

transcriptase (RT; Lifetech Oriental, Tokyo, Japan). Reaction mixtures without the RT were also prepared and used as negative controls. An aliquot of each cDNA synthesis reaction mixture was diluted and used for real-time Polymerase chain reaction (PCR) quantitation. An equal volume of aliquot from each cDNA was mixed, serially diluted, and used as standard cDNAs. TaqMan probes/primers for RANKL, OPG, IL-7 and 18S rRNA, and PCR enzyme mix for real-time PCR were purchased from Applied Biosystems Japan (Tokyo, Japan). The real-time PCR quantitation was performed in triplicate by using a GeneAmp SDS5700 and GeneAmp SDS5700 software (Applied Biosystems Japan) according to the instruction manuals. The relative amount of target was calculated from standard curves generated in each PCR, and quantitation data with a coefficient of variance (CV) less than 10% were used for further analyses. Each calculated mRNA amount was standardized by reference to 18S rRNA. Data were expressed as the mean ratio to the control value  $\pm$  SD, as described in the figure legends.

## ELISA

The femurs and tibias were punctured at the epiphysis with a 22-G needle, and the fluids as well as bone marrow cells in the bones were flushed out by centrifugation (3000g) for 30s. Total volume of the flushed-out bone marrow cell suspension from one mouse (two femurs and two tibias) was adjusted to 150  $\mu$ l with  $\alpha$ -MEM and further centrifuged at 1000g for 3 min. The supernatant was harvested as bone fluid. The amount of soluble RANKL or IL-7 in each bone fluid and blood sample was measured by using a Quantikine M kit (R & D Systems, Minneapolis, MN, USA) according to the instruction manual.

## Bone marrow cell cultures

The bone marrow cells ( $1 \times 10^5$ ) were seeded into each well of 96-well plates and cultured in  $\alpha$ -MEM containing 10% FBS, macrophage-colony stimulating-factor (M-CSF; 5 ng/ml, R & D systems), soluble RANKL (5 ng/ml; R & D Systems), and various concentrations of IL-7 (0–30 ng/ml; R & D Systems) for 4–5 days. In other experiments, the cells were cultured in  $\alpha$ -MEM containing 10% FBS, M-CSF (5 ng/ml), and various concentrations of IL-7 (0–30 ng/ml) for 3–4 days, followed by further cultivation with M-CSF (5 ng/ml) and soluble RANKL (5 ng/ml) for 3 days. After cultivation, the cells were stained for tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) activity using a leukocyte acid phosphatase kit (Sigma-Aldrich Japan, Tokyo, Japan). The TRAP<sup>+</sup> multinucleated cells (MuNCs) containing three or more nuclei were counted under an inverted microscope.

## Cocultures of bone marrow cells and stromal cells

The stromal layer was prepared by culturing MC3T3-G2/PA6 or ST2 cells as previously described [20]. The bone

marrow cells ( $1 \times 10^4$ ) were seeded onto the stromal layer and cocultured in  $\alpha$ -MEM containing 10% FBS and various concentrations of IL-7 (0–30 ng/ml) for 3 days, followed by further cultivation with PGE<sub>2</sub> (0.5–2  $\mu$ g/ml) or 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> ( $0.5-1 \times 10^{-8}$  M) for 7 days. In other experiments, the cells were cocultured in  $\alpha$ -MEM containing 10% FBS, PGE<sub>2</sub> (0.5–2  $\mu$ g/ml), or 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> ( $0.5-1 \times 10^{-8}$  M) and various concentrations of IL-7 (0–30 ng/ml) for 7 days. After cultivation, TRAP<sup>+</sup> MuNC formation was evaluated as already described.

## Unfractionated bone cell cultures

Unfractionated bone cells were prepared as previously described [20,25]. Briefly, the long bones of 12-day-old ddy mice were minced into small fragments, and cells were released from the fragments in  $\alpha$ -MEM containing 5% FBS by vigorous agitation using a vortex mixer. After sedimentation of the bone fragments, the supernatant was used as the unfractionated bone cell suspension. Although bone marrow cells flushed from long bones contain virtually no TRAP<sup>+</sup> osteoclasts and few stromal cells, the unfractionated bone cell population contains osteoclasts approximately 0.01%–0.05% of the total cell number and a large number of osteoblasts/stromal cells [25], as evidenced by cytospin examination and by the fact that unfractionated bone cells seeded and cultured at a high density ( $5 \times 10^5$  per each well of 96-well plate) on dentin slices start to form resorption pits in the absence of osteoclastogenic factors within 2 days [25]. The unfractionated bone cells ( $5 \times 10^4$  cells) were seeded into each well of 96-well plates and cultured in  $\alpha$ -MEM containing 5% FBS with the indicated factors for 4 days. Then the medium was exchanged for fresh medium containing the factors, and the cells were further cultured for another 4 days. TRAP<sup>+</sup> MuNC formation was evaluated as already described. After culturing the cells for the initial 4 days, only a few cells were TRAP<sup>+</sup> and virtually no TRAP<sup>+</sup> cells were found at the end of the culture when the cells were cultured in the absence of osteoclastogenic factors. Therefore, TRAP<sup>+</sup> cells at the end of the culture period were considered newly formed TRAP<sup>+</sup> cells. These newly formed TRAP<sup>+</sup> MuNCs have various characteristics of bona fide osteoclasts such as calcitonin receptors and bone-resorbing activity [25].

## Frequency analysis of clonogenic osteoclast precursors

Frequency analysis of clonogenic osteoclast precursors in unfractionated bone cells pretreated with test factors was performed based on a limiting dilution assay [20,26] with some modifications. The unfractionated bone cells were seeded into each well of 96-well plates at 1, 15, or 50 cells per well and precultured for 4 days in  $\alpha$ -MEM containing 5% FBS and M-CSF (5 ng/ml) with or without IL-7 (10 ng/ml). The cells were then washed with  $\alpha$ -MEM, further cultured for 3 days in  $\alpha$ -MEM containing 5% FBS, M-CSF (5 ng/ml), and soluble RANKL (5 ng/ml), and then stained for TRAP. The wells containing TRAP<sup>+</sup> MuNCs were

counted as osteoclast positive. Plates with appropriate numbers of osteoclast-positive wells (6–20 wells in 96 wells) from each experimental group were selected, and 1/frequency of osteoclast precursors was calculated according to the formula  $1/\text{frequency} = N/[\ln\{T/(T-P)\}]$ , where  $N$  is the number of cells seeded in a well (1, 15, or 50 cells),  $T$  is the number of wells per group (96 wells), and  $P$  is the number of osteoclast-positive wells. In preliminary experiments, we observed that no TRAP<sup>+</sup> MuNCs are formed when cells are pre-cultured in the absence of M-CSF and found no effects of treatment with higher doses of soluble RANKL (10 ng/ml) and M-CSF (10 ng/ml) on frequency.

### Statistical analysis

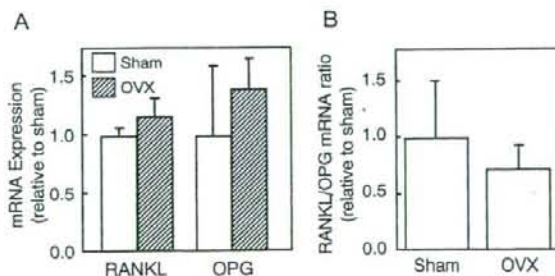
Statistical significance was determined by one-way analysis of variance (ANOVA) and Fisher's probable least squares difference test. For the analysis of IL-7 quantitation, the Mann-Whitney  $U$  test was used (see Fig. 4B). A value of  $P < 0.05$  was considered statistically significant.

## Results

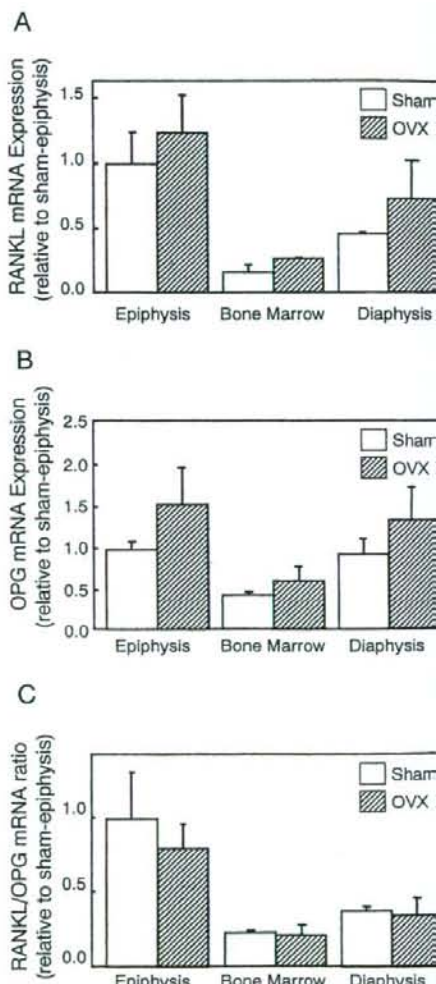
### Quantitation of RANKL and OPG mRNA expressions in femurs

Bone resorption as well as the number of osteoclasts in femurs is already increased at 14 days after OVX [27]. To evaluate the effects of estrogen withdrawal on the expression of RANKL and OPG mRNA, we quantitated the expression of each in femurs at 7–9 days after the surgery. As shown in Fig. 1A, OVX did not significantly stimulate RANKL mRNA expression in the femurs. Similarly, OPG mRNA expression was not significantly altered, resulting in no substantial change in the RANKL/OPG mRNA ratio (Fig. 1B). Similar results were obtained when we examined the animals 4–5 days after the surgery (data not shown). Because many of the osteoclasts reside in the epiphysis, but not so many in the diaphysis and virtually none in the

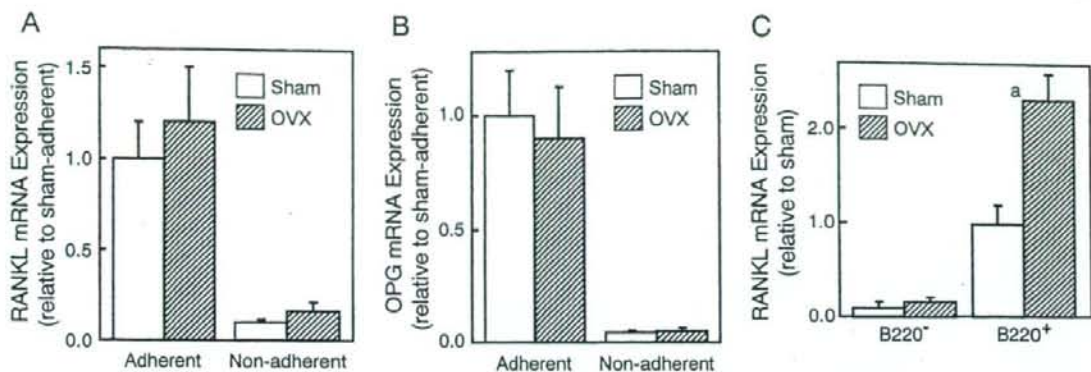
flushed-out bone marrow, regulation of RANKL and OPG expression may be different at each site. Therefore we divided femurs into the three parts and quantitated the expression individually. RANKL mRNA was highly expressed in the epiphysis compared with its expression in the diaphysis and flushed-out bone marrow (Fig. 2A). OPG mRNA was highly expressed in both the epiphysis and diaphysis (Fig. 2B). OVX did not alter either expression significantly (Fig. 2A,B) and resulted in no substantial change in the RANKL/OPG mRNA ratio in any part of the femur (Fig. 2C).



