

## 骨代謝における骨芽細胞と破骨細胞の細胞連関

中村 浩彰

松本歯科大学 口腔解剖学第二講座

Cell-Cell Interaction between Osteoblast-lineage Cells and Osteoclasts

HIROAKI NAKAMURA

*Department of Oral Histology, Matsumoto Dental University, School of Dentistry*

### Summary

Bone is an actively metabolized tissue. Bone volume is maintained through a balance of bone formation by osteoblasts and bone resorption by osteoclasts. Recent research demonstrated that receptor activator of NF- $\kappa$ B (RANK)-RANK ligand (RANKL) mechanism plays a pivotal role in the differentiating and activating osteoclasts. Osteoblast-lineage cells, consisting of osteoblasts, osteocytes and bone lining cells, regulate bone resorption via the expression of RANKL. The balance of RANKL and OPG, a decoy receptor for RANKL, is thought to regulate the bone remodeling. Thus, bone remodeling is accomplished by the harmonized interaction between osteoblast-lineage cells and osteoclasts. RANK-RANKL mechanism is also engaged in pathological bone resorption such as periodontal diseases. New approach based on the interaction between osteoblasts and osteoclasts will be necessary to prevent and treat bone diseases.

### はじめに

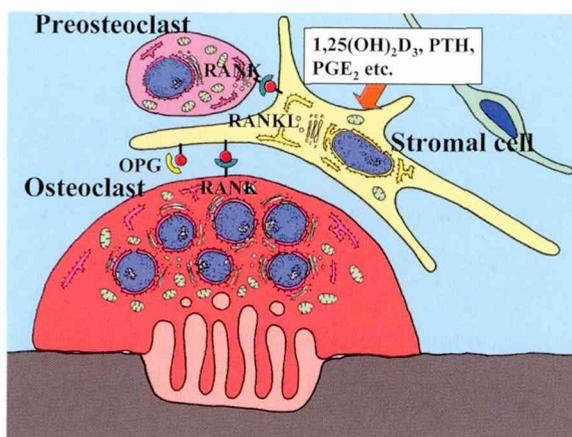
骨は体の支柱や運動器として機能するとともに、脳、肺、心臓などの器官を外界から保護している組織でもある。口腔においては、歯の支持組織として働いており、歯周病による歯槽骨吸収の進行を防ぐことは、QOL (quality of life) 維持のための課題の一つである。また、骨はミネラルの貯蔵庫であり、血中カルシウム、リンの濃度を一定に保つために欠くことのできない組織でもある。骨はいったん完成すると、一生変わらない組織であるような印象を受けるが、その内部では活

発な代謝が営まれており、骨リモデリングにより、古い骨は吸収され、新しい骨に置き換えられている。この骨リモデリングは、骨吸収を担う破骨細胞と骨形成を行う骨芽細胞系細胞により成し遂げられているが、それぞれの細胞の増殖、分化、活性化は、活性型ビタミンD、エストロゲン、parathyroid hormone (PTH)、カルシトニンなどの全身性ホルモンのほか、骨芽細胞では Bone morphogenetic protein (BMP)、破骨細胞では Macrophage colony stimulating factor (M-CSF)、Receptor activator of NF- $\kappa$ B (RANK) Ligand, osteoprotegerin (OPG) などの局所因

子によっても制御されていることが明らかになってきた。本稿ではこれまでの知見を踏まえ、骨芽細胞系細胞と破骨細胞の相互作用について、1) 破骨細胞の分化、活性化における細胞関連、2) 骨吸収機構における細胞関連について、形態学的所見をもとに考察を加えたいと思う。

