

## カルシウムが破骨細胞に及ぼす影響

三條 晃

岩手医科大学歯学部歯科矯正学講座

(主任：三浦 廣行 教授)

(受付：2003年12月19日)

(受理：2004年1月7日)

**Abstract** : Though it has been reported that osteoblasts perceive extracellular calcium levels and regulate the differentiation and function of osteoclasts, the details of its mechanism of calcium perception or of its genetic expression system mostly remains unclear. In the present study, therefore, the influence of a high-calcium environment on osteoblasts was examined from the expressions of RANKL and CaSR mRNAs as well as from the formation of osteoclasts following cocultures.

The identification of CaSR was made by the immunohistochemical staining method using rat alveolar bones with experimental tooth movement. On the third and seventh days after manipulation, both osteoclasts and osteoblasts showed CaSR positive reaction on the compressed side of the alveolar bones. On the other hand, CaSR positive reaction was observed only for osteoblasts on the tension side of the alveolar bones, though the reaction was weak.

In the subsequent experiment using an osteoblast-like cell line (SaOS-2), RT-PCR was performed by changing the calcium concentration in the cultured solution from 1.8 to 2.5, 10 and 40 mM and further by treating with 0.1 and 1.0  $\mu$ M of ionomycin. The PCR products of RANKL and CaSR mRNAs were then analyzed. The expressions of RANKL and CaSR mRNAs decreased in a calcium concentration dependent manner. When SaOS-2 cells were treated with ionomycin, RANKL mRNA expression increased in a dose dependent manner. However, CaSR mRNA expression increased at 0.1  $\mu$ M ionomycin but showed almost no difference at 1.0  $\mu$ M as compared with the untreated level.

In order to examine the effect of calcium on the differentiation of osteoclasts, SaOS-2 cells were cocultured with a human myeloid leukemia cell line (HL-60). Total RNAs were extracted after SaOS-2 cells pretreated with calcium were cocultured with HL-60 and after SaOS-2 cells pretreated with  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  were cocultured with HL-60 under the presence of calcium, and the amount of tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) mRNA expression was examined by RT-PCR. Simultaneously, the number of osteoclasts that appeared was counted. As a result, the expression of TRAP mRNA increased in a dose dependent manner up to the calcium level of 2.5 mM but decreased at levels above it. The number of osteoclast-like cells showed a similar pattern to the expression of TRAP mRNA. In the case of SaOS-2 cells pretreated with  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , the TRAP mRNA expression increased in a dose dependent manner up to a calcium level of 10 mM but the expression at a calcium level of 40 mM decreased to a similar level observed at 1.8 mM.

From the results mentioned above, it was suggested that a high extracellular calcium level in osteoblasts suppresses the expression of RANKL through CaSR which exists in the cell membrane and further suppresses the differentiation of osteoclastic precursors to osteoclasts.

**Key words** : calcium, RANKL, CaSR, osteoblast, osteoclast

## 緒 言

歯の移動は、圧迫側の骨吸収と牽引側の骨添加により行われている。圧迫側では、歯根膜血管の圧迫による循環障害が起こる。これを改善するため、歯根膜腔を復元するために歯槽骨壁の吸収が促される。また、圧迫という外力が局所の組織にダメージを与え、炎症反応が引き起こされる結果、この部位にはケミカルメディエーターであるインターロイキン1やプロスタグランジン E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) などが放出され、骨吸収促進因子として骨芽細胞に作用する。他方、牽引側には、歯根膜線維の牽引によって、線維芽細胞とコラーゲン線維の増殖が認められ、骨芽細胞による骨添加が起こり歯槽骨壁に類骨組織、束状骨、層板骨が出現する。このように歯の移動時には破骨細胞による骨吸収と、骨芽細胞による骨形成が異なる領域において進行するが、破骨細胞と骨芽細胞は互いに独立した存在ではなく、両者には相互作用があることが知られている。

一般に 1,25 (OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub> (活性型ビタミン D<sub>3</sub>)、副甲状腺ホルモン (PTH)、PGE<sub>2</sub>、インターロイキン-11 (IL-11) などが骨芽細胞に作用すると、膜結合型の破骨細胞分化因子 (receptor activator of NF-κB ligand : RANKL) の発現が亢進する<sup>1-3)</sup>。この RANKL は破骨細胞前駆細胞に発現している破骨細胞分化因子受容体 (receptor activator of NF-κB : RANK) と結合することにより、単核破骨細胞、さらに多核の成熟破骨細胞へ分化する<sup>4)</sup>。また骨芽細胞は骨吸収促進因子の刺激により、マクロファージコロニー刺激因子 (macrophage colony-stimulating factor : M-CSF) の産生も促進する。Suda ら<sup>5,6)</sup> は大理石骨病を呈する op/op マウスの解析から、M-CSF が破骨細胞

の形成に必須な因子であり、破骨細胞前駆細胞の分化促進や破骨細胞の延命と融合、それに続く活性化に関与していることを明らかにした。

活性化した破骨細胞によって、骨吸収が起こると、骨基質から様々な有機成分とともにカルシウムイオン (Ca<sup>2+</sup>) が溶出する。通常のヒト血中カルシウム濃度は、常に 9~10mg/dl (2.25~2.50mM) に調節されているが、骨吸収のときのカルシウム濃度は、生理的濃度をはるかに上回り、吸収窩の部分では最大で 40mM にまでなることが知られている<sup>7)</sup>。

最近、細胞外のカルシウム濃度が上昇すると、骨芽細胞の細胞内カルシウムレベルも上昇し、その結果、プロテインキナーゼ C (PKC) の活性化を介して RANKL の発現が誘導されることが報告された<sup>8)</sup>。また、カルシウムイオンは骨芽細胞の増殖促進作用や遊走性に影響を及ぼし、骨組織の細胞間連鎖機構に重要な役割を果たす可能性が示唆されている<sup>9,10)</sup>。

1993年、Brown ら<sup>11)</sup> によりウシ副甲状腺からカルシウム感受受容体 (CaSR) がクローニングされ、7回細胞膜貫通型受容体<sup>12)</sup> である CaSR は、体液中のカルシウム調節に関与していることが示された。また、CaSR は骨芽細胞や破骨細胞においても存在が確認されており<sup>10,13,14)</sup>、CaSR ノックアウトマウスでは、骨代謝の異常が観察されている<sup>15)</sup>。このことからカルシウムイオンが CaSR を介して骨芽細胞や破骨細胞に影響を与えると思われるが、その詳細は明らかにされていない。

これまでの研究において低カルシウム環境処理によるものが大半を占めており、高カルシウム環境処理による研究は数少ない。加えて、高カルシウム環境における破骨細胞分化因子の制御機序や、破骨細胞形成との関連性については不明な点が多い。