**Fig. 1.** A Quantitation of relative amount of RANKL mRNA (*RANKL*) and osteoprotegerin (OPG) mRNA (*OPG*) expressed by femurs 7–9 days after sham operation (*Sham*) or ovariectomy (*OVX*). B Ratio of RANKL mRNA/OPG mRNA. Data are expressed as relative to sham (mean  $\pm$  SD of 10–12 mice)



**Fig. 2.** Quantitation of relative amount of RANKL mRNA (A) and OPG mRNA (B) expressed in the epiphysis, flushed-out bone marrow and diaphysis 7–9 days after sham-operation (*Sham*) or ovariectomy (*OVX*). C Ratio of RANKL mRNA/OPG mRNA. Data are expressed as relative to sham epiphysis (mean  $\pm$  SD of 7–9 mice)



**Fig. 3.** Quantitation of relative amount of RANKL mRNA (A) and OPG mRNA (B) expressed by adherent or nonadherent cells separated by 24-h cultivation of bone marrow cells from sham-operated (Sham) or ovariectomized (OVX) mice 7 days after surgery. C

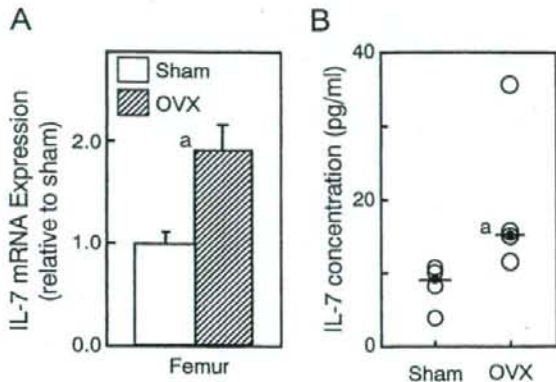
Quantitation of relative amount of RANKL mRNA expressed by B220<sup>-</sup> and B220<sup>+</sup> cells purified from nonadherent cells. Data are expressed as relative to sham (mean  $\pm$  SD of 6 mice). \* $P$  < 0.05 (vs. sham mice)

#### Quantitation of RANKL and OPG mRNAs expressed by adherent bone marrow osteoblasts/stromal cells and nonadherent lymphohematopoietic cells

To further analyze the effect of OVX on RANKL and OPG mRNA expressions by sub-populations of cells in bone marrow, adherent stromal cells and nonadherent lymphohematopoietic cells were separated by culturing bone marrow cells for 24h and subjected to mRNA quantitation. As shown in Fig. 3A,B, bone marrow stromal cells expressed RANKL and OPG mRNAs at levels more than five times higher compared with nonadherent lymphohematopoietic cells, and OVX did not upregulate either mRNA expression. The nonadherent cells slightly, but not significantly, increased RANKL mRNA expression by OVX. As we previously demonstrated the enhanced expression of RANKL by B220<sup>+</sup> cells freshly isolated from ovariectomized mice [10], we checked RANKL mRNA expression by B220<sup>+</sup> cells isolated from nonadherent cells after 24-h cultivation. The results showed that B220<sup>+</sup> cells from ovariectomized mice expressed an amount of RANKL mRNA approximately twofold larger compared with that of sham-operated mice (Fig. 3C). Because the amount of RANKL mRNA expression by nonadherent cells, which include B220<sup>+</sup> cells, is less than one-tenth of that of total bone marrow cells, it seems that the increased RANKL mRNA expression by B220<sup>+</sup> cells does not significantly affect the amount of RANKL mRNA expression by total bone marrow cells. Taken together, it is suggested that RANKL and OPG mRNA expressed by the adherent cells including stromal cells is not significantly affected by estrogen deficiency.

#### Quantitation of IL-7

Because IL-7 was reported to be an important mediator of estrogen-deficiency induced bone resorption [15], we determined whether IL-7 would be increased by OVX. Consistent with a previous report [15], we found that the

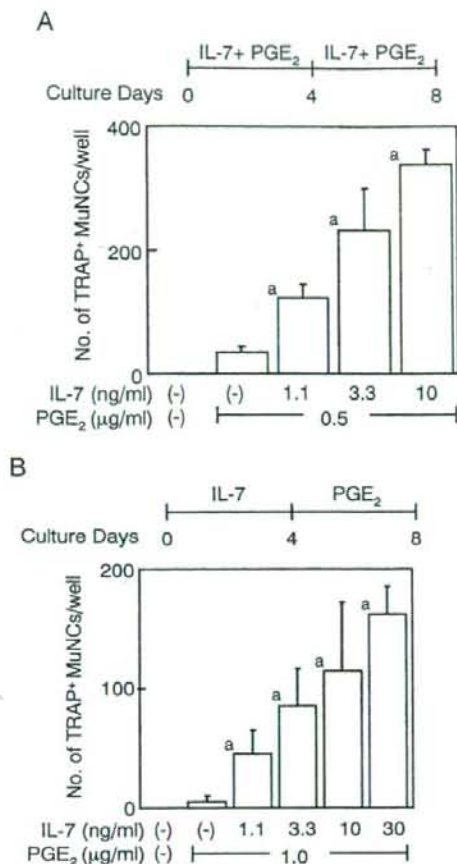


**Fig. 4.** A Quantitation of relative amount of interleukin 7 (IL-7) mRNA expressed by femurs 7 days after sham operation (Sham) or ovariectomy (OVX). Data are expressed as relative to sham (mean  $\pm$  SD of 8 mice). \* $P$  < 0.05 (vs. Sham). B Quantitation of IL-7 in bone fluids 7 days after sham operation (Sham) or ovariectomy (OVX). Bar indicates median value of each group (4 mice per group). \* $P$  < 0.05 (vs. Sham)

amounts of IL-7 mRNA in bone as well as IL-7 concentration in bone fluid were significantly increased at 7 days after OVX (Fig. 4A,B).

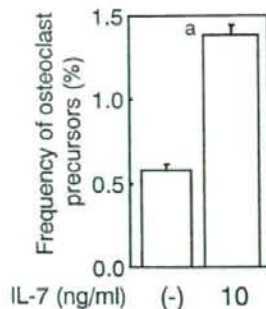
#### Effect of IL-7 on osteoclastogenesis in unfractionated bone cell cultures

The foregoing results suggesting that IL-7, but not stromal cell-derived RANKL, increased by estrogen deficiency prompted us to examine the effects of IL-7 on osteoclastogenesis. As it has been shown that IL-7 does not stimulate osteoclastogenesis in cultures of flushed-out bone marrow cells [24], we tested several culture systems including cocultures of bone marrow cells and stromal cells (ST2



**Fig. 5.** Effects of IL-7 on osteoclastogenesis in cultures of unfractionated bone cells. **A** Unfractionated bone cells were treated with the indicated doses of IL-7 plus prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) for 8 days. **B** The bone cells were treated with indicated doses of IL-7 for 4 days, followed by treatment with the indicated dose of PGE<sub>2</sub> for 4 days. Data are expressed as the mean  $\pm$  SD of 4 wells. \**P* < 0.05 [vs. IL-7 (-) + PGE<sub>2</sub> (0.5 μg/ml or 1.0 μg/ml)]

cells or MC3T3-G2/PA6 cells) and cultures of bone marrow cells. In all culture systems we tested, neither IL-7 in combination with PGE<sub>2</sub> or 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (for cocultures) nor IL-7 in combination with M-CSF and soluble RANKL (for bone marrow cell cultures) could stimulate osteoclastogenesis (data not shown). Therefore, we utilized unfractionated bone cell cultures, which contain the cells attached tightly to the bone surfaces (see Materials and methods). We found that IL-7 alone does not affect osteoclastogenesis (data not shown), and that addition of PGE<sub>2</sub> (0.5 μg/ml) alone slightly stimulates formation in unfractionated bone cell cultures (Fig. 5A). When the bone cells were treated with IL-7 (0–10 ng/ml) in the presence of PGE<sub>2</sub> (0.5 μg/ml), IL-7 stimulated osteoclastogenesis dose-dependently. To clarify the effect of IL-7, we first pretreated the unfractionated bone cells with IL-7 for 4 days before PGE<sub>2</sub> (1.0 μg/ml) treatment to induce RANKL production. Pretreatment of



**Fig. 6.** Frequency analysis of clonogenic osteoclast precursors in unfractionated bone cells pretreated with M-CSF in the absence (-) or presence of 10 ng/ml IL-7. Data are expressed as the mean  $\pm$  SD from three experiments. \**P* < 0.05 [vs. IL-7 (-)]

unfractionated bone cells with IL-7 alone (0–10 ng/ml) augmented osteoclastogenesis induced by PGE<sub>2</sub> even in the absence of IL-7 (Fig. 5B). It should be noted that in this sequential treatment RANKL mRNA expression stimulated by PGE<sub>2</sub> was not significantly affected by the pretreatment of IL-7 (data not shown). These data suggest that IL-7 could stimulate osteoclastogenesis without affecting PGE<sub>2</sub>-induced RANKL mRNA expression, at least in the unfractionated bone cell cultures.

#### Effect of IL-7 on frequency of clonogenic osteoclast precursors in cultures of unfractionated bone cells

A possible mechanism to stimulate osteoclastogenesis by IL-7 is that IL-7 augments the number of osteoclast precursors. To explore this possibility, we examined the effect of IL-7 on M-CSF-induced generation of osteoclast precursors by using frequency analysis. Theoretically, single unfractionated bone cells are pretreated with M-CSF alone or M-CSF plus IL-7 for 4 days and then the osteoclastogenic potential of the cells generated by the pretreatment is evaluated by stimulation with M-CSF plus soluble RANKL. The advantage of this assay is that even if the production profile of cytokines such as M-CSF, TNF- $\alpha$ , and RANKL varies between the presence or absence of IL-7 during the pretreatment, because very small numbers of cells are present in each well and osteoclastogenesis from the pretreated cells is induced by the addition of constant amount of M-CSF and soluble RANKL, the effects of the variability can be neglected, which enables accurate evaluation of the number of osteoclast precursors generated by the pretreatment. The results of the frequency analysis revealed that the addition of IL-7 significantly increased the number of osteoclast precursors by approximately 2.4 fold (Fig. 6). Because an augmented number of osteoclast precursors could contribute to the increase in osteoclastogenesis independent of changes in osteoclastogenic factor production, these data suggest that IL-7-induced stimulation of osteoclastogenesis in the cultures of unfractionated bone cells is at least partly mediated by the stimulatory effect of IL-7 on the generation of osteoclast precursors.

