プロスタグランジンと骨吸収

——マウス骨髄細胞培養における破骨細胞様多核細胞形成に対する効果——

赤津拓彦・高橋直之・宇田川信之・須田立雄*

Prostaglandins promote osteoclast-like cell formation by a mechanism involving cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate in mouse bone marrow cell cultures We have developed a mouse marrow culture system in which multinucleated osteoclast (OC)-like cells are formed within 8 days¹⁾. Using this culture system, we examined the effect of prostaglandins (PGs), potent bone-resorbing agents, on OC-like cell formation²⁾. Four PGs (PGE₁ and PGE₂ at 10⁻⁸~10⁻⁵ M, 6-keto-PGF_{1α} at 10⁻⁵ M, and PGF_{2α} at 10⁻⁶~10⁻⁵ M) significantly stimulated the formation of OC-like cells. The potency of the PGs in inducing OC-like cell formation was well correlated with the potency in increasing the production of cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate (cAMP) in bone marrow cells. Addition of dibutyryl-cAMP also induced OC-like cell formation. Moreover, isobutylmethylxanthine (IBMX), a potent inhibitor of phosphodiesterase, potentiated the OC-like cell formation induced by PGE₂. Calcitonin induced cAMP production in cultures treated with PGE₂, but not in cultures with vehicle. When bone marrow mononuclear cells were cultured on dentine slices in the presence of PGE₂, multinucleated OC-like cells were similarly formed and they resorbed calcified tissues.

These results suggest that PGs stimulate resorption of calcified tissues by promoting osteoclast formation. The activity of PGs in inducing OC-like cell formation is considered mediated by a mechanism involving cAMP.

Takuhiko Akatsu・Naoyuki Takahashi・Nobuyuki Udagawa・Tatsuo Suda*

* Department of Biochemistry, School of Dentistry, Showa University

key words: prostaglandin, osteoclast, bone resorption, cAMP

炎症性骨吸収は、慢性関節リウマチや歯周疾患の際にしばしばみられる合併症である。その起因物質としては、インターロイキン1や各種プロスタグランジン (PGs) が候補としてあげられるが、その骨吸収機序の詳細は明らかとなっていない。

炎症巣で産生される PGs が、炎症性骨吸収のメディエーターとして関与していることは、① *in vitro* の骨器官培養系で各種 PGs が骨吸収能を持つこと³⁾、② 実験的歯牙移動が PGE₂ の局所注射で促進されること、③ 大量の PGE₂ の血管内注入で高カルシウム血症が惹起されることなどから明らかである。

ところが、最近、Chambers らにより、各種 PGs が骨吸収の主要な担い手である破骨細胞の骨吸収活性を直接に抑制することが明らかにされ^{4,5)}、PGs の骨吸収機序が混沌としてきた。

破骨細胞が骨吸収を促進する機序としては、新生破骨細胞の形成誘導と形成された破骨細胞の活性化という異なる過程が存在する。前者の過程を検討する実験系として、筆者らは、マウス骨髄細胞培養系を確立した¹⁾。そこで、新生破骨細胞形成誘導に及ぼす PGs の効果を、

マウス骨髄細胞培養系を用い検討した。

材料と方法

(1) 動物と試薬

実験には、静岡実験動物より購入した雄 ddy マウス (7~9 週齢) を用いた。PGE₂ は、シグマ社より購入した。PGE₁、PGF_{2α}、および 6k-PGF_{1α} は、小野薬品より、サケカルシトニンは、帝国臓器より供与された。

(2) マウス骨髄細胞培養系^{1,2)}

ddy マウスより脛骨を無菌的に分離し、1 ml の α -minimum essential medium (α -MEM) を骨髄腔に注入し、骨髄細胞を採取した。採取した細胞を10%非働化ウシ胎児血清加 α -MEM に浮遊させ、24 穴プレートに $7.5 \times 10^5 / 0.5 \text{ ml} / \text{穴}$ となるように分注し、培養に供した。培養液の交換は2日ごとに実施し、0.4 ml のみ新しい培養液と交換した。各種薬剤の添加は、培養開始時ならびに培養液交換時に実施した。

(3) 破骨細胞様多核細胞の算定

8 日間の培養後、プレートに付着した細胞を既報の方法に従って¹⁾、破骨細胞のマーカー酵素である酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ (tartrate-resistant acid phosphatase, TRACP) 染色に供した。本酵素染色に陽性で3核

