

Fig. 2 Expression of osteopontin (opn) mRNA in arthritic paws from a mice with collagen-induced arthritis (CIA). Serial sections of arthritic paws were stained with hematoxylin eosin and in situ hybridization was performed using a primer specific for OPN mRNA. A ; hematoxylin eosin stain, B ; in situ hybridization OPN mRNA expression was detected at the bone-pannus junction, co-incident with the presence of multinucleated giant cells which stained positive for tartrate-resistant acid phosphatase, suggesting activated osteoclasts. (Original magnification x400) (Arthritis Rheumatism から許可の上転載した)

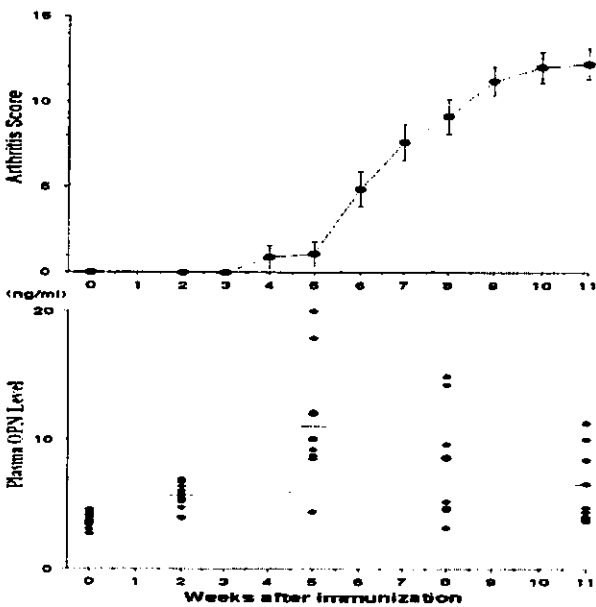


Fig. 3 コラーゲン誘導関節炎 (CIA) マウスの血中 OPN レベルの推移 (Arthritis Rheumatism から許可の上転載した)

ブは抗タイプIIコラーゲン抗体で誘導する実験的関節炎 (CAIA) において、OPN ノックアウトマウスでは、野生型に比べて骨吸収が抑えられると報告している<sup>11)</sup>。この OPN ノックアウトマウスの結果については、われわれや他の研究者の報告では、有意な抑制はみられず<sup>12) 13)</sup>、マウスの遺伝的背景 (とくに関節炎に対する疾患感受性) の相違や OPN の作用における redundancy の存在が示唆されている<sup>44) 46)</sup>。このようなマウスにおける実験結

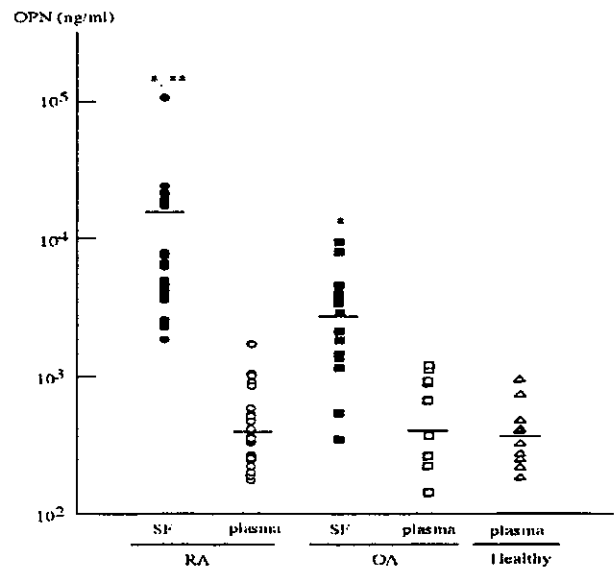


Fig. 4 関節リウマチ, 変形性関節症, 健康人における血中, 関節液中の OPN レベル RA ; rheumatoid arthritis, OA ; osteoarthritis, SF ; synovial fluid \*SF OPN levels vs plasma,  $p < 0.05$ , \*\*SF OPN levels, RA VS OA,  $p < 0.05$  (Journal of Rheumatology から許可の上転載した)

果から、関節炎における骨吸収においても OPN が促進的に作用していることが示唆されている。実際に、炎症性関節炎の代表的疾患である RA においても滑膜組織での OPN の発現は亢進し、RA の関節液中には健康人の血中レベルの約10-1,000倍の OPN が存在することが判明した (Fig. 4)<sup>12)</sup>。このことから、RA の関節局

所では、大量の OPN が産生され、骨吸収を促進していることが示唆される。この関節液中の OPN レベルは CRP などの炎症のマーカーと相関しており、RA の疾患活動性と関連している<sup>12)</sup>。また、in vitro において OPN は軟骨細胞に働いて、MMP-1 (matrix metalloproteinase-1, collagenase-1) の産生を誘導することも報告されている<sup>13)</sup>。さらに、RA の血中ではトロンピンで分断された OPN が増加しており<sup>12)</sup>、最近、OPN の潜在的エピトープの重要性も指摘されている<sup>14)</sup>。

#### 腫瘍性骨吸収性疾患とオステオポンチン

腫瘍性骨吸収性疾患の代表的なものとして多発性骨髄腫 (multiple myeloma; MM) がある。多発性骨髄腫は形質細胞の悪性腫瘍であるが、全身性の骨吸収性骨破壊をひとつの特徴とし、このために強い骨痛や病的骨折などが臨床で大きな問題となることが多い。MM の骨吸収部位には他の骨吸収性疾患の場合と同様に活性化された破骨細胞が観察されることから、MM の骨吸収も主に破骨細胞による骨吸収の亢進が原因と考えられている。そして、以前から骨髄腫細胞から破骨細胞活性化因子 (osteoclast activating factor; OAF) が産生されているものと推察されている。OAF については、IL-1, TNF $\beta$ , IL-6 などの炎症性サイトカインが候補として考えられていたが、まだ、直接的な責任分子は同定されていない。最近、われわれは MM 患者の血清中の OPN レベルが、健常人や MGUS (monoclonal gammopathy of undetermined significance; MGUS, MM の前臨

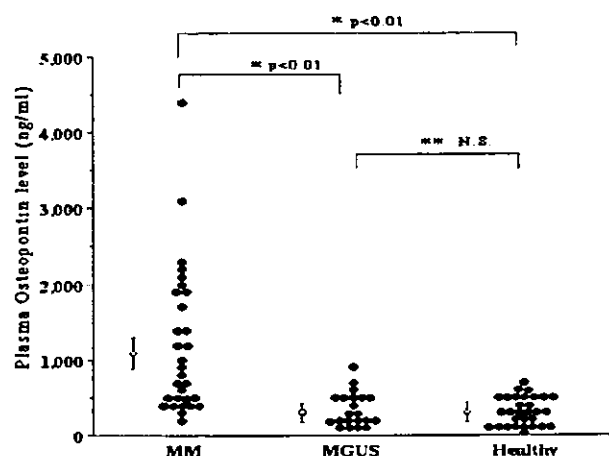


Fig. 5 多発性骨髄腫 (MM)、良性単ガンマグロブリン血症 (MGUS; monoclonal gammopathy of undetermined significance)、健常人 (Healthy; healthy volunteers) の血中 OPN レベル (British Journal of Haematology から許可の上転載した)

床状態の良性単ガンマグロブリン血症) 患者に比べ有意に上昇していることを見いだした (Fig. 5)<sup>15)</sup>。また、この MM 患者の血中の OPN レベルは、臨床病期や骨病変の有無と相関することを明らかにした<sup>15)</sup>。さらに、MM 患者の骨髄細胞や MM 患者由来の cell line が大量の OPN を産生することを示した<sup>15)</sup>。このことから、腫瘍性骨吸収性疾患の MM における骨吸収の原因分子としての OPN の関与が示唆される。

#### おわりに

OPN は組織のリモデリングに関わる多彩な作用をもつサイトカインであり、種々の疾患において注目されている。また、前述のように OPN は Eta-1 と同一分子でもあり、TH1 免疫誘導作用やマクロファージ活性化作用をもつ、いわば、骨代謝系と免疫系におけるクロストーク分子と考えられ、RA のように骨代謝系と免疫系の両方の側面をもつ疾患においては、重要な診断、活動性の指標や治療上の標的分子となることが考えられる。

#### 文 献

- 1) Prince CW, Oosawa T, Butler WT et al: Isolation, characterization, and biosynthesis of a phosphorylated glycoprotein from rat bone. *J Bio Chem* 262: 2900-2907, 1987
- 2) Oldberg A, Franzen A, Heinegard D: Cloning and sequence analysis of rat bone sialoprotein (osteopontin) cDNA reveals an Arg-Gly-Asp cell binding sequence. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 8819-8823, 1986
- 3) Denhardt DT, Guo X: Osteopontin: a protein with diverse functions. *FASEB J* 7: 1475-1482, 1993
- 4) Bosky AL, Maresca M, Ullrich W, et al: Osteopontin-hydroxyapatite interactions in vitro: Inhibition of hydroxyapatite formation and growth in a gelatin gel. *Bone Miner* 22: 147-59, 1993
- 5) Hunter GK, Hauschka PV, Poole AR, et al: Nucleation and inhibition of hydroxyapatite formation by mineralized tissue protein. *Biochem J* 317: 59-64, 1996
- 6) Ishijima M, Rittling SR, Yamashita T et al: Enhancement of osteoclastic bone resorption and suppression of osteoblastic bone formation in response to reduced mechanical stress do not occur in the absence of osteopontin. *J Exp Med*