## Discussion

In this study, we showed that adherent cells in the epiphysis and diaphysis, as well as in bone marrow cells, which represent the majority of osteoblasts/stromal cells in bone, do not significantly alter RANKL and OPG mRNA expressions in the estrogen-deficient state. We found that production of IL-7 in bone is stimulated by OVX and that IL-7 augments osteoclastogenesis, at least via increasing the number of osteoclast precursors in cultures of unfractionated bone cells.

To evaluate the importance of RANKL produced by osteoblasts/stromal cells in epiphysis where many osteoclasts reside, we quantitated the target mRNA using RNA isolated from epiphysis or diaphysis freed from bone marrow, instead of using RNA from isolated osteoblasts/stromal cells, because of technical difficulties in separating the osteoblasts/stromal cells that are attached tightly to the bone matrix. Because we were unable to precisely quantify RANKL on the cells at protein level, we could not rule out the possibility of upregulation of RANKL by a post-transcriptional mechanism. However, the fact that many cytokines implicated in acceleration of osteoclastogenesis caused by estrogen deficiency, such as IL-1, PGE<sub>2</sub>, and TNF- $\alpha$ , increase RANKL production by osteoblasts/stromal cells via stimulation of RANKL mRNA expression [28,29], suggesting the possibility that the lack of enhancement of RANKL mRNA expression by cells at the epiphysis and diaphysis represents no substantial change in RANKL production by osteoblasts/stromal cells at the protein level. In addition, stromal cells separated from bone marrow cells also did not upregulate RANKL mRNA expression by OVX. These data are in contrast to a report showing an enhanced expression of cell surface RANKL on osteoblasts/stromal cells as well as on T and B lineage cells in bone marrow of postmenopausal women [17]. The discrepancy of RANKL expression by osteoblasts/stromal cells might be explained by species differences. In fact, substantial differences in responsiveness to estrogen between mouse and human bone have been reported [30,31].

Another possible explanation is that only a small portion of osteoblasts/stromal cells in bone increases RANKL mRNA expression and that this increase is not detectable when RNA is isolated from whole osteoblasts/stromal cell population. Collectively, it is suggested that the majority of osteoblasts/stromal cells do not up-regulate RANKL production, at least at the mRNA level, by estrogen deficiency in mice. On the other hand, we found increased RANKL mRNA expression by B220<sup>+</sup> cells, as previously reported [20], and increased concentration of soluble RANKL in bone fluid and in serum of ovariectomized mice (data not shown). Therefore, we could not rule out an increase of soluble RANKL, which is presumably produced by the cells other than osteoblasts/stromal cells, and RANKL on adherent cells, such as B220<sup>+</sup> cells, in estrogen deficiency. We confirmed also the increase of IL-7 production in bone, as previously reported [15]. It has been shown that these cells produce soluble RANKL and TNF- $\alpha$  in response to

IL-7 [13,14] and that TNF- $\alpha$  produced by T cells in ovariectomized mice is indispensable for acceleration of osteoclastogenesis [12]. It should be noted that TNF- $\alpha$  itself has relatively weak osteoclastogenic activity compared with RANKL, but that it additively enhances osteoclastogenesis induced by even a saturating amount of RANKL *in vitro* [11].

Taken together, these data support the hypothesis that TNF- $\alpha$  produced by T cells as well as soluble and membrane-bound RANKL produced by T and B lineage cells, rather than membrane-bound RANKL on osteoblasts/stromal cells, is increased by estrogen deficiency, leading to acceleration of osteoclastogenesis. In addition, these data also support the hypothesis that osteoclast precursors circulating in the bloodstream [32] are primed by an increased level of soluble RANKL and/or TNF- $\alpha$ , the production of which might possibly be stimulated in response to IL-7 in organs rich in T cells, such as spleen and thymus, and then migrate and differentiate in the bone microenvironment where osteoblasts/stromal cells covering bone matrix express a constant amount of RANKL on their cell surfaces as a basal condition to induce final osteoclastic differentiation.

A recent report has suggested that the potential of a purified B220<sup>+</sup> cell fraction to generate osteoclasts requires contaminated B220<sup>-</sup> cells [33]. However, we previously utilized a frequency analysis of osteoclast precursors, in which analysis the possibility that contaminated B220<sup>-</sup> cells in purified B220<sup>+</sup> cell fraction would influence the results could be excluded, and showed that the frequency of osteoclast precursors in purified B220<sup>+</sup> cells and that of B220<sup>-</sup> cells are at a comparable level. Therefore, it is theoretically possible to conclude that a major part of the osteoclasts generated in the purified B220<sup>+</sup> cell fraction is indeed derived from B220<sup>+</sup> cells. Our results showing that IL-7 stimulates osteoclastogenesis as well as generation of osteoclast precursors only in unfractionated bone cell cultures may have implications concerning the target cells of IL-7.

Recently, it has been reported that bone lining cells or endosteum covering calcified bone matrix is the hematopoietic stem cell niche and that hematopoietic stem cells are attached tightly to the endosteum [34-36]. Indeed, hematopoietic stem cells are released only after collagenase treatment of bone matrix but not by flushing-out the bone marrow [36]. In addition, localization studies have shown that myelomonocytic progenitors exist at the periosteum and migrate to the central area of the bone marrow as they mature [37]. It has been also reported that the proliferating  $\mu$ -chain-negative immature B220<sup>+</sup> cells first appear at the subosteal region and then migrate into the central area of the bone marrow [38-40], suggesting that B220<sup>low</sup> progenitor cells giving rise to B220<sup>+</sup> pro-B cells reside at the subosteal region. Importantly, a similar pattern of B220<sup>+</sup> cell localization has been reported in IL-7 transgenic mice with focal osteolysis [41]. From a methodological point of view, one of the differences between cultures of the unfractionated bone cells and cultures using bone marrow cells is that the unfractionated bone cells contain not only bone marrow cells, but also a population of cells that is released from the bone surface by vigorous

shaking of small pieces of bone fragments (see Materials and methods). Indeed, previous analyses have demonstrated that the unfractionated bone cell population is rich in cells that are attached tightly to the bone surface, such as osteoblasts/stromal cells, osteoclasts [25,26], and TRAP<sup>+</sup> B220<sup>+</sup> cells [20], when compared with the population of flushed-out bone marrow cells.

Because IL-7 promotes the proliferation and differentiation of the cells over a relatively wide range of differentiation stages from immature B220<sup>low</sup> to B220<sup>high</sup> and B220<sup>+</sup> osteoclast precursors are relatively immature among B220<sup>+</sup> cells [23], therefore our results may suggest that the immature B220<sup>low</sup> existing at the subosteal region are possibly released in the unfractionated bone cells and that IL-7 acts on these cells to generate B220<sup>+</sup> osteoclast precursors. It was reported that RANKL stimulates not only osteoclastogenesis but also B220<sup>+</sup> cell proliferation when used together with IL-7 [42]. In estrogen-deficient mice, therefore, B220<sup>low</sup> cells at the subosteal region would be well suited for their proliferation as well as osteoclastic differentiation because of the presence of increased amounts of IL-7 and TNF- $\alpha$ , in addition to M-CSF and RANKL expressed on the surfaces of osteoblasts/stromal cells covering the bone matrix, where osteoclasts exist and function. In this regard, the flushed-out bone marrow cells from ovariectomized mice may contain an increased number of B220<sup>+</sup> osteoclast precursors as a result of IL-7-stimulated proliferation of the cells at the subosteal region, but treatment of the flushed-out bone marrow cells with IL-7 in vitro may promote the differentiation of B220<sup>+</sup> cells along the B-cell lineage, thereby decreasing their potential of osteoclastic differentiation. This finding may explain the inhibitory effect of IL-7 on osteoclastogenesis in bone marrow cell cultures [24]. Further studies are required to reveal the precise nature of the target cells for IL-7.

It could be possible that treatment of the unfractionated bone cells with IL-7 results in increase of B220<sup>+</sup> cells that express RANKL; however, we could not detect a significant effect of IL-7 on RANKL mRNA expression, at least in our cultures (data not shown). Although our results do not rule out the involvement of B220<sup>+</sup> cell-derived RANKL for acceleration of osteoclastogenesis in vivo, a possible explanation might be that only a small portion of RANKL is produced by B220<sup>+</sup> cells, and that the increase of RANKL mRNA expression by B220<sup>+</sup> cells resulting from IL-7 treatment in our cultures could not significantly affect the total amount of RANKL mainly produced by stromal cells in response to PGE<sub>2</sub>. Taken together, it is speculated that the stimulatory effect of IL-7 on osteoclastogenesis in the unfractionated bone cells might not be the result of the increase in osteoclastogenic factors but rather be caused the expansion of osteoclast precursors.

In conclusion, our study suggests that estrogen deficiency does not significantly alter RANKL and OPG expression by osteoblasts/stromal cells, but increases IL-7 production in bone, and that IL-7 augments a pool size of osteoclast precursors through the action of IL-7 on the cells attached to the bone surfaces rather than on those contained in the bone marrow cell population, thereby leading to stimula-

tion of osteoclastogenesis. The increased osteoclastogenic factors produced by immune cells, rather than osteoblasts/stromal cells, and/or an augmented pool size of osteoclast precursors might be important for the pathogenesis and treatment of estrogen deficiency-induced osteoporosis.

**Acknowledgment** This work was supported by the Ministry of Education, Sciences, Sports and Cultures' Grand-in-Aid for Scientific Research C 16591836 (TS).