### 1) 破骨細胞の分化・活性化における細胞関連

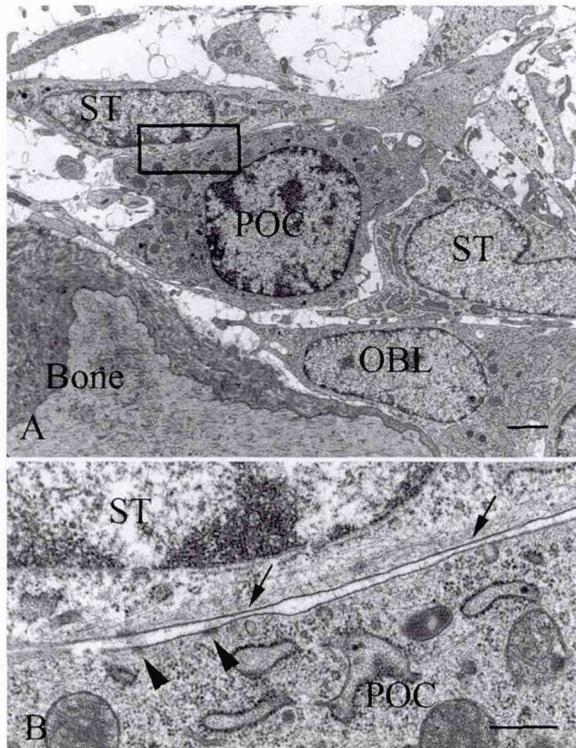
破骨細胞は造血系幹細胞由来の単球-マクロファージ系細胞の癒合により形成されるが、PTHなどの骨吸収促進因子レセプターの多くは、骨芽細胞系細胞に存在することから、その分化、活性化には骨芽細胞系細胞との細胞間相互作用の重要性が指摘されていた<sup>1,2)</sup>。このことは、破骨細胞が骨組織にのみ存在するという生体内での分布の特異性からも支持されていたが、細胞間相互作用の分子機構については長い間不明であった。近年、骨芽細胞系細胞あるいは間質細胞に発現するRANKLが破骨細胞系細胞のRANKと結合し、レセプター・リガンドを介した細胞間相互作用により破骨細胞の分化、活性化を制御することが明らかになった<sup>3,4)</sup>。すなわち、骨吸収を促進する活性型ビタミンD、PTH、PGE<sub>2</sub>などは骨芽細胞系細胞の細胞膜上のRANKL発現を誘導し、破骨細胞系細胞はRANKLレセプターであるRANKを介して分化、活性化されるという機構である(図1)。RANKL局在は破骨細胞と間質細胞が



**Fig.1:** Scheme of RANK-RANKL mechanism  
Bone resorption factors such as PTH, Vitamin D<sub>3</sub> and PGE<sub>2</sub> induce expression of RANKL on osteoblast-lineage and stromal cells. RANK-RANKL regulates the differentiation and activation of osteoclasts. OPG, a decoy receptor for RANKL, interrupts the RANK-RANKL interaction.

接する部位に認められ、in vivoにおいてもRANK-RANKL系が破骨細胞の分化、活性化において重要であることが示唆される。RANKによる細胞内情報伝達系は、tumor necrosis factor (TNF) receptor-associated factor (Traf) 6を介して、p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) や NF- $\kappa$ B を活性化し、特異的な遺伝子発現を誘導して、破骨細胞の分化、活性化を調節していると考えられているが<sup>5-7)</sup>、詳細な機構については不明な点も残されている。一方、OPGはRANK-RANKLの相互作用を阻害するRANKLのデコイレセプターであり、破骨細胞の分化、活性化は、RANKLとOPGのバランスにより決定されるという考えが広く受け入れられている<sup>8-11)</sup>。また、骨破壊が進行する疾患においても、RANK-RANKL系が重要な意義を持っていることが明らかになってきた。つまり、歯周病においては、炎症性サイトカインであるTNFやinterleukin (IL)-1あるいは菌体成分であるリポ多糖 (LPS)、ジアシルポリペプチドが骨芽細胞系細胞のRANKL発現を誘導し、破骨細胞の分化、活性化を亢進して、病的骨破壊を進行させることがわかってきたのである<sup>12)</sup>。

骨組織を観察すると、前破骨細胞、破骨細胞は骨芽細胞系細胞あるいは骨髄間質細胞と接しており、破骨細胞の分化、活性化における骨芽細胞系細胞の関与は形態学的にも推察される。微細形態学的には、破骨細胞系細胞と骨芽細胞系細胞の間にはヘパラン硫酸プロテオグリカン (HSPG) を含むわずかな細胞外基質が存在し、両細胞には細胞接着装置に相当する細胞膜の裏打ち構造が見られる<sup>13-15)</sup> (図2)。HSPGは線維芽細胞成長因子 (FGF) などのヘパリン結合性成長因子を保持し、それらの分解、不活性化を防ぐことなどから、サイトカインの授受を仲介することにより細胞間、細胞基質間相互作用に関わっていると考えられている。また、生体内にはフィブロネクチンのようなヘパリン結合性の接着タンパクも存在しており、HSPGはサイトカインによる情報伝達系に加え、細胞接着機構にも重要であると思われる。実際、破骨細胞周囲にはフィブロネクチンの局在が認められ、血清由来あるいは間質細胞が産生するフィブロネクチンがHSPGにより局所に保持され、破骨細胞と骨芽細胞系細胞の細胞間接



**Fig.2** : Electron micrographs indicating cell-cell contact sites between a preosteoclast (POC) and stromal cells (ST).

