

— 総 説 —

骨改造現象における細胞連鎖機構に関する 細胞生物学的知見

小 澤 英 浩

新潟大学歯学部口腔解剖学第一教室

Cell Biological Aspects on the Cellular Sequence in Bone Remodeling

Hidehiro OZAWA

(Niigata University School of Dentistry,
1st Department of Oral Anatomy)

はじめに

骨組織を構成する細胞は間葉系骨原性細胞由来の骨芽細胞、骨細胞とそれらの前駆細胞、ならびに造血幹細胞に由来する破骨細胞とその前駆細胞からなり、骨改造現象はそれらの細胞群の連鎖的变化に基づいて起こる。

骨芽細胞ならびにその前駆細胞は主として骨形成に関与すると共に破骨細胞の分化・活性化にも重要な役割を果し、さらに骨細胞と共同して骨組織の維持、ミネラルのホメオステシスにおける関門としての機能を果している。一方、破骨細胞は骨組織を吸収しそこに新たな骨形成を誘導する骨改造の中心的役割を果す。これら各細胞の機能は互いに関連し依存し合っており、組織細胞学的にも骨の形成と吸収の間には常に動的平衡が維持されていることが示されている。

骨の骨膜面、骨内膜面、ハバース管面における骨改造は、骨の代謝回転を司る一群の細胞とそこで新生される骨基質、すなわちBMU (Basic Multi-cellular Unit) を一つの組織単位として起こる。BMUにおいては常に骨吸収が先行し、その

後引き続いて骨形成が連鎖的に起こり、Baronらはその過程を細胞学的に捉え、休止期、活性化期、吸収期、逆転期、形成期の5期に分けて考えている⁽¹⁾。これら一連の細胞連鎖機構は、物理化学的刺激、体液性因子のみならず、各種サイトカインあるいは骨基質中に含まれている様々な局所因子の作用によって調節されている。さらに、それら諸因子の作用発現に対応する各細胞の相互的位置関係や形態変化なども骨改造現象における細胞連鎖機構にとって不可欠な要因と考えられる。

骨改造現象の細胞生物学的特徴

1) 骨芽細胞の分化石灰化開始期・骨形成期・休止期

骨組織の形成は、胎生期の未分化間葉系細胞の集団化として始まり、次いでそこから骨芽細胞の前駆細胞(前骨芽細胞)への分化を開始する膜性骨化と、軟骨組織を経て骨化する内軟骨性骨化とに分けられる。通常、骨組織では未分化間葉細胞は増殖能と分化能を持ったまま、骨原性細胞として骨膜内層、骨内膜層、骨梁表面や中心管周囲に休止状態で存在する。

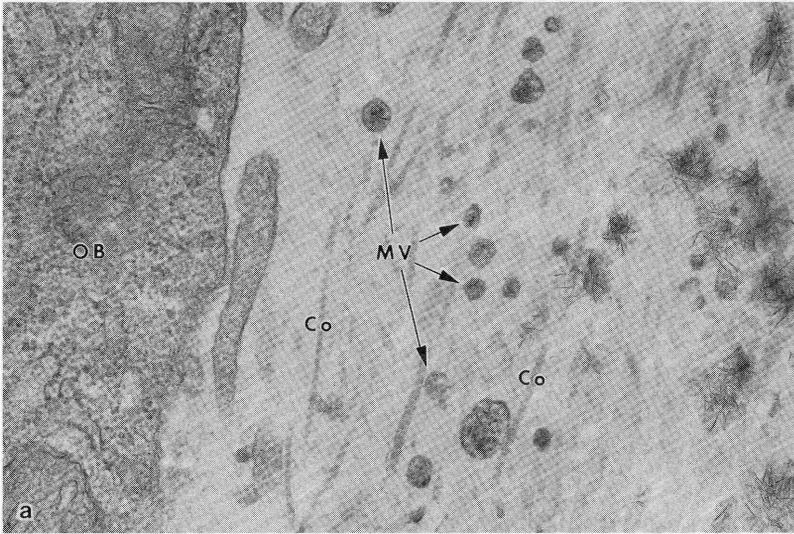
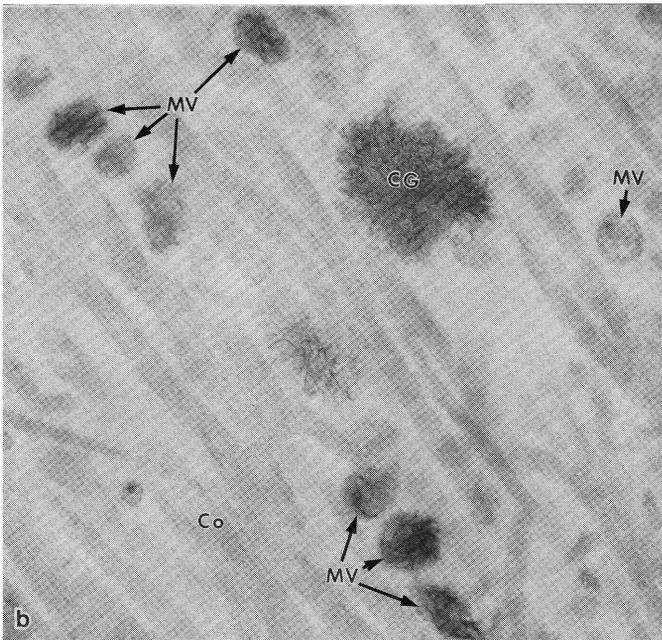


図1：骨形成開始期の骨芽細胞と基質小胞性石灰化。このような石灰化は急速に起こる骨改造現象にも認められる。

a：遊離リボソームに富む骨芽細胞(OB)に近接して疎らに配列する細いコラーゲン細線維(Co)とその間に散在する基質小胞(MV)と石灰化球が認められる。



b：基質小胞性初期石灰化像。I型コラーゲン細線維(Co)間には結晶化の各過程を示す基質小胞(MV)と石灰化球(CG)が見られる。

骨原性細胞から分化した前骨芽細胞の多くはグリコーゲン顆粒を豊富に持ちI型コラーゲンの他、III、V、VI型コラーゲンや多糖体などの有機基質を盛んに分泌する⁽²⁾。前骨芽細胞は骨芽細胞へと分化を開始すると、次第に細胞膜のアルカリ性ホスファターゼ(ALPase)活性が顕著になり、細胞極性の発現と共に基質小胞を分泌し、そこに最初の石灰化が起こる^(3,4)(図1)。基質小胞性石灰

化からコラーゲン性石灰化を経て、幼若な骨基質が形成されると、骨芽細胞に近接して局在するようになる前骨芽細胞は単に骨芽細胞への分化する予備細胞群として存在するのみでなく、上皮小体(副甲状腺)ホルモン(PTH)のレセプターを獲得し、自らの増殖、分化と共に近接して出現する破骨細胞の分化・活性化に対しても直接的に作用する可能性がGoltzmanら⁽⁵⁾によるI-PTHのオー

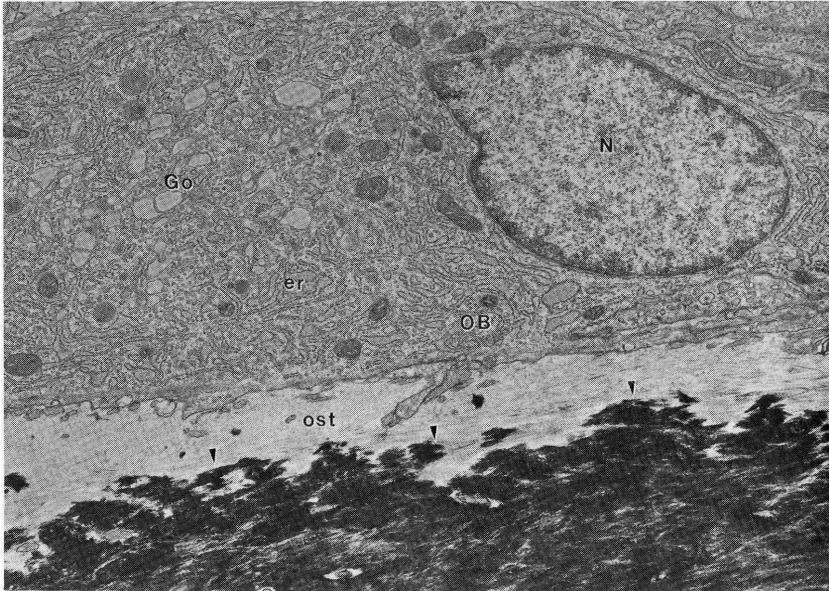


図2：活発な骨形成を行う骨芽細胞と添加的石灰化。骨芽細胞(OB)は粗面小胞体(er)やゴルジ体(Go)が発達し、活発な骨形成を示す。類骨(ost)中には基質小胞はなく、石灰化は石灰化前線(矢頭)に添加的に起こる。類骨基質は細いコラーゲン細線維で占められるが、石灰化骨のコラーゲン細線維はより太い線維から成る。N：核

