

## プロスタグランジン F<sub>2</sub>αによる破骨細胞分化制御機構の解析

加門 正義 (筑波大学 生物学類 4年) 指導教官: 坂本 和一 (筑波大学 生物科学系)

### ◎導入・目的

プロスタグランジンは、生体内局所ホルモンの一つで生体内の様々な組織で産生され、多種多様な生理作用を引き起こす。その中の一つのプロスタグランジン F<sub>2</sub>α (PGF<sub>2</sub>α) は、特異的受容体である FP に作用することにより子宮筋収縮や黄体退縮、骨代謝などに関わっている。FP は七回膜貫通型の受容体であるが、最近、PGF<sub>2</sub>α 受容体調節タンパク質 (FPRP) が発見され、FP に相互作用して PGF<sub>2</sub>α の作用を調節していることが明らかにされた。

一方、骨は破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成を繰り返し、常に代謝されて新しい骨基質に置き換えられている。破骨細胞は造血幹細胞に由来し、そこから分化した破骨細胞前駆細胞は、破骨細胞分化誘導因子 (RANKL) の作用により多核化して破骨細胞へと分化する。RANKL は骨組織の骨芽細胞から産生され、RANKL 受容体を有する破骨細胞前駆細胞との細胞間相互作用により、破骨細胞の分化形成を誘導すると考えられている。

既に当研究室では、PGF<sub>2</sub>α が破骨細胞の細胞接着性に関わることを明らかにしていることから、PGE<sub>2</sub> ばかりでなく PGF<sub>2</sub>α も破骨細胞の分化に重要な役割を演じていることが示唆されている。そこで本研究は、破骨細胞の分化に対する PGF<sub>2</sub>α の生理作用とその作用メカニズムを明らかにすることを目的とした。

### ◎方法

マウスマクロファージ由来の RAW264 細胞は、破骨細胞分化誘導因子である RANKL を加えると破骨細胞に分化することが知られている。そこで、まず RANKL 発現プラスミド PGX-2TK-RANKL を大腸菌 JM109 に導入し、IPTG (Isopropyl-β-D-ThioGalactopyranoside) による発現誘導を行い、GST 融合 RANKL を Glutathion Sepharose4B を用いて精製した。更に、破骨細胞への分化を誘導するために、精製した RANKL (50、100、150、200ng/ml) を含む α-MEM 培地 (10%FBS、1%NEAA) を使い、RAW264 細胞を 48-well plate 上に  $2.5 \times 10^3$ 、 $5 \times 10^3$ 、 $1 \times 10^4$  cells/well の密度でまいて培養を行った。培養 3 日後に各濃度の RANKL を含む培地を交換し、5 日後に 4% パ

ラホルムアルデヒドで固定して酒石酸耐性酸性ホスファターゼ染色 (TRAP 染色) を行った。また、RAW264 細胞を RANKL (0 または 100ng/ml) を含む培地でそれぞれ 6cm dish 上で培養し、破骨細胞への分化前 (1 日後) または分化後 (5 日後) に細胞を回収して RNA を抽出し、RT-PCR を行って内部標準とする G3PDH の mRNA の発現を調べた。

### ◎結果・考察

GST 融合タンパク質として  $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  の RANKL が精製できた。精製した RANKL を RAW264 細胞に加えると、どの濃度でも破骨細胞の分化が観察されたが (1well 当たり 10 ~ 100 個)、RANKL150ng/ml、細胞密度  $5 \times 10^3$  cells/well の場合に、破骨細胞が最も多く観察された (図参照)。細胞密度が  $5 \times 10^3$  cells/well 以上の場合は細胞が多すぎるために分化した割合が低く、また、RANKL 濃度 150ng/ml 以上の場合はそれ以上の破骨細胞の数の増加は認められなかった。また、RT-PCR 実験により内部標準となる G3PDH を検出できたが、現在、更に FP や FPRP 及び FPRP に相互作用する CD9mRNA の発現を調べているところである。今後、PGF<sub>2</sub>α の作用による破骨細胞の形態的变化と各 mRNA の発現の変化との関連を調べる予定である。