A : A preosteoclast is surrounded by stromal cells and an osteoblast-lineage cell (OBL).

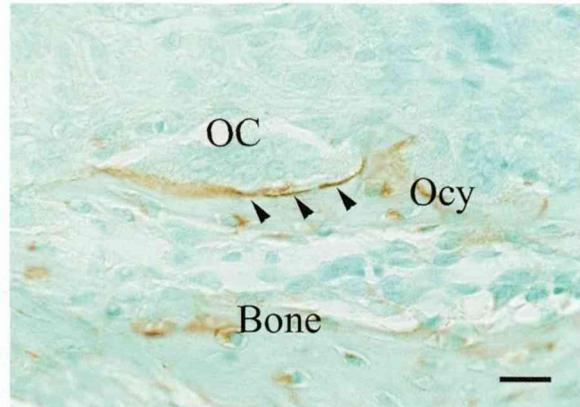
B : Electron micrograph, at a higher magnification, of square in A. Adherent structures through extracellular matrices (arrowheads) and close contact structures (arrows) are seen at the region between the preosteoclast and the stromal cell.

Scale bars : A=2  $\mu$ m, B=0.5  $\mu$ m (文献15より改変)

着に関与している可能性が強い<sup>16)</sup>. 今のところ、HSPGに保持されているサイトカインについてはわかっていないが、OPGもヘパリン結合性であり、可溶性RANKLと複合体を形成することにより、破骨細胞の分化、活性化に作用する可能性がある。HSPGが間接的にRANK-RANKL系を調節するか否かについては、今後の研究が必要と思われる。

## 2) 骨吸収機構における細胞連関

骨吸収機構において、破骨細胞は波状縁に局在する $H^+$ -ATPaseにより酸を能動輸送し、骨基質中のミネラルを脱灰するとともに<sup>17,18)</sup>、カテプシンK, Matrix Metalloproteinase (MMP) 9を合成、分泌し、骨の有機質分解を行っている<sup>19-22)</sup>. 今のところ、破骨細胞が合成、分泌するMMP 9はゼラチナーゼであることから、コラーゲン細線

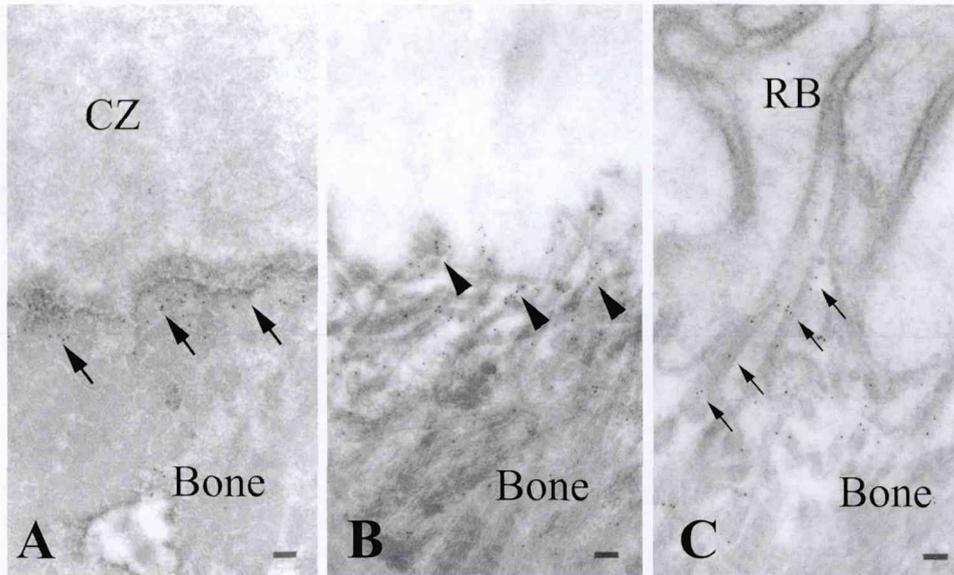


**Fig.3** : Light micrograph indicating MMP 13 localization.

Immunoreactivity is seen on the bone surface (arrowheads) under an osteoclast (OC). Labeling is also detected in osteocytes (Ocy) in bone matrix (Bone).

