

破骨細胞接着膜面に出現するポドゾームの構造解析

朝日大学歯学部口腔解剖学分野

明坂年隆

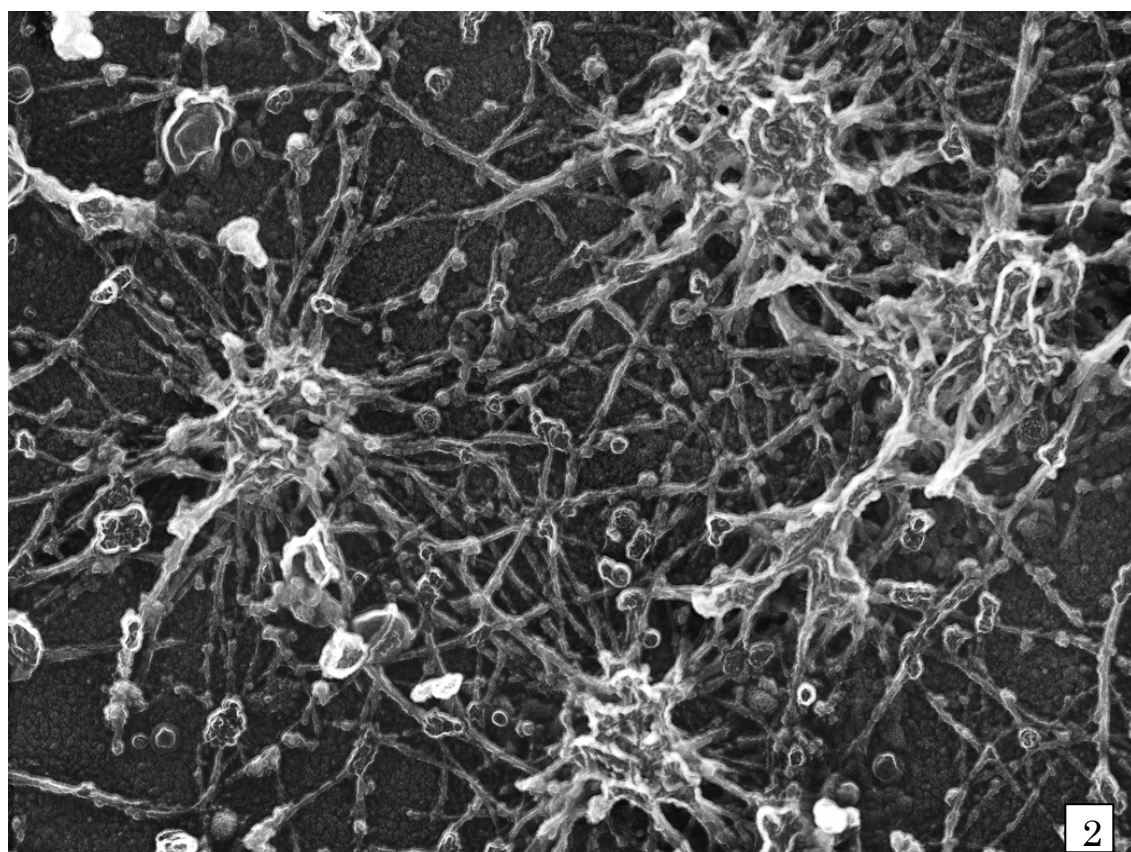
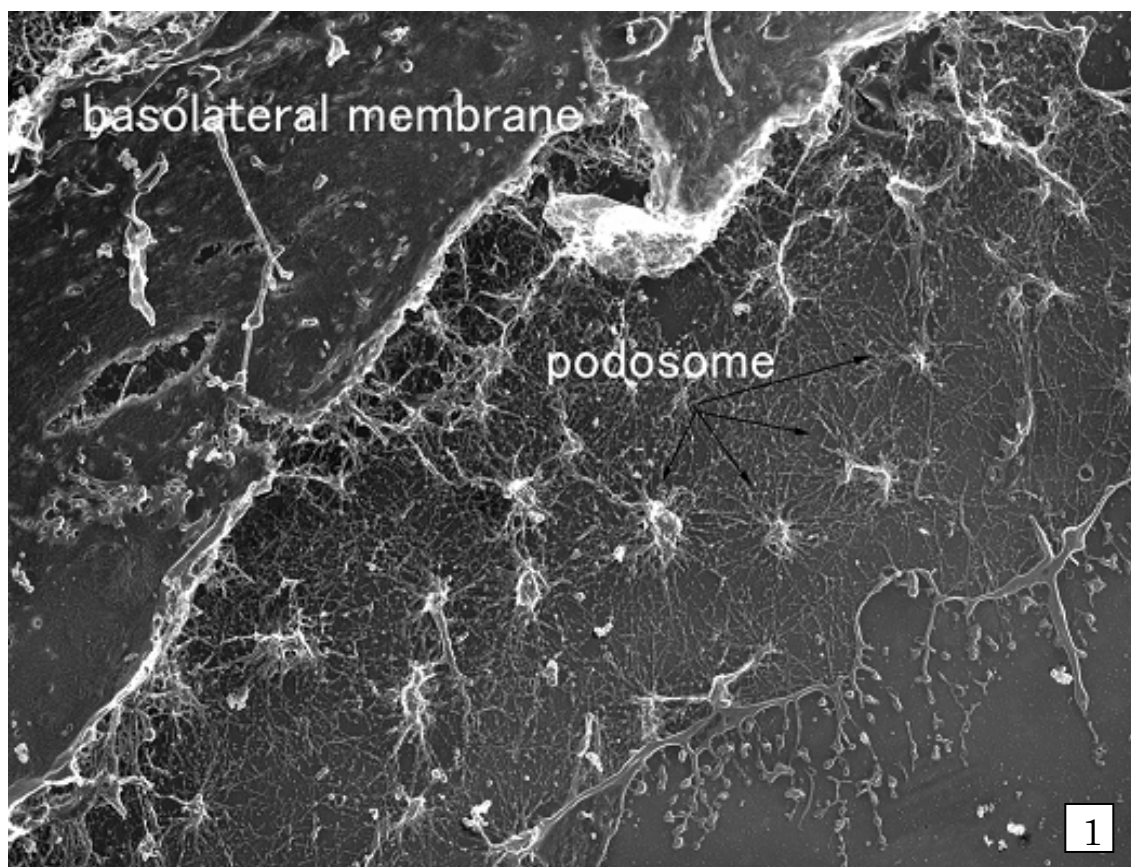
破骨細胞の接着メカニズムについて広範な研究が続けられているが接着膜面と接着装置としての細胞骨格の構造との関係について不明な点が多い。*In vitro* で出現してくる接着構造としての podosome や actin ring が *in vivo* における clear zone と対応しているかどうか議論が分かれる点でもある。Focal contact の一変形として考えられている podosome はダイナミックに変動する F-actin を主体とした細胞骨格から成り破骨細胞の成熟によりラメリポディウムに出現し離散、集合を繰り返し actin ring を形成する。このような現象は actin-GFP を破骨細胞に発現させ動的に生きた培養細胞で観察できる。蛍光顕微鏡下で蛍光ドットとして単独で識別できる podosome も電子顕微鏡レベルでは全て長い F-actin で連結されて podosome cluster を形成しているのが判る。