* 昭和大学歯学部口腔生化学教室

図1 effect of graded concentrations of various PGs on the formation of OC-like cells

Mouse marrow mononuclear cells were cultured with increasing concentrations of PGE_1 (●), PGE_2 (▲), $\text{PGF}_{2\alpha}$ (○), or 6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ (△). After culture for 8 days, TRACP-positive multinucleated cells were counted as OC-like cells. No multinucleated OC-like cells were observed in the control culture (□). Data are expressed as the means $\pm$ SEM of quadruplicate cultures. Points without vertical bars represent experimental data with smaller SEMs than the size of each symbol. Significantly different from the control culture: * $P < 0.05$, ** $P < 0.005$.

以上の核を含む多核細胞を破骨細胞様多核細胞として数えた。

(4) 骨髓細胞による cAMP 産生量の測定

骨髓細胞 (1.5×10^6) に各種濃度の PGs を添加し、1 mM の isobutylmethylxanthine (IBMX) 存在下で 37°C 10 分間インキュベートした。産生された cAMP 量は、ラジオイムノアッセイにて測定した。骨髓細胞培養系でカルシトニンに対する cAMP 産生を測定する際は、24 穴プレートに付着した細胞のみを用いた。さらに、培養の最後の12時間は、 PGE_2 を除いた培養液にて培養した。

(5) 石灰化組織上の吸収窩の形成

骨髓細胞をクジラの象牙質切片上にて、 PGE_2 存在下で8日間培養した。培養後、象牙質切片上に形成された吸収窩を走査電顕を用いて検索した。

結果

図1にマウス骨髓細胞培養系における破骨細胞様の多核細胞形成に対する、各種 PGs の効果を示した。用い

図2 dose response curves of various PGs on the production of cAMP by mouse bone marrow cells

Freshly isolated marrow cells (1.5×10^6) were incubated for 10 min without (□) or with graded concentrations of PGE_1 (●), PGE_2 (▲), $\text{PGF}_{2\alpha}$ (○), or 6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ (△) in 0.5 ml of α -MEM containing 0.1% bovine serum albumin and 1 mM IBMX. The amount of cAMP was measured with a RIA cAMP kit and data are expressed as the means $\pm$ SEM of triplicate experiments. Points without vertical bars represent experimental data with smaller SEMs than the size of each symbol. Significantly different from the control culture: * $P < 0.05$, ** $P < 0.005$. Significantly different from the culture with PGE_2 at each concentration: † $P < 0.05$.

た4種の PGs のうち、 PGE_1 と PGE_2 はもっとも強力で、 10^{-8} ～ 10^{-5} M の濃度で用量依存的に破骨細胞様多核細胞の形成を促進した。 $\text{PGF}_{2\alpha}$ の多核細胞形成能は、これら2者に比較して弱く、形成促進には 10^{-6} ～ 10^{-5} M の高濃度を必要とした。6-k- $\text{PGF}_{1\alpha}$ の活性は、さらに弱く、 10^{-5} M の濃度でのみ破骨細胞様多核細胞の形成を促進した。

図2は、骨髓細胞による cAMP 産生に対する各種 PGs の効果を示した。 PGE_1 と PGE_2 は、低濃度より用量依存的に cAMP 産生を促進した。一方、 $\text{PGF}_{2\alpha}$ と 6-k- $\text{PGF}_{1\alpha}$ の cAMP 産生能は弱く、 10^{-5} M ではじめて有意の cAMP 産生促進がみられた。図1と図2より、PGs による破骨細胞様多核細胞の形成と骨髓細胞の cAMP 産生は、ほぼ相関していることが示された。

図3 effect of simultaneous addition of IBMX ($2.5 \times 10^{-6} \text{M}$) and increasing concentrations of PGE_2 on the formation of OC-like cells. Mouse marrow mononuclear cells were cultured in the presence (○) or absence (●) of IBMX, and the number of OC-like cells was counted on day 8. Data are expressed as the means $\pm$ SEM of quadruplicate cultures. Points without vertical bars represent experimental data with smaller SEMs than the size of each symbol. Significantly different from the cultures without IBMX at each concentration of PGE_2 : * $P < 0.01$.

図4 effect of increasing concentrations of dibutyryl cyclic AMP on the formation of OC-like cells

The number of OC-like cells was counted on day 8. Data are expressed as the means $\pm$ SEM of quadruplicate cultures.