Effects of Calcium concentration in Osteoclasts  
Akira SANJO

Department of Orthodontics, School of Dentistry, Iwate Medical University.  
1-3-27 Chuo-dori, Morioka, Iwate 020-8505, Japan

そこで本研究では、高カルシウム環境が骨芽細胞の介在による破骨細胞前駆細胞の破骨細胞への分化に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。そこで、ヒト骨肉腫由来の骨芽細胞様細胞 SaOS-2 を種々の高カルシウム濃度で処理した後の RANKL と CaSR 遺伝子の発現を検討した。さらに、SaOS-2 とヒト前骨髄性白血病細胞 HL60 との共存培養の手法によって破骨細胞のマーカー酵素である酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ (tartrate-resistant acid phosphatase: TRAP) mRNA の発現と破骨細胞前駆細胞から分化、誘導、形成される破骨細胞数についても検討を加えた。

## 材料と方法

### 1. CaSR の免疫組織学的観察

実験には、Sprague-Dawley 系雄性ラット (10~12週齢, 体重210~230g) を用いた。歯の移動は、Waldo 法<sup>16)</sup>に基づき行った。すなわち、矯正治療用ゴムリング (1/4 L, 厚さ0.4 mm, ユニテック社, USA) をラットの顎上側第一臼歯 (M1) と第二臼歯 (M2) の間に挿入し、近遠心方向への歯の移動を3および7日間行った。

歯の移動終了後、ラットをエーテル麻酔下にて4%パラホルムアルデヒド固定液 (0.1M リン酸緩衝液, pH7.4) で、灌流固定を行い、ただちに上顎を一塊として取り出し、同固定液に4°Cで14日間浸漬した。その後、10%ギ酸クエン酸ナトリウム脱灰溶液 (pH7.4) に4°Cで21日間浸漬した。脱灰終了後、エタノール系列により脱水し、通法に従いパラフィン包埋した。厚さ5  $\mu$ mの水平断連続切片を作製し、シラン処理を施したスライドガラスに貼付した。切片は通法に従い、脱パラフィン後、3%過酸化水素水を含むメタノール液に30分浸漬して、内在性ペルオキシダーゼを不活化した。ついで、0.01M リン酸緩衝液 (8.5%NaCl 加 PBS) で洗浄後、一次抗体とインキュベートした。検出には Vectastain<sup>®</sup> Elite kit (ベクター社, USA) を用いた avidin-biotin-peroxidase complex 法

(ABC法)により免疫組織学的染色により行った。一次抗体として100倍希釈したウサギ抗ヒト Ca<sup>2+</sup>Sensing Receptor ポリクローナル抗体 (AFFINTY BIOREAGENTS, INC) を用いた。抗体の特異性には、一次抗体の代わりに正常ウサギ血清 (和光純薬, 大阪) を用いて行い、陽性反応を示さなかったことにより確認した。免疫染色後の切片は、diaminobenzidine (DAB, 和光純薬, 大阪) 反応により発色させた後、光学顕微鏡下で観察した。

### 2. 細胞培養

ヒト骨肉腫由来の骨芽細胞様細胞 SaOS-2 (理研ジーンバンク, 埼玉) は、10%ウシ胎児血清 (fetal bovine serum: FBS) (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA) を含む  $\alpha$ -MEM 培地 (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA) で、ヒト前骨髄性白血病細胞の HL60 (理研ジーンバンク, 埼玉) は、10% FBS を含む RPMI1640培地 (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA) で37°C, 5% CO<sub>2</sub> 存在下にて培養した。細胞は35mmディッシュ (Nunc 社製, USA) 上に2.5 $\times$ 10<sup>5</sup>cell/well で播種し、2日間培養後、実験に用いた。

細胞外カルシウム濃度の影響を検討するため、カルシウムの最終濃度が2.5, 10, 40mM となるように CaCl<sub>2</sub> を培地に添加した。既に1.8 mM カルシウムを含む  $\alpha$ -MEM を対照とし、処理時間は1時間とした。

細胞内カルシウム濃度の影響を検討するために、SaOS-2 を0.1, 1.0 $\mu$ M の ionomycin (CAL-BIOCHEM<sup>®</sup> 社製) で3時間処理した。

培養後の細胞は半定量 RT-PCR 実施のために total RNA 調製試料に用いた。

### 3. 半定量 RT-PCR 法

Total RNA の抽出は、Trizol<sup>®</sup> Reagent (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA) を用いて、プロトコールに従い行った。Phosphate buffered saline (PBS) で洗浄した細胞に1.2ml の Trizol<sup>®</sup> Reagent を添加し、30秒間超音波処理後、250 $\mu$ l のクロロホルムを加え、4°C, 15000 rpm で20分間、遠心分離した。遠心分離後の上

清に同量のイソプロパノールを加え、4°C、15000rpmで再度20分間遠心分離を行った。得られたRNAの沈殿を1.5mlの75%エタノールで洗浄後、50 $\mu$ lのDEPC水に溶解し、total RNAの試料とした。RNAの濃度は260nmの吸光度を測定することにより算出した。

cDNAの鋳型を合成するための逆転写反応は2.0 $\mu$ gのtotal RNAを含む試料12.5 $\mu$ lに4 $\mu$ lの5 $\times$  RT buffer, 2 $\mu$ lの10mM dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 0.5 $\mu$ lのRNase Inhibitor (40unit/ $\mu$ l) (サワディーテクノロジー社製), 1 $\mu$ lの逆転写酵素, SuperScript™ II RNase H-Reverse Transcriptase (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA) (200 unit/ $\mu$ l)を加え、42°Cで60分間行った。反応終了後、72°Cで15分間加熱処理をすることにより、逆転写酵素を失活させた。合成されたcDNAを含む溶液20 $\mu$ lに滅菌蒸留水60 $\mu$ lを加えてPolymerase Chain Reaction (PCR)のための鋳型とした。

PCR反応は10 $\mu$ lの鋳型cDNAに2 $\mu$ lの10 $\times$  PCR buffer, 2 $\mu$ lの2mM dNTPs, 2 $\mu$ lの2mM センスプライマー, 2 $\mu$ lの2mM アンチセンスプライマー, 2 $\mu$ lのTaq DNA polymerase (TaKaRa Taq™, TAKARA BIO INC)を加え、95°Cで30秒の熱処理, 55~60°Cで60秒のアニーリング, 72°Cで90秒の伸長反応を1サイクルとして行った。アニーリングの温度, PCR反応サイクル数, センスまたはアンチセンスプライマーを以下に示す。RANKL (58°C, 23サイクル, 5'-TCGTTGGATCACA GCACATCA-3', 5'-CTTGCTCCTCTTGGC CAGAT-3'), CaSR (58°C, 28サイクル, 5'-CGGTCACCTTCTCACTGAGCTT-3', 5'-GGTCAGCGTATCGCTGCTTT-3'), 酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ (tartrate-resistant acid phosphatase : TRAP) (60°C, 28サイクル, 5'-GCCACCCCTGCCCTGCGCTTTGT A-3', 5'-CTTGAGCCAGGACAGCTGTGT G-3')<sup>17)</sup>, 破骨細胞形成抑制因子 (osteoprotegerin : OPG) (55°C, 22サイクル,

