N, Matsuura S, et al. Osteoblasts provide a suitable microenvironment for the action of receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand. *Endocrinology* 2006; 147: 3366-74.
- 6) Nakamichi Y, Udagawa N, Takahashi N. IL-34 and CSF-1: similarities and differences. *J Bone Miner Metab* 2013; 31: 486-95.
- 7) Nakamichi Y, Mizoguchi T, Arai A, et al. Spleen serves as a reservoir of osteoclast precursors through vitamin D-induced IL-34 expression in osteopetrotic op/op mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109: 10006-11.
- 8) Fischman DA, Hay ED. Origin of osteoclasts from mononuclear leucocytes in regenerating newt limbs. *Anat Rec* 1962; 143: 329-37.
- 9) Arai A, Mizoguchi T, Harada S, et al. Fos plays an essential role in the upregulation of RANK expression in osteoclast precursors within the bone microenvironment. *J Cell Sci* 2012; 125: 2910-7.
- 10) Akiyama T, Shimo Y, Yanai H, et al. The tumor necrosis factor family receptors RANK and CD40 cooperatively establish the thymic medullary microenvironment and self-tolerance. *Immunity* 2008; 29: 423-37.
- 11) Knoop KA, Kumar N, Butler BR, et al. RANKL is necessary and sufficient to initiate development of antigen-sampling M cells in the intestinal epithelium. *J Immunol* 2009; 183: 5738-47.
- 12) Maeda K, Kobayashi Y, Udagawa N, et al. Wnt5a-Ror2 signaling between osteoblast-lineage cells and osteoclast precursors enhances osteoclastogenesis. *Nat Med* 2012; 18: 405-12.
- 13) Mochizuki A, Takami M, Miyamoto Y, et al. Cell adhesion signaling regulates RANK expression in osteoclast precursors. *PLoS One* 2012; 7: e48795.
- 14) Kobayashi K, Takahashi N, Jimi E, et al. Tumor necrosis factor alpha stimulates osteoclast differentiation by a mechanism independent of the ODF/RANKL-RANK interaction. *J Exp Med* 2000; 191: 275-86.
- 15) Li J, Sarosi I, Yan XQ, et al. RANK is the intrinsic hematopoietic cell surface receptor that controls osteoclastogenesis and regulation of bone mass and calcium metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 1566-71.