図5 time course of changes in the formation of OC-like cells and the cAMP response to calcitonin in the cultures treated with PGE_2 . Mouse marrow mononuclear cells were cultured with (●) or without (○) 10^{-5}M PGE_2 . At indicated times, amounts of cyclic AMP produced by marrow cells exposed to 10^{-7}M calcitonin for 10 min were examined in the presence of IBMX. To minimize the effect of PGE_2 on cAMP production, marrow cells were cultured without PGE_2 for the last 12 hr before adding calcitonin. Basal levels of cAMP were similar at all times during the culture periods irrespective of the presence or absence of PGE_2 : $1.01 \pm 0.03 \text{ pmol/well}$ in the cultures without PGE_2 and $1.16 \pm 0.09 \text{ pmol/well}$ in the cultures with 10^{-5}M PGE_2 on day 8. Results are expressed as the means $\pm$ SEM of the treated/control ratio of quadruplicate cultures. The number of OC-like cells was scored in parallel cultures and results are expressed as the means $\pm$ SEM of quadruplicate cultures.

PGs による破骨細胞様多核細胞の形成過程における cAMP の関与をさらに明らかにするため、PGs による破骨細胞様細胞形成に対する IBMX (phosphodiesterase の強力な阻害剤) の効果を検討した。その結果は図3に示したように、IBMX の同時添加により、 PGE_2 による破骨細胞様多核細胞の形成は増強され、用量反応曲線は低濃度側へ移動した。さらに、cAMP のアナログである dibutyryl-cAMP によっても、破骨細胞様多核細胞の形成は促進された(図4)。

破骨細胞はカルシトニンに依存して cAMP 産生の促進が起こる。図5は、破骨細胞様多核細胞形成とカルシトニン依存性の cAMP 産生能の時間経過を示した。 PGE_2 無添加の対照群では、破骨細胞様多核細胞も形成されず、またカルシトニン依存の cAMP 産生もみられなか

った。一方、 PGE_2 添加の培養群では、破骨細胞様多核細胞形成の時間経過にほぼ一致して、カルシトニン依存性の cAMP 産生の増加がみられた。

最後に、 PGE_2 で誘導された破骨細胞様多核細胞に石灰化組織を吸収する能力があるかどうかを、象牙質切片上で PGE_2 存在下で骨髓細胞を培養して検討した。その結果は図 6 に示すように、多数の吸収窩が形成された。

考 察

PGs は、エイコサノイドの一種で、内因性、外因性を問わず種々の刺激に反応して、いろいろな細胞で産生される。産生された PGs は広範な生理活性を有し、局所ホルモンとしてその作用を発現すると考えられている。

in vitro で破骨細胞様の多核細胞が形成されることは、種々の骨髓細胞培養系で明らかになっている^{1,2,6)}。とりわけ、マウス骨髓細胞培養系で形成される破骨細胞様多核細胞は、以下に示すように、ほとんどすべての破骨細胞の要件を満足する。まず第一に、破骨細胞のマーカー酵素である TRACP に陽性であること。第二に、カルシトニンとの結合性を有し⁷⁾、カルシトニンに依存して cAMP 産生を示すこと(図 5)。第三に、石灰化組織を吸収する能力を有すること(図 6)。などである。このことから、マウス骨髓細胞培養系で形成された破骨細胞様多核細胞は、新生破骨細胞の形成誘導能を反映すると考えられる。

マウス骨髓細胞培養系における各種 PGs の破骨細胞様多核細胞の誘導能は、図 1 に示したように、 $\text{PGE}_1 \approx \text{PGE}_2 \gg \text{PGF}_{2\alpha} > 6\text{-k-PGF}_{1\alpha}$ の順であった。 PGE_2 に強力な破骨細胞様多核細胞の誘導能があることは、ネコの骨髓細胞培養系を用いた Ibbotson らの報告⁶⁾と一致する。また、Raisz らが詳細に報告している^{3,8-10)}各種 PGs の骨吸収能の程度(PGE_2 を 1 としたとき、 PGE_1 は 0.49, $\text{PGF}_{2\alpha}$ は 0.04, さらに $6\text{-k-PGF}_{1\alpha}$ はきわめて微弱)と破骨細胞様多核細胞誘導能の程度がほぼ相関することから、PGs の骨吸収に新生破骨細胞の誘導過程が重要な役割を果たしていると考えられる。