5'-AGGAAATGCAACACACGACAAC-3', 5'-GGCGTAAACTTTGTAGGAACAGC-3'), GAPDH (55°C, 23サイクル, 5'-GAAGGTGA AGGTCGGAGTC-3', 5'-GAAGATGGTGAT GGGATTTTC-3')。

PCR反応終了後の増幅産物を1 $\mu$ g/mlのエチジウムブロミドを含む2%アガロースゲルで100V, 40分間電気泳動し、UV300nmのトランスイルミネーターで観察した。RANKL, CaSR, TRAPのmRNA発現量はATTO Densitograph software library Lane & Spot Analyzer Ver. 6® (アトー株式会社)を用いて、GAPDHを対照とした相対値で示した。

#### 4. 共存培養

骨芽細胞としてSaOS-2を、破骨細胞に分化可能な前駆細胞としてHL60を用いてNagaiとSato<sup>18)</sup>の方法にもとづき共存培養を行った。35mmディッシュにSaOS-2 (2.5 $\times$ 10<sup>5</sup>cell/well)を播種し、2日間培養した。その後、最終カルシウム濃度が2.5, 10, 40mMとなるようにCaCl<sub>2</sub>を添加し、1時間培養した。培養液除去後、SaOS-2は4%パラホルムアルデヒド固定液を用いて2分間処理した後、PBSで3回洗浄した。固定したSaOS-2上にHL60 (2.5 $\times$ 10<sup>5</sup> cell/well)を播種し、M-CSF (10ng/ml)を添加し、さらに6日間共存培養を行った。共存培養の培地としては、10%FBSを含む $\alpha$ -MEMを使用した。

SaOS-2 (2.5 $\times$ 10<sup>5</sup>cell/well)は、活性型ビタミンD<sub>3</sub>(10<sup>-8</sup>M)とdexamethasone(Dex)(10<sup>-7</sup>M)存在下で24時間培養した。4%パラホルムアルデヒドで固定したSaOS-2上にHL60(2.5 $\times$ 10<sup>5</sup>cell/well)を播種し、CaCl<sub>2</sub>とM-CSF(10ng/ml)を添加した。最終カルシウム濃度を2.5, 10, 40mMに設定し、6日間共存培養を行った。共存培養の培地としては、10% FBSを含む $\alpha$ -MEMを使用した。

共存培養後の細胞はRT-PCRとTRAP染色に用いた。

#### 5. TRAP染色

共存培養により形成された破骨細胞を観察す

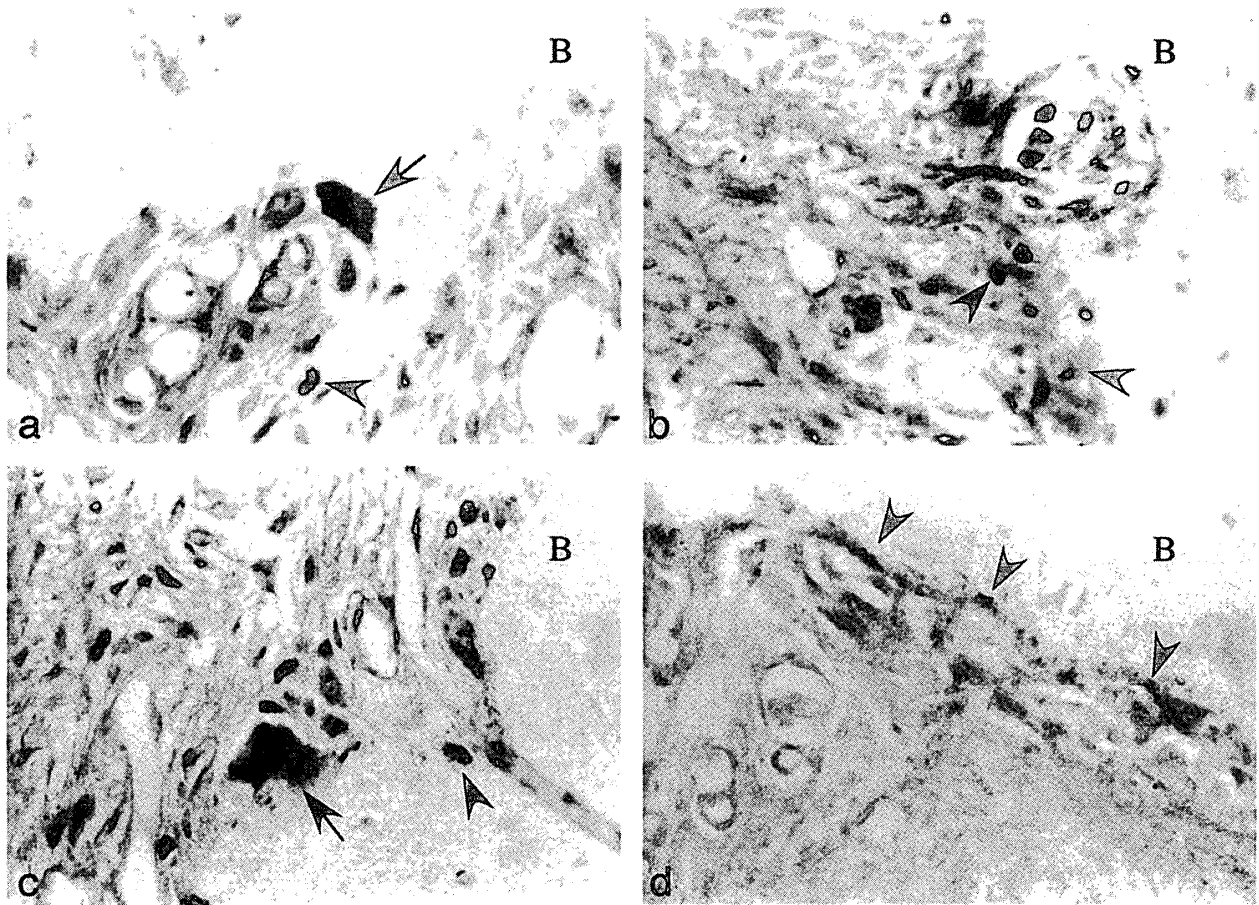


Fig. 1. Immunohistochemical reactions for CaSR on experimental side (x 400).