## References

- Riggs BL, Khosla S, Melton LJ III (2002) Sex steroids and the construction and conservation of the adult skeleton. *Endocr Rev* 23:279-302
- Manolagas SC (2000) Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev* 21:115-137
- Pacifici R (1996) Estrogen, cytokines, and pathogenesis of postmenopausal osteoporosis. *J Bone Miner Res* 11:1043-1051
- Kameda T, Mano H, Yuasa T, Mori Y, Miyazawa K, Shiokawa M, Nakamaru Y, Hiroi E, Hiura K, Kameda A, Yang NN, Hakeda Y, Kumegawa M (1997) Estrogen inhibits bone resorption by directly inducing apoptosis of the bone-resorbing osteoclasts. *J Exp Med* 186:489-495
- Riggs BL (2000) The mechanisms of estrogen regulation of bone resorption. *J Clin Invest* 106:1203-1204
- Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, Lacey DL, Boyle WJ, Riggs BL (2000) The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption. *J Bone Miner Res* 15:2-12
- Suda T, Takahashi N, Udagawa N, Jimi E, Gillespie MT, Martin TF (1999) Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr Rev* 20:345-357
- Kong YY, Feige U, Sarosi I, Bolon B, Tafuri A, Morony C, Capparelli C, Li J, Elliott R, McCabe S, Wong T, Campagnuolo C, Moran E, Bogoch ER, Van G, Nguyen LT, Ohashi PS, Lacey DL, Fish E, Boyle WJ, Penninger JM (1999) Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. *Nature (Lond)* 402:304-309
- Horwood NJ, Kartsogiannis V, Quinn JM, Romas E, Martin TF, Gillespie MT (1999) Activated T lymphocytes support osteoclast formation in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 265:144-150
- Kanematsu M, Sato T, Takai H, Watanabe K, Ikeda K, Yamada (2000) Prostaglandin E2 induces expression of receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand/osteoprotegerin ligand on pre-cells: implications for accelerated osteoclastogenesis in estrogen deficiency. *J Bone Miner Res* 15:1321-1329
- Cenci S, Weitzmann MN, Roggia C, Namba N, Novack I, Woodring J, Pacifici R (2000) Estrogen deficiency induces bone loss by enhancing T-cell production of TNF-alpha. *J Clin Invest* 106:1229-1237
- Roggia C, Gao Y, Cenci S, Weitzmann MN, Toraldo G, Isaia G, Pacifici R (2001) Up-regulation of TNF-producing T cells in the bone marrow: a key mechanism by which estrogen deficiency induces bone loss in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:13966-13969
- Toraldo G, Roggia C, Qian WP, Pacifici R, Weitzmann MN (2000) IL-7 induces bone loss in vivo by induction of receptor activator of nuclear factor kappa B ligand and tumor necrosis factor alpha from T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:125-130
- Weitzmann MN, Roggia C, Toraldo G, Weitzmann L, Pacifici R (2002) Increased production of IL-7 uncouples bone formation from bone resorption during estrogen deficiency. *J Clin Invest* 110:1643-1650
- Weitzmann MN, Cenci S, Rifas L, Brown C, Pacifici R (2000) Interleukin-7 stimulates osteoclast formation by up-regulating T-cell production of soluble osteoclastogenic cytokines. *Blood* 96:1873-1878

16. Ikeda T, Utsuyama M, Hirokawa K (2001) Expression profiles of receptor activator of nuclear factor kappaB ligand, receptor activator of nuclear factor kappaB, and osteoprotegerin messenger RNA in aged and ovariectomized rat bones. *J Bone Miner Res* 16:1416-1425
17. Eghbali-Fatourehchi G, Khosla S, Sanyal A, Boyle WJ, Lacey DL, Riggs BL (2003) Role of RANK ligand in mediating increased bone resorption in early postmenopausal women. *J Clin Invest* 111:1221-1230
18. Seck T, Diel I, Bismar H, Ziegler R, Pfeilschifter J (2001) Serum parathyroid hormone, but not menopausal status, is associated with the expression of osteoprotegerin and RANKL mRNA in human bone samples. *Eur J Endocrinol* 145:199-205
19. Shibata T, Shira-Ishi A, Sato T, Masaki T, Masuda A, Hishiyama A, Ishikura N, Higashi S, Uchida Y, Saito MO, Ito M, Ogata E, Watanabe K, Ikeda K (2002) Vitamin D hormone inhibits osteoclastogenesis in vivo by decreasing the pool of osteoclast precursors in bone marrow. *J Bone Miner Res* 17:622-629
20. Sato T, Shibata T, Ikeda K, Watanabe K (2001) Generation of bone-resorbing osteoclasts from B220<sup>+</sup> cells: its role in accelerated osteoclastogenesis due to estrogen deficiency. *J Bone Miner Res* 16:2215-2221
21. Katavic V, Grcevic D, Lee SK, Kalinowski J, Jastrzebski S, Dougall W, Anderson D, Puddington L, Aguila HL, Lorenzo JA (2003) The surface antigen CD45R identifies a population of estrogen-regulated murine marrow cells that contain osteoclast precursors. *Bone (NY)* 32:581-590
22. Manabe N, Kawaguchi H, Chikuda H, Miyaura C, Inada M, Nagai R, Nabeshima Y, Nakamura K, Sinclair AM, Scheuermann RH, Kuro-o M (2001) Connection between B lymphocyte and osteoclast differentiation pathways. *J Immunol* 167:2625-2631
23. Blin-Wakkach C, Wakkach A, Rochet N, Carle GF (2004) Characterization of a novel bipotent hematopoietic progenitor population in normal and osteopetrotic mice. *J Bone Miner Res* 19:1137-1143
24. Lee SK, Kalinowski JF, Jastrzebski SL, Puddington L, Lorenzo JA (2003) Interleukin-7 is a direct inhibitor of in vitro osteoclastogenesis. *Endocrinology* 144:3524-3531
25. Takada Y, Kusuda M, Hiura K, Sato T, Mochizuki H, Nagao Y, Tomura M, Yahiro M, Hakeda Y, Kawashima H, Kumegawa M (1992) A simple method to assess osteoclast-mediated bone resorption using unfractionated bone cells. *Bone Miner* 17:347-359
26. Hayashi S, Miyamoto A, Yamane T, Kataoka H, Ogawa M, Sugawara S, Nishikawa S, Nishikawa S, Sudo T, Yamazaki H, Kunisada T (1997) Osteoclast precursors in bone marrow and peritoneal cavity. *J Cell Physiol* 170:241-247
27. Sakai A, Nishida S, Okimoto N, Okazaki Y, Hirano T, Norimura T, Suda T, Nakamura T (1998) Bone marrow cell development and trabecular bone dynamics after ovariectomy in ddy mice. *Bone (NY)* 23:443-451
28. Hofbauer LC, Lacey DL, Dunstan CR, Spelsberg TC, Riggs BL, Khosla S (1999) Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha, but not interleukin-6, stimulate osteoprotegerin ligand gene expression in human osteoblastic cells. *Bone (NY)* 25:255-259
29. Li X, Pilbeam CC, Pan L, Breyer RM, Raisz LG (2002) Effects of prostaglandin E<sub>2</sub> on gene expression in primary osteoblastic cells from prostaglandin receptor knockout mice. *Bone (NY)* 30:567-573
30. Couse JF, Korach KS (1999) Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us? *Endocr Rev* 20:358-417
31. Smith EP, Boyd J, Frank GR, Takahashi H, Cohen RM, Specker B, Williams TC, Lubahn DB, Korach KS (1994) Estrogen resistance caused by a mutation in the estrogen-receptor gene in a man. *N Engl J Med* 331:1056-1061
32. Parfitt AM (1998) Osteoclast precursors as leukocytes: importance of the area code. *Bone (NY)* 23:491-494
33. Jacquin C, Gran DE, Lee SK, Lorenzo JA, Aguila HL (2006) Identification of multiple osteoclast precursor populations in murine bone marrow. *J Bone Miner Res* 21:67-77
34. Zhang J, Niu C, Ye L, Huang H, He X, Tong WG, Ross J, Haug J, Johnson T, Feng JQ, Harris S, Wiedemann LM, Mishina Y, Li L (2003) Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature (Lond)* 425:836-841
35. Calvi LM, Adams GB, Weibrecht KW, Weber JM, Olson DP, Knight MC, Martin RP, Schipani E, Divieti P, Bringham FR, Milner LA, Kronenberg HM, Scadden DT (2003) Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature (Lond)* 425:841-846
36. Arai F, Hirao A, Ohmura M, Sato H, Matsuoka S, Takubo K, Ito K, Koh GY, Suda T (2004) Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. *Cell* 118:149-161
37. Nilsson SK, Johnston HM, Coverdale JA (2001) Spatial localization of transplanted hemopoietic stem cells: inferences for the localization of stem cell niches. *Blood* 15:2293-2299
38. Jacobsen K, Tepper J, Osmond DG (1990) Early B-lymphocyte precursor cells in mouse bone marrow: subosteal localization of B220<sup>+</sup> cells during postirradiation regeneration. *Exp Hematol* 18:304-310
39. Jacobsen K, Osmond DG (1990) Microenvironmental organization and stromal cell associations of B lymphocyte precursor cells in mouse bone marrow. *Eur J Immunol* 20:2395-2404
40. Osmond DG, Kim N, Manoukian R, Phillips RA, Rico-Vargas SA, Jacobsen K (1992) Dynamics and localization of early B-lymphocyte precursor cells (pro-B cells) in the bone marrow of scid mice. *Blood* 79:1695-1703
41. Valenzona HO, Pointer R, Ceredig R, Osmond DG (1996) Prolymphomatous B cell hyperplasia in the bone marrow of interleukin-7 transgenic mice: precursor B cell dynamics, microenvironmental organization and osteolysis. *Exp Hematol* 24:1521-1529
42. Kato I, Sato H, Kudo A (2003) TRANCE together with IL-7 induces pre-B cells to proliferate. *Eur J Immunol* 33:334-341

再生医療  
Regenerative  
Medicine

日本再生医療学会雑誌

医療

2007

2

Vol.6 No.1

別刷

メディカルビュー社

〒541-0046 大阪府中央区平野町1-7-3 吉田ビル TEL 06-6223-1468

〒113-0034 東京都文京区湯島3-19-11イトーピア湯島ビル TEL 03-3835-3041



## 歯周組織再生医療と DDS 技術に 期待するもの

*Periodontal regeneration and DDS*

### Keywords

歯周病  
歯周組織再生  
塩基性線維芽細胞増殖因子  
歯根膜細胞

村上 伸也 島袋 善夫  
北村 正博 山田 聡

大阪大学大学院歯学研究科口腔分子免疫制御学講座  
歯周病分子病態学・歯周病診断制御学

### Summary

In order to enhance periodontal tissue regeneration, we have been investigating the biological activities of basic fibroblast growth factor (bFGF, FGF-2). Intraosseous bony defects were surgically created in beagle dogs and non-human primates and recombinant FGF-2 was topically applied to those defects. Six or eight weeks after application, in all sites where FGF-2 was applied, significant periodontal ligament (PDL) formation with new cementum and new bone formation was observed in amounts greater than in the control sites. No instances of epithelial down growth, ankylosis, or root resorption were observed in the FGF-2 sites. Based on the data of *in vitro* analysis, we speculate that FGF-2 plays important roles in wound healing by promoting angiogenesis, regulating production of extracellular matrices, and inducing the growth of immature PDL cells, and in turn accelerates periodontal regeneration. Introducing DDS which enables controlled release of plural cytokines may enhance the potential of "cytokine therapy" in the fields of not only periodontal regeneration but also craniofacial medicine.