PGs の生理活性のあるものは、cAMP を 2 次メッセンジャーとして発現されるといわれている。PGs の骨吸収促進作用においても、*in vitro* の骨吸収能と骨芽細胞による cAMP 産生の程度がよく相関すること^{11,12)}や、cAMP のアナログ(dibutyl- cAMP)でも骨吸収が起こる¹³⁾ことから、2 次メッセンジャーとして cAMP の関与が示唆されている。

本研究は、骨吸収促進作用と同様、以下の理由で PGs の破骨細胞様多核細胞形成促進作用にも、cAMP が関与することを示している。まず第一に、PGs は骨髓細胞の cAMP 産生を促進し、その程度が破骨細胞様多核細胞の形成能とほぼ相関すること(図 1, 2)。第二に、

図 6 a typical scanning electron micrograph of a dentine slice on which bone marrow cells were cultured with 10^{-5} M PGE_2

After culture for 8 days, multinucleated cells formed on the dentine slice were removed and the slice was scanned by electron microscopy. (A) A low power view. $\times 160$. Many resorption lacunae (arrows) are recognized. (B) A high power view. $\times 1,000$. Numerous collagen fibers exposed are seen in a resorption cavity.

IBMX の同時添加により、 PGE_2 による破骨細胞様多核細胞の形成が増強されること(図 3)。第三に、dibutyl- cAMP の単独添加でも破骨細胞様多核細胞が形成されること(図 4)である。しかしながら、破骨細胞様多核細胞の形成能と骨髓細胞による cAMP の産生能の間には、若干の解離があることから、cAMP 以外の 2 次メッセンジャーも破骨細胞様多核細胞の形成過程に関与しているかもしれない。

骨髓細胞は造血細胞と間質細胞よりなり、前者は破骨細胞前駆細胞を、後者は骨芽細胞の前駆細胞を含むと考えられている^{14,15)}。PGs は、骨芽細胞ならびに破骨細胞の cAMP 産生を促進させることが報告されている^{11,12,16)}が、骨髓細胞培養系での標的細胞がどちらの細胞であるのかはまだ明らかでない。PGs は破骨細胞の前駆細胞に直接働き、破骨細胞への分化を促すのかもしれない。あるいは、別の種類の細胞(たとえば骨芽細胞系列の細胞)に働き、間接的に破骨細胞前駆細胞を破骨細胞に分化させるのかもしれない。また、あるいは両者の機序が同時に存在している可能性もあり、今後の検討課題である。

Chambers らは、PGs の破骨細胞に対する直接作用は、カルシトニンと同様、骨吸収を抑制することであると報告した^{4,5)}。Chambers らの報告が正しいとすると、

Raisz の実験系で認められる PGs の強力な骨吸収促進作用は、破骨細胞に対する PGs の直接作用では説明できない。マウス骨髄細胞培養系で、カルシトニン、活性型ビタミン D や副甲状腺ホルモンによる破骨細胞様多核細胞の形成を抑制するが、PGE₂ 自身は破骨細胞様多核細胞の強力な形成促進因子である²⁾。さらに、骨髄細胞培養系で形成された破骨細胞様多核細胞は、PGE₂ 存在下でも石灰化組織を吸収する (図 6)。

カルシトニンと PGs は、どちらも破骨細胞の cAMP 産生を介して作用を発現すると考えられているが、最近 Nicholson らは、破骨細胞の adenylate cyclase の活性化に関して、カルシトニンは持続的であるのに対し、PGs は一過性であると報告している¹⁷⁾。多分、このような cAMP 産生に対する作用の質的相違により、カルシトニンと PGs の作用の違いの一部は説明されるのかもしれない。

まとめ

破骨細胞が骨吸収を促進するメカニズムは、新生破骨細胞の形成誘導と、形成された破骨細胞の活性化という二つの過程にわけられる。今回の成績より、PGs の骨吸収促進作用には、前者の過程が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。また、この過程には cAMP が 2 次メッセンジャーとして関与していることが示唆された。