Compression zone (a : day 3 ; c : day 7)

Tension zone (b : day 3 ; d : day 7)

B, alveolar bone ; arrow heads, osteoblast ; arrows, osteoclast

るために、破骨細胞のマーカ酵素である TRAP 染色を行った。細胞をパラホルムアルデヒド固定液 [4%パラホルムアルデヒド, 3.5% サッカロース, 0.1M カコジル酸緩衝液 (pH 7.4)] で10分間処理後、アゾ色素法<sup>19)</sup>にしたがって染色した。すなわち、細胞は Naphtol AS-BI phosphoric acid (Sigma® 社製) を基質に用いた酸性フォスファターゼ活性検出反応液 [0.05% Naphtol AS-BI phosphoric acid, 50 mL (+) - 酒石酸ナトリウム, 0.1M 酢酸緩衝液 (10%水酢酸, 1%酢酸ナトリウム, pH5.0)] に室温で15~30分浸漬し、光学顕微鏡下で観察した。1 cm<sup>2</sup>に観察される3個以上の核を有する TRAP 陽性多核細胞 (MNCs) を破骨細胞として計数した。

## 結 果

### 1. ラット歯槽骨における CaSR の局在

ラット歯槽骨において、歯を移動した後の CaSR の局在を免疫組織学的手法により検討した。歯の移動3日目の圧迫側では、歯槽骨の骨芽細胞と破骨細胞で CaSR の陽性反応 (Fig. 1 a) が、牽引側では歯槽骨骨縁上の骨芽細胞で CaSR の弱い反応が認められた (Fig. 1 b)。また移動7日目の圧迫側では、吸収窩に存在する破骨細胞と、その周囲の骨芽細胞において強い陽性反応 (Fig. 1 c) が、牽引側では骨縁上の骨芽細胞で CaSR の弱い反応が認められた (Fig. 1 d)。

移動3日目および7日目の牽引側では、破骨細胞は観察されなかった (Fig. 1 b, 1 d)。移動3日目と7日目の圧迫側を比較すると、移動3

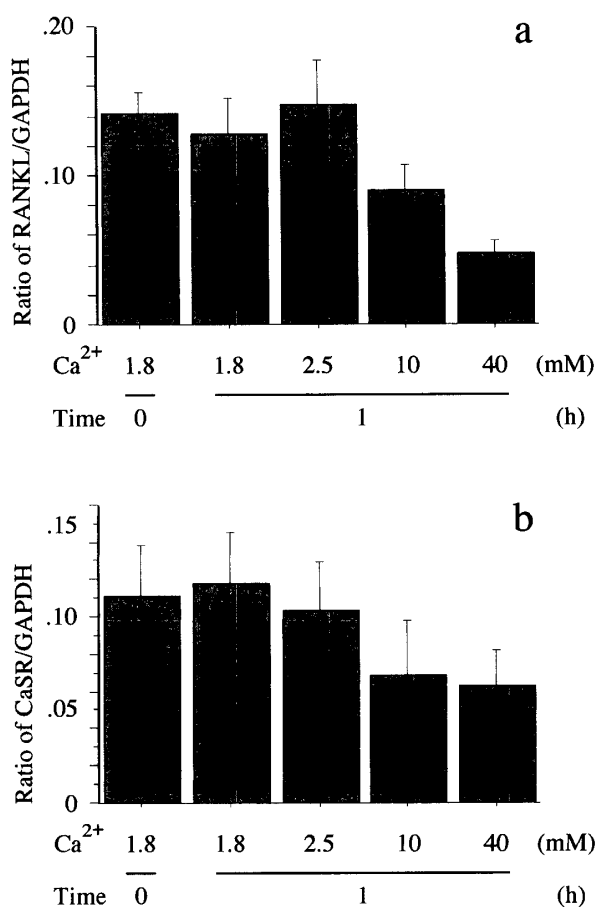


Fig. 2. Effect of extracellular calcium concentration on the expression of RANKL mRNA and CaSR mRNA in SaOS-2. SaOS-2 was cultured for 1 h in fresh medium containing various concentrations of Ca<sup>2+</sup>. Total RNA was isolated from SaOS-2, and the expression levels of RANKL mRNA and CaSR mRNA were analyzed by RT-PCR.

日目で破骨細胞に CaSR の強い陽性反応が認められた (Fig. 1 a, 1 c)。

## 2. 細胞外カルシウム濃度の影響

骨芽細胞に CaSR が存在することを認めたので細胞外のカルシウム環境が骨芽細胞に与える影響を検討するために、種々のカルシウム濃度で処理した骨芽細胞 SaOS-2 の RANKL mRNA と CaSR mRNA の発現量の変動を RT-PCR 法で調べた。通常の培養細胞用培地に含有されている 1.8mM カルシウム濃度とヒト血清中に存在する 2.5mM カルシウム濃度で処理した SaOS-2 における RANKL mRNA 発現

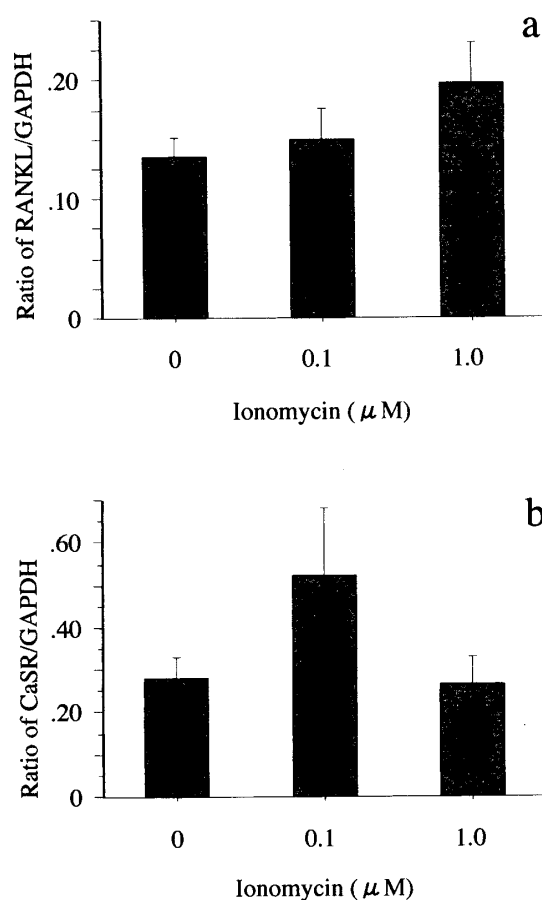


Fig. 3. Effects of ionomycin on the expression of RANKL mRNA and CaSR mRNA in SaOS-2. SaOS-2 was treated with various concentrations of ionomycin for 3 h. Total RNA was isolated from SaOS-2, and the expression levels of RANKL mRNA and CaSR mRNA were analyzed by RT-PCR.