- 193 : 399-404, 2001
- 7) Ross FP, Chappel J, Alvarez JI et al : Interaction between the bone matrix proteins osteopontin and sialoprotein and the osteoclast integrin avb3 potentiate bone resorption. *J Biol Chem* **268** : 9901-9907, 1993
  - 8) Miyauchi A, Alvarez JI, Greenfield EM et al : Recognition of osteopontin and related peptides by an avb3. *J Biol Chem* **266** : 20369-20374, 1991
  - 9) Yoshitake H, Rittling SR, Denhardt DT et al : Osteopontin-deficient mice are resistant to ovariectomy-induced bone resorption. *Proc Natl Acad Sci USA* **96** : 8156-8160, 1999
  - 10) Ohshima S, Kobayashi H, Yamaguchi N et al : Expression of osteopontin at sites of bone erosion in a murine experimental arthritis of collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* **46** : 1094-1101, 2002
  - 11) Yumoto K, Ishijima M, Rittling SR et al : Osteopontin deficiency protects joints against destruction in anti-type II collagen antibody induced arthritis in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **99** : 4556-4561, 2002
  - 12) Ohshima S, Yamaguchi N, Nishioka K et al : Enhanced local production of osteopontin in rheumatoid joints. *J Rheumatol* **29** : 2061-2067, 2002
  - 13) Petrow PK, Hummel KM, Schedel J et al : Expression of osteopontin messenger RNA and protein in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **43** : 1597-15605, 2000
  - 14) Yamamoto N, Sakai F, Kon S et al : Essential role of the cryptic epitope SLAYGLR within osteopontin in a murine model of rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* **112** : 181-188, 2003
  - 15) Saeki Y, Mima T, Ishii T et al : Enhanced production of osteopontin in multiple myeloma : clinical and pathogenic implications. *Br J Haematol* **123** : 263-270, 2003
  - 16) Ashkar S, Weber GF, Panoutsakopoulou V et al : Eta-1 (osteopontin) : an early component of type-1 (cell mediated) immunity. *Science* **287** : 860-864, 2000
  - 17) Jansson M, Panoutsakopoulou V, Baker J et al : Cutting edge : Attenuated experimental autoimmune encephalomyelitis in eta-1/osteopontin deficient mice. *J Immunol* **168** : 2096-2099, 2002
  - 18) Chabas D, Baranzini SE, Mitchell D et al : The influence of the proinflammatory cytokine, osteopontin on autoimmune demyelinating disease. *Science* **294** : 1731-1735, 2001
  - 19) Singh RP, Patarca R, Schwartz J et al : Definition of a specific interaction between the early T lymphocyte activation 1 (Eta-1) protein and murine macrophages in vitro and its effects upon macrophages in vivo. *J Exp Med* **171** : 1931-1942, 1990
  - 20) Giachelli CM, Lombardi D, Johnson RJ et al : Evidence for a role of osteopontin in macrophage infiltration in response to pathological stimuli in vivo. *Am J Pathol* **152** : 53-58, 1998
  - 21) Lampe MA, Patarca R, Iregui MV et al : Polyclonal B cell activation by Eta-1 cytokine and the development of systemic autoimmune disease. *J Immunol* **147** : 2902-2906, 1991
  - 22) Liaw L, Almeida M, Hart CE et al : Osteopontin promotes vascular cell adhesion and spreading and is chemotactic for smooth muscle cells in vitro. *Cir Res* **74** : 214-224, 1994
  - 23) O'Brien ER, Garvin MR, Stewart DK et al : Osteopontin is synthesized by macrophage, smooth muscle, and endothelial cells in primary and restenotic human coronary atherosclerotic plaques. *Arterioscler Throm* **14** : 1648-1656, 1994
  - 24) Chiba S, Okamoto H, Kon S et al : Development of atherosclerosis in osteopontin transgenic mice. *Heart Vessels* **16** : 111-117, 2002
  - 25) Fitzpatrick LA, Severson A, Edwards WD et al : Association of osteopontin with atherosclerosis. *J Clin Invest* **94** : 1597-1604, 1994
  - 26) Williams EB, Halpert I, Wickline S et al : Osteopontin increased in the heritable cardiomyopathy of Syrian hamsters. *Circulation* **92** : 705-709, 1995
  - 27) Worcester EM, Blumenthal SS, Beshensky AM et al : The calcium oxalate crystal growth inhibitor protein produced by mouse kidney cortical cells in culture is osteopontin. *J Bone Miner Res* **7** : 1029-1036, 1992
  - 28) Hwang SM, Lopez CA, Heck DE et al :

- Osteopontin inhibits induction of nitric oxide synthetase gene expression by inflammatory mediators in mouse kidney epithelial cells. *J Biol Chem* **269** : 711-715, 1994
- 29) Pichler R, Giachelli CM, Lombardi D et al : ubulointerstitial disease in glomerulonephritis : Potential role of osteopontin. *Am J Pathol* **144** : 915-926, 1994
- 30) Pichler R, Franceschini N, Young BA et al : Pathogenesis of cyclosporine nephropathy : Roles of angiotension II and osteopontin. *J Am Soc Nephrol* **6** : 1186-1196, 1995
- 31) Lan HY, Yu XQ, Yang N et al : De novo glomerular osteopontin expression in rat crescentic glomerulonephritis. *Kidney Int* **53** : 136-145, 1998
- 32) Wang X, Loudon C, Yue TL et al : Delayed expression of osteopontin after focal stroke in the rat. *J Neurosci* **18** : 2075-2083, 1998
- 33) O' Regan A, Berman JS : Osteopontin, a key cytokine in cell-mediated and granulomatous inflammation. *Int J Exp Pathol* **81** : 373-390, 2000
- 34) Nau GJ, Guifoile P, Chupp GL et al : A chemoattractant cytokine associated with granulomas in tuberculosis and silicosis. *Proc Natl Acad Sci USA* **94** : 6414-6419, 1997
- 35) Chiba S, Rashid MM, Okamoto H et al : The role of osteopontin in the development of granulomatous lesions in lung. *Microbiol Immunol* **44** : 319-332, 2000
- 36) O' Regan AW, Hayden JM, Body S et al : Abnormal pulmonary granuloma formation in osteopontin-deficient mice. *Am J Respir Crit Care Med* **164** : 2243-2247, 2001
- 37) Senger DR, Ferruzzi CA, Papadopoulos A : Elevated expression of secreted phosphoprotein I (osteopontin, 2ar) as a consequence of neoplastic transformation. *Anticancer Res* **9** : 1291-1300, 1989
- 38) Brown LF, Papadopoulos A, Berse B et al : Osteopontin expression and distribution in human carcinomas. *Am J Pathol* **146** : 95-100, 1994
- 39) Yeatman TJ, Chambers AF : Osteopontin and colon cancer progression. *Clin Exp Metastasis* **20** : 85-90, 2003
- 39) Kim JH, Skates SJ, Uede T et al : Osteopontin as a potential diagnostic biomarker for ovarian cancer. *JAMA* **287** : 1671-1669, 2002
- 40) Chambers AF, Wilson SM, Kerlvi N et al : Osteopontin expression in lung cancer. *Lung cancer* **15** : 311-323, 1996
- 41) Rodan GA, Martin TJ : Therapeutic approaches to bone diseases. *Science* **289** : 1508-1514, 2000
- 44) Crippes BA, Engelman VW, Settle SL et al : Antibody to b3 integrin inhibits osteoclast-mediated bone resorption in the thyroparathyroidectomized rat. *Endocrinology* **137** : 918-924, 1996
- 45) Blom T : Comment on "The influence of the proinflammatory cytokine, osteopontin, on autoimmune demyelinating disease" . *Science* **299** : 1845, 2003
- 46) Ishii T, Ohshima S, Ishida T et al : Osteopontin-deletion remains predisposed to collagen-induced arthritis (CIA). *Arthritis Rheum* **50** : 669-671, 2004

(平成15年10月15日受付)

(平成16年2月20日受理)



# Bio Medical Quick Review Net

No. 4017

骨破壊因子としてのオステオポンチン

佐伯 行彦

国立大阪南病院臨床研究部 部長

株式会社メディカル ドウ

Medical Do Co., Ltd.

本Reviewの内容を無断で複製、転載すると、著作権、出版権侵害となる場合がありますのでご注意ください。

# 骨破壊因子としてのオステオポンチン

佐伯 行彦

国立大阪南病院臨床研究部 部長

オステオポンチン (OPN) の骨吸収性疾患に関連した最近の知見について、われわれの研究成果をまじえて解説した。OPNは多彩な作用をもつ一種のサイトカインであるが、特に、破骨細胞による骨吸収において必須の分子の一つとして知られている。最近の研究結果から、OPNは閉経後の骨粗鬆症、関節リウマチ、多発性骨髄腫など様々な骨吸収性疾患において重要な役割を果たしていることが明らかになってきた。OPNは、これらの骨吸収性疾患において、診断や疾患活動性の指標、あるいは治療上の標的分子として注目されている。

key  
words

オステオポンチン, 破骨細胞, 骨吸収, 骨粗鬆症, 関節リウマチ, 多発性骨髄腫

## はじめに

オステオポンチン (osteopontin : OPN) は、もともと骨の細胞外基質から単離された分泌型のリン酸化糖タンパク分子である<sup>1,2)</sup>。OPNは破骨細胞、マクロファージ、活性化T細胞、平滑筋細胞や上皮細胞など様々な細胞により産生され、骨、腎臓、胎盤、平滑筋、腺組織など多くの組織でその発現が認められる。また、OPNはアルギニン-グリシン-アスパラギン酸 (RGD) 配列を有し、 $\alpha v \beta 1$ 、 $\alpha v \beta 3$ 、 $\alpha v \beta 5$ などの複数のインテグリンと結合することができ、様々な細胞において接着・遊走やシグ

ナル伝達に関与し、骨吸収、血管新生、創傷の治療などの正常組織にみられる組織のリモデリングに関与していることが知られている<sup>3)</sup>。さらに最近、骨破壊、再狭窄、動脈硬化、腎疾患、腫瘍などの病態・疾患とも関わりがあることが明らかになってきた。また、OPNはEta-1 (early T cell activation -1) という分子と同一分子であり、TH 1免疫の誘導やマクロファージの活性化など免疫系においても重要な役割を果たしている、多彩な作用を有する一種のサイトカインと考えられている (表1)<sup>4,5)</sup>。

本稿では、OPNの骨吸収性疾患に関連した最近の知見をわれわれの研究成果をまじえて紹介したい。

Yukihiko Saeki

Osaka-Minami National Hospital, Department of Clinical Research, Director

Osteopontin as a factor for bone-resorption.

E-mail : saekiy@ommc-hp.jp

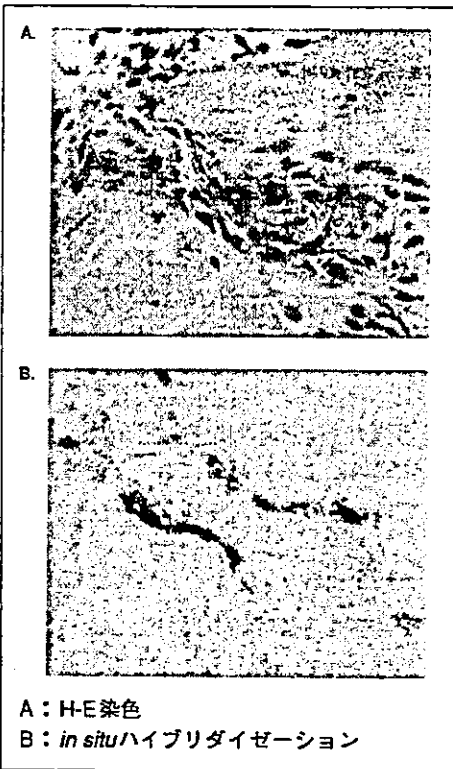


図2 コラーゲン誘導関節炎の骨破壊部位での活性化破骨細胞におけるOPNの発現 (文献10より)

瘍性のものの、大きく3つに分けることができる。まず、非炎症性の骨吸収性疾患は加齢や女性ホルモンの減少などを原因とするもので、代表的なものとして閉経後の骨粗鬆症がある。次に炎症性のものとしては、関節リウマチ (RA) をはじめとするリウマチ性疾患がある。また、腫瘍性のものとしては多発性骨髄腫、骨転移などが挙げられる。最近、これらの骨吸収性疾患において、OPNの関与を示唆する報告がみられる。