### 歯周病と歯周治療

歯周病はデンタルプラーク（細菌バイオフィルム）に起因する感染症であり、疾患の進行に伴い歯の支持組織である歯周組織が破壊される慢性炎症性疾患である（図1）。世界中において依然罹患率の高い疾患の一つであり、成人が歯を失う最大の原因に挙げられている。日本においても成人の約80%が罹患している「口」の生活習慣病として位置づけられている。歯周治療の原則は、原因であるデンタルプラークを歯根表面の壊死セメント質とともに機械的に除去することである。しかしながら、それだけでは創傷治療の場にいち早く到達する歯肉上皮により創傷治療が完了してしまい、歯周病の進行により失われたセメント質や歯槽骨の新生を伴った歯周組織再生は達成できない。中高年者、高齢者において「口」と「歯」が支えるQOLが歯

Murakami, Shinya / Shimabukuro, Yoshio / Kitamura, Masahiro / Yamada, Satoru

Department of Periodontology, Osaka University Graduate School of Dentistry  
E-mail: ipshinya@dent.osaka-u.ac.jp

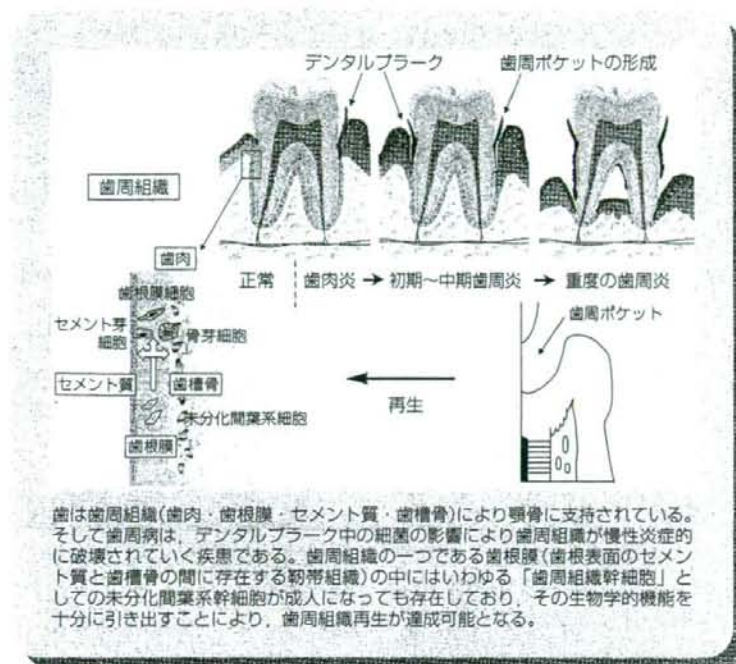


図1 歯周組織と歯周病

周病の蔓延により脅かされている現状を考えると、予知性の高い新規歯周組織再生療法の開発は社会的急務であるといえる。

### 歯周組織の再生は可能か？

はたして、歯周組織の再生は医学的・生物学的に可能なものであろうか？我々の歯は、2種類の硬組織(セメント質、歯槽骨)と2種類の軟組織(歯肉、歯根膜)からなる歯周組織により、顎骨に強固に支持されている。具体的には、歯根膜線維芽細胞により産生されるコラーゲン線維束の端がセメント

質と歯槽骨に埋入されることにより、歯と歯槽骨は強固に連結されている。近年、歯根周囲の靭帯組織であるこの歯根膜組織の中に骨芽細胞やセメント芽細胞へ分化し得る間葉系幹細胞が成人になっても存在することが示され<sup>1)</sup>、歯根膜に存在するこのような細胞の生物学的活性を十分に引き出すことにより、従来の原因除去治療のみでは不可能と考えられてきた歯周組織の再生を誘導することが歯科医学的に可能であると現在では考えられている(図1)。

理想的な歯周組織の再生誘導を考えた場合、①歯周組織欠損部に面する歯

根面に歯根膜由来細胞が選択的・優先的に誘導されること、②これら歯根膜由来細胞中に含まれる未分化間葉系幹細胞(歯周組織幹細胞)が分化能を保有したまま増殖した後、骨芽細胞やセメント芽細胞や歯根膜線維芽細胞として部位特異的な分化を遂げること、③歯根膜線維芽細胞によって産生されたコラーゲン線維束が骨芽細胞やセメント芽細胞により新生された骨組織、セメント質に埋入され歯と歯槽骨間に線維性の結合が再生されることが必要となる。

### 歯周組織再生療法開発の現状

このような歯周組織再生誘導に際して必要とされる過程を少なくとも部分的に活性化することにより、歯周組織再生誘導を果たそうとする試みがすでに臨床応用されている。たとえば、組織誘導再生法(GTR法)は、歯肉上皮の下方増殖を抑制し、歯周組織欠損部へ歯根膜細胞の選択的・優先的な誘導を果たすことにより歯周組織再生を誘導するものである。また、セメント質新生を誘導すると考えられているエナメル基質蛋白を歯周組織欠損部に投与することにより歯周組織再生を促進しようとする治療法もすでに臨床応用されており、これらの治療法はともに一定の成果を挙げている。

近年、歯周組織欠損部への歯根膜細胞の遊走や同欠損部における細胞増殖および硬組織形成細胞への分化の過程をある種のサイトカインを局所投与す

1. PDGF + IGF-1  
(platelet-derived growth factor) (Insulin like growth factor-1)
2. BMP-2  
(bone morphogenetic protein-2)
3. TGF- $\beta$   
(transforming growth factor- $\beta$ )
4. OP-1 (BMP-7)  
(osteogenic protein-1)
5. VEGF  
(vascular endothelial growth factor)
6. BDNF  
(brain-derived neurotrophic factor)
7. PDGF +  $\beta$ -TCP  
(platelet-derived growth factor) ( $\beta$ -tricalcium phosphate)
8. FGF-2 (bFGF)  
(basic fibroblast growth factor)

表1 サイトカインによる歯周組織再生誘導

| ビーグル犬          | 対照側 (n=6)   | FGF-2 側 (n=6) |
|----------------|-------------|---------------|
| 新生骨形成率 (%)     | 35.4 ± 8.9  | 83.6 ± 14.5*  |
| 新生骨梁形成率 (%)    | 16.6 ± 6.2  | 44.1 ± 9.5*   |
| 新生セメント質形成率 (%) | 37.2 ± 15.1 | 97.0 ± 7.5*   |

FGF-2 投与時の欠損量を 100% とし、6 週後に新生が確認された骨・骨梁・セメント質量をそれぞれ百分率で表わしている。対照側には基剤（架橋ゼラチン）のみを投与した。\* $p < 0.01$  (文献<sup>2)</sup>より引用改変)

表2 ビーグル犬に作製した実験的 2 級根分岐部病変に対する FGF-2 の歯周組織再生誘導効果

ることにより活性化し、歯周組織再生を促進しようとする新たな治療法の確立が試みられている。表1に示すすべてのサイトカインは、少なくとも動物実験において歯周組織再生誘導効果が確認されているものである。このうち、PDGF-BBと $\beta$ -TCPの合剤<sup>2)</sup>は歯周組織再生誘導用 deviceとして2006年米国にてFDAの承認がとられている。

一方、我々の研究室では、強力な血管新生作用と間葉系細胞の増殖誘導能を有する塩基性線維芽細胞増殖因子 (basic fibroblast growth factor: bFGF; FGF-2) に着目し、FGF-2を歯周外科時に歯槽骨欠損部に局所投与することにより、歯周病により失われた歯周組織の再生を人為的に誘導・促進する、新しい歯周組織再生療法の開発

に取り組んでいる。

### 塩基性線維芽細胞増殖因子による歯周組織再生誘導

我々は、FGF-2の局所投与が歯周組織再生を促進するか否かをビーグル犬モデルを用いて検証した<sup>3)</sup>。まず、下顎臼歯部複根歯に歯槽骨欠損(2級根分岐部病変)を作製した。シリコン印象材を同欠損部に充填した状態で、一度歯肉弁を復位・縫合し、同上歯槽骨欠損部に炎症反応を惹起した。4週後に再手術し、印象材を除去後、通常の歯周外科手術に準じて骨欠損部および露出歯根面の十分な搔爬を行い、歯槽骨欠損底部を印記しておく目的で歯科用ドリルを用いて根面にノッチを付与した。その後、架橋ゼラチンを基剤とした FGF-2 を実験側の歯周組織欠損部に填入し、対照側には、同基剤のみを填入した。そして、FGF-2投与後6週経過した後に、FGF-2投与部位に歯周組織の再生が誘導されているか否かを組織学的計測により検討した。その結果、FGF-2投与側では、肉眼的にも明らかな骨の新生が認められた(図2)。そして、組織学的にも新生歯槽骨、新生歯根膜、新生セメント質が観察され、統計学的にも有意な歯周組織再生が誘導、促進されているのが確認された(表2、図3)。これ以外のモデルとして、ビーグル犬の歯槽骨に作製した2・3壁性骨欠損や、カンクイザルにおける根分岐部病変に FGF-2 を局所投与した場合<sup>4)</sup>においても、歯肉上皮の下方増殖・骨性癒着・歯根吸収などの

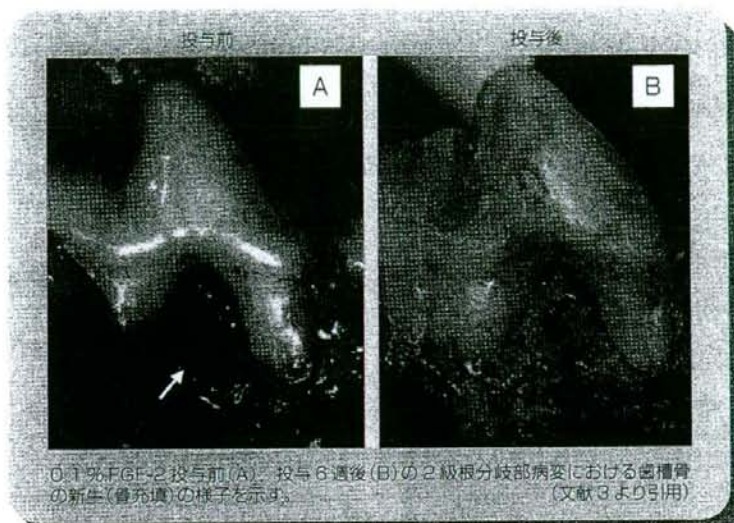


図2 FGF-2投与によりビーグル犬の根分岐部病変に誘導された歯槽骨再生  
(→巻頭Color Gravure参照)

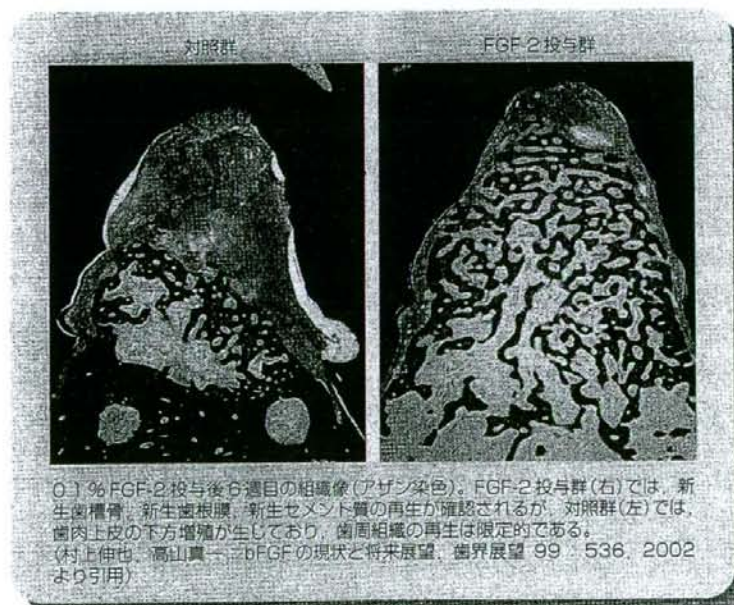


図3 FGF-2投与によりビーグル犬の根分岐部病変に誘導された歯周組織再生  
(→巻頭Color Gravure参照)