量には有意な差は認められなかった (Fig. 2 a)。しかしながら、カルシウム濃度を 10mM と 40mM にまで上昇させると濃度依存的に RANKL mRNA の発現量が減少した。40mM カルシウム濃度では、1.8mM カルシウム濃度に較べて RANKL mRNA の発現はおおよそ 1/3 にまで減少した (Fig. 2 a)。SaOS-2 は通常 1.8mM カルシウム濃度で培養されているが Fig. 2 b に示すように CaSR mRNA の発現が認められた。この発現量は RANKL mRNA の発現と同様、細胞外カルシウム濃度に逆比例して減少した。対照 (1.8mM カルシウム濃度) に

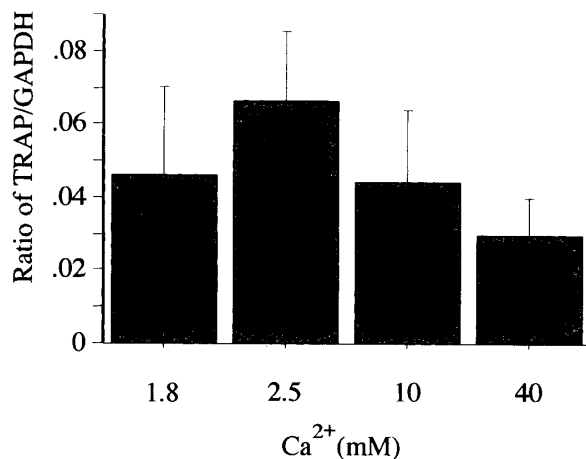


Fig. 4. Effects of various concentrations of Ca<sup>2+</sup> on TRAP mRNA in cocultures.

SaOS-2 was precultured for 1 h in the presence of various concentrations of Ca<sup>2+</sup>. Cells were fixed with 2% paraformaldehyde for 2 min washed with PBS for three times. HL 60 cells were cocultured with fixed SaOS-2 cells in the presence of 10ng/ml of M-CSF. SaOS-2 and HL 60 were cocultured in 35mm culture plates on day 6. Total RNA was isolated from osteoclasts, and TRAP mRNA expression levels were analyzed by RT-PCR. Control was cocultured with culture medium only.

比較して40mMカルシウム濃度処理のCaSR mRNA発現量はおよそ半分であった。

データは示していないが、処理に用いたカルシウム濃度は、破骨細胞形成抑制因子 (osteoprotegerin : OPG) mRNA の発現量に影響を与えなかった。

### 3. 細胞内カルシウム濃度の影響

Ionomycin は細胞内へ直接カルシウムを取り込ませることが知られている<sup>20)</sup>。そこで、SaOS-2 の細胞内カルシウム濃度を上昇させるために、培地中に最終濃度が0.1 $\mu$ M ならびに1.0  $\mu$ M となるように ionomycin を添加した。細胞内カルシウムの影響をみるために ionomycin 処理後の SaOS-2 の RANKL mRNA と CaSR mRNA の発現量を RT-PCR 法で調べた。

RANKL mRNA の発現量は、ionomycin 濃度に依存して上昇し、ionomycin 未処理に較

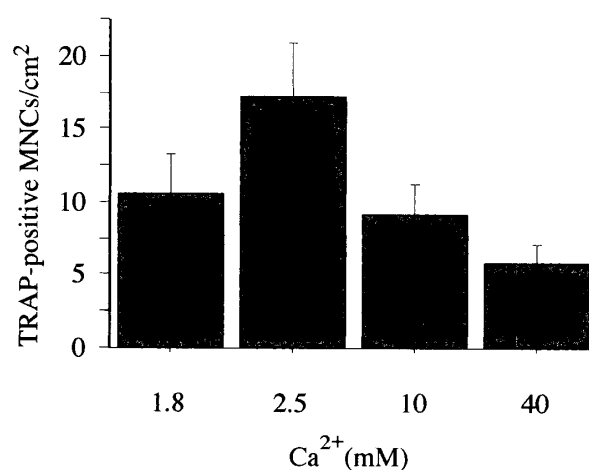


Fig. 5. Effects of various concentrations of Ca<sup>2+</sup> on osteoclast-like MNCs formations in cocultures.

SaOS-2 was precultured for 1 h in the presence of various concentrations of Ca<sup>2+</sup>. Cells carried out as described under Materials and Methods. The number of TRAP-positive MNCs was counted as osteoclasts.

べ、1.0 $\mu$ M ionomycin 濃度では約1.5倍に増加した (Fig. 3 a)。一方、CaSR mRNA の発現量は0.1 $\mu$ M ionomycin 濃度では未処理に較べおよそ2倍に増加したが、1.0 $\mu$ M ionomycin 処理では未処理の値と同程度だった (Fig. 3 b)。

### 4. 破骨細胞分化に及ぼすカルシウムの影響

骨芽細胞を高カルシウム環境においたときに RANKL mRNA の発現が減少した。そこで、破骨細胞形成に与える影響を調べるためにカルシウムで処理後、パラホルムアルデヒド固定した SaOS-2 と破骨細胞に分化する造血系細胞株の HL60を用い、共存培養を行った。破骨細胞のマーカー酵素である TRAP の mRNA 発現量を RT-PCR にて調べた。この際、破骨細胞への分化の指標として TRAP 染色陽性細胞数を計測した。Fig. 4 に示すように TRAP mRNA の発現量は1.8mM カルシウム処理に較べ、2.5mM カルシウム処理で上昇したが、カルシウム濃度の上昇に伴い発現量は減少した。このときの TRAP 陽性細胞数と TRAP mRNA の発現量には正の対応関係がみられた (Fig. 5)。

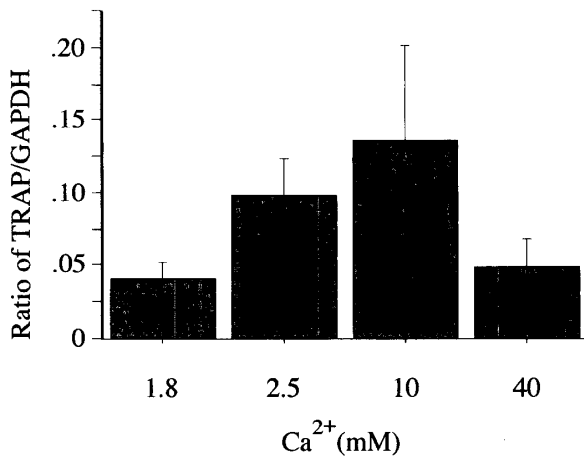


Fig. 6. Effects of increasing concentrations of medium calcium on TRAP mRNA in cocultures.

SaOS-2 was precultured for 24h in the presence of  $10^{-8}$ M of  $VD_3$  and  $10^{-7}$  M of Dex. SaOS-2 and HL 60 were cocultured in 35mm culture plates. The culture medium of the coculture was replaced with fresh medium containing increasing concentrations of  $CaCl_2$  on day 6. Total RNA was isolated from osteoclasts, and TRAP mRNA expression was analyzed by RT-PCR. Control was cocultured with culture medium only.