文 献

- 1) Takahashi, N., Yamana, H., Yoshiki, S., Roodman, G.D., Mundy, G.R., Boyde, A., Suda, T.: Osteoclast-like cell formation and its regulation by osteotropic hormones in a mouse bone marrow culture. *Endocrinology* 122: 1373-1382, 1988.
- 2) Akatsu, T., Takahashi, N., Debari, K., Morita, I., Murota, S., Nagata, N., Takatani, O., Suda, T.: Prostaglandins promote osteoclast-like cell formation by a mechanism involving cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate in mouse bone marrow cell cultures. *J. Bone Mineral Res.* 4: 29-35, 1989.
- 3) Raisz, L.G., Martin, T.J.: Prostaglandins in bone and mineral metabolism. Peck WA (ed) *Bone and Mineral Research, Annual 2*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1984, p 286-310.
- 4) Chambers, T.J., Fuller, K., Athanasou, N.A.: The effect of prostaglandins I₂, E₁, E₂ and dibutyl cyclic AMP on the cytoplasmic spreading of rat osteoclasts. *Br. J. Exp. Path.* 65: 557-566, 1984.
- 5) Chambers, T.J., McSheehy, P.M.J., Thomson, B.M., Fuller, K.: The effect of calcium-regulating hormones and prostaglandins on bone resorption by osteoclasts disaggregated from neonatal rabbit bones. *Endocrinology* 116: 234-239, 1985.
- 6) Ibbotson, K.J., Roodman, G.D., McManus, L.M., Mundy, G.R.: Identification and characterization of osteoclast-like cells and their progenitors in cultures of feline marrow mononuclear cells. *J. Cell Biol.* 99: 471-480, 1984.
- 7) Takahashi, N., Akatsu, T., Sasaki, T., Nicholson, G.C., Moseley, J.M., Martin, T.J., Suda, T.: Induction of calcitonin receptors by 1 α , 25-dihydroxy-vitamin D₃ in osteoclast-like multinucleated cells formed from mouse bone marrow cells. *Endocrinology* 123: 1504-1510, 1988.
- 8) Dietrich, J.W., Goodson, J.M., Raisz, L.G.: Stimulation of bone resorption by various prostaglandins in organ culture. *Prostaglandins* 10: 231-240, 1975.
- 9) Neuman, S.D., Raisz, L.G.: Effects of the prostacyclin products, 6-keto prostaglandin E₁ and 6-keto prostaglandin F_{1 α} , on bone resorption *in vitro*. *Prostaglandins Leuk. Med.* 15: 103-108, 1984.
- 10) Raisz, L.G., Dietrich, J.W., Simmons, H.A., Seyberth, H.W., Hubbard, W., Oates, J.A.: Effect of prostaglandin endoperoxides and metabolites on bone resorption *in vitro*. *Nature* 267: 532-534, 1977.
- 11) Atkins, D., Martin, T.J.: Rat osteogenic sarcoma cells: Effects of some prostaglandins, their metabolites and analogues on cyclic AMP production. *Prostaglandins* 13: 861-871, 1977.
- 12) Crawford, A., Atkins, D., Martin, T.J.: Rat osteogenic sarcoma cells: Comparison of the effects of prostaglandins E₁, E₂, I₂(prostacyclin), 6-keto F_{1 α} and thromboxane B₂ on cyclic AMP production and adenylate cyclase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 82: 1195-1201, 1978.
- 13) Klein, D.C., Raisz, L.G.: Role of adenosine-3', 5'-monophosphate in the hormonal regulation of bone resorption: Studies with cultured fetal bone. *Endocrinology* 89: 818-826, 1971.
- 14) Mundy, G.R., Roodman, G.D.: Osteoclast ontogeny and function. *Bone and Mineral Research, Annual 5*. (ed. Peck, W.A.) Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1987, p 209-297.
- 15) Tabuchi, C., Simmons, D.J., Fausto, A., Russell, J.E., Binderman, I., Avioli, L.V.: Bone deficit in ovariectomized rats. Functional contribution of the marrow stromal population and the effect of oral dihydrotachysterol treatment. *J. Clin. Invest.* 78: 637-642, 1986.
- 16) Nicholson, G.C., Livesey, S.A., Moseley, J.M., Martin, T.J.: Actions of calcitonin, parathyroid hormone, and prostaglandin E₂ on cyclic AMP formation in chicken and rat osteoclasts. *J. Cell Biochem.* 31: 229-241, 1986.

- 17) Nicholson, G.C., Moseley, J.M., Yates, A.J.P., Martin, T.J.: Control of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate production in osteoclasts: Calc-

itonin-induced persistent activation and homologous desensitization of adenylate cyclase. *Endocrinology* 120: 1902-1908, 1987.