1. 非炎症性骨吸収性疾患とOPN

OPNのノックアウトマウスは正常に生まれ、出産し、胎児数や寿命においても野生型とほぼ同等である。しかしながら、野田らのグループにより、閉経後骨粗鬆症の実験モデルである卵巣摘出マウスにおける骨吸収はOPNノックアウトマウスでは野生型に比べて有意に抑制されることが報告されている<sup>9</sup>。このことから、閉経後の骨粗鬆症における骨吸収の亢進にOPNの関与が示唆されている。

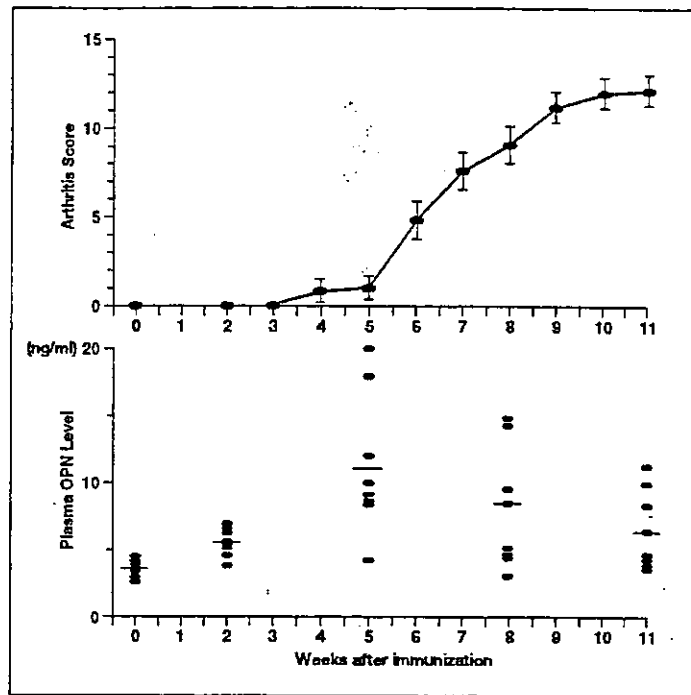


図3 コラーゲン誘導関節炎マウスの血中のOPNレベルの推移 (文献10より)

2. 炎症性骨吸収性疾患とOPN

実験的関節炎モデルである、コラーゲン誘導関節炎 (CIA) における骨びらん (まさに骨破壊が進行している) 部位には、図2のように活性化した破骨細胞が多数存在し、これらの骨吸収をアクティブに行っている破骨細胞に一致してOPNの発現がみられる<sup>10</sup>。また、血中のOPNレベルは関節炎の発症時期に一致して上昇がみられ、関節炎 (骨破壊) の進行期には高値が持続する (図3)。一方、野田らのグループは抗タイプIIコラーゲン抗体で誘導する実験的関節炎 (CAIA) において、OPNノックアウトマウスでは、野生型に比べて骨破壊が抑えられると報告している<sup>11</sup>。このOPNノックアウトマウスの結果については、われわれや他の研究者の報告では有意な抑制はみられず<sup>12,13</sup>、関節炎モデルの相違、マウスの遺伝的背景 (とくに関節炎に対する疾患感受性) の相違や作用におけるOPNと他の分子との重複によることが考えられる<sup>14,15</sup>。このようなマウスにおける実験結果から、関節炎における骨破壊においてもOPNが促進的に作用し

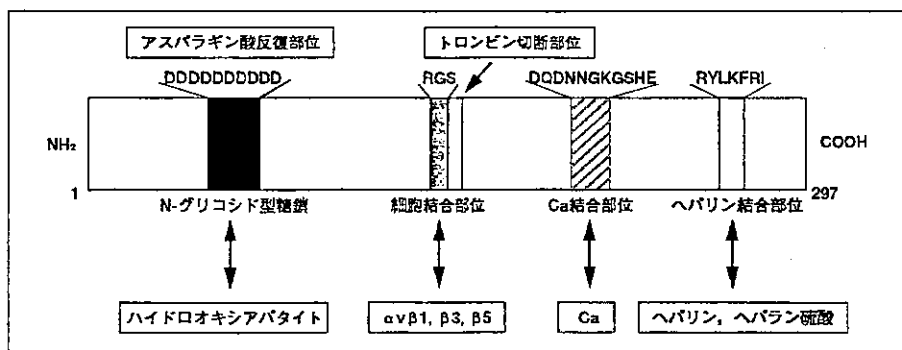


図1 オステオポンチンの構造

### I. OPNの構造 (図1)

OPNは約300個のアミノ酸からなる、分子量約32,000のポリペプチドを骨格にもつ分泌型リン酸化糖タンパク質分子である。リン酸化や糖付加の程度により分子量は44,000~75,000に変化する。OPNはグルタミン、グルタミン酸、アスパラギン、アスパラギン酸が総アミノ酸の半数以上を占める特徴的なタンパク分子である。また、中央部にはトロンピン切断部位が存在し、そのすぐN末端側には細胞接着ドメインと考えられるRGD配列をもつ。さらに、カルシウムやヒドロキシアパタイトなどに親和性の高いドメインをもち、骨などの石灰化基質に高い親和性をもつ。

### II. 破骨細胞による骨吸収におけるOPNの役割

最近、主にノックアウトマウスを用いた研究により、破骨細胞による骨吸収の分子機構が明らかとなってきた<sup>4)</sup>。破骨細胞による骨吸収の最終ステップでは、破骨細胞は骨へ強固に接着する必要があるが、この破骨細胞と骨の接着にはOPNと $\alpha v \beta 3$ インテグリンとの結合が必須と考えられている。実際に、 $\alpha v \beta 3$ インテグリンに対する抗体でこの結合を阻害すると破骨細胞による骨吸収は抑制される<sup>4)</sup>。また、OPNノックアウトマウスにおいては軽度の大理石病が観察され、 $\beta 3$ インテグリンノックアウトマウスでも同様に軽度の大理石病が観察され

る。これらの事実から、OPNはインテグリンとの結合により破骨細胞による骨吸収において促進的な役割を果たしているものと考えられる。

### III. 骨吸収性疾患

骨は、絶えず骨形成と骨吸収を繰り返してターンオーバーされ、維持されている。したがって、正常な(健康な)骨を維持するためには骨形成と骨吸収のバランスが保たなければならない。そのバランスが破綻し骨吸収へ傾くと、病的な骨、つまり骨吸収性疾患を生じることになる。骨吸収性疾患は、病態病理学的に①非炎症性のもの、②炎症性のもの、③腫

表1 オステオポンチンの多彩な生物学的作用と病態・疾患との関わり (文献4~41より)

細胞・組織	生物学的作用と病態・疾患との関わり	文献
骨	ミネラルの骨への沈着を制御	4,5
	荷重シグナルの伝達	6
	破骨細胞の骨への接着	7,8
	骨吸収性疾患(骨粗鬆症、関節リウマチ、多発性骨髄腫)	9-15
免疫系	TH1免疫の初期誘導	16
	IL-12, IFN $\gamma$ の産生亢進, IL-10の産生制御	17,18
	単球, マクロファージの遊走	19,20
	B細胞の抗体産生を促進	21
心・血管系	再狭窄	22,23
	粥状動脈硬化のプラーク形成, 石灰化	24,25
	心筋症	26
腎臓・尿路系	NO産生の抑制	27
	尿路結石の形成の阻止	28
	腎炎	29-31
脳	虚血(脳卒中)	32
肉芽腫形成	創傷, 結核, サルコイドーシス	33-36
腫瘍	細胞のトランスフォーメーション, 癌	37-41



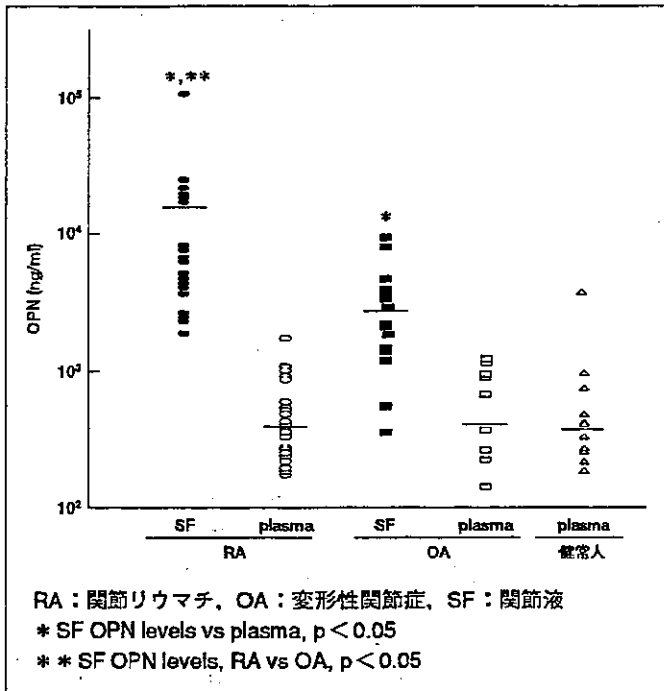


図4 血中・関節液中のOPNレベル (文献12より)

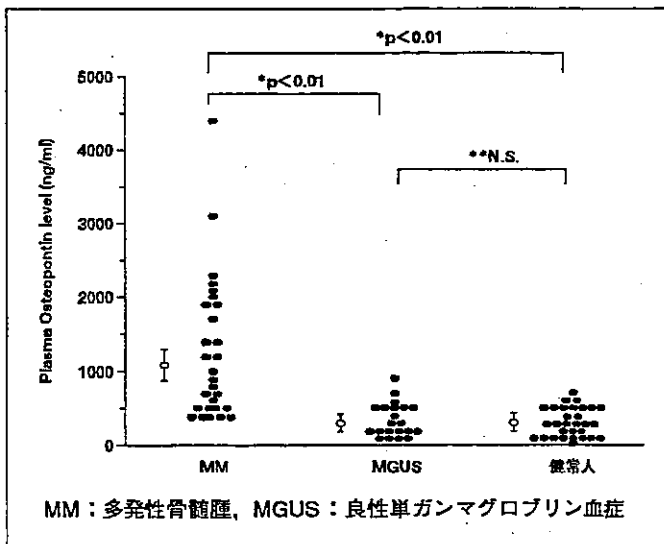


図5 血中OPNレベル (文献15より)

ていることが示唆されている。実際に、炎症性関節炎の代表的疾患であるRAにおいても滑膜組織でのOPNの発現は亢進し、RAの関節液中には健康人の血中レベルの約10~1000倍のOPNが存在する(図4)<sup>12)</sup>。このことから、RAの関節局所では、大量のOPNが産生され、骨破壊を促進していることが

考えられる。さらに、この関節液中のOPNレベルの上昇はCRPなどの炎症のマーカーと強く相関しており、OPNの産生亢進がRAの疾患活動性と関連していることが示唆されている<sup>12)</sup>。また、*in vitro*においてOPNが軟骨細胞に作用し、MMP-1 (matrix metalloproteinase-1, collagenase-1)の産生を誘導することも報告されている<sup>13)</sup>。さらに、RAの血中ではトロンピンで分断されたOPNが増加しており<sup>12)</sup>、最近、トロンピンで分断された後に表出するOPNの潜在的エピトープの重要性も指摘されている<sup>14)</sup>。