破骨細胞によって骨吸収が起こると、細胞外のカルシウム濃度は著しく上昇し、吸収高では最大で40mMになることが知られている<sup>7)</sup>。そこで、骨吸収促進因子として知られている活性型ビタミン  $D_3$  で SaOS-2 を処理し、RANKL を高発現させた後に、カルシウム存在下で HL 60 と共存培養を行い、HL60における TRAP mRNA の発現を調べた。10mM カルシウム濃度までは濃度依存的に TRAP mRNA 発現の増加を認めたが、40mM カルシウム濃度では対照 (1.8mM カルシウム) の発現量と同程度だった (Fig. 6)。

## 考 察

### 1. 骨芽細胞ならびに破骨細胞における CaSR の局在

歯科矯正学分野において歯の移動時の骨吸収、骨形成に関わる骨リモデリングの調節は重要な課題である。骨吸収は骨吸収促進因子の働

きによるところが大きい。最近、副甲状腺において CaSR が発見された<sup>11)</sup>。7回細胞膜貫通型受容体<sup>7)</sup>である CaSR は、細胞膜上で細胞外カルシウムを感知し、副甲状腺ホルモン分泌調節を担う受容体である<sup>11)</sup>が、骨代謝関連細胞である破骨細胞、骨芽細胞、骨細胞や骨髄細胞に発現することが報告されている<sup>10, 13, 14, 21~23)</sup>。本研究ではラットの歯の移動により圧迫側に破骨細胞が出現することが観察された (Fig. 1)。また、免疫組織学的検索から骨芽細胞ならびに破骨細胞に CaSR の存在が認められたので、これら骨芽細胞、破骨細胞の機能とカルシウム代謝との関連性が推測される。

骨芽細胞系細胞である MC 3 T 3 -E 1 細胞や SaOS-2 に CaSR の発現を認めた報告がある<sup>10)</sup>。しかし、CaSR 以外にも Ca 感受性を有する受容体が存在する<sup>24)</sup>ことから、骨代謝関連細胞における CaSR の生理的意義については不明である。本研究では、カルシウムが骨芽細胞に発現する RANKL, CaSR ならびに破骨細胞前駆細胞の破骨細胞への分化過程に及ぼす影響について検索し、骨吸収や骨形成におけるカルシウム感知機構の役割を解明することを目的とした。

### 2. SaOS-2 に対する細胞外カルシウム濃度の影響

ヒト体内カルシウムの99%以上は骨に存在するが、血清カルシウム濃度は厳格に調節されており、2.25~2.50mM である。一方、樹立した細胞株は通常1.8mM カルシウムを含む培地で培養されている。本研究では、1.8mM と2.5mM カルシウム濃度で1時間培養した骨芽細胞 SaOS-2 において RANKL mRNA の発現量はほとんど同程度であった。しかし、高カルシウム濃度で細胞を培養すると、RANKL mRNA の発現量は濃度依存的に減少した (Fig. 2 a)。これは、高濃度の細胞外カルシウムに反応して RANKL の合成が抑制されることを示す。一般に血中カルシウム濃度が増加すると骨吸収が低下し、骨形成が促進されることから血中カルシウムが増加した状態では骨芽細胞の存在下で骨



吸収が抑制される。したがって、本研究での骨芽細胞における RANKL mRNA 発現低下から、破骨細胞前駆細胞に発現している RANK との相互作用が減少し、破骨細胞への分化が抑制されることを推測させる。一般に骨吸収は骨吸収促進因子を介して制御が行われると考えられている。すなわち、SaOS-2 の培養において、骨吸収因子である活性型ビタミン D<sub>3</sub> は転写因子でもあるビタミン D 受容体を、IL-11 や IL-6 は gp130 を、PTH や PGE<sub>2</sub> は cAMP を介することにより RANKL 発現を促進する。しかし、本研究ではこれらとは別の RANKL 発現制御経路があることが示唆された。本研究では骨芽細胞様細胞 SaOS-2 におけるカルシウム濃度による RANKL mRNA の変動には CaSR を介した系が関与している可能性が高いことが示された。事実、歯の移動時の骨芽細胞や圧迫側に出現した破骨細胞に CaSR が局在することを認めた (Fig. 1)。また、通常の培地中の 1.8mM や血清に含まれる 2.5mM カルシウム濃度で発現している CaSR mRNA はカルシウム濃度を 10mM や 40mM 濃度に上げたときに減少した (Fig. 2 b) が、これは RANKL mRNA 発現パターン (Fig. 2 a) ときわめて類似している。したがって、CaSR と RANKL は連動していることが強く示唆された。カルシウムを感知する CaSR は破骨細胞や骨芽細胞の前駆体に発現している報告がある<sup>14,25)</sup>。また、破骨細胞前駆細胞には CaSR が存在し、細胞外の高濃度カルシウムは破骨細胞様細胞の形成を阻害するという報告がある<sup>21)</sup>。しかしながら、骨芽細胞における CaSR におよぼす細胞外カルシウム濃度の影響に関する報告はほとんどない。本研究では、骨芽細胞においてカルシウム濃度によって RANKL mRNA の発現とともに CaSR mRNA の発現が変動することを明らかにした。したがって、RANKL の発現に対する調節機構として CaSR がその一端を担っていることが強く示唆された。

### 3. SaOS-2 に対する細胞内カルシウム濃度の影響

高濃度の細胞外カルシウムの上昇により CaSR を介して RANKL が減少するという上述の知見を踏まえ、次に細胞内カルシウムの変動が RANKL におよぼす影響について調べることにした。血液中の細胞外カルシウム濃度は、おおむね 2.5mM (イオン化カルシウム 1.25mM) に維持されているが、細胞内カルシウム濃度はその 10,000 分の 1 の 100nM 程度である。しかし、細胞がホルモン等で刺激された場合、主に細胞ミトコンドリア内のカルシウムプールからカルシウムが放出され、細胞内カルシウム濃度が 1 $\mu$ M に増加する<sup>26)</sup>。ときとして、その濃度は非刺激時の 100~1,000 倍 (10 $\mu$ M~100 $\mu$ M) にも達することがあるともいわれている<sup>27)</sup>。本研究では、細胞外カルシウムを直接細胞内に取り込む calcium ionophore である ionomycin を用いたところ、濃度依存的に RANKL mRNA の発現を増加させた (Fig. 3 a)。しかし、0.1 $\mu$ M で増加した CaSR mRNA は 1.0 $\mu$ M 濃度でコントロール値とほぼ同じであった (Fig. 3 b)。CaSR は細胞膜に存在するが、ionomycin により細胞内に取り込まれたカルシウム濃度が増加すると早急に CaSR mRNA のダウンレギュレーションが生じることが考えられる。一方、細胞内カルシウム濃度の増加の刺激は PKC を介して RANKL の発現を促進するという報告<sup>9)</sup>があるので、本研究においても、細胞内でのカルシウム濃度の増加がセカンドメッセンジャーとしてのシグナルとなり、RANKL mRNA 発現を増加させたことが推測される。