動的接着構造としての podosome 細胞骨格と膜面を高分解能レベルで形態的解析するため、私たちは細胞破碎を行なって一部の細胞骨格を残存させながら接着側細胞膜面を露出させ急速凍結、回転蒸着レプリカの技法を培養破骨細胞に応用して電子顕微鏡観察を行なった。超音波による物理的な細胞破碎は数秒で完了し急速凍結固定と組み合わせると数十秒の間に物理固定まで終わることができ、より忠実な構造保存が期待できる。得られた透過型電子顕微鏡データはすべてデジタル画像に変換し、ステレオペア、トモグラフィー、アナグリフステレオ、市販の3次元解析ソフト（Alicona 社製 Mex ver.5）を用いて三次元解析を行った。

細胞破碎により細胞膜面と強固な結合の無い細胞骨格要素は容易に除去され、膜面上には podosome とその関連細胞骨格、膜面粒子、クラスリン被覆領域が残存していた。Podosome は細胞剥離で除去できないアクチン線維が収束する無定形のコア部と、その中心から放散して周辺の膜面に伸展する長いアクチン線維から成り立っており蛍光顕微鏡下のコアとリング部に相当する。特にコア部では従来から考えられていた単なるアクチン線維が収束したものではなくアクチン線維が分岐した短いアクチン線維の集合と、その部から放散して出る長いアクチン線維が観察された。アクチン線維と膜面は膜面粒子を介して結合しアクチン線維にそって膜面粒子の介在が見られ、アクチン線維終末が膜面に結合することはなかった。ミオシンサブフラグメントで修飾したアクチン線維の極性を決定する実験からその重合端は podosome のコア部に向いていた。それらの極性はアクチン線維の重合化により生じた張力を podosome の細胞膜面領域に伝えより強固な接着環境を作り出していると考えられる。細胞骨格のうち大部分の微小管はその形成中心から podosome に向かい位置的には密接に関連していた。一部のものは podosome 分布領域でフリー微小管として存在した。微小管の一部は直接 podosome コアに結合していることが観察され微小管による podosome の配列制御が形態的に裏づけられた。膜面には細胞骨格の排除されたクラスリン被覆領域が観察された。podosome 領域に出現するものはクラスリン小窩、小胞の形成が観察されたがそれ以外の領域ではクラスリン領域が互いに連結し大小不整のクラスリン領域を形成していた。大部分はフラットのままで被覆小窩、小胞の形成はほとんど観察されず“frustrated phagocytosis”の状態に在るといえる。このようなクラスリン被覆領域は基質面とも他の細胞膜領域より近接し、細胞破碎に抵抗して基質面に残存すること、ストレスファイバーによるフォーカルコンタクト部にも共通して出現することからクラスリン被覆領域も培養破骨細胞の接着構造として機能していると考えられる。

この様に細胞破碎、急速凍結、回転蒸着レプリカによって得られる情報は今まで不明にされていた破骨細胞の接着構造と膜面の関係を高分解能で形態解析が可能となり動的接着構造としての podosome、接着膜面の分化形態、さらに破骨細胞接着メカニズムの理解のための有力な情報を提供できる。

（写真1：細胞剥離によってラメリポディウムの一部が接着細胞膜面の細胞質面が露出されコア部から放射状に分布する podosome の特徴的な構造が観察される。一部背側膜も残存し podosome 細胞骨格は接着側、背側細胞膜と結合している。写真2：4つの podosome が識別でき、それぞれのアクチンネットワークが組合わさってクラスターを形成している。アクチン線維の分岐や細胞膜面粒子との結合が観察される。コア部は3D観察から突出した構造として観察される。）



演題名: 骨芽細胞/ストローマ細胞が支持する破骨細胞ニッチ

発表者氏名: 溝口 利英

所属機関名: 松本歯科大学・総合歯科医学研究所・硬組織疾患制御再建学部門

(要旨)

破骨細胞は、単球・マクロファージ系の前駆細胞より分化する。この分化過程は、骨芽細胞/ストローマ細胞（以下、骨芽細胞）が発現する M-CSF (macrophage colony-stimulating factor)、RANKL (receptor activator of NF κ - β ligand) および OPG (osteoprotegerin: RANK のデコイ受容体) により厳密に調節されている。骨吸収を担う唯一の細胞である破骨細胞は、骨吸収を必要とする場所のみに出現する。これまで多くの研究者達は、骨芽細胞が発現する M-CSF、RANKL および OPG が破骨細胞の出現部位を決定すると信じてきた。我々は、これらの因子と非依存的に破骨細胞の形成部位が決定されることを、以下の知見より得た。