Scale bar : 20  $\mu$ m (文献25より改変)

維を直接分解するのはカテプシンKであると考えられている。このように、骨吸収の主役は破骨細胞であることに疑いないが、坂本ら<sup>23)</sup>は骨芽細胞や骨細胞がコラーゲナーゼを分泌することから、骨吸収機構における骨芽細胞系細胞の関与を指摘してきた。実際、生きた骨と死骨では、破骨細胞による吸収窩の形態は異なり、前者の方が、より深い吸収窩を示し、コラーゲン線維の残存も少ないことが報告されている<sup>24)</sup>. コラーゲナーゼの一つであるMMP13は、I, II, III, IV型コラーゲンや軟骨のプロテオグリカンであるアグリカンを分解する酵素であり、骨組織においては *in situ* hybridization法によりMMP13 mRNAが骨芽細胞系細胞に発現することが報告されている<sup>25)</sup>. MMP13局在は、骨基質を活発に合成、分泌する骨芽細胞や破骨細胞には見られず、主として破骨細胞直下の骨基質表面に認められる<sup>26)</sup> (図3). また、免疫電顕観察により、波状縁下のコラーゲン細線維にMMP13局在を示す金粒子が多数認められ、MMP13が骨吸収過程においてコラーゲン分解に関与していることを示唆している (図4). さらに、MMP13局在は破骨細胞直下の骨細胞のゴルジ装置内と骨細管内に認められることから、破骨細胞の波状縁下のMMP13は骨細胞により分泌され、骨細管を通過して波状縁下に至るものと推測される。これらの結果は、骨吸収機構におけるコラーゲン分解過程において、骨細胞由来のMMP13により分断化されたものが、破骨細胞由来のMMP 9によりさらに分解される可能性を



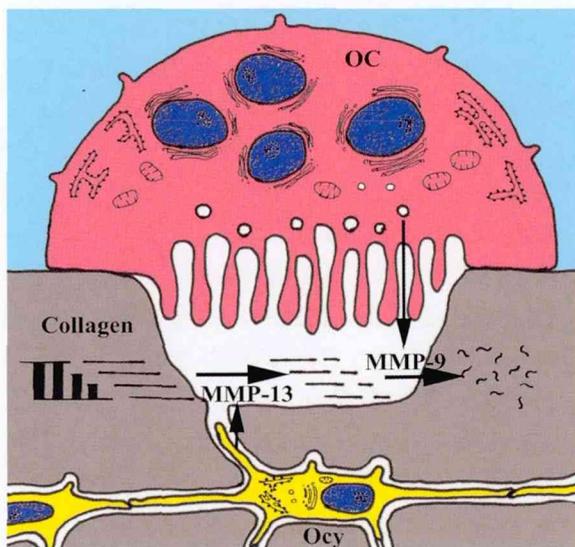
**Fig.4:** Electron micrographs indicating MMP 13 localization under an osteoclast.

A : Gold particles(arrows)are detected on the bone surface under a clear zone(CZ).

B : Numerous gold particles(arrowheads)are seen on collagen fibrils at the region between a clear zone and a ruffled border.

C : Gold particles(arrows)are associated with collagen fibrils in a ruffled border(RB). Bone ; bone matrix.

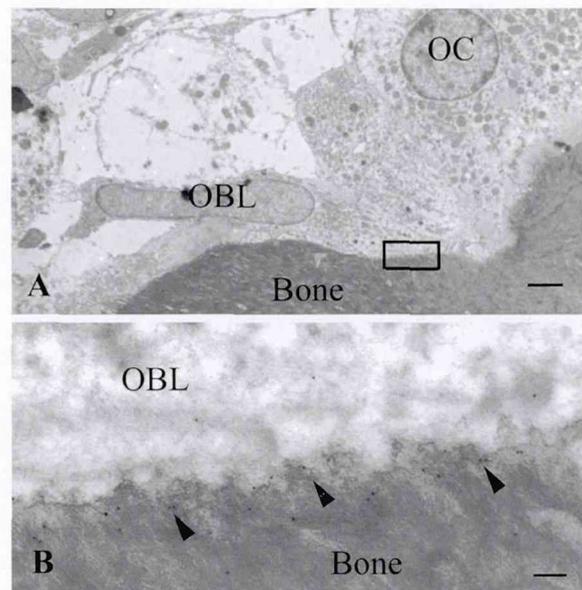
Scale bars : 0.1  $\mu\text{m}$  (文献25より改変)



**Fig.5:** Scheme of roles of MMP 9 and MMP 13 in collagen degradation.

MMP 13 secreted by osteocytes (Ocy) may degrade collagen fibrils. Degraded collagens could be digested by MMP9 synthesized by osteoclast (OC).