### 3. 腫瘍性骨吸収性疾患とOPN

腫瘍性骨吸収性疾患の代表的なものとして多発性骨髄腫 (multiple myeloma : MM)がある。MMは形質細胞の悪性腫瘍であるが、全身性の骨吸収性骨破壊を1つの特徴とし、このために強い骨痛や病的骨折などが臨床で大きな問題となることが多い。MMの骨吸収部位には他の骨吸収性疾患の場合と同様に活性化された破骨細胞が観察されることから、MMの骨吸収も主に破骨細胞による骨吸収の亢進が原因と考えられている。そして、以前から骨髄腫細胞から破骨細胞活性化因子 (osteoclast activating factor : OAF) が産生されているものと推察されている。OAFについては、IL-1、TNF $\beta$ 、IL-6などの炎症性サイトカインが候補として考えられていたが、まだ直接的な責任分子は同定されていない。最近、われわれはMM患者の血清中のOPNレベルが、健康人やMGUS (monoclonal gammopathy of undetermined significance, MMの前臨床状態の良性単ガンマグロブリン血症)患者に比べ有意に上昇していることを

見出した(図5)<sup>15)</sup>。また、このMM患者の血中のOPNレベルは、MMの臨床病期や骨病変の有無と相関していた<sup>15)</sup>。さらに、MM患者の骨髄細胞やMM患者由来のcell lineは大量のOPNを産生していた<sup>16)</sup>。このことから、腫瘍性骨吸収性疾患のMMにおける骨破壊の原因分子としてのOPNの関与が示

唆される。

## おわりに

OPNは組織のリモデリングに関わる多彩な作用をもつサイトカインであり、種々の疾患において注目されている。特に、OPNは閉経後の骨粗鬆症、関節リウマチ、多発性骨髄腫など種々の骨吸収性疾患において骨破壊因子として作用していることが強く示唆され、これらの疾患の重要な診断や活動性の指標、および治療上の標的分子となることが考えられる。

## 参考文献

- 1) Prince CW, Oosawa T, et al : J Biol Chem 262, 2900-2907, 1987.
- 2) Oldberg A, Franzen A, et al : Proc Natl Acad Sci USA 83, 8819-8823, 1986.
- 3) Denhardt DT, Guo X : FASEB J 7, 1475-1482, 1993.
- 4) Bosky AL, Maresca M, et al : Bone Miner 22, 147-159, 1993.
- 5) Hunter GK, Hauschka PV, et al : Biochem J 317, 59-64, 1996.
- 6) Ishijima M, Rittling SR, et al : J Exp Med 193, 399-404, 2001.
- 7) Ross FP, Chappel J, et al : J Biol Chem 268, 9901-9907, 1993.
- 8) Miyauchi A, Alvarez JI, et al : J Biol Chem 266, 20369-20374, 1991.
- 9) Yoshitake H, Rittling SR, et al : Proc Natl Acad Sci USA 96, 8156-8160, 1999.
- 10) Ohshima S, Kobayashi H, et al : Arthritis Rheum 46, 1094-1101, 2002.
- 11) Yumoto K, Ishijima M, et al : Proc Natl Acad Sci USA 99, 4556-4561, 2002.
- 12) Ohshima S, Yamaguchi N, et al : J Rheumatol 29, 2061-2067, 2002.
- 13) Petrow PK, Hummel KM, et al : Arthritis Rheum 43, 1597-1605, 2000.
- 14) Yamamoto N, Sakai F, et al : J Clin Invest 112, 181-188, 2003.
- 15) Saeki Y, Mima T, et al : Br J Haematol 123, 263-270, 2003.
- 16) Ashkar S, Weber GF, et al : Science 287, 860-864, 2000.
- 17) Jansson M, Panoutsakopoulou V, et al : J Immunol 168, 2096-2099, 2002.
- 18) Chabas D, Baranzini SE, et al : Science 294, 1731-1735, 2001.
- 19) Singh RP, Patarca R, et al : J Exp Med 171, 1931-1942, 1990.
- 20) Giachelli CM, Lombardi D, et al : Am J Pathol 152, 353-358, 1998.
- 21) Lampe MA, Patarca R, et al : J Immunol 147, 2902-2906, 1991.
- 22) Liaw L, Almeida M, et al : Cir Res 74, 214-224, 1994.
- 23) O'Brien ER, Garvin MR, et al : Arterioscler Thromb 14, 1648-1656, 1994.
- 24) Chiba S, Okamoto H, et al : Heart Vessels 16, 111-117, 2002.
- 25) Fitzpatrick LA, Severson A, et al : J Clin Invest 94, 1597-1604, 1994.
- 26) Williams EB, Halpert I, et al : Circulation 92, 705-709, 1995.
- 27) Worcester EM, Blumenthal SS, et al : J Bone Miner Res 7, 1029-1036, 1992.
- 28) Hwang SM, Lopez CA, et al : J Biol Chem 269, 711-715, 1994.
- 29) Pichler R, Giachelli CM, et al : Am J Pathol 144, 915-926, 1994.
- 30) Pichler R, Franceschini N, et al : J Am Soc Nephrol 6, 1186-1196, 1995.
- 31) Lan HY, Yu XQ, et al : Kidney Int 53, 136-145, 1998.
- 32) Wang X, Loudon C, et al : J Neurosci 18, 2075-2083, 1998.
- 33) O'Regan A, Berman JS : Int J Exp Pathol 81, 373-390, 2000.
- 34) Nau GJ, Guifoile P, et al : Proc Natl Acad Sci USA 94, 6414-6419, 1997.
- 35) Chiba S, Rashid MM, et al : Microbiol Immunol 44, 319-332, 2000.
- 36) O'Regan AW, Hayden JM, et al : Am J Respir Crit Care Med 164, 2243-2247, 2001.
- 37) Senger DR, Perruzzi CA, et al : Anticancer Res 9, 1291-1300, 1989.
- 38) Brown LF, Papadopoulos A, et al : Am J Pathol 146, 95-100, 1994.
- 39) Yeatman TJ, Chambers AF : Clin Exp Metastasis 20, 85-90, 2003.
- 40) Kim JH, Skates SJ, et al : JAMA 287, 1671-1679, 2002.
- 41) Chambers AF, Wilson SM, et al : Lung cancer 15, 311-323, 1996.
- 42) Rodan GA, Martin TJ : Science 289, 1508-1514, 2000.
- 43) Crippes BA, Engelman VW, et al : Endocrinology 137, 918-924, 1996.
- 44) Blom T : Science 299, 1845, 2003.
- 45) Ishii T, Ohshima S, et al : Arthritis Rheum (in press).

## 著者プロフィール

佐伯 行彦

1980年 大阪大学医学部卒業

大阪大学医学部第三内科入局

1981年 第2大阪豊稗病院内科医員

1984年 大阪大学医学部第三内科医員

1985年 米国ニューヨーク州立ローズウェルパーク癌研究所研究員

1991年 大阪大学医学部第三内科助手

2000年 大阪大学医学部附属病院免疫・アレルギー・感染内科副科長

2002年 大阪大学大学院医学系研究科分子病態内科講師

2003年 国立大阪南病院臨床研究部部長 (現職)

## II. 骨代謝調節系

### 破骨細胞の機能・骨吸収メカニズム

#### 概論：破骨細胞の分化・骨吸収調節機構

Regulatory mechanism of osteoclast differentiation and function

奥村茂樹<sup>1</sup> 宇田川信之<sup>1</sup> 高橋直之<sup>2</sup>

**Key words** : 破骨細胞, 骨芽細胞, 骨吸収, RANKL, 極性化

#### はじめに

いったん形成された骨組織は、なぜ破骨細胞による吸収と骨芽細胞による形成を繰り返すのだろうか。一定の形態を保つかに見える骨も、骨吸収と骨形成を絶えず繰り返す動的な組織である。破骨細胞と骨芽細胞の機能バランスが崩れると、骨粗鬆症や大理石骨病などの骨疾患が引き起こされる。骨には少なくとも2つの役割がある。1つは力学的に身体を支える‘支柱’としての役割であり、もう1つはカルシウム(Ca)貯蔵庫としての役割である。骨の支柱的役割から骨疾患を考えると、破骨細胞は文字どおり‘骨を破壊する細胞’である。しかし、骨をCaの貯蔵庫として考えると、破骨細胞は血中にCaを動員する‘Ca濃度調節細胞’といえる。骨密度の低下も、血中のCa濃度の異常もともに危険である。

本稿では、この骨吸収を担う破骨細胞が、どのように形成され骨吸収能を示すのか、概略的ではあるが順を追って述べてたい。

#### 1. 破骨細胞としての形質獲得

破骨細胞は骨組織にのみ存在し、骨吸収を担う多核細胞である。単球/マクロファージ系の破骨細胞前駆細胞が骨組織において単核の破骨

細胞に分化した後、互いに融合し、多核の破骨細胞が形成される<sup>1)</sup>。この破骨細胞の分化と機能発現は、骨形成を司る骨芽細胞により厳密に調節されている。1998年、骨芽細胞に発現し、破骨細胞の分化と機能を調節する破骨細胞分化因子RANKL(receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand)がクローニングされ<sup>1)</sup>、骨吸収調節メカニズムの一端が分子レベルで明らかにされた(図1)。すなわち、骨芽細胞は破骨細胞の分化に必要な因子であるM-CSF(macrophage colony-stimulating factor)とRANKLを発現する<sup>1)</sup>。一方、破骨細胞前駆細胞は、M-CSF受容体(c-fms)とRANKL受容体(RANK)を発現する。破骨細胞前駆細胞は、骨芽細胞との細胞間接触を介してRANKLを認識し、M-CSFの存在下で破骨細胞に分化する。また、骨芽細胞は、RANKLのデコイレセプターであるOPG(osteoprotegerin)も分泌する。OPGは、RANKLとRANKの結合を競合的に阻害する骨吸収抑制因子である。

骨芽細胞によるM-CSFの発現は恒常的であるのに対し、RANKLの発現は1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>(1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>)、PTH(parathyroid hormone)、PGE<sub>2</sub>(prostaglandin E<sub>2</sub>)、IL-11(interleukin 11)などの骨吸収因子により誘導される<sup>1)</sup>。1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>はビタミンD受容体(VDR)

<sup>1</sup>Shigeki Okumura, Nobuyuki Udagawa: Department of Biochemistry, Matsumoto Dental University 松本歯科大学 学生化学 <sup>2</sup>Naoyuki Takahashi: Institute for Oral Science 同総合歯科医学研究所