トラジオグラフィー(A.R)の結果示されている。ER rich-cell, endocytic cellといわれる前骨芽細胞や間質細胞は Epidermal Growth Factor (EGF) のレセプターを持つことが¹²⁵I-EGF のA.Rで明らかにされており、この場合にも破骨細胞の分化や活性化とこれら前骨芽細胞様細胞との相互作用の可能性が論じられている⁽⁶⁾。

分化した骨芽細胞は骨表面に単層配列し、主として骨の有機性基質の形成、石灰化、電解質代謝に関与するが、同時に破骨細胞の分化・誘導・活性化にも重要な役割を果たす。

骨基質形成の盛んな骨芽細胞は活性型骨芽細胞と呼ばれ、粗面小胞(rER)とゴルジ体の発達、ならびに分泌顆粒で特徴づけられる。活性型骨芽細胞と石灰化した骨質との間には、一層の未石灰化骨基質である類骨層が介在する(図2)。

これらの骨芽細胞によって分泌される骨の有機基質には、I型コラーゲンを主体として、その他、Caやアパタイト結晶に親和性の強いオステオカルシン(BGP)、基質グラ蛋白質(MGP)オステオネクチン、オステオポンチンなどの非コラーゲ

ン蛋白質や多糖体、ならびに骨改造を調節する各種の骨成長因子なども含まれている⁽⁷⁾。

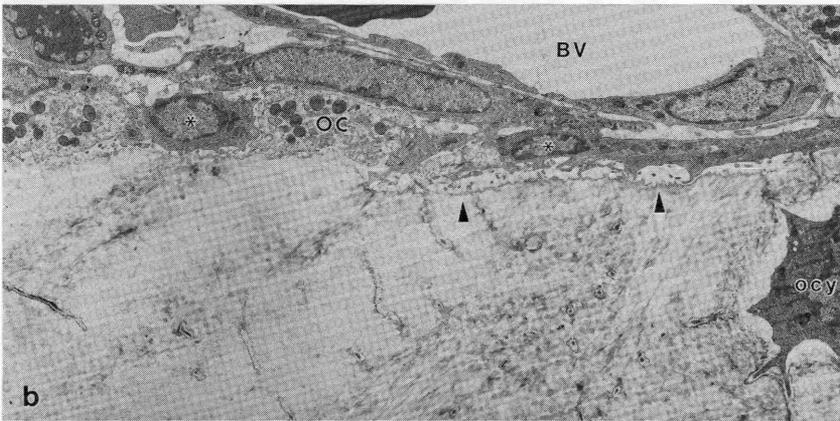
形成期骨芽細胞のあるものは細胞極性を失いつつ自らの周囲に骨基質を形成して埋め込まれ骨細胞となるが、他の骨芽細胞はやがて骨形成能を失い扁平化して、休止期の骨芽細胞またはBone Lining Cells(BLC)と呼ばれるようになる⁽⁸⁻¹⁰⁾(図3)。休止期の骨芽細胞は細胞質に乏しく、各細胞小器官も未発達で類骨層を介さないで直接石灰化骨基質と接して局在するか、あるいは僅かな未石灰化骨基質を介して石灰化骨基質と接している。

骨芽細胞の扁平化に伴い類骨層が消失して行く過程は、単に骨芽細胞の骨形成能の低下のみならず骨芽細胞によるコラーゲナーゼ産生所見とも関連して論じられている。すなわちSakamotoら⁽¹¹⁾は、骨組織のコラーゲナーゼに対する特異抗体を用い免疫組織化学的にコラーゲナーゼを染め出したところ、この酵素は破骨細胞にはなく骨芽細胞と骨髄中の単核細胞に局在することを見出したのである。その後培養骨芽細胞系細胞にもコラーゲナーゼ活性が明らかにされ、しかもその活性はPTH、PGE₂、



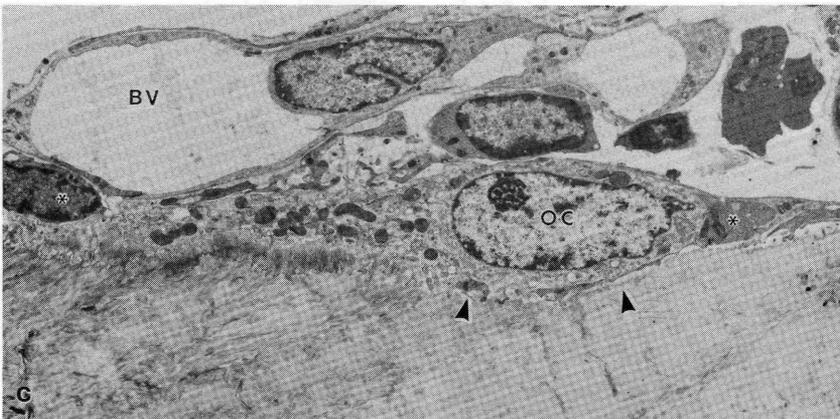
図3：休止期の骨芽細胞

a：扁平化した骨芽細胞Bone Lining Cell(BLC)は細胞質に乏しく、細胞小器官の発達も悪い。類骨層はなく骨表面のLamina Limitans(LL)に直接接している。N：核



b：多様な形態のBone Lining Cells(米印)とその間に入り込んで局在する破骨細胞(Oc)の一部を示す電顕像。

矢頭：Lamina Limitans、BV：血管、Ocy：骨細胞



c：破骨細胞(Oc)を取り巻くように密接して局在するBone Lining Cell(米印)。

矢頭：Lamina Limitans、BV：血管

1.25(OH)₂D₃、メカニカルストレスなどによっても促進されることが判かった⁽¹²⁻¹⁴⁾。またこれらのコラゲナーゼは潜能性であり、骨芽細胞で産生される plasminogen activator により活性化され、その産生は PTH 等によって促進される⁽¹⁵⁾。すなわち、骨芽細胞によって産生され、同時に活性化されるコラゲナーゼの役割は、破骨細胞による骨吸収に先立って骨芽細胞が類骨を分解除去し、石灰化した骨基質を露出させ、同時にコラーゲンの分解産物や類骨中に含まれている BGP、TGF-β、PDGF、α₂-HS グリコプロテインなど化学走性物質の溶出と関連付けて考えられている。これらの溶出した物質はマクロファージに対する化学走性物質としても知られており、同じ骨髄細胞系である破骨細胞の前駆細胞を骨表面へ引き寄せる可能性物質として注目されている。微細構造学的には類骨が除去された BLC と直接する骨表面は、電子密な境界板 Lamina Limitans (LL) で覆われる事が多い⁽¹⁶⁻¹⁸⁾。LL は石灰化骨組織と組織液間に介在する一種の生物学的障壁と考えられ、種々の物質を吸着させる性質を持っているため、そこに前述の化学走性物質が蓄えられている可能性も考えられる。なお、骨細胞もコラゲナーゼ産性能を有し、後述するように破骨細胞による骨吸収の補助的役割を果たしている可能性も指摘されている。

骨表面を広く覆う扁平な骨芽細胞 (BLC) の機能については余り知られていない。しかし、体液と骨組織との境界に位置しており、骨細胞とも深いかわり合いを持つため、Ca や P などミネラルの輸送調節機構と関連して論じられる ALPase や Ca-ATPase 活性の局在性、あるいは骨芽細胞間、骨芽細胞・骨細胞間、骨細胞同士間に形成されているギャップ結合による細胞性の網目構造は、骨組織における骨芽細胞・骨細胞系によるミネラルの輸送調節機構の可能性を形態学的に示唆している⁽¹⁹⁾。これら骨芽細胞・骨細胞系細胞間のギャップ結合は一定領域でホルモンその他の刺激によるシンクロナイズした細胞の動態を可能にすると共に、骨細胞・骨芽細胞系によるイオンの細胞内輸送経路を可能にしている⁽²⁰⁾。すなわち、Bone