異常な治癒形態を生じない、統計学的に有意な歯周組織再生が誘導されていることを確認している。また、2001年よりFGF-2の歯周組織再生誘導効果ならびに安全性の検討を目的として、多施設参加の第Ⅱ相臨床治験(プラセボを含む用量反応同時対照による二重盲検試験)が行われた。その結果、ヒトの2壁性および3壁性歯槽骨欠損に対し、0.3% FGF-2含有ハイドロキシルプロピルセルロース(HPC)製剤の局所投与がレントゲン写真上で統計学的に有意な歯槽骨新生を誘導し得ることが確認されている。また、同治験期間中には安全性上大きな問題になるような事例は認められなかったと報告されている。

### FGF-2による歯周組織再生誘導のメカニズム

FGF-2による歯周組織再生誘導のメカニズムを知る一助として、培養ヒト歯根膜由来細胞(HPDL)に対するFGF-2の作用を、我々は詳細に検討している。その結果、FGF-2はHPDLの増殖を濃度依存的に促進し、さらに血清中の何かの因子と協調することによりHPDLの増殖を相乗的に促進することを確認した<sup>9)</sup>。また、未成熟なHPDLのほうがFGF-2に対するレセプターを数多く発現し、FGF-2に対して高い反応性を示すことも明らかにしている<sup>10)</sup>。

次に、ヒト歯根膜細胞からの細胞外マトリックス産生に及ぼすFGF-2の作用について検討を加えた。その結果、FGF-2は他のサイトカイン刺激に比し、特徴

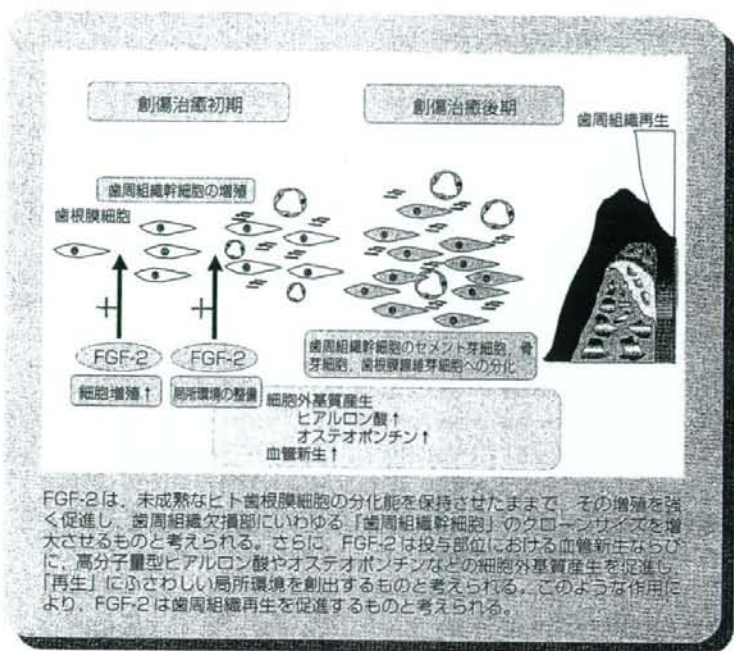


図4 歯周組織再生を誘導する FGF-2 の作用機序(仮説)

に高分子量型ヒアルロン酸の合成を促進することが明らかとなった<sup>7)</sup>。高分子量型ヒアルロン酸は、創傷治癒初期過程に重要な役割を演じている細胞外基質の一つと考えられている。また最近、FGF-2は細胞遊走活性を有するオステオポンチンの産生も HPDLより誘導することが確認されている(投稿準備中)。さらに FGF-2は投与部位において血管新生促進作用を発揮することもよく知られており、これらの作用を通じて、歯周組織再生にふさわしい環境が FGF-2の投与部位に創出されるものと考えられる(図4)。

すなわち、創傷治癒の初期段階にお

いて FGF-2は、①歯根膜細胞を未分化な状態に保ちつつ増殖を促進することにより治癒の場での歯根膜細胞の細胞密度を増加させる、そして、②血管新生促進・細胞外基質産生の制御を通じて歯周組織再生にふさわしい局所環境を整備する、ものと考えられる。そしてその結果として、歯槽骨、セメント質の新生を含む歯周組織再生が、FGF-2投与部位において量的、時間的に促進されることになるのであろう<sup>8)</sup>(図4)。

## DDS 技術に期待するもの

組織・臓器の再生誘導を効率的に行うには、組織工学(tissue engineering)というシグナル分子(signaling molecule)の作用を至適条件で作用させることが必須であり、そのために Drug Delivery System (DDS) のコンセプトを導入することの意義が指摘されている。実際、今回紹介した動物実験においても、FGF-2の徐放が期待される架橋ゼラチンを用いている。しかしながら、どの濃度で、どの程度の期間 FGF-2を作用させることが、歯周組織再生誘導に関して最大の効果を生むのかに関しては、いまだ十分な検討はなされておらず、今後の検討課題の一つとして残されている。一方、FGF-2存在下においては歯根膜細胞の骨芽細胞・セメント芽細胞への分化が可逆的に抑制されることが知られている<sup>9)</sup>。したがって、しかるべき時期に FGF-2の活性が投与部位から消失することもまた、効果的な歯周組織再生誘導を考える上で重要な点となるであろう。一方、著明な骨誘導能を有する bone morphogenetic protein-2 (BMP-2)の局所投与により歯周組織再生が促進されるが、その際、歯根と歯槽骨が部分的に骨性癒着(ankylosis)する可能性があることが指摘されている。これを回避するためには、創傷治癒の早期に BMP-2が放出されないようにする、もしくは、FGF-2のような増殖因子が早期に作用した後、BMP-2のような

分化因子が作用するよう工夫された DDS が有効かもしれない。このような DDS 機能を有したサイトカイン基剤が開発されれば、個々のサイトカインの作用がさらに高められ、単に歯周組織再生療法としてのサイトカインの適応が拡大されるのみならず、その適応は広く顎顔面領域の再建手術にも応用し得るようになるものと期待される。

●文 献

- 1) Seo BM, Miura M, Gronthos S, et al: Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet* 364: 149-155, 2004
- 2) Nevins M, Giannobile WV, McGuire MK, et al: Platelet-derived growth factor stimulates bone fill and rate of attachment level gain: results of a large multicenter randomized controlled trial. *J Periodontol* 76: 2205-2215, 2005
- 3) Murakami S, Takayama S, Kitamura M, et al: Recombinant human basic fibroblast growth factor (bFGF) stimulates periodontal regeneration in class II furcation defects created in beagle dogs. *J Periodont Res* 38: 97-103, 2003
- 4) Takayama S, Murakami S, Shimabukuro Y, et al: Periodontal regeneration by FGF-2 (bFGF) in primate models. *J Dent Res* 80: 2075-2079, 2001
- 5) Takayama S, Murakami S, Miki Y, et al: Effects of basic fibroblast growth factor on human periodontal ligament cells. *Periodont Res* 32: 667-675, 1997
- 6) Takayama S, Murakami S, Nozaki T, et al: Expression of receptors for basic fibroblast growth factor on human periodontal ligament cells. *J Periodont Res* 33: 315-322, 1998
- 7) Shimabukuro Y, Ichikawa T, Takayama S, et al: Fibroblast growth factor-2 regulates the synthesis of hyaluronan in human periodontal ligament cells. *J Cell Physiol* 203: 557-563, 2005
- 8) 村上伸也: 塩基性線維芽細胞増殖因子による歯周組織再生の試み。大阪歯学雑誌 47: 75-84, 2003

# 解明が進むヒトパピローマウイルス による子宮頸癌の発症機構

## E6, E7 癌タンパク質の新規機能

温川恭至, 清野 透

子宮頸癌発生の原因ウイルスとして、ヒトパピローマウイルス (human papillomavirus: HPV) が同定されて20年以上が経過した。90%以上の子宮頸癌では16型など一群のHPVがコードするE6, E7が癌細胞で発現しており、それぞれp53, RB癌抑制遺伝子産物を不活化していることが明らかになっている。E6にはテロメラーゼを活性化する機能も備わっており、E6とE7は共同してヒト初代上皮細胞を高率に不死化することができる。E6とE7の発現のみでは細胞は癌化しないが、E6, E7は細胞の不死化から癌化に至る多くの過程に関与していると考えられている。本稿では、最近明らかになったE6, E7の機能を紹介するとともに、HPV被感染細胞が子宮頸癌へと進行する機構について考察したい。

キーワード● HPV, E6, E7, 子宮頸癌, 標的分子

### はじめに

子宮頸癌の少なくとも90%以上は、16型をはじめとする特定の高リスク型HPVの感染が主因であると考えられている。現在、全世界で毎年約50万人が子宮頸癌を罹患し、そのうち約1/3の方が死亡しており、女性の癌による死亡原因の第2位に位置している。先進国における子宮頸癌の発生率は主に検診の効果により年々減少傾向にあるが、日本では初交年齢の低下に伴い20歳代の若い年齢層での急激な増加傾向が社会問題となっている。

HPVゲノムは染色体外においてプラスミド状態で複製されるが、子宮頸癌細胞からは染色体に組み込まれたHPVゲノムDNAが検出される。染色体への組み込み時期は高度異形成への進展時とほぼ一致している。癌細胞中ではE6とE7遺伝子が必ず発現しており、発癌および癌形質の維持に重要な役割を果たしている<sup>1)</sup>。

E6とE7は、それぞれp53, RBの不活化に加え多様な生物活性を有しており、ヒト正常細胞を単に不死化するだけでなく、悪性形質の付与にも積極的に関与していることが次第に明らかになってきた。

### 1 E6の新たな機能

#### ① テロメラーゼの活性化

テロメラーゼを構成する逆転写酵素サブユニット (telomerase reverse transcriptase: TERT) は、幹細胞などごく一部の細胞でしか発現しておらず、多くの体細胞ではテロメア末端の一定以上の短縮に伴い細胞老化がおとずれ増殖停止する。また、ヒト癌において、テロメラーゼの活性化は、p53経路またはRB経路の異常と並んで最も共通にみられる変化であることが示されている。通常の培養条件においてヒト正常子宮頸部角化細胞の不死化には、少なくともRB経路の

Molecular mechanisms of cervical carcinogenesis by high-risk human papillomaviruses: Novel functions of E6 and E7 oncoproteins

Takashi Yugawa/Tohru Kiyono: Virology Division, National Cancer Center Research Institute (国立がんセンター研究所ウイルス部)