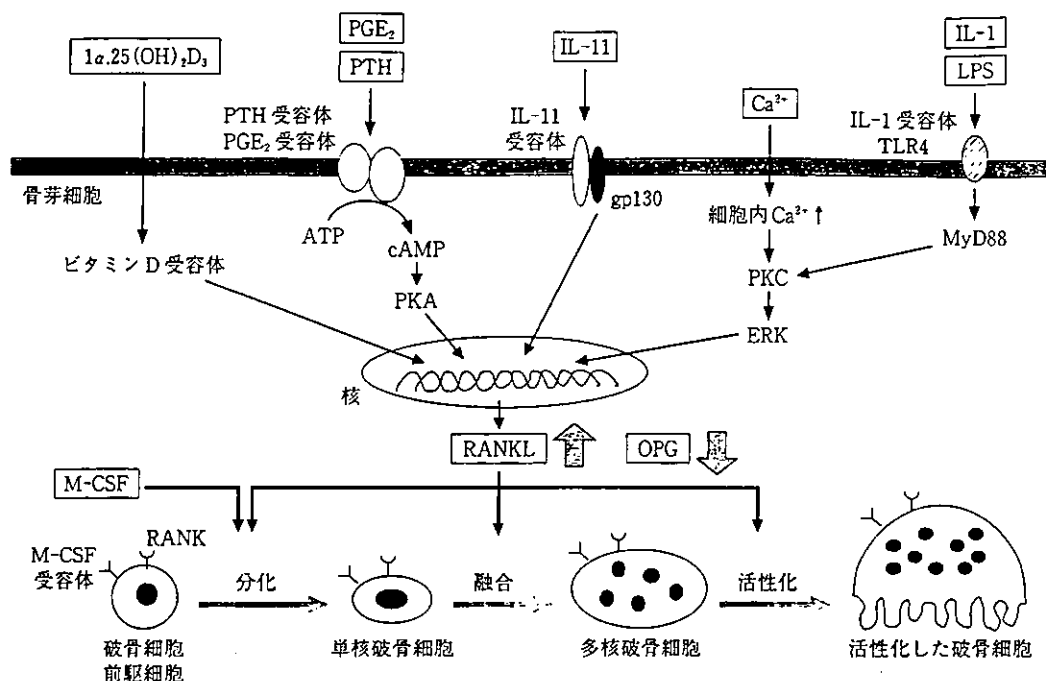


図1 骨芽細胞におけるRANKLの発現誘導とRANKLの作用

を介し、IL-11やIL-6は双方に共通のシグナル伝達因子であるgp130を介してRANKLの発現を上昇させる。また、PTHやPGE<sub>2</sub>の受容体からのシグナルは、cAMP/PKAを介してRANKL発現を上昇させると考えられる。これらの骨吸収因子は、骨芽細胞によるOPGの産生も抑制し、破骨細胞形成を促進する(図1)。更に、骨芽細胞の細胞内Caレベルが上昇するような薬物や培養液のCa<sup>2+</sup>濃度の増加はRANKLの発現を誘導する<sup>2)</sup>。この細胞内Caレベルの上昇を介するRANKLの発現誘導は、PKC(protein kinase C)とERK(extracellular signal-regulated kinase)が仲介するという結果を著者らは得ている。IL-1とLPS(リポ多糖)は骨芽細胞のRANKLの発現を誘導するが、この発現誘導はPKC/ERKを介する。一方、分化した成熟破骨細胞もRANKを発現しており、RANKLからの刺激により骨吸収活性が誘導される<sup>1)</sup>。

単球/マクロファージ系細胞は破骨細胞への分化に伴い、食能や抗原提示能など単球/マクロファージ特有の形質を失い、骨吸収能を獲

得する。破骨細胞のマーカー分子としてカタプシンKやカルシトニン受容体、p60<sup>src</sup>、酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ(TRAP)などが知られている。単球/マクロファージ系前駆細胞から分化した単核破骨細胞は、骨吸収能をはじめとするこれらのマーカーをすべて発現する<sup>1)</sup>。そのため、破骨細胞分化を誘導する重要なシグナルは単核破骨細胞への分化で完結すると考えられる(図1)。

## 2. 単核破骨細胞の融合

単核破骨細胞は融合して多核細胞を形成する。破骨細胞はなぜ多核化するのか。その生理的意義は不明であるが、正常な骨吸収を行うために重要であると推測される。細胞-細胞間の膜融合は、破骨細胞の形成のみならず、ウイルス感染や受精、筋芽細胞から筋管細胞の形成時にも認められる。エキソサイトーシスやエンドサイトーシスなど、細胞内の膜融合は広く研究されているが、細胞間の膜融合機構はほとんど解明されていない。破骨細胞の研究においても、細

細胞融合機構の研究は大きく遅れている。しかし、幾つか興味深い知見も報告されているので紹介したい。

細胞間融合には、細胞膜表面の糖、コレステロールのような脂質、更に細胞外の酸性環境なども関与していると考えられている<sup>3)</sup>。倉地らは、破骨細胞間融合にマンノースが関与する可能性を指摘した<sup>4)</sup>。マウスの骨芽細胞と造血細胞の共存培養系において、マンノース残基に結合する pradimicin を培養初期(0-3日)に添加しても多核破骨細胞の形成には影響が認められないが、単核破骨細胞が融合する時期に添加すると、多核化が抑制されたという。更に、破骨細胞前駆細胞の膜表面マンノース量が、分化に伴って増大することを示し、破骨細胞の融合に細胞膜表面のマンノースが重要な役割を果たしている可能性を報告した。

また、細胞融合に関与する膜蛋白として、ADAM (a disintegrin and metalloprotease domain) が注目される。ADAM ファミリーメンバーは、metalloprotease domain, disintegrin domain, cysteine-rich domain, EGF 様リピートなど、多様なドメインを有する<sup>5)</sup>。これらの中で、インテグリンが結合する disintegrin domain は細胞融合にも関与する可能性が指摘されている。受精に関与する fertilin や筋芽細胞の融合に関与する分子として発見された meltrin も ADAM ファミリーメンバーである。meltrin は3種類のイソフォーム ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) がクローニングされている。このうち、 $\alpha$  と  $\beta$  は骨格筋と骨にのみ発現しているという<sup>6)</sup>。破骨細胞の融合に meltrin- $\alpha$  が関与する可能性が報告された<sup>7)</sup>。興味深いことは、マンノースと meltrin- $\alpha$  は、ともに融合に必要な時期にのみ発現し、融合が終了すると発現が低下することである。実際の骨表面における細胞間融合過程は不明だが、関連分子の発現が厳密に制御されていると考えられる。

細胞運動も細胞融合を考えるうえで重要である。インテグリンは、RGD 配列を認識する細胞外マトリックスの受容体で、接着と細胞運動にかかわる膜蛋白である。破骨細胞は数種類のイン

テグリンを発現している。とりわけ、 $\alpha_v\beta_3$  インテグリン (ビトロネクチンレセプター) が強く発現しているため、その役割が注目される。仲村らは、 $\alpha_v\beta_3$  インテグリンに特異的に結合する echistatin が単核破骨細胞の融合を抑制することを報告した<sup>8)</sup>。更に、M-CSF が誘導する単核破骨細胞の運動を阻害するという。このように、 $\alpha_v\beta_3$  インテグリンは細胞運動を調節し、破骨細胞の細胞融合を促進するものと考えられる。一方、インテグリンが細胞融合に直接関与している可能性も指摘される。マウスの受精では、卵表面の  $\alpha_6\beta_1$  インテグリンと精子の fertilin- $\beta$  が結合し、細胞融合が起こる<sup>9)</sup>。ADAM ファミリーメンバーとインテグリンによる異分子間相互作用は、破骨細胞の融合にも関与しているかもしれない (図2)。

単核破骨細胞の融合を直接促進する因子として、RANKL, M-CSF, IL-1, TNF $\alpha$ , LPS があげられる。転写因子 NFAT2 (NFATc1) が破骨細胞の分化を誘導することが報告され、その役割が注目されている<sup>9,10)</sup>。Ishida らは、破骨細胞に分化する初期に上昇する遺伝子として NFAT2 を見いだした<sup>9)</sup>。NFAT2 の活性化を阻害する薬物サイクロスポリン A は、RANKL が誘導する RAW264 細胞の単核破骨細胞の出現は抑制しないが多核破骨細胞の出現を抑制したという。更に、NFAT2 の antisense を RAW264 細胞に発現させると、RANKL 誘導性の TRAP-陽性単核細胞の出現は抑制されないが、多核化が抑制されることを報告した。最近、NFAT1 (NFATc2) は、IL-4 の産生の促進を介して筋芽細胞の融合を促進することが報告された<sup>11)</sup>。このように、NFAT が破骨細胞の融合過程を調節している可能性も示唆される。

### 3. 活性化による骨吸収能獲得

このようにして多核化した破骨細胞は、どのように骨吸収活性を発現するのだろうか。骨吸収を行っている破骨細胞は、骨表面に明帯 (clear zone) と波状縁 (ruffled border) を形成し、細胞極性を示す (図3)。破骨細胞は、波状縁よりプロトン (H<sup>+</sup>) と塩素イオン (Cl<sup>-</sup>) を骨面に放

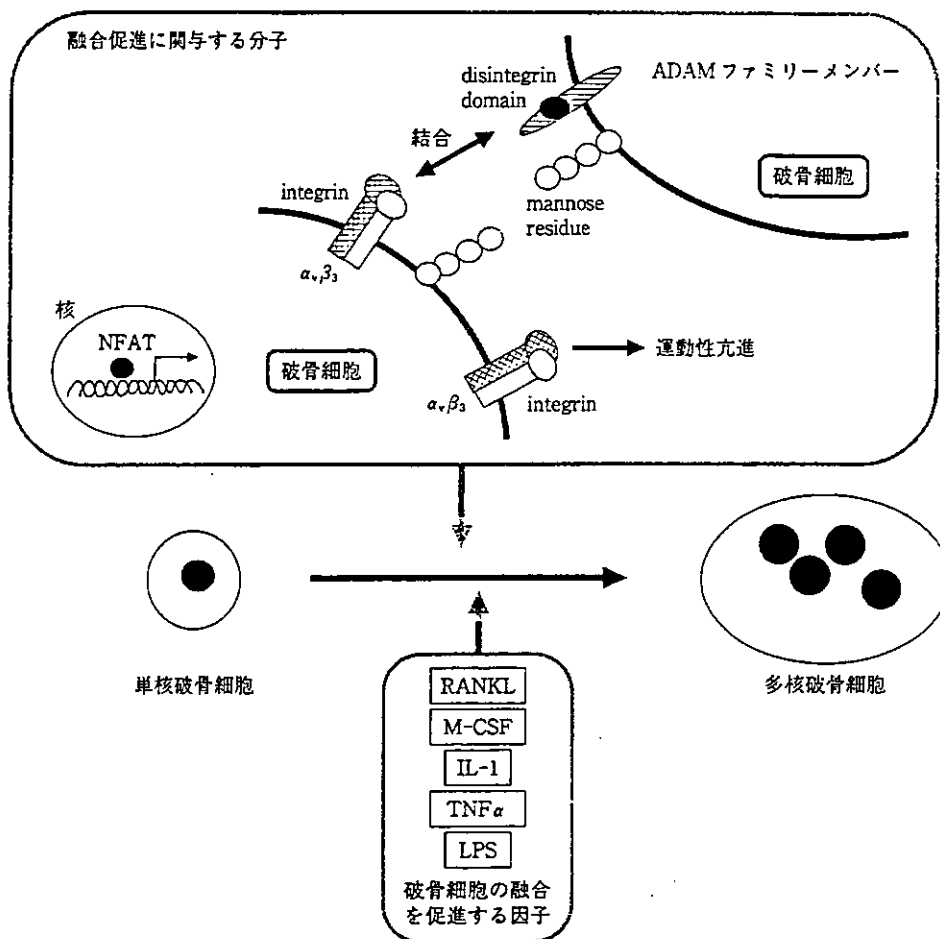


図2 破骨細胞の融合を促進する因子と融合促進に関与する分子

出し、ヒドロキシアパタイト結晶を脱灰する。そのため、波状縁にはV-ATPase(液胞型プロトン-ATPase)とClチャンネルが集積している(図4)。また、波状縁からカテプシンKなどの蛋白分解酵素も分泌され、骨基質蛋白の分解も促される。