Cell Unit として知られる骨細胞・骨芽細胞

(BLC) 系は骨内の液相に区画を作り、Ca の流量調節機構、特に骨からの Ca 流出に対して大きな役割を果たしている可能性が強い^(21,22)。なお、ギャップ結合は破骨細胞系細胞と骨芽細胞系細胞の間ではなく、骨細胞を含む骨芽細胞系列の細胞間のみ認められる。これは形態的にも機能的にもシンクロナイズした細胞性の網目を骨組織全体にわたって作っている骨芽細胞系細胞が、骨組織の代謝維持の中核をなしており、破骨細胞はその調節下に置かれていることを物語っている。

骨芽細胞と骨細胞は連携して骨溶解を起こすこともあり、骨細胞性骨溶解 Osteocytic Osteolysis (Belanger)⁽²³⁾ と呼ばれている。例えば PTH は骨細胞への Ca 取り込みの増加、骨細胞の肥大化とそれに伴う骨小腔の拡大化や LL の消失・不規則化などをもたらすことが形態学的に観察されており、それらの形態変化が骨細胞による骨質の溶解現象と関連づけて論じられている。この現象は鳥類の髓骨や Ca 欠乏ラットの骨組織、あるいは過剰のビタミン D₃ 投与などによっても認められており、いずれも血中電解質のなかで、特に骨と関係する Ca²⁺、Mg²⁺、HPO₄²⁻ などが骨細胞によって調節される現象 (骨細胞性代謝回転) として理解されている。しかし、この現象の形態学的解釈には Boyde⁽²⁴⁾ のように、Belanger らの主張している骨細胞性骨溶解の像は、必ずしも骨細胞による骨溶解を示すとは限らないとし、骨細胞性骨溶解には骨細胞や骨芽細胞の形態変化は不要であると批判する意見もある。同様に Sissons ら⁽²⁵⁾ も、カルシウム欠乏食によるラット骨組織の骨小腔所見は骨細胞による骨吸収ではなく、むしろ骨形成障害によるものと見なしており、この問題はなお十分な形態学的検討が必要とされよう。

以上のような骨芽細胞の多様な機能は、ホルモン、ビタミン、局所因子としての各種サイトカイン等によって調節されており、関連するレセプターの存在も明らかにされている。例えば、PTH, 1α, 25(OH)₂D₃, TNF-α, β, Prostaglandins (PGs), IL-1α, β などのレセプターは骨芽細胞やその前駆細胞に局在し、破骨細胞の分化・活性化に対

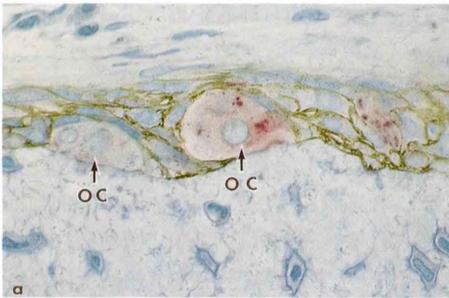
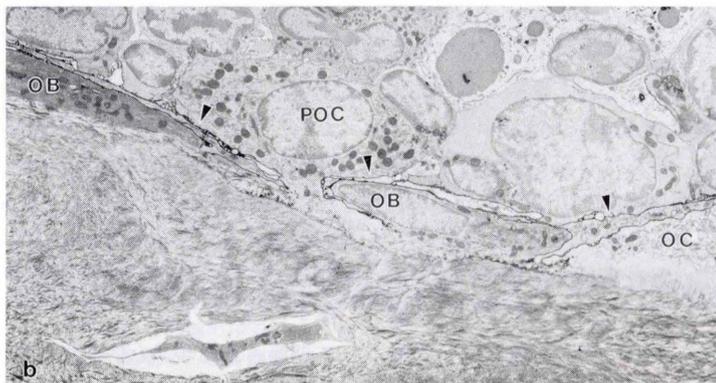


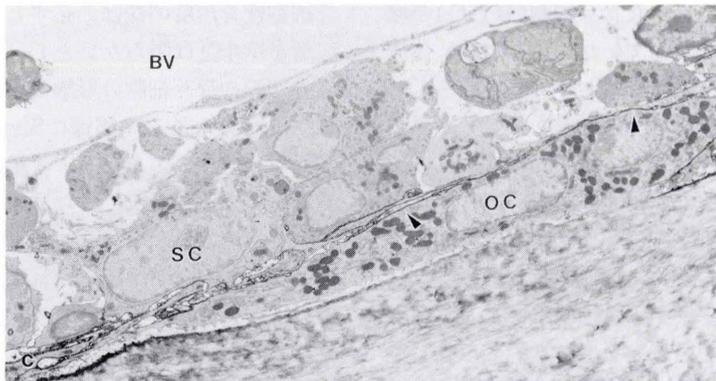
図4：破骨細胞の分化と骨芽細胞系細胞。

- a：ALPase活性とTRACPase活性局在の同時染色法による所見。骨表面で多核化しつつあるTRACPase陽性の破骨細胞(OC)を密接して取り囲む褐色に染められたALPase陽性の骨芽細胞系細胞。(小黒一郎、小澤英浩：The Bone, Vol.4(2),1990)

して作用発現をする可能性も指摘されている^(26,27)。Estrogenのレセプターも鳥類のみならず、人を含む哺乳類の骨芽細胞にも存在することが明らかにされ、DNA合成やコラーゲン合成を促進することが示されている⁽²⁸⁾。なお破骨細胞の分化活性化を抑制するCalcitonin(CT)のレセプターはまだ骨芽細胞には見いだされていないが、ある種



- b：骨表面へ定着した前破骨細胞と密接するALPase陽性の骨芽細胞と骨髄間質細胞の突起(矢頭)



- c：多核化しつつある破骨細胞(OC)に密接する間質細胞(SC)の突起はALPase活性を示すが(矢頭)、同じ細胞の他の部位はALPase活性を示さない。BV：血管

の骨芽細胞培養細胞はCTにより骨形成能を活性化する可能性が示唆されており^(30,31)、In vivoでも骨梁増加を認める結果が報告されている⁽³²⁾。後述するように、骨芽細胞系と破骨細胞系の細胞は共に細胞分化の過程で密接した局在性を維持しており、相互作用を営んでいる可能性が強い。この相互作用は破骨細胞の分化に対する骨芽細胞系細胞の働き掛けのみならず、破骨細胞系から骨芽細胞系細胞に対する作用も考えられ、CTによる骨形成促進効果はその現れの一つかも知れない。

3) 破骨細胞の分化・活性化と骨芽細胞(33)

破骨細胞は造血幹細胞に由来し、IL-3, CFU-GM, 1,25(OH)₂D₃などの作用により単球・マクロファージ系列の細胞から分化すると考えられている⁽³⁴⁾。このようにして分化した破骨細胞の単核前駆細胞は、前破骨細胞となり骨芽細胞の形態変化に伴い開大・露出された骨面に引き寄せられて定着し、多核化して破骨細胞へと分化する⁽³⁵⁾ (図

4)。前破骨細胞を骨表面へ誘導し、定着させるための骨芽細胞の形態変化はPTHによっても起こる。実験的にはPTHの投与により、骨芽細胞は形態変化を生じ伸長しながら互いに平行して配列するようになり、そこに細胞間隙が形成される所見や⁽³⁶⁻³⁹⁾、培養骨芽細胞においても収縮などの形態変化が起こることが報告されている^(40,41)。最近、Aliらは一層の骨芽細胞層を露出させて骨を器官培養する方法を考案し、PTHを投与すると骨芽細胞は形態変化を起こすが、PGE₂を与えても変化しない事をSEM観察で明らかにしている⁽⁴²⁾。このような骨芽細胞の形態変化によって露出された骨表面には、各種の化学走性物質が溶出しており、そこへ前破骨細胞が誘導され破骨細胞へと分化する可能性については既に述べた。Rodan & Martinが提示した破骨細胞に対する骨芽細胞の役割に関する仮説は、以上のような骨芽細胞の形態変化を伴う形態学的所見によっても支持される。実際、骨表面に近接して見られる前破骨細胞や破骨細胞には、多くの場合骨芽細胞ないしは間質細胞が密接して局在している。これらの形態学的所見は、破骨細胞の分化や骨表面への誘導には、骨表面の化学走性物質のみならず、破骨細胞の前駆細胞周囲を網の目を作って取り囲んでいる間葉系細胞(間質細胞・骨芽細胞系細胞)が重要な役割を果たしている可能性を示している(図5)。すなわち、破骨細