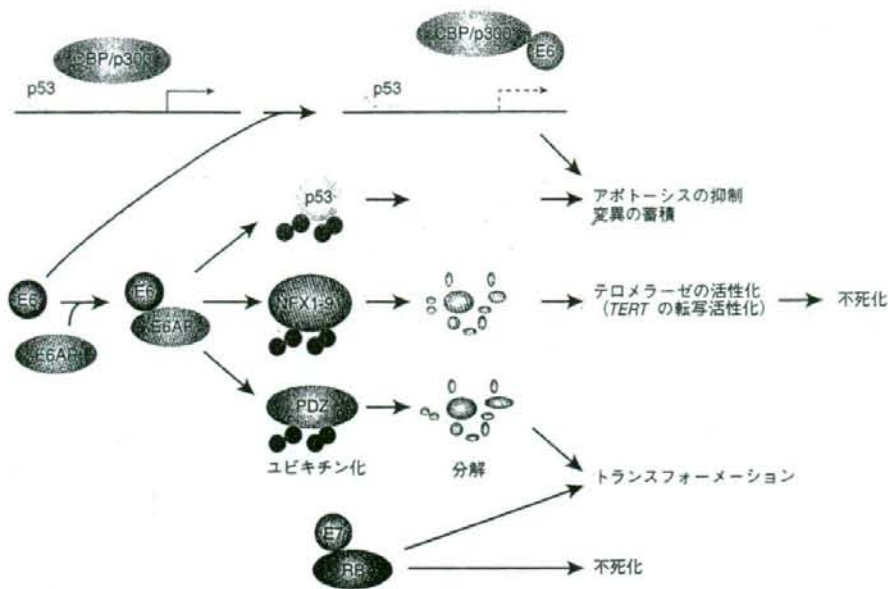


図1 E6とE7の主要な標的分子

E6は細胞のHECT型ユビキチンリガーゼ(E3)の1つであるE6APと結合し、標的タンパク質の分解を促進する。E6あるいはE6APそれぞれ単独ではp53にほとんど結合しないが、両者の複合体はp53と結合し、E6APのユビキチンリガーゼ活性により本来の基質ではないp53をユビキチン化する。ユビキチン化されたp53はプロテアソームに認識され分解を受ける。また、E6はp53の転写共役因子であるCBP/p300やADA3とも結合し、その機能を抑制することでp53経路をより完全に遮断している。E7はN末端のLXCXEモチーフを介してRBと結合し、RBとE2Fの結合を阻害することでRBを不活化する。また、E7はRBの分解も促進することが知られている。E7によりRB経路が不活化されるとp14<sup>ARF</sup>を介してp53経路が活性化し細胞周期の停止かアポトーシスが誘導されるが、E6によりp53が不活化されていると細胞は増殖を継続することが可能となる。また、E6はTERTプロモーターに対する抑制因子NFX1-91の分解を介して、TERT遺伝子の発現を誘導する。体細胞においてテロメラーゼ活性はTERTの発現に依存しているため、E6はこれによってテロメラーゼを活性化し、E7と共同して正常細胞の不死化を誘導する。E6は他にも複数のPDZドメイン含有タンパク質を標的化し、細胞のトランスフォーメーションを促進する可能性がある。

不活化とテロメラーゼの活性化が必要である。HPVによる不死化では、RB経路の不活化はE7が担っておりテロメラーゼの活性化はE6によってなされるが、後者の分子機構に関しては長年不明であった。最近、E6によってTERTプロモーターに対する転写抑制因子NFX1-91がE6AP依存的に分解促進されることが示された(図1)<sup>2)</sup>。この結果、転写抑制が解除されMycのE-boxへの結合が促進されるが、その過程にはさらにE6とc-mycの複合体形成や<sup>3)</sup>、E6によるc-myc誘導<sup>4)</sup>などが提唱されている。

② p53の不活化とNotch1の下方制御

E6は単独で上皮角化細胞の分化を抑制する活性を有しているが、その分子基盤は未解明である。近年、皮膚などの重層扁平上皮組織においては、Notch1が角化細胞の分化誘導因子であり、癌抑制遺伝子として機能することがわかってきた<sup>5)</sup>。これまでNotch1は癌遺伝子として分離され、実際、乳癌などでの高発現が報告されていたためこの報告は驚きであった。正常子宮頸部では比較的高レベルに検出されるNotch1の発現は低分化型や悪性度の高い子宮頸癌では低下して



おり、活性型の Notch1 を子宮頸癌由来の細胞株に導入すると E6E7 遺伝子の転写抑制を介して細胞増殖を抑制することが示された<sup>9)</sup>。

しかしながら、Notch1 の発現低下をもたらす分子機構は不明であった。これに関し、われわれは E6 が p53 の不活化を介して Notch1 の発現を抑制していることを発見し、p53 の新規標的遺伝子として Notch1 遺伝子を同定した (投稿準備中)。さらに、この p53-Notch1 経路は、角化細胞においてゲノム傷害誘導時に活性化し、分化を促進することがわかった。すなわち、p53 は Notch1 遺伝子の発現誘導を介した角化細胞の最終分化誘導によって、ゲノムに傷害を受けた細胞を増殖系から排除していると捉えることができる。これは重層扁平上皮組織における p53 の新たなゲノム監視機構を示唆している (図 2)。HPV による子宮頸癌発症においては、E6 によって p53 の分解が促進されると同時に Notch1 癌抑制遺伝子の発現が抑制されており、E6 による Notch1 下方制御を介した分化抑制が発癌に関与していると推測される。

一方で、子宮頸部における扁平上皮化生<sup>※1)</sup>や異形成、高分化型の癌では、Notch1 の高発現が観察されており、また Notch1 の活性化は (機序は明らかでないが) PI3K-Akt 経路の活性化を導くことで、子宮頸癌の発生に貢献しているという報告もあり<sup>7)</sup>、両面性を呈している Notch1 の生物活性に関しては今後詳細な検討が必要である。同時に、子宮頸癌以外の上皮癌においても p53 の変異が Notch1 癌抑制遺伝子の不活化を介して発癌を促進する可能性もあり、さらなる解析を行う必要がある。

### ③ 複数の PDZ ドメイン含有タンパク質の標的化

E6 と E7 は、それぞれ腎癌株細胞をトランスフォームし造腫瘍性を与えることが知られている。子宮頸癌から分離される高リスク型 HPV の E6 タンパク

#### ※1: 扁平上皮化生

子宮頸部においては扁平・円柱上皮接合部 (squamo-columnar junction) が女性ホルモンの影響により年齢とともに移動するが、単層円柱上皮が予備細胞の増殖により扁平上皮化することを扁平上皮化生とよぶ。HPV は子宮頸部の扁平上皮にも感染するが感染の頻度は低い。この解剖学的に特異な領域の基底細胞に HPV が感染することが子宮頸部上皮内腫瘍性病変 (cervical intraepithelial neoplasia; CIN) の形成、子宮頸癌の発生につながると思われる。

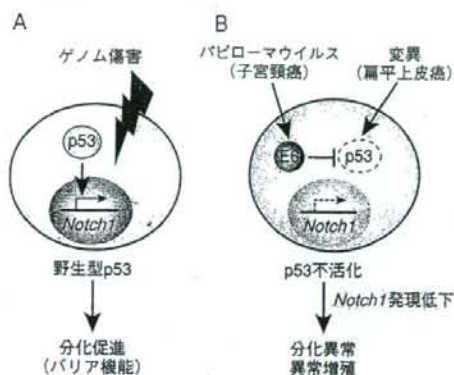


図 2 p53 依存性の Notch1 発現誘導と子宮頸癌における Notch1 下方制御のもつ生物学的意義

A) 正常上皮角化細胞にゲノム傷害がもたらされると、p53 は Notch1 遺伝子発現を活性化し分化を誘導する。これは生体がもつバリア機能である可能性がある。すなわち、p53 は分化促進によってゲノムに傷害を受けた細胞を増殖系から排除しつつ、一過的に表皮層を厚くすることで UV などのさらなるストレスから防御をはかっている可能性がある。この p53 の応答は重層扁平上皮組織における新たなゲノム監視機構として機能しているのかもしれない。B) HPV による子宮頸癌発症においては、高発現する E6 によって p53 の不活化と同時に Notch1 癌抑制遺伝子の発現が抑制されており、細胞は分化に対する抵抗性と異常増殖能を獲得する可能性がある。また、子宮頸癌以外の上皮癌においても p53 の変異が Notch1 癌抑制遺伝子の不活化を介して発癌を促進している可能性がある

質の C 末端にはすべて PDZ ドメイン結合モチーフが保存されており、トランスフォーミング活性およびヌードマウスでの腫瘍原性に必須である。また、E6 トランスジェニックマウスにおける皮膚の過形成誘導は、PDZ ドメイン結合モチーフに依存している。これまでに、DLG, Scrib, MAGI-1, -2, -3, MUPP1 などの PDZ ドメイン含有タンパク質が、E6 と結合し分解促進される標的タンパク質候補として報告されている。これらのタンパク質群は細胞極性の維持や細胞間接着装置の形成などにかかわっていると考えられており、E6 による分解促進は上皮-間葉転換を誘導し、トランスフォーメーションを引き起こす可能性がある。しかしながら、いずれの標的分子についても、その子

宮頸癌発生における生物学的意義は未解明である。

## 2 E7の新たな機能

### ① p600との相互作用

E7のN末端側にはSV40の大型T抗原やアデノウイルスのE1Aにも保存された領域CR1とCR2がある。CR2にはLXCXEモチーフがあり、これを介してRBファミリータンパク質に結合し不活化している。最近、E7はCR1を介してp600と相互作用することが示された<sup>8)</sup>。RBファミリータンパク質と結合できるがp600と結合できないE7変異体ではトランスフォーミング活性が失われていること、また子宮頸癌細胞株においてp600をRNAiによってノックダウンすると足場非依存性の増殖が阻害されることから、p600との相互作用はE7のトランスフォーメーション能にとって必須な役割をもつことが示唆される。しかし、E7がp600の機能をいかに修飾しているのかについては今後の課題である。

### ② 新規標的因子群

E7の主要な標的であるRBは、P/CAFアセチル・トランスフェラーゼによってアセチル化を受け、細胞周期からの離脱と細胞分化に機能することが示されている<sup>9)</sup>。E7は、このP/CAFと相互作用し活性を阻害することが報告されており<sup>10)</sup>、RBの不活化と合わせて、角化細胞の分化抑制につながる可能性がある。また、P/CAFはp53の転写共役因子としても機能することから、P/CAFの不活化は間接的に前述のp53による分化誘導経路を阻害する可能性もある。

E7は他にもRBファミリータンパク質の不活化やPP2Aとの結合・機能抑制を介してAktの活性化を誘導する<sup>11)12)</sup>。また、アポトーシスや細胞老化の阻害に働くDEK遺伝子の発現を亢進したり<sup>13)</sup>、PMLと相互作用してPMLによる細胞老化を回避する機能<sup>14)</sup>も有しており、これらの活性はE7によるトランスフォーメーションに関与している可能性がある。