実験①: 遺伝子欠損マウスの解析を行った。RANKL 欠損マウスへの RANKL の全身投与、op/op (M-CSF 欠損) マウスへの M-CSF の全身投与、OPG 欠損マウス、全てにおいて破骨細胞は骨組織のみに出現した。このことは、破骨細胞の形成部位の決定に、これらの因子は必要ないことを示している。

実験②: 骨誘導因子 (bone morphogenetic protein: BMP) を含んだコラーゲンスポンジ (BMP スポンジ) をマウス背部筋膜下に移植し、異所性骨の誘導実験を行った。BMP スポンジ内に ALP 陽性の骨芽細胞が出現し、続いて異所性骨が誘導された。破骨細胞は、骨芽細胞と同時期に出現し、その局在は骨芽細胞に接していた。

実験③: RANKL 欠損マウスへの BMP スポンジの移植実験を行った。BMP スポンジ内に骨芽細胞は出現するが、破骨細胞は出現しなかった。そこへ RANKL を投与すると、全身性に RANKL が存在するにも関わらず、破骨細胞は骨芽細胞に接した場所のみに出現した。このことは、骨芽細胞が、RANKL 非依存的に破骨細胞の出現部位を決定することを示唆している。

実験④: 骨芽細胞に遊走する破骨細胞前駆細胞のキャラクターを定義した。In vitro において、破骨細胞前駆細胞から破骨細胞への分化には細胞周期の進行とそれに続く細胞周期の停止が必要であった。細胞周期が停止した前駆細胞を post mitotic osteoclast precursor (pOCP) と定義した。

実験⑤: pOCP の in vivo における存在様式を解析した。pOCP は骨組織に存在し、RANKL 刺激で速やかに破骨細胞に分化した。pOCP は、op/op マウスと RANKL 欠損マウスにも存在し、その形成に M-CSF と RANKL は必要なかった。BMP スポンジにより異所性に出現する破骨細胞も pOCP から分化した。

我々は、骨芽細胞が pOCP を支持する環境を、破骨細胞ニッチと定義した。pOCP の破骨細胞ニッチへの遊走機構は未だ不明であり、今後のさらなる展開が期待される。

DC-STAMP は破骨細胞の細胞融合に必須である

宮本健史

慶応義塾大学医学部 発生・分化生物学講座/運動器機能再建・再生学講座/整形外科学講座

破骨細胞は造血幹細胞由来の単球・マクロファージ系の細胞であり、単核の細胞同士が細胞融合することによって多核の破骨細胞を形成することが知られている。この細胞融合に関しては様々な分子が関与していることが報告されてきたが、必須である分子や、なぜ多核化するのか、ということについては解明されていなかった。我々は細胞融合している多核の破骨細胞と、細胞融合しない単核のマクロファージとの間で DNA のサブトラクション法を行ない、7 回膜貫通型受容体蛋白である dendritic cell-specific transmembrane protein (DC-STAMP) をクローニングし、DC-STAMP 欠損マウスを作製したところ、DC-STAMP 欠損マウス由来の破骨細胞の細胞融合が完全に抑制されていることを見出した。DC-STAMP 欠損マウス由来の破骨細胞は、分化マーカーや破骨細胞の分化に必須である転写因子群の発現、波状縁の形成には異常がなく、また DC-STAMP の発現を戻すことによって細胞融合も回復することから、DC-STAMP は細胞融合に特異的に作用することが示唆された。事実、DC-STAMP を過剰に発現するトランスジェニックマウス由来の破骨細胞の細胞融合は、野生型のものに比して有意に亢進していた。DC-STAMP 欠損マウスは、破骨細胞の多核化が抑制されることによって骨吸収能が低下し、その結果 DC-STAMP 欠損マウスでは骨量が増加していたことから、DC-STAMP は破骨細胞の細胞融合を介した骨量調整因子であるとも考えられる。この DC-STAMP の発現制御機構としては、DC-STAMP のプロモーターには c-Fos 及び NFAT といった破骨細胞分化に必須の転写因子群の結合サイトがあり、これらの転写因子群によって発現が制御されていることを見出した。