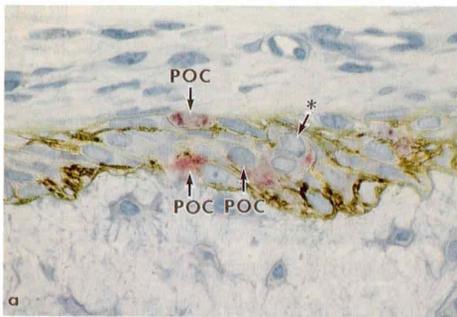


図5：前破骨細胞の破骨細胞への分化。

- a：ALPase活性とTRACPase活性の同時染色法による骨膜内層における破骨細胞の前駆細胞(POC)と骨芽細胞系細胞の観察所見。米印は2核の前破骨細胞を示す。骨膜表層には分裂像を示す前駆細胞が見られる。(小黒一郎、小澤英浩：The Bone, Vol.4 (2), 1990)
- b：幼若ラット頭頂骨骨膜面における前破骨細胞と骨芽細胞系細胞の接触像。単核の前破骨細胞(POC)を取り囲む骨芽細胞の突起(矢頭)とその周囲の骨芽細胞(OB)。

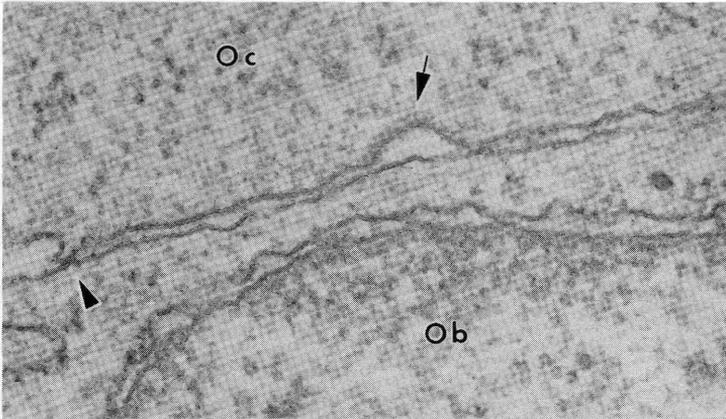


図6：破骨細胞系細胞(Oc)と骨芽細胞系細胞(Ob)の接触部位の強拡大像。所々細胞膜の接着部位(矢頭)が見られ、その近くに被覆小窩(矢印)が形成される事が多い。

胞の前駆細胞は骨芽細胞系細胞と互いに接触しながら情報交換をして分化し骨表面へと誘導されると考えられる。両系列の細胞の接触部位には斑点状の小さな膜接着が観察され、そのような接着部位で囲まれた細胞間の僅かなスペースを形成する両細胞の細胞膜には、それぞれの細胞から分泌される因子(サイトカイン)を効率的にレセプターを介して取り込む被覆小窩も観察される(図6)。また、これらの細胞膜には各種レクチンで染め出される糖鎖が発達しており、それらを介しての細胞間認識作用と共に、細胞膜表面における各種サイトカインなどの濃縮機構⁽⁴⁴⁾も暗示している。このようなCell-Cell接触による細胞分化が血液細胞の分化に見られるようなホーミングレセプター^(45,46)などを介して行われているのか等については今後の検討課題である。さらに細胞膜の膜癒合を示す微細形態学的所見も報告されており、両細胞間におけるより直接的な情報伝達機構も考えられる⁽³⁵⁾。

in vitroでの破骨細胞の分化に対する骨芽細胞系細胞の関与を示唆する最初の報告は、Burgerら⁽⁴⁷⁾によってなされた。すなわち彼女らは破骨細胞がまだ出現しない時期の胎仔骨を造血組織と共培養すると、生きた胎仔骨との共培養時にのみ破骨細胞が分化することを見だし、破骨細胞の分化には骨芽細胞が必要である事を示した。さらに、Takahashi, Udagawaら^(48,49)は $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ を添

加して培地で骨髄細胞あるいは脾細胞を骨芽細胞系細胞ないしは間質細胞と共培養して破骨細胞の分化過程を観察し、破骨細胞の分化・活性化には骨芽細胞の共存が必要であり、しかも互いに直接する事が重要であることを示している。微細構造学的にも両細胞系列の細胞がin vivoにおけると同様に細胞膜接触を介して密接し、そこには被覆小窩の形成も認められる事が確認されている⁽⁵⁰⁾。

活性化した破骨細胞と骨芽細胞ないしはその前駆細胞との関係は、破骨細胞の分化の過程と同様な微細構造学的特徴を示す(図7)。すなわち、両細胞間には膜の斑点状接着構造とともに、しばしば被覆小窩の形成が見られ、両細胞間の情報交換機構を示唆している。破骨細胞と骨芽細胞系細胞の相互関係を示す微細構造学的所見は骨吸収のみか連続して起こるラット切歯に面する唇側歯槽骨表面にも観察される。すなわち、骨形成の見られないこの骨吸収部位においても、破骨細胞間や破骨細胞に近接して局在する血管との間にはALPase活性を示す骨芽細胞様細胞が破骨細胞に密接して認められる(図8)。この所見は直接骨形成をしない骨芽細胞様特徴を持ったこれらの細胞も恐らく破骨細胞の分化や活性化に関与していることを示している⁽⁵¹⁾。

in vitroでの破骨細胞の活性化に対する骨芽細胞の役割については、Chambersら⁽⁵²⁾が初めて単

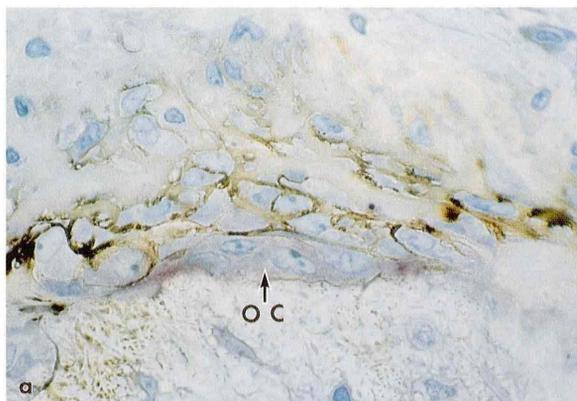
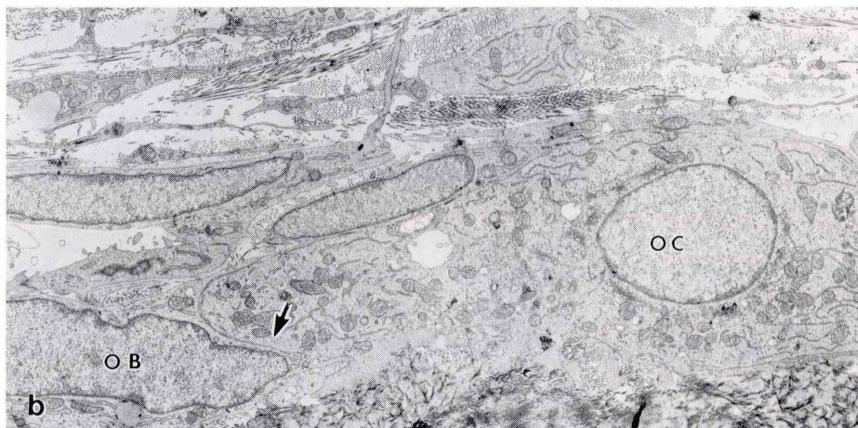