## 3 E6, E7による染色体不安定性の誘導

染色体不安定性に由来する細胞性遺伝子異常の蓄積

は多くの癌において重要な機構である。E6, E7は、それぞれ独立した機構で短期間に染色体不安定性を誘導することが知られている<sup>15)</sup>。

詳細な機構は不明だが、E7によるサイクリンA、E/CDK2の制御を介して、中心体のover-duplication(過剰複製)が生じる<sup>16)17)</sup>。これにより、有糸分裂時に複数の紡錘体極が形成される。また、E6によってG2/Mチェックポイントが無効化されるため、複数の紡錘体極形成による染色体の分配異常を伴ったまま細胞質分裂が進行し、異数体が発現する。また、これも詳細な機構は不明だが、E6, E7発現細胞においてDNA損傷が蓄積した状態で細胞周期が進行すると、分裂後期に染色体(おそらく染色体末端部)間で橋状構造(anaphase bridge)が形成され、bridge-breakage(架橋-DNA切断)サイクルが反復されることによって染色体の構造異常が引き起こされる<sup>18)</sup>。これらの機構を介して、E6, E7による染色体不安定性が誘導され、染色体異常がもたらされる。他にも、E6, E7によって、Aurora A, Plk1, SurvivinといったG2/M期タンパク質群の高発現が観察されており<sup>19)</sup>、染色体の不安定化に関与している可能性がある。

## 4 E6, E7の高発現に至る機構

### —ウイルスゲノムの組込みとE2からの開放

HPVは重層扁平上皮組織の基底細胞に潜伏感染し、細胞の分化とともに溶解感染状態に入り、ウイルスゲノム複製とキャプシド構造タンパク質の発現によりウイルス粒子を産生し、上層の最終分化細胞と共に脱落するという生活環をとっている。したがって、ウイルス血症を起こさないため免疫監視機構が働きにくく、感染が持続しやすい。それでも、あらたなHPV感染の多くは1年以内に排除され自然治癒する。しかし、一部の症例では、何らかの理由により持続感染状態が続く(図3)。E6, E7はIRF(interferon regulatory factor)の機能抑制など免疫監視機構から積極的に逃れる機能を有しているため、E6, E7を安定発現する段階に入った前癌細胞はより存続し続けることになる。すなわち、異形成が宿主の免疫機構によって排除されるより早く、HPVゲノムDNAの染色体への組込

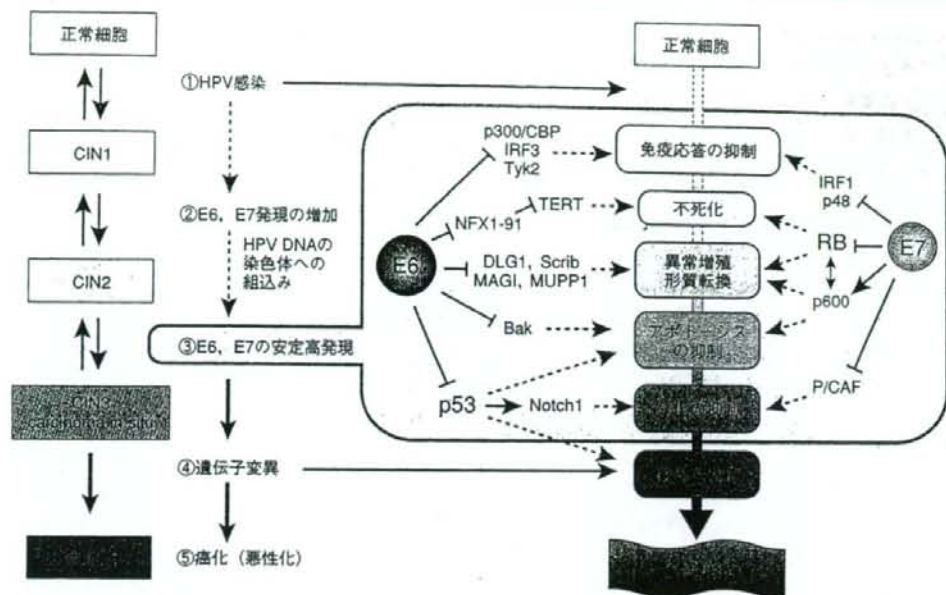


図3 HPVによる子宮頸癌の発生機構

大部分のHPV感染は自然治癒するが、宿主免疫監視機構を逃れHPV感染が持続するとCIN1（微細な異形成）病変が形成される。持続感染の後、HPVゲノムDNAの染色体への組込みとE2の欠失変異により基底細胞におけるE6とE7の発現が増加すると、その細胞は不死化・形質転換・アポトーシスの抑制・分化の抑制・遺伝子変異の蓄積といった癌化に必要な多くのステップを一度に踏破しCIN2（中等度異形成）からCIN3（高度異形成）へと進行する。RBとp53が不活化しテロメラーゼ活性をもつことで細胞が不死化し異常増殖を行う間に、染色体不安定性による遺伝子変異の蓄積が起き、増殖優位性を獲得したクローナルな癌細胞集団が出現すると考えられる

みなどによりE6とE7を高発現する細胞が出現することが、癌化にとって必須でありかつ律速段階となっていると考えられる。

この染色体上の組込み位置に関して、後述するようにc-myc近傍に組込まれ遺伝子増幅したと思われる例が報告されている<sup>20)</sup>。しかしながら、多くの組込みはゲノム全域で起きており、挿入変異の証拠も見つかっていない。

癌細胞から見つかるHPVゲノムの組込みパターンには共通の特徴がある。E6、E7遺伝子とそのプロモーターは必ず存在し、同じプロモーターから転写されるE2遺伝子には必ず欠失変異が見つかる。したがって、組込み後の主要ウイルス転写産物はE6とE7をコードし、3'-非翻訳領域は細胞側遺伝子由来となり、多

くの場合mRNAの安定性が増すことが知られている。E2は、ウイルス遺伝子の発現を制御する転写因子であり、少なくとも染色体に組込まれたE6E7プロモーターに対しては抑制的に働くことがすでに知られており、Brd4がこの転写抑制における共役因子として機能することが最近明らかになった<sup>21)</sup>。さらに、E2はE6<sup>22)</sup>、E7<sup>23)</sup>との直接結合を介してこれらの機能を阻害することも報告された。E2遺伝子を子宮頸癌細胞株に再発現させると増殖阻害が誘導されることから、E2の発現消失とE6、E7の安定発現は癌化への進行のみならず癌形質の維持に必要であることが示される。また、HPVゲノムの組込み初期にはエピゾーマルHPV DNAも共存すると考えられる。E1とともにE2はE6E7プロモーター領域にある複製起点に働き

onion skin 型の複製<sup>22</sup>をもたらす可能性がある。このような細胞では、E6/E7領域の増幅や転座などのゲノム異常が起きる一方、その程度に応じてアポトーシスが誘導されると考えられる。実際にHeLa細胞の染色体を詳細に解析すると*c-myc*近傍に組込まれた8q24領域のHPV18ゲノムが*c-myc*とともに増幅し、増幅領域の転座が複数回にわたって起きていることが推定される<sup>20</sup>。一方でSiHa細胞<sup>23</sup>のようにHPV16 DNAが1コピーのみ組込まれている癌細胞もある。組込みに依存したゲノム異常の他にいったんE6とE7が高発現すると、染色体不安定性が短期間に誘導され細胞性遺伝子の変異が蓄積し、癌遺伝子の活性化や癌抑制遺伝子の不活性化などにより増殖優位性を獲得したクローナルな細胞集団が出現し、癌化へと進行すると推測される(図3)。実際にヒト正常角化細胞に子宮頸癌で発現している程度のE6とE7を発現させ、三次元培養すると高度異形成に準ずる組織像が得られる。

HPVトランスジェニックマウスを用いた子宮頸癌モデルの解析から、重層扁平上皮組織の基底細胞におけるE6、E7の発現に加えエストロゲンが子宮頸癌の発生と悪性化に寄与していることが示された<sup>25</sup>。また、臨床サンプルの疫学的解析から正常組織や前癌病変ではみられなかったアロマトラーゼ(アンドロゲンをエストロゲンに変換する酵素)の発現が約35%の子宮頸癌においてみられており、このアロマトラーゼの発現誘導はエストロゲン受容体の発現亢進と相関することがわかった<sup>26</sup>。さらに、HPV陽性子宮頸癌由来細胞に対して特異的に、外来導入したアロマトラーゼがエストロゲン受容体の発現とE6、E7の高発現の誘導ならびに足場非依存的な細胞増殖能の亢進を引き起こすことが示された。一方、BRCA1はエストロゲン受容体遺伝子発現に抑制的に働くことが知られているが、E6とE7はBRCA1と直接結合しこの転写抑制を解除することができる<sup>27</sup>。これらのことから、アロマトラーゼ

の発現誘導とエストロゲン刺激がE6、E7の発現と協調して子宮頸癌への進行におけるリスク因子となっていることが示唆される。

## おわりに

E6、E7の発現だけでは、ヒト正常上皮細胞を癌化するには不十分であることはすでに述べたとおりである。これまでに、子宮頸癌細胞において*H-ras*の変異、*PIK3CA*、*c-myc*、*ErbB2*、*cIAP1*の増幅、*PTEN*、*TSLC1*の発現低下といったいくつかの遺伝子変化が見出されており、癌化における関与が示唆されているが詳細は不明である。子宮頸癌の発生に関与する遺伝子変化を同定するため、子宮頸部由来の正常細胞をもとに、E6、E7をはじめ癌化との関連が指摘されている種々の遺伝子を導入し腫瘍原性を評価する必要がある。この*in vitro*で子宮頸癌を再構成する系は、実際の個体内における変異蓄積過程を短期間に模倣する系ともいえる。これらの細胞性遺伝子の変化も、実はE6とE7による染色体不安定性の結果促進され*in vivo*で選択されたものと考えられることから、E6、E7は子宮頸癌発生において事実上唯一の原因と捉えることができる。この点において、E6、E7の安定高発現をもたらすHPVゲノムDNAの染色体への組込みは、HPV感染後、発癌における最大のリスク因子であると考えられ、今後詳細な機構解析が必要である。

子宮頸癌の予防に関して、特定の高リスク型HPVに対するワクチン(Merck社の対HPV-6、-11、-16、-18ワクチンGARDASIL、GlaxoSmithKline社の対HPV-16、-18ワクチンCervarix)が開発されている。これらのワクチンは海外の臨床試験では期待通りの効果をあげており、GARDASILは2006年6月にFDAに承認され、日本でも臨床試験が開始されている。こ

## ※2 onion skin 型の複製

1つの複製起点から複数のDNAループが形成される複製様式。SV40 DNAなどが宿主染色体に組込まれ、ウイルスゲノムの複製起点より複製が開始される場合にみられる。ウイルスゲノム複製の反復に伴って、隣接する染色体上のDNA配列も過剰に複製されることになるため、遺伝子増幅をもたらす原因になる可能性がある。

## ※3 SiHa細胞

子宮頸癌由来の細胞株。高リスク型のHPV16陽性で、1細胞当たりHPV16 DNAを1コピー有する。他に、子宮頸癌に由来する細胞株の例としてCaSKI細胞、HeLa細胞があるが、これらはそれぞれHPV16 DNAを約200~400コピー、HPV18 DNAを約50コピー有している。いずれも、E2の発現導入やE6/E7転写産物に対するRNA干渉などによってE6/E7の発現を抑制すると、少なくともp53、RB経路が再活性化し、増殖停止が誘導される。