このような骨吸収を開始するには、少なくとも2つのシグナル系が同時に作動する必要があると考えられる。接着装置ポドソームを介するシグナルとTRAF6(TNF receptor associated factor 6)を介するシグナルである(図3)。破骨細胞は、 $\alpha_v\beta_3$ インテグリンを介して骨基質に接着する。接着により、Pyk2(prolin-rich tyrosine kinase 2(focal adhesion kinase のホモロ

グ)), p130<sup>cas</sup>, p60<sup>src</sup>などが接着点にリクルートされ、接着シグナル複合体が形成される<sup>12,13</sup>。骨に接着したというシグナルは、この複合体を介し、波状縁形成誘導シグナルを細胞内に伝達する<sup>12,13</sup>。

しかし、純化した破骨細胞は、骨基質に接着させても骨吸収能を発現しないため、他のシグナルも必要であることがわかる。様々なサイトカインを検索したところ、RANKL, IL-1, LPSが、純化した破骨細胞の骨吸収(波状縁形成)を誘導することが示されている<sup>110</sup>。RANK, IL-1受容体, Toll-様受容体4(TLR4, LPS受容体)は、TRAF6を共通のシグナル伝達分子として利用することから、破骨細胞の波状縁形成には

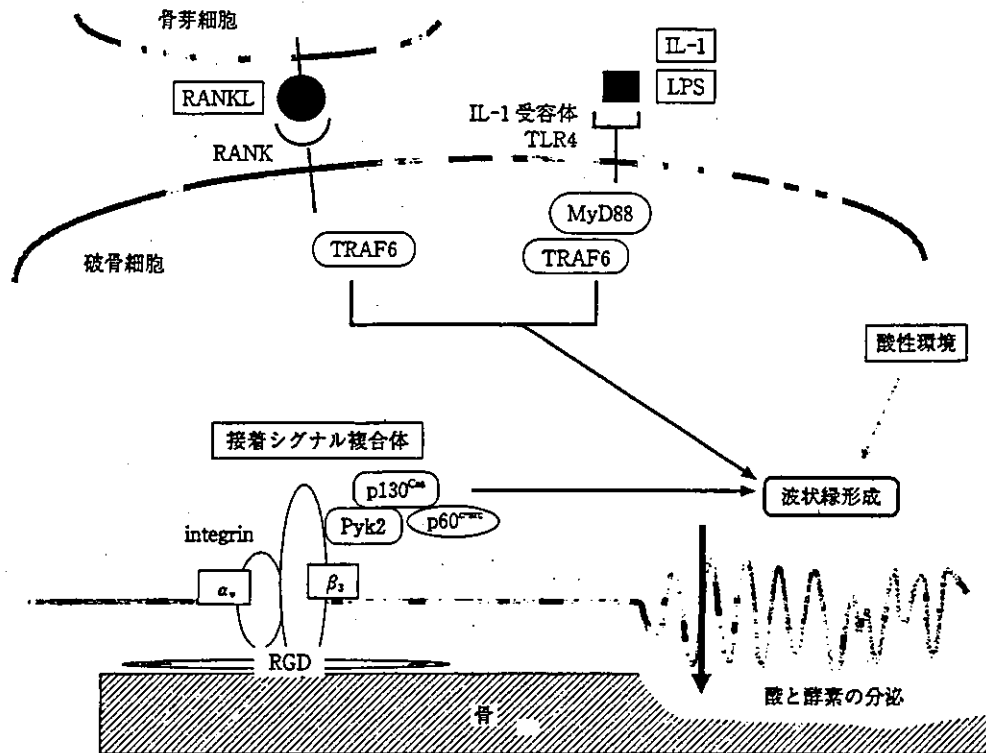


図3 波状縁形成を誘導するシグナル系

TRAF6を介するシグナルも必要と考えられる<sup>1)</sup>。

更に、骨吸収を促進する要因として、酸性環境があげられる。酸性環境は、破骨細胞の carbonic anhydrase II の mRNA の発現<sup>14)</sup>やポドソーム形成を促進し<sup>15)</sup>、V-ATPase の活性を亢進させることが報告されている。実際、酸性環境にすると吸収窩形成能が著しく増加する<sup>16)</sup>。一方、V-ATPase は Triton x-100 などの界面活性剤による可溶化に抵抗性を示し、不溶性分画に残ることから、細胞骨格によって運ばれる可能性が示唆される<sup>17)</sup>。破骨細胞に特異的に認められる V-ATPase の  $\alpha_3$  サブユニットに対する特異抗体を用いて免疫染色すると、微小管の染色像と一致する<sup>18)</sup>。V-ATPase の特異的阻害剤である bafilomycin A で破骨細胞を処理すると、酸分泌のみでなく波状縁の形成も抑制されるため、V-ATPase 活性自体が、破骨細胞の極性化に関与すると考えられる<sup>19)</sup>。 $\alpha_3$  サブユニットに異常をもつ大理石骨病マウス (oc/oc マウス) の

破骨細胞では、骨表面側への V-ATPase の集積が認められず、波状縁形成も認められない<sup>19)</sup>。このように酸分泌と波状縁形成は密接につながっているものと推察される。

#### 4. 極性化した破骨細胞の機能

Väänänen らは、骨吸収を行っている破骨細胞の機能と構造を解析し、興味ある所見を報告した<sup>20,21)</sup>。破骨細胞は、消化した蛋白を吸収小胞 (transcytotic vesicle) を形成して波状縁領域から取り込み、細胞内移送 (トランスサイトosis) を経て apical 領域から分泌しているという。彼らは、この apical 領域を functional secretory domain (機能的分泌領域: FSD) と名付けている。FSD には、ある種のウイルス蛋白が特異的に輸送されること、また吸収小胞が FSD に集積することから、他の膜領域と異なる膜構造をもつという<sup>20,21)</sup>。したがって、骨吸収を行っている破骨細胞の細胞膜は、機能的にも異な

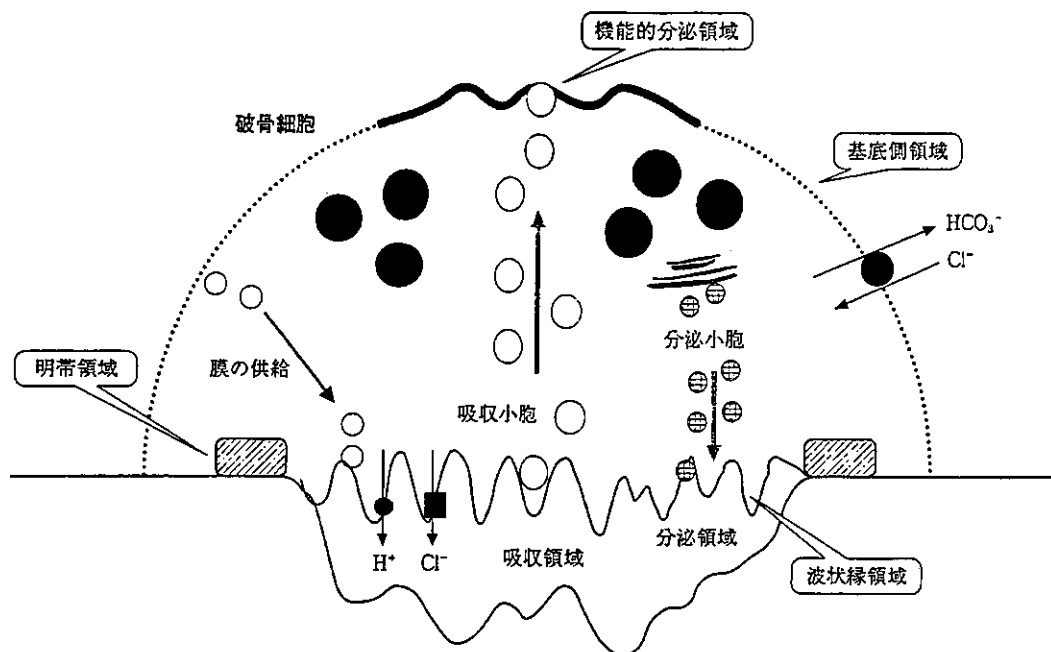


図4 骨吸収を行っている破骨細胞のもつ4つの異なる膜領域とその役割

る4つの膜領域①波状縁領域(ruffled border domain), ②明帯領域(clear zone domain), ③基底側領域(basolateral domain), ④機能的分泌領域(FSD))に分けられる(図4)。

波状縁領域は、吸収窩に面する部位に形成される複雑に入り組んだ膜ドメインで、酸や蛋白分解酵素を分泌するとともに消化した蛋白を吸収する。そのため、波状縁領域は更に分泌領域と吸収領域に分離されるという<sup>21)</sup>。

明帯領域の実体は、F-アクチンのドット(ポドソーム)がリング状に集合したものである。その機能は、接着シグナルの伝達と特定の膜環境を保持するフェンス的役割と考えられる。

基底側領域の機能は不明であるが、この部位に $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$  exchangerが存在し、持続的な酸の分泌を可能にするのであろう。また、エンドサイトーシスされるトランスフェリンレセプターの解析より、基底側領域の一部の膜は、波状縁領域に使われる可能性も指摘されている<sup>20,21)</sup>。このように骨吸収を行っている破骨細胞は高度に極性化した細胞である。破骨細胞の骨吸収機能は、それぞれの膜領域が独自の機能を果たす

ことで維持されるのであろう。

#### おわりに

以上、足早にはであったが、破骨細胞の分化から骨吸収まで順を追って見てきた。この数年の間に、破骨細胞分化と機能発現の調節機構の解明は、大きく進歩した。しかし、①RANKL, OPG, M-CSFの局在のみが、破骨細胞の形成する部位を決定するのか、②破骨細胞の分化を決定する細胞内シグナルは何か、③破骨細胞はなぜ多核化するのか、また関与する分子は何か、④破骨細胞は骨をどのように認識して骨面に波状縁を形成するのか、⑤骨吸収に関与する酸や酵素は、どのように波状縁に運ばれるか、⑥破骨細胞はどのようなシグナルを受けて骨吸収を停止するのか、⑦破骨細胞のアポトーシスはどのように調節されているのかなど、多くの問題が未解決である。今後の研究により、これらの疑問が解明され、骨粗鬆症をはじめとする骨代謝疾患の治療に貢献すると確信する。