図7：活性化した破骨細胞と密接して局在する骨芽細胞系細胞。

a：ALPase活性とTRACPase活性の同時染色法による骨膜面における破骨細胞(OC)の骨吸収像と周囲のALPase活性陽性細胞。(小黒一郎、小澤英浩：The Bone, Vol.4(2),1990)



b：幼若ラット頭頂骨膜側における破骨細胞(OC)と骨芽細胞(OB)の接触。矢印は被覆小窩。

離した破骨細胞を用いて検討を行った。すなわちCTにより不活性化された単離破骨細胞に対する $1.25(\text{OH})_2\text{D}_3$ やPTHの作用は、骨芽細胞と共培養するかPTHや $1.25(\text{OH})_2\text{D}_3$ を添加して培養した骨芽細胞の培養上清を加えてはじめて破骨細胞が賦活化する事を見いだしたのである。破骨細胞への分化・活性化を促進する因子として知られているPTH, $1.25(\text{OH})_2\text{D}_3$, PGE_2 ,DIF, $\text{IL-1}\alpha$, $\text{TNF-}\beta$, $\text{TGF-}\alpha$ など各種のホルモンやサイトカインのレセプターが多くが骨芽細胞に局在するこ

とは既に述べた。Chambersらは、これらの多くが骨芽細胞を介して破骨細胞に作用することを明らかにしたが、その中で、 IL-1 , TNF などのサイトカインは少なくともin vitroでは骨芽細胞系細胞の増殖や分化に対して抑制的に作用するので、それらは骨吸収促進因子というよりはむしろ骨形成抑制因子として作用するアンカップラーではな(53-55)かろうかと推測されている。

一方、破骨細胞の分化活性化を直接抑制する物質として、CT,PGs,Macrophage Stimulating

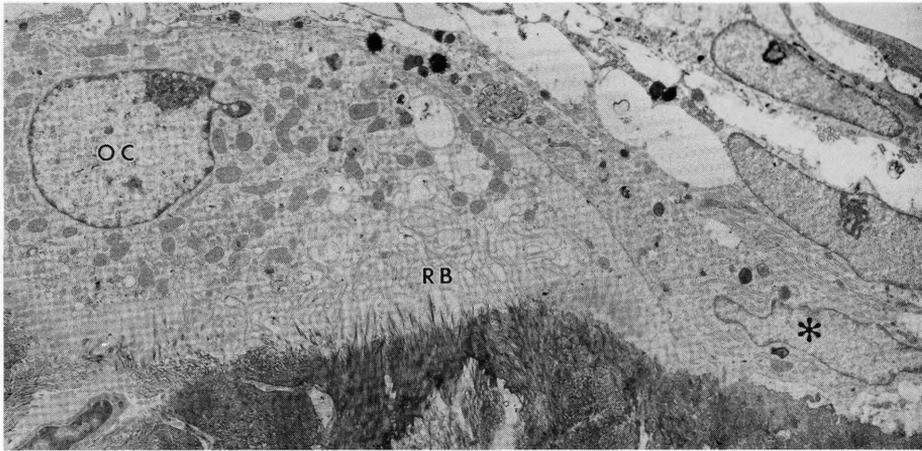


図8：ラット切歯唇側歯槽骨表面における破骨細胞。この骨表面は常に骨吸収のみで、骨形成は起こらない。その場合でも破骨細胞(OC)には骨芽細胞様細胞(米印)が密接している。RB：波状縁

Factor(M-CSF)⁽⁵⁶⁾、 $\text{INF-}\gamma$ 、 $\text{TNF-}\beta$ 等が挙げられているが、レセプターに関してはCTが良く知られている⁽⁵⁷⁾。最近我々はCTのレセプターが破骨細胞の前駆細胞にも存在し、細胞分化の進行に伴いレセプターの数も増加する傾向があることをI-eCT(エルカトニン)によるオートラジオグラフィーの結果明らかにした。この事実はCTが破骨細胞の活性化を抑制するのみならず、その分化も調節する可能性を物語っている。また、電顕オートラジオグラフィーの結果は、破骨細胞ないしはその前駆細胞の細胞膜に局在するCTレセプターは経時的に細胞内に取り込まれ、そこで消化される過程を示しており、破骨細胞のエスケープ現象に対して一つの細胞学的な解釈を与えている⁽⁵⁰⁾。

破骨細胞の分化あるいは活性化の過程、何れにしても骨芽細胞を介してどのように情報が破骨細胞系細胞へ伝達されるかについてはなお不明である。しかし骨芽細胞がある種の液性因子を分泌して、情報伝達を行う可能性も示唆されており、そ

れらはPTH、IL-1で活性化される分子量500-1000位の物質とも⁽⁵⁸⁾、indomethacinで抑制されない分子量25,000以上の物質とも言われている。さらに骨芽細胞から分泌される液性因子としてDIF、IL-1、TNF、PDGF様物質などの骨吸収因子がin vitroの研究結果から示されている^(33,59)。形態学的には既に述べたようなCell-Cell接触機構による可能性も十分に考えられるが、そこでどのような分子生物学的現象が生じているのかは不明であり、今後細胞膜に存在する各種接着因子、レセプター、IL-1 α など膜結合性サイトカインなどの局在を明らかにするとともに、それらと関連する細胞骨格の微細構造とその変化について検索を進める必要があろう。

なお骨細胞もまたある種のサイトカインを分泌し破骨細胞の分化や活性化を調節している可能性があり、破骨細胞が骨吸収する際に近接する骨細胞と明帯の細胞突起と密接して存在する形態学的知見はその傍証の一つとも考えられる(図9)。さらに破骨細胞の骨吸収に際して近接する骨細胞が

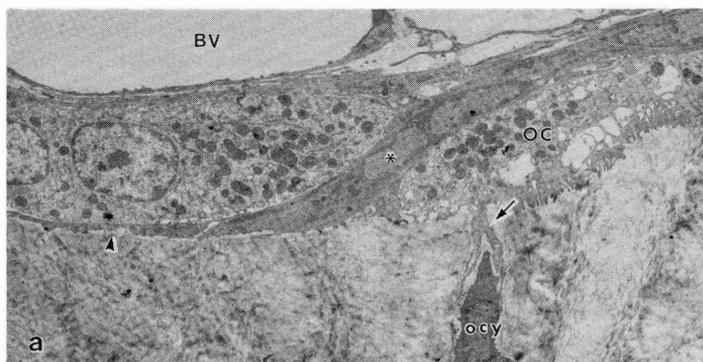
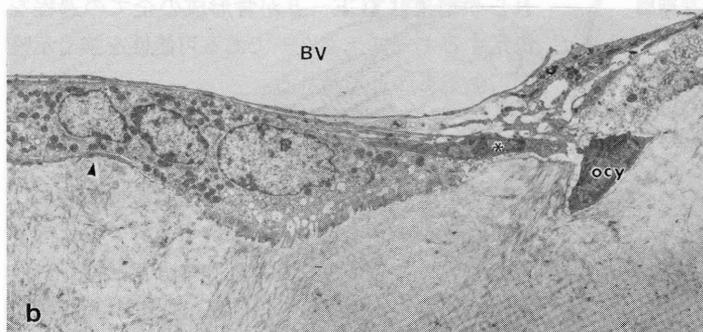
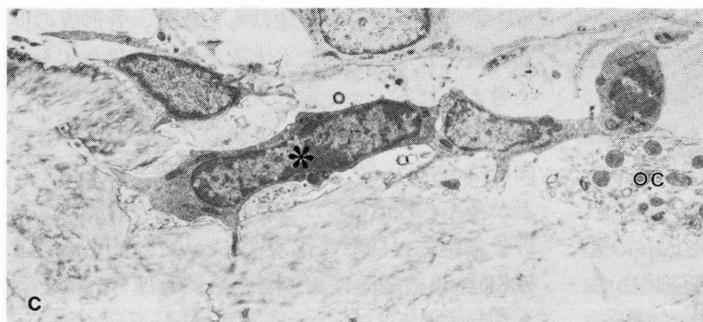