Ionomycin 処理実験から、細胞内に取り込まれたカルシウムによるシグナル伝達系により RANKL mRNA 発現上昇が起きたと考えられ、細胞内カルシウムシグナル系としてのもっとも有力な候補は PKC 経路と思われる。さらに、細胞内カルシウム上昇と RANKL mRNA の上昇が CaSR mRNA 発現に影響すると考えられる。

### 4. 骨芽細胞と破骨細胞前駆細胞の共存培養におよぼすカルシウムの影響

破骨細胞形成能を調べるために骨芽細胞と破骨細胞へ分化可能な細胞の共存培養手技を導入した。1981年 Ko ら<sup>28)</sup>は培養シャーレ上にビタミン D<sub>3</sub> と M-CSF 存在下で増殖したマウスの骨芽細胞上に脾細胞を共存培養させることにより脾細胞が TRAP 陽性破骨細胞様細胞に分化することを初めて報告したが、それ以来、この共存培養系は破骨細胞の分化と機能の研究に多く用いられている。今回の実験では、SaOS-2 をカルシウムあるいは、活性型ビタミン D<sub>3</sub> で処理した後、細胞産生因子の分泌を停止させるためにホルマリンで固定した。

高カルシウム濃度が骨芽細胞の RANKL mRNA や CaSR mRNA の発現に影響を与えたので、破骨細胞への分化過程に対するカルシウムの関与について共存培養系を用いて調べた。2.5mM カルシウム濃度で処理した SaOS-2 を HL60 と共存培養すると、TRAP mRNA (Fig. 4) と TRAP 陽性多核細胞数 (Fig. 5) が対照に比べ増加した。これはカルシウムにตอบสนองして SaOS-2 における RANKL 発現量が亢進し、HL60 に発現している RANK と相互作用した結果、HL60 が破骨細胞へ分化したことを示す。しかし、10mM、40mM カルシウム濃度での刺激では SaOS-2 の RANKL mRNA と HL60 の TRAP mRNA がともに低下した。

破骨細胞形成には、RANKL と OPG の相対比率が重要であることが報告されている<sup>29)</sup>。しかし、データには示していないが、骨芽細胞における OPG mRNA の発現量はカルシウム濃度にほとんど影響を受けなかった。したがって、OPG の変動はカルシウム介在のシグナル伝達経路とは別の系を介していると考えられる。

破骨細胞が骨吸収を行う際に、通常よりカルシウム濃度は上昇し、そのことにより SaOS-2 の RANKL の発現に影響を与える。そこで、SaOS-2 をあらかじめ骨吸収因子である活性型ビタミン D<sub>3</sub> で処理して RANKL mRNA を一定量増加させておき、ついで HL60 との共存培養をカルシウム存在下で行い、破骨細胞への分

化に影響を与えるかを検討したところ、10mM カルシウム濃度においても TRAP mRNA の増加が認められた (Fig. 6)。しかし、40mM カルシウム濃度に上昇させると TRAP mRNA 発現は抑制された。これは破骨細胞が細胞外カルシウムを感知して TRAP mRNA の発現を抑制した結果と推察される。

ラット破骨細胞において細胞外カルシウム濃度を 10~15mM 濃度で処理すると破骨細胞内カルシウム濃度が上昇する<sup>30)</sup>。これは破骨細胞が細胞外カルシウムを感知し、その情報を細胞内へと伝達していることを示唆するもので、この情報がさらに遺伝子発現の制御、すなわち低カルシウムでは破骨細胞の活性化、高カルシウムでは抑制と破骨細胞の機能の制御につながっていくものと思われ、上述した本実験の結果を支持するものである。

以上の結果から、カルシウムは CaSR を介して骨芽細胞ならびに破骨細胞の制御に深く関与していることが示唆された。

## 結 論

- 1) 骨芽細胞において、高レベルの細胞外カルシウムは細胞膜に存在する CaSR を介して RANKL の発現を抑制する。これにより破骨細胞前駆細胞の破骨細胞への分化を抑制する。
- 2) 破骨細胞において、骨吸収の亢進により骨から遊離されたカルシウム濃度が高くなることによって破骨細胞の機能を抑制する。

謝辞：稿を終えるにあたり、終始ご懇篤な指導と校閲を賜りました本学歯科矯正学講座三浦廣行教授、口腔生化学講座佐藤詔子教授、口腔解剖学第二講座名和橙黄雄教授に深甚なる謝意を表します。本研究の遂行にあたり御教示いただきました口腔生化学講座客本齊子講師、同講座帖佐直幸博士に衷心より感謝の意を表します。多大なる御協力をいただきました本学歯科矯正学講座の皆様、口腔生化学講座の皆様、組織培養室利用の皆様、そして関わりを持った全ての皆様に厚く感謝いたします。