示している (図5)。すなわち、骨吸収という現象も破骨細胞のみで営まれているのではなく、骨芽細胞系細胞との共同作業により達成されている可能性が強い。これを裏付ける報告として、PTHが骨芽細胞系細胞において AP-1, Runx 2/Cbfa 1 結合部位を介して MMP 13発現を上昇させる



**Fig.6:** Electron micrographs indicating MMP 13 localization under an osteoblast-lineage cell (OBL).

A : An osteoblast-lineage cell attaches bone surface.

B : Electron micrograph, at a higher magnification, of square in A. Gold particles(arrowheads)are seen in the bone matrix under the osteoblast-lineage cell. Bone ; bone matrix, OC ; osteoclast.

Scale bars : A=2  $\mu\text{m}$ , B=0.2  $\mu\text{m}$

ことが明らかにされており<sup>27)</sup>、PTHによる骨吸収亢進機構に骨芽細胞系細胞由来の MMP13が関与する可能性を示唆している。

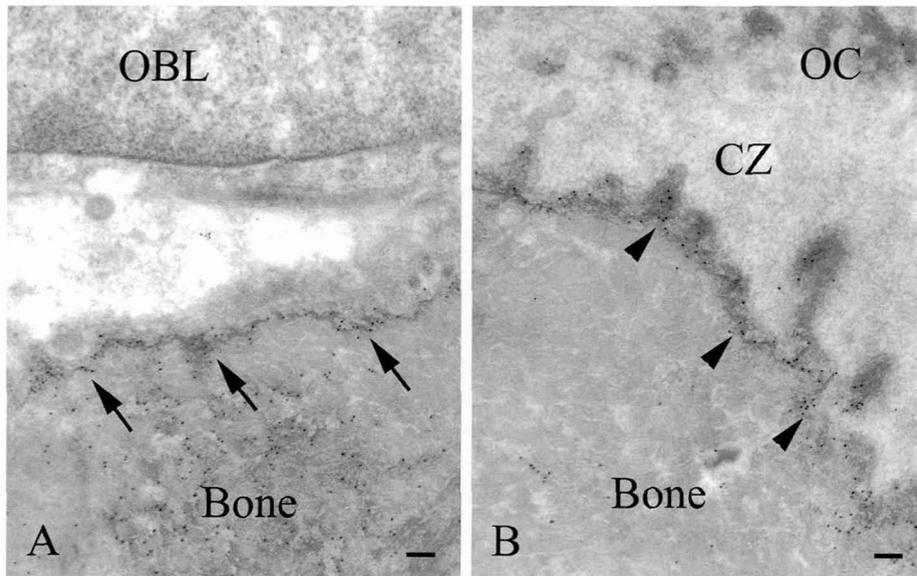


Fig.7 : Electron micrographs indicating osteopontin localization in bone matrix.

A : Gold particles (arrows) are detected on the bone surface under an osteoblast-lineage cell (OBL).

B : Labeling (arrowheads) is also seen under a clear zone (CZ) of an osteoclast (OC).

Bone ; bone matrix.

Scale bars : 0.2  $\mu$ m

MMP13は、破骨細胞の骨基質認識機構にも機能している可能性がある。つまり、古い骨基質表面には未石灰化のコラーゲンが残存しており、破骨細胞が接着するためのコラーゲン除去にMMP13が機能するというものである。本来、坂本らのコラゲナーゼに対する仮説は、このような骨リモデリング過程の破骨細胞による骨基質認識における役割であった。確かに、bone lining cell直下の骨基質表面にはMMP13とオステオポンチン局在しており(図6, 7)、bone lining cellはMMP13を分泌して、未石灰化部位のコラーゲン分解するとともに、オステオポンチンも分泌し、破骨細胞が骨基質に接着するための微小環境を形成しているのかもしれない。