図9：破骨細胞と掘り出された骨細胞。
 a：破骨細胞(OC)の明帯の伸びた突起(矢印)によって掘だされつつある骨細胞(ocy)。米印は破骨細胞に密接して介在する骨芽細胞様細胞で、その突起は破骨細胞と骨表面の間に入り込んでいる(矢頭)。BV：血管



b：骨表面へ掘り出された骨細胞(ocy)。



c：骨表面へLining Cell様に並びつつある骨細胞(米印)。OC：破骨細胞

コラゲナーゼを分泌し、基質コラーゲンの分解を助けているらしいことも知られており、カテプシンの局在性はその可能性を示唆している。

以上の様に破骨細胞の分化・活性化には近接する骨芽細胞系(間質系)細胞が直接的に関与する可能性を示唆する状況証拠は多いが、骨基質中にも調節因子が含まれており、破骨細胞はそれらを取り込んで活性化(抑制化)する可能性も示されている。被覆小窩による骨表面からの物質取り込み像はその一例であり⁽⁶⁰⁾、in vitroの実験でも多核巨

細胞が波状縁を持った活性型破骨細胞へ分化するための骨基質の役割が指摘されている。

4) 骨吸収から骨形成への転換

破骨細胞は活性化されると、酸と加水分解酵素を分泌し、酸によるミネラルの溶解と吸収、ならびに加水分解酵素による細胞内外での有機基質の消化、吸収により骨吸収を行うものと考えられている。

骨有機基質の中には破骨細胞が分泌した酸によって活性化され、しかもコラゲナーゼやリソゾーム

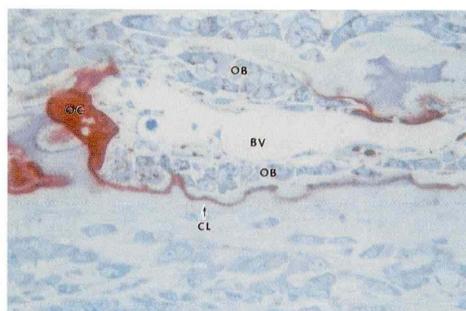


図10：破骨細胞(OC)による骨吸収面に形成されるACPase活性陽性のセメント線(CL)上に誘導され分化した骨芽細胞(OB)。BV：血管

系酵素に対しても安定なBMPやTGF- β のような物質にも含まれている。そのような物質は破骨細胞から分泌された酸素や多糖体等と共に吸収窩表面に活性化された形で蓄積され、引き続いて起こる新たな骨形成に対する局在因子(カップリング因子)の役割を果たす可能性が強い。組織化学的には吸収窩表面にACPase, TRACPase活性陽性、且つ多糖体染色性を示す薄い層が認められ、それらは新旧の骨基質を境するセメント線(CL)に連続しており、骨芽細胞はその層の上に誘導され新たな骨基質を形成する^(61,62)(図10)。

すでにBaylink⁽⁶³⁾は、骨吸収から骨形成への連鎖的移行には破骨細胞あるいはその前駆細胞から分泌される骨成長因子(skeletal growth factor, SGF)が関与するとし、それをカップリング因子 coupling factorと呼んだ。しかしその後、カップリング因子は骨芽細胞が分泌するIGF-IIとN末端のアミノ酸構造が一致することが判った⁽⁶⁴⁾。さらにIGF-I, IGF-II, TGF- β , β_2 -MGなど多くの成長因子が骨芽細胞のDNA合成やコラーゲン合成を促進すること、IL-1, TNF- α , PDGF, Fibroblast Growth Factorsなども骨芽細胞の増殖を活性化することが明らかにされている。

骨基質中から分離された成長因子としては、BDGF-I, II, すなわちTGF- β , β_2 -MGやIGF-IIなどが知られており^(64,65)、TGF- β は安定化蛋

白質で不活性化されて骨基質中に存在する。TGF- β は骨器官培養系で骨吸収の促進に伴い培養液中に放出され酸で活性化されるので、破骨細胞による骨吸収の過程で活性化され骨芽細胞の分化に關与する可能性が指摘されている。この物質はin vitroでは骨原性細胞の増殖を促し、未分化間葉細胞を軟骨細胞へ分化させるが^(66,67)、in vivoでは骨膜内へ直接投与すると軟骨を経ずに骨形成が起こるとされている⁽⁸⁸⁾。しかも、TGF- β は破骨細胞の分化も抑制する可能性が示されており、これらの結果はTGF- β が骨形成の全ての過程を決定するキーファクターである可能性を強く示唆しているものと思われる。

一方、前述のBMPもTGF- β のsuperfamilyとして位置づけられ⁽⁶⁹⁾、酸で活性化されリソゾーム酵素に対して安定であり、しかも骨原性細胞のDNA合成を活性化するので、カップリング因子としてCL中に存在し骨芽細胞の分化活性化に作用する可能性が強い⁽⁷⁰⁾。今後、BMPのみならず骨形成因子の構造解析が進み分子構造が決定されると、カップリング現象はもとより、骨形成の促進物質として臨床的にも大きな役割を果たすものと考えられる。

なお、破骨細胞によって吸収された直後の骨表面には、コラーゲン細繊維が取り残されていることが多く、Baronらはこれら未消化の有機成分は破骨細胞に付随して出現するreversal phase(逆転相)の単核細胞によってさらに処理されると考えられている^(1,71,72)。

しかしながら、逆転相に出現するといわれている細胞が如何なる細胞であるのか、その機能などについては結論が得られていない。マクロファージ系の細胞である可能性も、また骨吸収に伴って掘り出された骨細胞である可能性も考えられるが、この点に関しては今後さらに検討が必要と思われる。

図11は以上概設した骨改造における骨吸収系細胞と骨形成系細胞の細胞連鎖のあらましを模式的に描いたものであり、この細胞連鎖機構に基づく代謝回転の平衡が維持されない時に、骨粗鬆症など各種骨疾患が起こるものと考えられる。

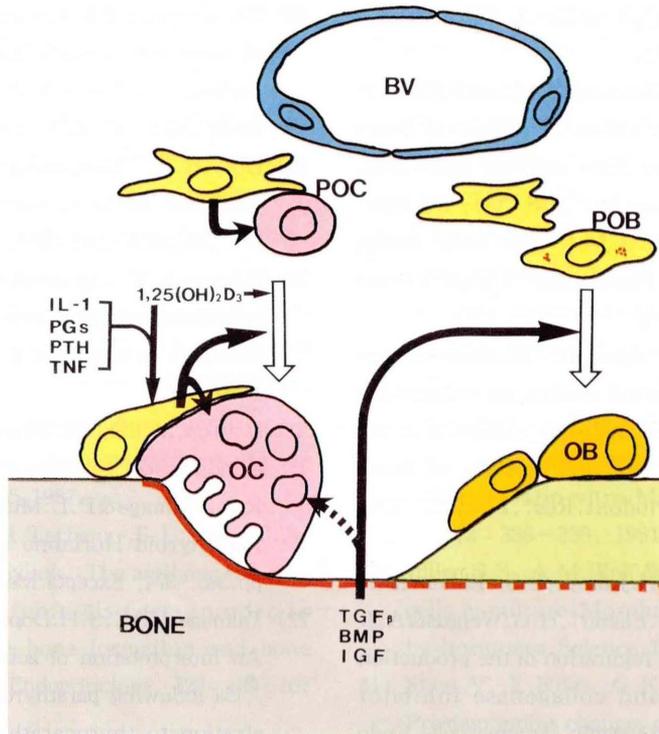


図11：骨吸収と骨形成の細胞連鎖と関連する各種因子との関係。
 OC：破骨細胞、OB：骨芽細胞、POC：前破骨細胞、POB：
 前骨芽細胞、CL：セメント線、BV：血管、破線は抑制作用
 を示す。

引用文献

- 1) Baron, R., A. Vignery & M. Horowitz. : Lymphocytes, macrophages and the regulation of bone remodeling. In : Bone and Mineral Research, Annual 2, (ed. W. A. Peck), New York, Elsevier Science Pub., pp175-243, 1983.
- 2) Becker, J., D. Schuppan., H. Benzian., T. Bals., E. G. Hahh., C. Cantalppi & P. Reichert. : Immunohistochemical distribution of collagen type IV, V and VI and of pro-collagen type I and III in human and alveolar bone and dentine. J. Histochem. Cytochem., **34** : 1417-1429, 1986.
- 3) 小澤英浩：石灰化機構の微細構造学的知見。歯基礎誌、**27** : 751-774, 1985.
- 4) 小澤英浩：骨の石灰化機構—微細形態学的知見を中心に。一日整会誌、**62** : 551-566, 1988.
- 5) Rouleau, M. F., J. Mitchell & D. Goltzman. : In vivo distribution of parathyroid hormone receptors in bone : Evidence that a predominant osseous target cell is not the mature osteoblast. Endocrinology, **123** : 187-191, 1988.
- 6) Martineau-Doize, B., W. H. Lai., H. Warshawsky & J. J. M. Bergeron. : In vivo demonstration of cell types in bone that harbor epidermal growth factor receptors Endocrinology, **123** : 841-858, 1988.
- 7) 佐々木哲：骨の非コラーゲン性たんぱく質。日本骨代謝誌、**4** : 56-68, 1986.
- 8) Luk, S. C., C. Nopajaroonsri & G. T. Simon. : The ultrastructure of endosteum : a topographic

