

## 酸化ストレスによる破骨細胞の分化制御に関する研究

原田 絢子 (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〕

骨は、骨芽細胞による骨形成と破骨細胞による骨吸収により絶えず新しく作り変えられている。通常は、骨量は骨形成と骨吸収のバランスが保たれて一定に維持されているが、このバランスが崩れると骨形成量の多い場合は大理石病に、骨吸収量の多い場合は骨粗鬆症になる。この骨代謝に関わる破骨細胞は、造血幹細胞から分化した前駆細胞の融合により形成される多核体の細胞で、骨表面に接着して酸やタンパク質分解酵素を分泌して骨を溶かすという重要な働きをしている。

一方、生体では放射線、紫外線、金属、有害物質などの外的要因や、低酸素状態(虚血)、炎症などの内的要因によるストレスによって活性酸素・活性窒素・フリーラジカルが生成することが知られている。最近、破骨細胞の分化や生体における骨吸収の促進に一酸化窒素などの活性酸素が深く関わる事が明らかになってきた。

そこで本研究では、破骨細胞の分化における活性酸素の働きを明らかにすることを目的に、マウスのマクロファージ様細胞 RAW264 が破骨細胞に分化する際に、過酸化水素がどの様な生理作用を示すのか調べた。

## 〔方法〕

マウスのマクロファージ由来の RAW264 細胞は、RANKL (Receptor Activator of NF- $\kappa$ B Ligand) により破骨細胞に分化することが知られている。まず実験で用いる RANKL を精製するために、RANKL 発現プラスミド PGX-2TK-RANKL を大腸菌 JM109 に導入し、IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-ThioGalactopyranoside) で発現を誘導させ、Glutathion Sepharose 4B を用いて GST-RANKL を精製した。さらに、RAW264 の培養系に精製した GST-RANKL を 0、50、100、200、500ng/ml になるように添加し、破骨細胞への分化能を調べた。

次に、RAW264 が破骨細胞に分化する際に過酸化水素がどの様に影響するか調べるために、 $H_2O_2$  の濃度 (0、1n、10n、100n、1  $\mu$ 、10  $\mu$ 、20  $\mu$ 、30  $\mu$ 、40  $\mu$ 、50  $\mu$  M) や、 $H_2O_2$  の添加時期 (培養開始 0、5、24、72 時間

後) を変えて培養系に  $H_2O_2$  を添加した。RAW264 細胞は 100ng/ml RANKL 存在下の  $\alpha$ -MEM (10% FBS、1% NEAA) に懸濁し、48well plate 上で  $2.5 \times 10^3$  または  $5.0 \times 10^3$  cells/well の細胞密度で播いて培養を行なった。培養 3 日後に培地を換え、培養 5 日後に 4% パラフォルムアルデヒドで固定した後、TRAP 染色 (酒石酸耐性酸性フォスファターゼ染色) を行い、3 核以上の TRAP 陽性の破骨細胞の数を数えて  $H_2O_2$  による破骨細胞の分化への影響を調べた。

次に、RAW264 細胞を 100ng/ml RANKL 存在下の  $\alpha$ -MEM 中で 6cm plate に  $1.0 \times 10^5$  cells/well になるように播き、5 時間後に  $H_2O_2$  (0、1n、10n、100n、1  $\mu$ 、10  $\mu$  M) を添加し、培養 3 日後と 5 日後に細胞を回収して RNA 抽出を行った。この RNA を用いて RT-PCR を行うことにより、破骨細胞で発現することが知られている TRAP やカルシトニンレセプターの mRNA の発現を調べた。

## 〔結果・考察〕

RANKL の精製を行なったところ、1L の大腸菌培養液あたり約 0.7g の GST-RANKL が精製でき、RAW264 の培養系にこの RANKL を添加したところ濃度依存的に破骨細胞の数の増加が観察された。そこで、100ng/ml の RANKL 存在下で異なる濃度の  $H_2O_2$  を添加したところ、100n ~ 10  $\mu$  M の  $H_2O_2$  濃度で TRAP 陽性の破骨細胞が増加し、30  $\mu$  M 以上の  $H_2O_2$  濃度では死滅する細胞が増加することがわかった。また、 $H_2O_2$  の添加時期 (培養開始 0、5、24、72 時間後) を変えて培養した場合には、培地換え等の影響を受けたためか、あまり安定した結果は得られなかった。

さらに RT-PCR の実験では TRAP とカルシトニンレセプターの mRNA の発現は培養 3 日後より 5 日後のほうが発現が増加していることが確認された。 $H_2O_2$  濃度による mRNA の発現の変化は現在調べているところである。

今後、 $H_2O_2$  濃度による破骨細胞の分化への影響や破骨細胞への分化に関わる様々な mRNA の発現を詳しく調べていく予定である。