#### 終わりに

骨代謝研究の進歩により、骨吸収機構については、ほぼ解決したように思われているが、いくつかの問題点も残されている。破骨細胞由来のカテプシンKの基質特異性、MMP13がpH3~4という酸性環境でコラゲナーゼとして働くか否か、そして破骨細胞のマーカー酵素として用いられている酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ(tartrate resistant acid phosphatase; TRAP)の機能については、ほとんどわかっていない。骨リモ

デリングは骨芽細胞系細胞と破骨細胞の共同作業であり、生理的条件下では骨量は一定に保たれるという事実からも、両者の相互作用が重要であることは疑いない。骨芽細胞系細胞は、破骨細胞の分化、活性化に加え、骨吸収機構や破骨細胞の骨基質認識過程においても重要な役割を担っており、その結果、骨形成と骨吸収のバランスが保たれ、骨組織は維持されているものと考えられる。今後、カップリング現象のメカニズムなどについて、分子生物学、生理学、形態学などの広い視野から解明していくことが、骨代謝研究の進歩に必須であり、骨粗しょう症や歯周病の予防、治療薬の開発に役立っていくのではないと思われる。

#### 文 献

- 1) Takahashi N, Akatsu T, Udagawa N, Sasaki T, Yamaguchi A, Moseley JM, Martin TJ and Suda T (1988) Osteoblastic cells are involved in osteoclast formation. *Endocrinology* **123** : 2600-2.
- 2) Suda T, Takahashi N, Udagawa N, Jimi E, Gillespie MT and Martin TJ (1999) Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr Rev* **20** : 345-57.

- 3) Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, Elliott R, Colombero A, Elliott G, Scully S, Hsu H, Sullivan J, Hawkins N, Davy E, Capparelli C, Eli A, Qian YX, Kaufman S, Sarosi I, Shalhoub V, Senaldi G, Guo J, Delaney J and Boyle WJ (1998) Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* **93** : 165-76.
- 4) Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinoshita M, Mochizuki S, Tomoyasu A, Yano K, Goto M, Murakami A, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K, Udagawa N, Takahashi N and Suda T (1998) Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci USA* **95** : 3597-602.
- 5) Naito A, Azuma S, Tanaka S, Miyazaki T, Takaki S, Takatsu K, Nakao K, Nakamura K, Katsuki M, Yamamoto T and Inoue J (1999) Severe osteopetrosis, defective interleukin-1 signalling and lymph node organogenesis in TRAF 6-deficient mice. *Genes Cells* **4** : 353-62.
- 6) Lomaga MA, Yeh WC, Sarosi I, Duncan GS, Furlonger C, Ho A, Morony S, Capparelli C, Van G, Kaufman S, van der Heiden A, Itie A, Wakeham A, Khoo W, Sasaki T, Cao Z, Penninger JM, Paige CJ, Lacey DL, Dunstan CR, Boyle WJ, Goeddel DV and Mak TW (1999) TRAF 6 deficiency results in osteopetrosis and defective interleukin-1, CD 40 and LPS signaling. *Genes Dev* **13** : 1015-24.
- 7) Matsumoto M, Sudo T, Saito T, Osada H and Tsujimoto M (2000) Involvement of p 38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway in osteoclastogenesis mediated by receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand (RANKL). *J Biol Chem* **275** : 31155-61.
- 8) Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Mochizuki SI, Yano K, Fujise N, Sato Y, Goto M, Yamaguchi K, Kuriyama M, Kanno T, Murakami A, Tsuda E, Morinaga T and Higashio K (1998) Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG) : a mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis in vitro. *Endocrinology* **139** : 1329-37.
- 9) Udagawa N, Takahashi N, Yasuda H, Mizuno A, Itoh K, Ueno Y, Shinki T, Gillespie MT, Martin TJ, Higashio K and Suda T (2000) Osteoprotegerin produced by osteoblasts is an important regulator in osteoclast development and function. *Endocrinology* **141** : 3478-84.
- 10) Nakamura M, Udagawa N, Matsuura S, Mogi M, Nakamura H, Horiuchi H, Saito N, Hiraoka BY, Kobayashi Y, Takaoka K, Ozawa H, Miyazawa H and Takahashi N (2003) Osteoprotegerin regulates bone formation through a coupling mechanism with bone resorption. *Endocrinology* **144** : 5441-9.
- 11) 中村美どり, 松浦幸子, 宮沢裕夫, 宇田川信之 (2004) 破骨細胞の神秘 松本歯学 **30** : 9-19.
- 12) Sato N, Takahashi N, Suda K, Nakamura M, Yamaki M, Ninomiya T, Kobayashi Y, Takada H, Shibata K, Yamamoto M, Takeda K, Akira S, Noguchi T and Udagawa N (2004) MyD 88 but not TRIF is essential for osteoclastogenesis induced by lipopolysaccharide, diacyl lipopeptide, and IL-1 alpha. *J Exp Med* **200** : 601-11.
- 13) Nakamura H and Ozawa H (1994) Immunohistochemical localization of heparan sulfate proteoglycan in rat tibiae. *J Bone Miner Res* **9** : 1289-99.
- 14) 小澤英浩, 江尻貞一, 網塚憲生, 池亀美華, 星和人 (2001) 「新・分子骨代謝と骨粗鬆症」, 19-54, メディカルレビュー社, 東京.
- 15) 松本歯科大学大学院硬組織研究グループ (2005) 「硬組織研究ハンドブック」, 40-1, 松本歯科大学出版会, 塩尻.
- 16) 中村浩彰：骨芽細胞系細胞と破骨細胞の細胞間相互作用における形態学的観察 (2000) 解剖誌 **75** : 427-32.
- 17) Blair HC, Teitelbaum SL, Ghiselli R and Gluck S (1989) Osteoclastic bone resorption by a polarized vacuolar proton pump. *Science* **245** : 855-7.
- 18) Nakamura H, Moriyama Y, Futai M and Ozawa H (1994) Immunohistochemical localization of vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase in osteoclasts of rat tibiae. *Arch Histol Cytol* **57** : 535-9.
- 19) Drake FH, Dodds RA, James IE, Connor JR, Debouck C, Richardson S, Lee-Rykaczewski E, Coleman L, Rieman D, Barthlow R, Hastings G and Gowen M (1996) Cathepsin K, but not cathepsins B, L, or S, is abundantly expressed in human osteoclasts. *J Biol Chem* **271** : 12511-6.
- 20) Okada Y, Naka K, Kawamura K, Matsumoto T, Nakanishi I, Fujimoto N, Sato H and Seiki M (1995) Localization of matrix metalloproteinase 9 (92-kilodalton gelatinase/type IV collagenase = gelatinase B) in osteoclasts : implications for bone resorption. *Lab Invest* **72** : 311-