- study in young adult rabbits. *J. Ultrast. Res.*, **46** : 165-183, 1974.
- 9) Miller, S.C., B.M. Bowman., J.M. Smith & W.S.S. Jee. : Characterization of endosteal bone-lining cells from fatty marrow bone sites in adult beagles. *Anat. Rec.*, **198** : 163-173, 1980.
- 10) Miller, S.C. & W.S.S. Jee. : The bone lining cell : a distinct phenotype ? *Calcif. Tissue Int.*, **41** : 1-5, 1987.
- 11) Sakamoto, S. & M. Sakamoto. : Biochemical and immunohistochemical studies on collagenase in resorbing bone in tissue culture. A novel hypothesis for the mechanism of bone resorption. *J. Periodont. Res.*, **17** : 523-526, 1982.
- 12) Partridge, N. C., J.J. Jeffrey., L.S. Ehlich., S.I. Teitelbaum., H.G. Fliszar., H.G. Welgus & A.J. Kahh. : Hormonal regulation of the production of collagenase and collagenase inhibitor activity by rat osteogenic sarcoma cells. *Endocrinology*, **120** : 1956-1962, 1987.
- 13) Delaisse, J.M., Y. Eechhout., C. Sear., A. Galloway., K. McCullagh & G. Vaes. : A new synthetic inhibitor of mammalian tissue collagenase inhibits bone resorption in culture. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **133** : 483-490, 1985.
- 14) 宮島邦彰 : 骨芽細胞様細胞のコラゲナーゼ産生に対する副甲状腺ホルモンと周期的伸展力の影響。日矯誌、**49** : 216-225, 1990.
- 15) Hamilton, J.A., S.R. Lingelbanch., N.C. Partridge & T.J. Martin. : Stimulation of plasminogen activator in osteoblastlike cells by bone resorbing hormones. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **122** : 230-236, 1984.
- 16) Scherft, J.P. : The lamina limitans of the organic matrix of calcified cartilage and bone. *J. Ultrast. Res.*, **38** : 318-331, 1972.
- 17) Scherft, J.P. : The lamina limitans of the organic bone matrix : formation in vitro. *J. Ultrast. Res.*, **64** : 173-181, 1978.
- 18) Wasserman, F. & J.A. Yaeger. : Fine structure of osteocyte capusule and of the wall of the lacunae in bone. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.*, **67** : 636-652, 1965.
- 19) Doty, S.B. : Morphological evidence of gap junctions between bone cells. *Calcif. Tissue Int.*, **33** : 509-512, 1981.
- 20) Talmage, R.V. : Morphological and physiological considerations in a new concept of calcium transport in bone. *Am. J. Anat.*, **129** : 467-476, 1970.
- 21) Holtrop, M.E. & J.M. Weinger. : Ultrastructural evidence for a transport system in bone. in R.V. Talmage & P.L. Munson (eds) : *Calcium, Parathyroid Hormone and the Calcitonins*, pp. 365-374, Excerpta Medica, Amsterdam, 1972.
- 22) Talmage, R.V., S.H. Doppelt & F.B. Fondren. : An interpretation of acute changes in plasma ⁴⁵Ca following parathyroid hormone administration to thyroparathyroidectomized rats. *Calcif. Tissue Res.*, **22** : 117-128, 1976.
- 23) Belanger, L.F. : Osteocytic osteolysis. *Calcif. Tissue Res.*, **2** : 229-236, 1969.
- 24) Boyde, A. : Evidence against "Osteocytic Osteolysis". *Metab. Bone Dis. et Rel. Res.*, **2S**. (Bone Histomorphometry, eds., W.S.S. Jee & A.M. Parfitt), pp. 239-255, 1980.
- 25) Sissons, H.A., G.J. Kelman & G. Mariotti. : Mechanisms of bone resorption in calcium-deficient rats. *Calcif Tissue Int.*, **36** : 711-721, 1984.
- 26) Rouleau, M.F., H. Warshawsky & D. Goltzman : Parathyroid hormone binding in vivo to renal, hepatic and skeletal tissues of the rat using a radioautographic approach. *Endocrinology*, **118** : 919-931, 1986.
- 27) Manolagas S.C., C.M. Taylor & D.C. Anderson. : Highly specific binding of 1,25-dihydroxycholecalciferol in bone cytosol. *J. Endocrinology*, **80** : 35-39, 1979.
- 28) Kusuhara, S. & H. Schraer. : Cytology and

- autoradiography of estrogen induced differentiation of avian endosteal cells, *Calcif. Tissue Int.*, **34** : 352—358, 1982.
- 29) Eriksen, E.F., D.S. Colvard., N.J. Berg., M.L. Graham., K.G. Mann., T.C. Spelsberg & B.L. Riggs. : Evidence of estrogen receptors in normal human osteoblast-like cells. *Science*, **241** : 84—86, 1988.
- 30) Ito, N., H. Yamazaki., M. Nakazaki., T. Miyahara., H. Kozuka & H. Sudo. : Response of osteoblastic clonal cell line (MT3T3E1) to [Asu, 7]eel calcitonin at a specific cell density or differentiation stage. *Calcif. Tissue Int.*, **40** : 200—205, 1987.
- 31) Farley, J.R., N.M. Tarbauz., S.L. Hall., T.A. Linkhart & D.J. Baylink. : The antibone resorptive agent calcitonin also acts in vitro to directly increase bone formation and bone cell proliferation. *Endocrinology*. **123** : 159—167, 1988.
- 32) Farley, J.R., S.L. Hall & N.M. Tarbauz. : Calcitonin (but not calcitnin generelated peptide) increases mouse bone cell proliferation in a dose-dependent manner, and increases mouse bone formation, alone and in combination with fluoride. *Calcif. Tissue Int.*, **45** : 214—221, 1989.
- 33) 赤津拓彦、須田立雄：骨芽細胞と破骨細胞のカップリング機構。臨床科学。25 : 627—634, 1989.
- 34) Kurihara, N., T. Suda., Y. Miura., H. Nakauchi., H. Kodama., K. Hiura., Y. Haketa & M. Kumegawa. : Generation of osteoclasts from isolated hematopoietic progenitor cells. *Blood*. **74** : 1295—1302, 1989.
- 35) Ejiri, S. : The preosteoclast and its cyto-differentiation into the osteoclast : Ultrastructural and histochemical studis of rat fetal parietal bone. *Arch. histol. jap.*, **46** : 533—577, 1983.
- 36) Jones, S.J & A. Boyde. : Morphological changes of osteoblasts in vitro. *Cell Tissue Res.*, **166** : 101—107, 1976.
- 37) Jones, S.J & A. Boyde. : Experimental study of changes in osteoblastic shape induced by calcitonin and parathyroid extract in an organ culture system. *Cell Tissue Res.*, **169** : 449—465, 1976.
- 38) Jones, S.J & A.R. Ness. : A study of the arrangement of osteoblasts of rat calvarium cultured in medium with or without added parathyroid extract. *J. Cell Sci.*, **25** : 247—263, 1977.
- 39) Jones, S.J., A. Boyde & I.M. Shapiro. : The response of osteoblasts to parathyroid hormone (PTH 1—34) in vitro. *Mateb. Bone Dis. Relat. Res.*, **2** : 335—338, 1981.
- 40) Miller, S.S., A.M. Wolf & C.D. Arnaud. : Bone cells in culture; Morphologic transformation by hormones. *Science*, **192** : 1340—1343, 1976.
- 41) Shen, V., L. Rifas., G. Kohier & W.A. Peck. : Prostagrandins changes cell shape and increase intercelluar gap junctions in osteoblasts cultured from rat fetal calvaria. *J. Bone Min. Res.*, **1** : 243—249, 1986.
- 42) Ail, N.N., P.B. Melhuish., A. Boyde., A. Bennett & S.J. Jones. : Parathyroid hormone, but not prostaglandin E₂, changes the shapes of osteoblasts maintained on bone in vitro. *J. Bone Min. Res.*, **5** : 115—121, 1990.
- 43) Rodam, C.A & T.J. Martin. : Role of osteoblasts in hormonal control of bone resorption—A hypothesis. *Calcif. Tissue Int.*, **33** : 349—351, 1981.
- 44) Gorden, M.Y., G.P. Riley., S.M. Watt & M.F. Greaves. : Compartmentalization of a haematopoietic growth factor (GM-CSF) by glycosaminoglycans in the bone marrow microenvironment. *Nature*, **326** : 403—405, 1987.
- 45) Aizawa, S & M. Tavassoli. : In vitro homing of hemopoietic stem cells is mediated by a recognition system with galactosyl and mannosyl specificities *Proc. Nati. Acad. Sci.*