## ■ 文 献

- 1) Takahashi N, et al: Cells of Bone: Osteoclast generation. In: Principles of Bone Biology (ed by Bilezikian JP, et al), Chapter 7, p 109-126, Academic Press, San Diego, 2002.
- 2) Takami M, et al: 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.
- 3) Vignery A: Osteoclasts and giant cells: macrophage-macrophage fusion mechanism. *Int J Exp Pathol* 81: 291-304, 2000.
- 4) Kurachi T, et al: Expression on outer membranes of mannose residues, which are involved in osteoclast formation via cellular fusion events. *J Biol Chem* 269: 17572-17576, 1994.
- 5) Huovila AP, et al: ADAMs and cell fusion. *Curr Opin Cell Biol* 8: 692-699, 1996.
- 6) Yagami HT, et al: A metalloprotease-disintegrin participating in myoblast fusion. *Nature* 377: 652-656, 1995.
- 7) Abe E, et al: Meltrin- $\alpha$ , a fusion protein involved in multinucleated giant cell and osteoclast formation. *Calcif Tissue Int* 64: 508-515, 1999.
- 8) Nakamura I, et al: Echinatin inhibits the migration of murine pre-fusion osteoclasts and the formation of multinucleated osteoclast-like cells. *Endocrinology* 139: 5182-5193, 1998.
- 9) Ishida N, et al: Large scale gene expression analysis of osteoclastogenesis in vitro and elucidation of NFAT2 as a key regulator. *J Biol Chem* 277: 41147-41156, 2002.
- 10) Takayanagi H, et al: Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts. *Dev Cell* 3: 889-901, 2002.
- 11) Horsley V, et al: IL-4 acts as a myoblast recruitment factor during mammalian muscle growth. *Cell* 113: 483-494, 2003.
- 12) Duong LT, et al: Integrin and calcitonin receptor signaling in the regulation of the cytoskeleton and function of osteoclasts. In: Principles of Bone Biology (ed by Bilezikian JP, et al), Chapter 9, p 141-150, Academic Press, San Diego, 2002.
- 13) Lakkakorpi PT, et al: PYK2 autophosphorylation, but not kinase activity, is necessary for adhesion-induced association with c-Src, osteoclast spreading, and bone resorption. *J Biol Chem* 278: 11502-11512, 2003.
- 14) Biskobing DM, Fan D: Acid pH increases carbonic anhydrase II and calcitonin receptor mRNA expression in mature osteoclasts. *Calcif Tissue Int* 67: 178-183, 2000.
- 15) Teti A, et al: Extracellular protons acidify osteoclasts, reduce cytosolic calcium, and promote expression of cell-matrix attachment structures. *J Clin Invest* 84: 773-780, 1989.
- 16) Arnett TR, Dempster DW: Effect of pH on bone resorption by rat osteoclasts in vitro. *Endocrinology* 119: 119-124, 1986.
- 17) Nakamura I, et al: Lack of vacuolar proton ATPase association with the cytoskeleton in osteoclasts of osteosclerotic (oc/oc) mice. *FEBS Lett* 401: 207-212, 1997.
- 18) Toyomura T, et al: Three subunit isoforms of mouse vacuolar H<sup>(+)</sup>-ATPase. Preferential expression of the  $\alpha$ 3 isoform during osteoclast differentiation. *J Biol Chem* 275: 8760-8765, 2000.
- 19) Sahara T, et al: Specific biological functions of vacuolar-type H<sup>+</sup>-ATPase and lysosomal cysteine proteinase, cathepsin K, in osteoclasts. *Anat Rec* 270: 152-161, 2003.
- 20) Väänänen K, Zhao H: Osteoclast function: Biology and mechanisms. In: Principles of Bone Biology (ed by Bilezikian JP, et al), Chapter 8, p 127-140, Academic Press, San Diego, 2002.
- 21) Mulari MT, et al: Osteoclast ruffled border has distinct subdomains for secretion and degraded matrix uptake. *Traffic* 4: 113-125, 2003.

## Comparison of the activities of multinucleated bone-resorbing giant cells derived from CD14-positive cells in the synovial fluids of rheumatoid arthritis and osteoarthritis patients

H. Takano<sup>1,2</sup>, T. Tomita<sup>1</sup>, T. Toyosaki-Maeda<sup>3</sup>, M. Maeda-Tanimura<sup>3</sup>,  
H. Tsuboi<sup>1</sup>, E. Takeuchi<sup>1</sup>, M. Kaneko<sup>1</sup>, K. Shi<sup>1</sup>, K. Takahi<sup>1</sup>, A. Myoui<sup>1</sup>,  
H. Yoshikawa<sup>1</sup>, T. Takahashi<sup>2</sup>, R. Suzuki<sup>4</sup> and T. Ochi<sup>1,4</sup>

**Objective.** To investigate the morphology and function of multinucleated bone-resorbing giant cells derived from CD14-positive cells in the synovial fluids (SF) of patients with rheumatoid arthritis (RA) or osteoarthritis (OA).

**Methods.** CD14-positive cells were obtained by magnetic-activated cell sorting of primary cultures of mononuclear cells from the SF. Multinucleated bone-resorbing giant cells were induced from the CD14-positive cells in the presence or absence of cytokines. We examined various characteristics, including osteoclast markers, fusion index and bone-resorption activities of the multinucleated giant cells.

**Results.** Multinucleated giant cells were induced from the CD14-positive cells in the SF of the RA and OA patients by the addition of interleukin (IL)-3, IL-5 and IL-7, or granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), respectively. These multinucleated giant cells were positive for tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP), carbonic anhydrase II, actin, vitronectin receptor and the calcitonin receptor. However, the average values for the number of nuclei, fusion index and bone-resorption functions of the SF cells from the RA patients were significantly higher than those derived from the OA patients.

**Conclusion.** These results suggest that the induction and activities of multinucleated bone-resorbing giant cells may play a pivotal role in bone destruction, and that these processes may be enhanced significantly in RA patients.

**KEY WORDS:** Rheumatoid arthritis, Synovial fluid, CD14-positive cell, Osteoclast.

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic inflammatory disease that is characterized by invasive synovial hyperplasia, which leads to progressive destruction of the joint. Although the precise mechanism of joint destruction has not yet been elucidated, osteoclasts appear to play a pivotal role in the joint destruction seen in RA patients. Osteoclasts are multinucleated bone-resorbing cells that are derived from CD34-positive haematopoietic stem cells [1–3]. Osteoclasts in the RA joint actively resorb bone at the site at which the proliferating synovial membrane invades the adjacent bone [4]. The osteoclast progenitors are members of the monocyte/macrophage lineage [1], and they differentiate into the mononuclear precursors of osteoclasts (preosteoclasts) [1, 5, 6]. The mononuclear preosteoclasts express tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP), which is not produced by peripheral blood monocytes [7]. Mature osteoclasts are generated by the fusion of these mononuclear preosteoclasts, while they are in close contact with stromal cells in the bone marrow [1, 8–10]. Rheumatoid synovial fibroblasts participate in bone destruction by inducing osteoclastogenesis [11–13]. Bone-resorptive cytokines, such as tumour necrosis factor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), interleukin 1 (IL-1), IL-6 and soluble IL-6 receptor (sIL-6R) in the synovial fluid or in the serum are reportedly involved in the immune responses and activation of inflammation seen in RA patients [14–20]. High levels of IL-6 and

sIL-6R, IL-17 and fibroblast growth factor (FGF)-2 in the synovial fluids of patients with RA appear to enhance osteoclastogenesis and promote joint destruction [21–23].

Nurse cells were first described in 1980 [24, 25] and are believed to play an important role in the differentiation, maturation and apoptosis of murine thymocytes [26–28]. Thymocytes initially adhere to thymic nurse cells and then crawl underneath them in a process that is referred to as pseudoemperipolesis. We reported previously on the presence of nurse-like cells in the synovial tissues and bone marrow of patients with RA, and suggested an important role for these cells in the pathogenesis of RA [29–31].

Recently, we reported that multinucleated bone-resorbing osteoclast-like cells were generated from peripheral monocytes that differentiated into TRAP-positive mononuclear cells when induced by RA nurse-like cells (RA-NLCs) [32]. In addition, certain cytokines in the synovial fluids (SF) of RA patients are responsible for osteoclast-like cell formation. We detected TRAP-positive mononuclear cells, which differentiated into multinucleated bone-resorbing giant cells, in the SF of patients with RA [32]. Although the presence of the bone-resorbing cells in RA joints is well known, the characteristics and functions of multinucleated bone-resorbing giant cells remain unknown. In the present study, we evaluated differences between RA and OA patients in the

<sup>1</sup>Department of Orthopaedic Surgery, Osaka University Graduate School of Medicine, 2-2 Yamada-oka, Suita, Osaka 565-0871, <sup>2</sup>Second Department of Oral and Maxillo-facial Surgery, Kyushu Dental College, 2-6-1 Manazuru, Kokurakita-ku, Kitakyushu, Fukuoka 803-8580, <sup>3</sup>Research Unit of Immunology, Shionogi Institute for Medical Science, Shionogi & Co., Ltd, 2-5-1, Mishima, Settu, Osaka 566-0022 and <sup>4</sup>Clinical Research Center for Allergy and Rheumatology, National Sagami Hospital, 18-1 Sakura-dai, Sagami, Kanagawa 228-8522, Japan.

Submitted 23 March 2003; revised version accepted 17 October 2003.

Correspondence to: T. Ochi. E-mail: t-ochi@sagamihara-hosp.gr.jp

morphology and function of multinucleated bone-resorbing giant cells, which were derived from CD14-positive monocyte-like cells in their SF.

## Patients and methods

### Patients

Seven patients with RA (seven women) and five patients with OA (two men and three women) participated in this study. All of the patients were treated at Osaka University Hospital or affiliated facilities. The average ages of the RA and OA patients were  $52.8 \pm 6.1$  and  $66.0 \pm 6.0$  yr, respectively. The diagnosis of RA was based on the 1987 revised criteria of the American College of Rheumatology (formerly, the American Rheumatism Association) [33], and that of OA was based on clinical and radiological features.

### Cell numbers and surface antigen analysis

Synovial fluid was obtained from the knee joints of RA and OA patients by aspiration with an 18-gauge needle under aseptic conditions. Full informed consent was obtained from the patients for sample aspiration and all of the subsequent procedures. The joint-infiltrating cells in the SF of the RA and OA patients were collected by centrifugation at 1900 g. The cells were counted using a haemocytometer, whereby dead cells that were stained with trypan blue were excluded.