- 22.
- 21) Tezuka K, Nemoto K, Tezuka Y, Sato T, Ikeda Y, Kobori M, Kawashima H, Eguchi H, Hakeda Y and Kumegawa M (1994) Identification of matrix metalloproteinase 9 in rabbit osteoclasts. *J Biol Chem* **269** : 15006-9.
  - 22) Wucherpfennig AL, Li YP, Stetler-Stevenson WG, Rosenberg AE and Stashenko P (1994) Expression of 92 kD type IV collagenase/gelatinase B in human osteoclasts. *J Bone Miner Res* **9** : 549-56.
  - 23) Sakamoto S and Sakamoto M (1982) Biochemical and immunohistochemical studies on collagenase in resorbing bone in tissue culture. A novel hypothesis for the mechanism of bone resorption. *J Periodontal Res* **17** : 523-6.
  - 24) Shimizu H, Sakamoto S and Sakamoto M (1989) Matrix collagen of devitalized bone is resistant to osteoclastic bone resorption. *Connect Tissue Res* **20** : 169-75.
  - 25) Gack S, Vallon R, Schmidt J, Grigoriadis A, Tuckermann J, Schenkel J, Weiher H, Wagner EF and Angel P (1995) Expression of interstitial collagenase during skeletal development of the mouse is restricted to osteoblast-like cells and hypertrophic chondrocytes. *Cell Growth Differ* **6** : 759-67.
  - 26) Nakamura H, Sato G, Hirata A and Yamamoto T (2004) Immunolocalization of matrix metalloproteinase-13 on bone surface under osteoclasts in rat tibia. *Bone* **34** : 48-56.
  - 27) Selvamurugan N, Chou WY, Pearman AT, Pulumati MR and Partridge NC (1998) Parathyroid hormone regulates the rat collagenase-3 promoter in osteoblastic cells through the cooperative interaction of the activator protein-1 site and the runt domain binding sequence. *J Biol Chem* **273** : 10647-57.