骨吸収過程における c-Src の機能的役割と制御機構

西村 理行

大阪大学大学院歯学研究科生化学教室

破骨細胞は、骨基質に接着すると、強い極性を示し、非常に特徴的なアクチン細胞骨格である破状縁と明帯を形成する。破状縁からは、酸およびカテプシン K や MMP9 などの加水分解酵素が分泌され、破状縁と明帯は、破骨細胞の骨吸収機能に必要不可欠である。この破状縁と明帯の形成には、チロシンキナーゼ c-Src が必須であり、c-Src 遺伝子欠損マウスは、重篤な骨吸収機能不全と、それに伴う骨大理石病を呈する。c-Src は、アクチンフィラメントの重合を制御し、細胞骨格を調節していることが明らかとなっている。これまでに、FAK、Pyk2 および c-Cbl などの分子が、c-Src の下流で機能し、破骨細胞の骨吸収活性に関与していることが報告されている。しかしながら、c-Src とアクチン細胞骨格の制御を関連付ける分子メカニズムは、明らかにされていない。そこで我々は、アクチン制御分子である Cortactin の破骨細胞における役割を検討した結果、Cortactin が、破骨細胞のアクチンリングに一致した局在を示すことを見出した。また、Cortactin が c-Src と結合し、c-Src によりチロシンリン酸化を受けることも明らかにした。さらに遺伝子工学的手法を活用して、破骨細胞における Cortactin の機能を阻害したところ、破骨細胞のアクチンリング形成ならびに骨吸収活性が著明に抑制されることを見出した。したがって、Cortactin は、c-Src の基質として機能し、破骨細胞のアクチン細胞骨格を制御し、その骨吸収活性の調節に関与していると示唆された。

破骨細胞における c-Src のキナーゼ活性は、他の組織に比べて非常に高いことが示されている。最近、我々は、破骨細胞における c-Src の活性制御は、他の組織と異なっていることを見出した。本シンポジウムでは、破骨細胞における c-Src 活性の制御機構についても概説したい。

破骨細胞に発現する Cl⁻チャネル (CLC7) と骨吸収機能調節

福岡歯科大学・細胞分子生物学講座・細胞生理学分野

岡部幸司、鍛冶屋 浩、岡本富士雄

破骨細胞は骨基質に密着し、ruffled border を介した H⁺や Cl⁻分泌により骨ミネラルを吸収する。近年、破骨細胞の波状縁には Cl⁻チャネル (CLC) ファミリーの一つである CLC7 型 Cl⁻チャネルが高く発現し、CLC7 遺伝子欠損マウスでは破骨細胞による骨吸収が抑制され大理石病を呈することや、欧米諸国で多い常染色体優性大理石骨病の患者では、CLC7 の mutation が生じていることが報告され、骨吸収における Cl⁻チャネルの重要性が注目されている。しかしながら、CLC7 分子の Cl⁻輸送機能やその骨吸収機能調節の機序の実体は未だ不明である。そこで、我々は CLC7-mutation における Cl⁻輸送の機能変異と骨吸収活性との関係を検討した。まず、マウス破骨細胞には CLC7 チャネルを介した外液 pH 依存性の外向整流性 Cl⁻電流が優位に存在し、大理石病患者で報告されている CLC7 の mutation の全てが Cl⁻輸送機能を低下させることが分かった。また、CLC7 の mutation と破骨細胞の骨吸収機能発現との関係を検討した結果、特に CLC7 チャネルの Cl⁻透過通路を形成する部位である 215 番目のアミノ酸に G215R の mutation を起こした CLC7 遺伝子を導入した破骨細胞では、CLC7 チャネルは発現しているが、骨吸収が強く抑制されることが明らかとなった。従って、CLC7 は破骨細胞の酸分泌に必須な機能分子であることや、その mutation による Cl⁻輸送機能の低下が大理石骨病の一因であることが示唆された。今後、こういった破骨細胞のイオン輸送体を分子ターゲットとした創薬は、従来にはないタイプの骨疾患治療薬の候補として期待できるものと考えられる。