The surface markers of the cells in the SF samples were examined by staining with monoclonal antibodies (mAbs). In this study, we used fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-human mAbs that were specific for CD4, CD8, CD15 or CD19 (all from Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), and phycoerythrin (PE)-conjugated anti-human mAbs that were specific for CD14, CD16 or HLA-DR (all from Becton Dickinson). The mononuclear cells (100 000) were incubated at 4°C for 30 min with 1 mg/ml of the FITC- or PE-conjugated mAbs. After washing twice with phosphate-buffered saline (PBS), the cells were analysed by flow cytometry using FACScan (Becton Dickinson), and the individual cell surface antigens were quantified. Dead cells were eliminated by propidium iodide staining, and excluded from the analysis by setting the scatter gates. The data were analysed using the CellQuest software (Becton Dickinson).

### Mononuclear cell culture from the synovial fluid

The joint-infiltrating cells in the SF samples from RA and OA patients were collected as described previously [32]. Briefly, the cells were collected by centrifugation at 1900 g, and cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Gibco BRL, Gaithersburg, MD) that was supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS; Gibco BRL) and 100 U/ml of penicillin-streptomycin (Gibco BRL) (Maintenance Medium; MM), and seeded into 6-well flat-bottomed culture plates (Becton Dickinson, Mountain View, CA). The cells were maintained at 37°C in humidified air that contained 7% CO<sub>2</sub>, and half of the medium was changed weekly. After 3 to 5 weeks of culture, most of the lymphocytes and granulocytes had disappeared, and the monocyte-like cells that floated on the fibroblast-like cells, which adhered to the bottom of the culture plate, predominated. The non-adherent cells were harvested and the CD14-positive monocyte-like cells were purified from these non-adherent cells using the magnetic-activated cell sorter (MACS; Miltenyi Biotec GmbH, Germany) and magnetic beads that were conjugated with the anti-CD14 antibody, according to the manufacturer's instruction.

### Formation of multinucleated bone-resorbing giant cells from CD14-positive monocyte-like cells

A total of 50 000 CD14-positive monocyte-like cells were cultured in MM for 96 h at 37°C and 7% CO<sub>2</sub> in 4-well chamber slides (Lab-Tek Chamber Slide System; Nalge Nunc International, IL), in the presence or absence of the following reagents: recombinant human (rh) interleukin (IL)-3, IL-5 and IL-7; granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF); a combination of macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) and the receptor activator of nuclear-factor- $\kappa$ B ligand (RANKL); or in the presence of 10% conditioned medium (CM). The optimal concentration of each cytokine was determined in preliminary experiments.

The frequency of multinucleated giant cell formation was calculated as the fusion index, which has been described previously [34]. Briefly, a minimum of 1000 nuclei within TRAP-positive multinucleated giant cells (>4 nuclei/cell) were counted. The fusion indices of the cells were calculated according to the following formula:

$$\text{Fusion index (\%)} = \frac{\text{total number of nuclei within the multinucleated (>4 nuclei/cell) cells}}{\text{total number of nuclei counted}} \times 100$$

### Cytochemical and immunocytochemical staining

At the end of culture period, the cells were stained with May-Grunwald-Giemsa and for the tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP). TRAP staining was performed with a staining kit (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) in accordance with the manufacturer's instruction. May-Grunwald-Giemsa staining involved a 5-min incubation with a 1:1 dilution of May-Grunwald solution (Merck, Darmstadt, Germany), followed by a 10-min incubation with 1:20 dilution of Giemsa solution (Merck).

The multinucleated giant bone-resorbing cells, which differentiated from CD14-positive monocyte-like cells, were fixed with cold acetone, and stained immunocytochemically with rabbit polyclonal antibodies that were specific for actin (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA), carbonic anhydrase II (Rockland, Gilbertsville, PA) or the vitronectin receptor (Chemicon International Inc., Temecula, CA), or with a goat polyclonal antibody that was specific for the calcitonin receptor (Santa Cruz Biotechnology).

### Cytokines and reagents

rhIL-3, IL-5, GM-CSF and M-CSF were purchased from R&D Systems (Minneapolis, MN). rhIL-7 was obtained from Genzyme Corporation (Cambridge, MA), and the receptor activator of nuclear-factor- $\kappa$ B ligand (RANKL) was purchased from Peprotech (London, UK). CM were prepared as reported previously [35]. Briefly, a mixture of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from 10 healthy donors was stimulated with phytohaemagglutinin (PHA; Sigma) at 37°C for 72 h. The culture supernatant fluids were collected, filtered and used as conditioned media.

### Bone resorption assays

To determine the resorption activities of the TRAP-positive giant cells, 70 000 CD14-positive monocyte-like cells were cultured on dentin slices that were placed in 4-well chamber slides in medium with different cytokines or CM for 14 days. The cells on the dentin slices were removed by brushing in distilled water, cleaned by ultrasonication to remove adherent cells, and stained with haematoxylin (Sigma). The resorption pits were counted under a microscope. As an alternative method for analysing bone resorption, the CD14-positive monocyte-like cells were cultured on

calcium phosphate-coated discs (Osteologic; Millenium Biologic Inc., Ontario, Canada) using the culture conditions described above. After 14 days of incubation, the discs were washed in 6% NaClO and 5.2% NaCl to remove the cells, dried, and examined by phase-contrast microscopy. The resorbed area on each disc was measured using the MacSCOPE image analyser (Mitani Corp., Fukui, Japan).

### Statistical analysis

The values are presented as the means  $\pm$  standard deviation (S.D.). Statistical analysis was performed using the non-parametric Mann-Whitney *U*-test. *P* values of  $>0.05$  were considered to be statistically significant.

## Results

### Numbers and cell surface markers of joint-infiltrating cells in the RA and OA patients

In order to evaluate the absolute number of joint-infiltrating cells in the SF, the cells were collected and counted. The average number of cells in the SF of the RA patients was  $11 \pm 7.8 \times 10^5/\text{ml}$ , and that of the OA patients was  $7.3 \pm 3.9 \times 10^4/\text{ml}$ . There was a significant increase in the average number of cells in the SF of RA patients, as compared with the SF of OA patients ( $P < 0.01$ ). FACSscan analysis was performed to examine the cell surface phenotype of the joint-infiltrating cells. The cells in the RA and OA SF samples were positive for HLA-DR, and weakly positive for CD4, CD8 and CD16. The percentage of CD4-positive cells in the RA-SF was significantly higher than in the OA-SF (RA-SF,  $39.2 \pm 8.6\%$  vs OA-SF,  $18.1 \pm 9.3\%$ ;  $P < 0.05$ ). The only significant difference between the RA and OA patients was in the levels of CD4-positive cells in their SF.

### Differentiation of cultured CD14-positive monocyte-like cells into multinucleated bone-resorbing giant cells

The non-adherent cells were harvested after 4 weeks of primary culture, and the CD14-positive cells were collected using MACS with magnetic beads that were conjugated to the anti-CD14 antibody. The purity of the CD14-positive cells was  $>98\%$ , as assessed by FACS analysis (data not shown). The CD14-positive monocyte-like cells from the RA-SF and OA-SF samples were cultured with IL-3 in the absence of fibroblast-like cells. These cells differentiated into multinucleated bone-resorbing giant cells (Fig. 1A and C). However, the numbers of cell nuclei differed among the two groups of patients. We counted the nuclei in all of the multinucleated cells that had five nuclei or more. The average number of nuclei was significantly higher in the RA group (RA,  $24.66 \pm 6.06$  nuclei vs OA,  $11.2 \pm 2.61$  nuclei;  $P < 0.05$ ) (Fig. 2). These multinucleated cells were positive for TRAP (Fig. 1B and 1D), and resorption pits were observed on dentin slices (Fig. 3A and B) and on Osteologic discs (Fig. 4A and B). The multinucleated cells were positive for carbonic anhydrase II, actin, vitronectin receptor and calcitonin receptor (Fig. 5). The average positive percentage of calcitonin receptor in TRAP-positive multinucleated cells was  $90.69 \pm 7.2\%$ , and TRAP-positive mononuclear cells were calcitonin receptor negative. IL-5, IL-7, GM-CSF and a combination of RANKL and M-CSF also induced the differentiation of CD14-positive monocyte-like cells into multinucleated cells. These cells were also positive for TRAP, and had the same functions and characteristics (data not shown). In the presence of each of the cytokines, the fusion index of the multinucleated cells, which were derived from the CD14-positive monocyte-like cells from the RA-SF, was significantly higher than that of the OA-SF ( $P < 0.05$ ). Interestingly, the CD14-positive cells that were cultured with a mixture of RANKL and M-CSF exhibited lower fusion indices than cells that were treated with IL-3 (Fig. 6). These results were confirmed in three separate experiments, using various concentrations of the cytokines. The

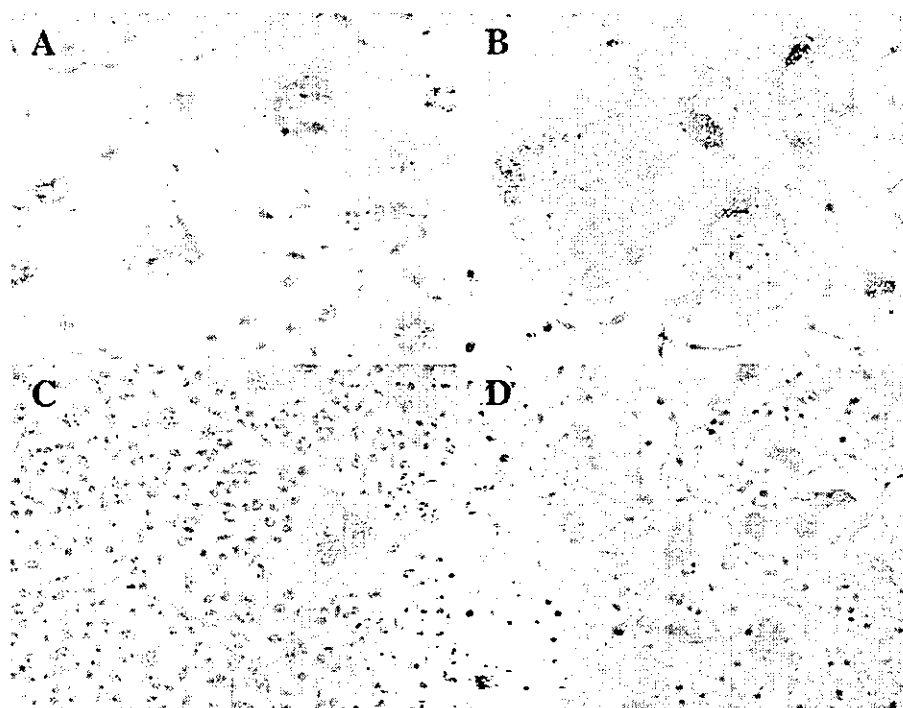


FIG. 1. Morphological examination of multinucleated giant cells that were derived from CD14-positive cells from the RA-SF or OA-SF. The CD14-positive monocyte-like cells were cultured with IL-3 (1 ng/ml). (A, C) May-Grunwald-Giemsa staining and (B, D) TRAP staining of multinucleated giant cells. Multinucleated giant cells from the RA-SF were bigger and had more nuclei compared with those from the OA-SF. Original magnification  $\times 100$ .