- U.S.A. 84 : 4485-4489, 1987.
- 46) Matsuoka, T., C. Hardy & M. Tavassoli. : Characterization of membrane homing receptors in two cloned murin hemopoietic progenitor cell lines. *J. Clin. Inv.*, **83** : 904-911, 1989.
- 47) Burger, E. H., J. W. M. Van der Meer & P. J. Nijweide. : Osteoclast formation from mononuclear phagocytes : Role of bone forming cells. *J. Cell Biol.*, **99** : 1901-1906, 1984.
- 48) Takahashi, N., H. Yamana., S. Yoshiki., G. D. Roodman., G. R. Mundy., S. J. Jons., A. Boyde & T. Suda. : Osteoclast-like cell formation and its regulation by osteotropic hormones in mouse bone marrow cultures. *Endocrinology*, **122** : 1373-1382, 1988.
- 49) Utagawa, N., N. Takahashi., T. Akatsu., T. Sasaki., A. Yamaguchi., H. Kodama., T. J. Martin & T. Suda. : The Bone marrow-derived stromal cell lines NC3Ts-G2/PA6 and ST2 support osteoclast-like cell differentiation in cocultures with mouse spleen cells. *Endocrinology*, **125** : 1805-1813, 1989.
- 50) Ozawa, H., S. Ejiri., S. Ohmi., I. Orguro., H. Nakamura., K. Irie., M. Irie & N. Amizuka. : Ultrastructural and cytochemical studies on the coupling phenomena between osteoclasts and osteoblastic cells. *J. Bone & Mineral Res.*, **4** : S212, 1989.
- 51) Irie, K & H. Ozawa. : Relationships between tooth eruption, occlusion and alveolar bone resorption. 1) Cytological and cytochemical studies of bone resorption on rat incisor alveolar bone facing enamel. *Arch. Histol. Cytol.*, **53** : 1990, in press.
- 52) Chambers, T. J & C. J. Dunn. : The effect of parathyroid hormone, 1,25-dihydroxycholecalciferol and prostaglandins on the cytoplasmic activity of isolated osteoclasts. *J. Pathology*, **137** : 193-203, 1982.
- 53) Sato, K., Y. Fujii., K. Kasano et al. : Stimulation of prostaglandin E₂ and bone resorption recombinant human interleukin 1 alpha in fetal mouse bones. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **138** : 618-624, 1986.
- 54) Stashenko, P., F. E. Dewhirst., M. L. Rooney., L. A. Desjardins & J. D. Heeley. : Interleukin-1 β is a potent inhibitor of bone formation in vitro. *J. Bone Min. Res.*, **2** : 559-565, 1987.
- 55) Centrella, M., T. L. McCarthy & E. Canalis. : Tumor necrosis factor- α inhibits collagen synthesis and alkaline phosphatase activity independently of its effect on deoxyribonucleic acid synthesis in osteoblast-enriched bone cell cultures. *Endocrinology*, **123** : 1442-1448, 1988.
- 56) Hattersley, G., E. Dorey., M. A. Horton & T. J. Chambers. : Human macrophage colony stimulating factor inhibits bone resorption by osteoclasts disaggregated from rat bone. *J. Cell Physiol.*, **137** : 199-203, 1988.
- 57) Nicholson, G. C., M. A. Horton., P. M. Sexton., C. S. D' Santos., J. M. Mosley., B. E. Kemp., J. A. S. Pringle & T. J. Martin. : Calcitonin receptors of human osteoclastoma. *Horm. metabol. Res.*, **19** : 585-589, 1987.
- 58) McSheehy, P. M. J & T. J. Chambers. : Osteoblast-like cells in the presence of parathyroid hormone release soluble factor that stimulates osteoclastic bone resorption. *Endocrinology*, **119** : 1654-1659, 1986.
- 59) 高橋直之、須田立雄 : 骨芽細胞が産生する破骨細胞刺激因子。 *The Bone*, **2** : 87-92, 1988.
- 60) 江尻貞一、小澤英浩 : 破骨細胞の分化誘導に関して一形態学的立場から。「骨吸収に関する諸問題一基礎と臨床一(小澤英浩、須田立雄編)、西村書店、35-46頁, 1987.
- 61) Oguro, I & H. Ozawa. : The Histochemical localization of acid phosphatase activity in BMU. *J. Bone & Mineral Metab.*, **6** : 45-49, 1988.
- 62) Oguro, I & H. Ozawa. : Cytochemical studies of the cellular events sequence in bone remodeling: Cytological evidence for a coup-

- ling mechanism. *J. Bone & Mineral Metab.*, **7** : 30–36, 1989.
- 63) Baylink, D., J., J.R. Farley., G. Howard., R. Drivadahi., Ed Puzas., T. Masuda., J. Ivey & H. Gruber. : Coupling factor, *Advances in Experimental Medicine and Biology*. In "Regulation of Phosphate and Mineral Metabolism" (eds. Massry, S.G., J.M. Letteri & E. Ritz), **151** : 409–421, 1992.
- 64) Mohan, S., J.C. Jennings., T.A. Linkhart & D. J. Baylink. : Primary structure of human skeletal growth factor : homology with human insulin-like growth factor-II. *Biochem. Biophys. Acta.* **966** : 22–27, 1988.
- 65) Canalis, E., T. McCarthy & M. Centrella. : A bone derived growth factor isolated from rat calvariae is beta 2 microglobulin. *Endocrinology*. **121** : 1198–1200, 1987.
- 66) Tashjian, Jr. A.H., E. Foelkel., M. Lazazaro., F.R. Singer., A.B. Roberts., R. Derynch., M. E. Winkler & L. Levine. : α and β human transforming growth factors stimulate prostagrandin production and bone resorption in cultured mouse calvaria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **82** : 4535–4538, 1985.
- 67) Robey, P.G., M.F. Young., K.C. Flanders., N.S. Roche., P. Kondaiah., A. Hari Reddi., J. D. Termine., M.B. Sporn & A.B. Roberts. : Osteoblasts synthesize and respond to transforming growth factor-type β (TGF- β) in vitro. *J. Cell Biol.*, **105** : 457–463, 1987.
- 68) Noda, M & J.J. Camilliere. : In Vivo stimulation of bone formation by transforming growth factor- β . *Endocrinology*, **124** : 2991–2994, 1989.
- 69) Wozney, J.M., V. Rosen., A.J. Celeste., L.M. Mitosock., M.J. Whitters., R.W. Kritz., R.M. Hewick & E.A. Wang. : Novel regulators of bone formation : molecular clones and activities. *Science*. **242** : 1528–1534, 1988.
- 70) 高岡邦夫 : 骨代謝調節因子としての骨形成因子。『骨代謝調節因子』(鎮目、藤、鈴木編)羊土社、25–45頁, 1987.
- 71) Baron, R. : Importance of the intermediate phases between resorption and formation of the bone remodeling sequence. In : *Bone Histomorphometry*. (ed. P.J. Meunier), Paris, Armour Montagu, pp179–183, 1977.
- 72) Baron, R., A. Vignery & P. Tran Van. : The significance of lacunar erosion without osteoclasts : Studies on the reversal phase of the remodeling sequence. *Metab. Bone Dis. Rel. Res.*, **2S** : 35–40, 1980.