形態学からみた破歯細胞のアポトーシス

北海道大・院歯・口腔機能解剖学

土門 卓文

生体内の単核細胞は形態学的に分類されるアポトーシスとネクローシスという 2 つの過程を経て細胞死することは良く知られている。骨を吸収する破骨細胞と歯を吸収する破歯細胞は多核・波状縁の存在等、同じ形態学的特徴をもつ細胞として知られている。しかしながら、これら細胞の生理的状況下におけるアポトーシスの報告はない。ヒト乳歯の歯根吸収面には様々な細胞活性にある破歯細胞が多数観察されることから、ヒト乳歯の歯根吸収面を詳細に観察し、破歯細胞のアポトーシスを検索した。

試料として生理的交換期に達したヒト乳歯を用いた。試料は固定・脱灰後、パラフィン包埋し、アポトーシスを起こした核の免疫組織化学的な指標である TUNEL 染色後、TRAP 染色を行った。その結果、歯根象牙質上の TRAP 陽性の破歯細胞の核は TUNEL 陰性を示していた。破歯細胞の周囲には TUNEL 陽性の核 1 個を含む TRAP 陽性の構造物、TUNEL 陽性の核 1 個と TUNEL 陰性の核 1 ～ 2 を含む TRAP 陽性の構造物、核を含まない TRAP 陽性の構造物が観察され、このような TUNEL・TRAP 陽性の構造物を貪食しているマクロファージも観察された。これらの免疫組織化学的な所見は生理的条件下で破歯細胞がアポトーシスしていることを示す所見と思われる。

次に、これら構造物の三次元構造と微細構造を理解するために、乳歯を固定・脱灰・エポン包埋後、 $0.5\mu\text{m}$ 厚の連続準超薄切片を作成し、トルイジンブルー (TB) 染色の後に光学顕微鏡で観察した。連続切片から TB に濃染する核クロマチンが偏在する典型的なアポトーシス小体が破歯細胞の細胞体と連続している像が観察された。連続切片を用いた三次元復構像から、象牙質上の核を含む細胞体部分から核を含まない細胞体部分が伸び出している破歯細胞が観察され、その立体像からアポトーシスにより断片化途中の破歯細胞であると思われた。この細胞の微細構造を理解するために、任意に選択した準超薄切片をエポンに再包埋し $0.1\mu\text{m}$ 厚の超薄切片作成後、再び透過型電顕 (TEM) で観察した。その結果、細胞内小器官に明らかな変性像は観察されなかったが、細胞表面に細胞体の収縮が原因と思われる多数の微絨毛構造が観察された。また、アポトーシスにより高度に変性した破歯細胞の TEM 像から、細胞体中に intact と思われる核、電子密度の高いクロマチンが偏在した典型的なアポトーシス像を示す核、そして電子密度の低い変性した核が混在しているのが観察された。

以上の結果から、生理的条件下において破歯細胞はアポトーシスすることが形態学的に明らかとなった。その過程は単核細胞のそれと同じく、細胞体の収縮→断片化→マクロファージによる貪食という過程を経ると思われる。破歯細胞は多核の巨細胞であるため、(1) 断片化の場合は少数の核を含むような大きさまでの構造物に断片化すること、(2) 細胞体中の複数の核はすべて同じ変性像を示さないことが形態学からみた破歯細胞のアポトーシスの特徴であると思われる。