なお、本研究の一部は、文部科学省私立大学ハイテク・リサーチ・センター事業補助金を受けて行った。

## 文 献

- 1) Yasuda, H., Shima, N., Nakagawa, N., Yamaguchi, K., Kinosaki, M. Mochizuki, S., Tomoyasu, A., Yano, K., Goto, M., Murakami, A., Tsuda, E., Morinaga, T., Higashio, K., Udagawa, N., Takahashi, N. and Suda, T. : Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95 : 3597-3602, 1998.
- 2) Lee, S. K. and Lorenzo, J.A. : Parathyroid hormone stimulates TRANCE and inhibits osteoprotegerin messenger ribonucleic acid expression in murine bone marrow cultures: correlation with osteoclast-like cell formation. *Endocrinology* 140 : 3552-3561, 1999.
- 3) Girasole, G., Passeri, G., Jilka, R. L. and Manolagas, S.C. : Interleukin-11 : A new cytokine critical for osteoclast development. *J. Clin. Invest.* 93 : 1516-1524, 1994.
- 4) Nakagawa, N., Kinosaki, M., and Yamaguchi, K., Shima, N., Yasuda, H., Yano, K., Morinaga, T. and Higashio, K. : RANK is the essential signaling receptor for osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 253 : 395-400, 1998.
- 5) Takahashi, N., Udagawa, N., and Suda, T. : A new member of tumor necrosis factor ligand and family, ODF/OPGL/TRANCE/RANKL, regulates osteoclast differentiation and function. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 256 : 449-455, 1999.
- 6) Suda, T., Takahashi, N., and Martin, T. J. : Modulation of osteoclast differentiation. *Endocr. Rev.* 13 : 66-88, 1992.
- 7) Silver, I. A., Murrills, R. J. and Etherington, D. J. : Microelectrode studies on the acid microenvironment beneath adherent macrophages and osteoclasts. *Exp. Cell. Res.* 175 : 266-276, 1988.
- 8) Takami, M., Takahashi, N., Udagawa, N., Miyaura, C., Suda, K., Woo, J., Martin, T. J., Nagai, K. and Suda, T. : Intracellular calcium and protein kinase C mediate expression of receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand and osteoprotegerin in osteoblasts. *Endocrinology* 141 : 4711-4719, 2000.
- 9) Honda, Y., Fitzsimmons, R. J. and Baylink, D. J. : Effect of extracellular calcium on insulin-like growth factor II in human bone cells. *J. Bone Miner. Res.* 10 : 1660-1665, 1995.
- 10) Brown, E. M. and MacLeod, R. J. : Extracellular calcium sensing and extracellular calcium signaling. *Physiol. Rev.* 81 : 239-297, 2001.
- 11) Brown, E. M., Gamba, G., Riccardi, D., Lombardi, M., Butters, R., Kifor, O., Sun, A., Hediger, Lytton, J. and Hebert, S. C. : Cloning and characterization of an extracellular  $\text{Ca}^{2+}$ -sensing receptor from bovine parathyroid. *Nature* 366 : 575-580, 1993.
- 12) Garrett, J. E., Capuano, I. V., Hammerland, L. G., Hung, B. C. P., Brown, E. M., Hebert, S. C., Nemeth, E. F. and Fuller, F. : Molecular cloning and functional expression of human parathyroid calcium receptor cDNAs. *J. Biol. Chem.* 270 : 12919-12925, 1995.
- 13) Kameda, T., Mano, H., Yamada, Y., Takai, H., Amizuka, N., Kobori, M., Izumi, N., Kawashima, H., Ozawa, H., Ikeda, K., Kameda, A., Hakeda, Y., and Kumagawa, M. : Calcium-sensing receptor in mature osteoclast, which are bone resorbing cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 245 : 419-422, 1998.
- 14) Yamaguchi, T., Chattopadhyay, N., Kifor, O., Butters, Jr. R. R., Sugimoto, T., and Brown, E. M. : Mouse osteoblastic cell line (MC 3 T 3 -E 1) expresses extracellular calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ o)-sensing receptor and its agonists stimulate chemotaxis and proliferation of MC 3 T 3 -E 1 cells. *J. Bone Miner. Res.* 13 : 1530-1538, 1998.
- 15) Ho, C., Conner, D. A., Pollak, M. R., Ladd, D. J., Kifor, O., Warren, H. B., Brown, E. M., Seidman, J. G. and Seidman, C. E. : A mouse model of human familial hypocalciuric hypercalcemia and neonatal severe hyperparathyroidism. *Nature Genetics* 11 : 389-394, 1995.
- 16) Waldo, C. M. and Rothblatt, J. M. : Histologic response to tooth movement in the laboratory rat. *J. Dent. Res.* 33 : 481-486, 1954.
- 17) Takahashi, S., Goldring, S., Katz, M., Hilsenbeck, S., Williams, R., and Roodman, G. D. : Downregulation of calcitonin receptor mRNA expression by calcitonin during human osteoclast-like cell differentiation. *J. Clin. Invest.* 95 : 167-171, 1995.
- 18) Nagai, M. and Sato, N. : Reciprocal gene expression of osteoclastogenesis inhibitory factor and osteoclast differentiation factor regulates osteoclast formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 257 : 719-723, 1999.
- 19) 鈴木 祐 : 染色法のすべて, 医歯薬出版, 東京, 60-62, 1988.
- 20) Parekh, A. B. and Penner, R.: Society of General Physiologists · 49th Annual Symposium. The Rockefeller University Press., New York, pp231-239, 1996.
- 21) Kanatani, M., Sugimoto, T., Kanazawa, M.,

- Yano, S. and Chihara K. : High extracellular calcium inhibits Osteoclast-like cell formation by directly acting on the calcium-sensing receptor existing in osteoclast precursor cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 261 : 144-148, 1999.
- 22) 三木善樹 : 骨芽細胞から骨細胞への分化に伴うカルシウム感受性レセプターの発現, 四国歯誌, 10 : 195-207, 1997.
- 23) House, M. G., Kohlmeier, L., Chattopadhyay, N., Kifor, Olga., Yamaguchi, T., Leboff, M. S., Glowacki, J. and Brown, E.M. : Expression of an extracellular calcium-sensing receptor in human and mouse bone marrow cells. *J. Bone Miner. Res.* 12 : 1959-1970, 1997.
- 24) Quarles, L. D., Hartle II, J. E., Siddhanti, S. R. and Guo, R. : A distinct cation-sensing mechanism in MC 3 T 3 -E 1 osteoblasts functionally related to the calcium receptor. *J. Bone Miner. Res.* 12 : 393-402, 1997.
- 25) Lorget, F., Kamel, S., Mentaverri, R., Wattel, A., Naassila, M., Maamer, M. and Brazier, M. : High Extracellular Calcium Concentrations Directly Stimulate Osteoclast Apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 268 : 899-903, 2000.
- 26) Brown, E. M., Pollak, M., Seidman, C. E., Seidman, J. G., Chou, Y. W., Riccardi, D. and Hebert, S. C. : Calcium-ion-sensing cell-surface receptors. *N. Engl. J. Med.* 333 : 234-240, 1995.
- 27) 西坂文章 : 表層, 深層の関節軟骨細胞における細胞内カルシウム情報伝達系に関する検討, 近畿大医誌, 25 : 25-34, 2000.
- 28) Ko, J. S. and Bernard, G. W., : Osteoclast formation in vitro from bone marrow mononuclear cells in osteoclast-free bone. *Am. J. Anat.* 161 : 415-425, 1981.
- 29) Horwood, N. J., Elliott, J., Martin, T. J. and Gillespie, M. T. : Osteotropic agents regulate the expression of osteoclast differentiation factor and osteoprotegerin in osteoblastic stromal cells. *Endocrinology* 139 : 4743-4746, 1998.
- 30) Zaidi, M., Kerby, J., Huang, C. L.-H., Alam, A. S. M. T., Rathod, H. Chambers, T. J. and Moonga, B. S. : Divalent cations mimic the inhibitory effect of extracellular ionized calcium on bone resorption by isolated rat osteoclasts. : further evidence for a "calcium receptor". *J. Cell. Physiol.* 149 : 422-427, 1991.
- 31) Shirai, Y., Yoshimura, Y., Yawaka, Y., Hasegawa, T., Kikuri, T., Takeyama, S., Matsumoto, A. and Oguchi, H. : Effects of extracellular calcium concentrations on osteoclast differentiation in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 265 : 484-488, 1999.