

博士論文

**Analysis of calcium oscillations in differentiation
of bone marrow-derived giant cells**

(骨髄由来巨細胞分化における

カルシウムオシレーション解析)

岡田 寛之

目次

要旨	5
序文	7
背景	
1. 破骨細胞分化における ITAM 下流 Ca oscillations	
破骨細胞の起源、分化誘導シグナル	8
破骨細胞分化における ITAM の役割	9
破骨細胞分化における ITAM 下流 Ca oscillations	10
2. 関節リウマチ治療薬 CTLA4-Ig (アバタセプト) による破骨細胞形成直接抑制	
関節リウマチの現在の治療	12
関節リウマチの病態と治療薬作用点	13
CTLA4-Ig (アバタセプト) による破骨細胞分化抑制機序	15
3. 異物巨細胞分化と Ca oscillations の役割	
インプラント周囲の異物反応	16
異物反応における異物巨細胞	17
異物巨細胞の分化メカニズム	18
目的	20
方法	22

結果 および 考察

1. 破骨細胞分化における ITAM 下流 Ca oscillations 解析	31
Figures	36
考察	46
2. CTLA4-Ig(アバタセプト)が破骨細胞形成を直接抑制する機序研究	52
Figures	56
考察	63
3. FBGC 分化条件の検討、FBGC 分化における Ca oscillations の検討	66
Figures	70
考察	80
結語	82
倫理面への配慮	83
謝辞	84
共同研究者一覧	85
引用文献	86

要旨

破骨細胞および異物巨細胞 (foreign body giant cell, FBGC) はいずれも骨髄の造血幹細胞に由来する。破骨細胞分化初期に生じる immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) 受容体下流の細胞内カルシウムの振動 (Ca oscillations) の報告はあるが、その制御機構は不明だった。本研究では、巨細胞分化における Ca oscillations の役割を検討した。

申請者は oscillations の周波数解析法を確立した。2種の ITAM 受容体 Fc receptor γ (FcR γ) および DNAX activating protein 12kDa (DAP12) は、M-CSF ないし RANKL 下流で oscillations に干渉し、干渉効果は周波数帯により異なることを明らかにした。また関節リウマチ治療薬アバタセプトが、FcR γ を介して Ca oscillations に抑制的に干渉し、NFATc1 発現を抑制し、破骨細胞分化を抑制することを解明した。

FBGC 分化時の Ca oscillations の報告はなかったが、FBGC 分化因子 IL-4 が Ca oscillations を強力に抑制することを明らかにした。

骨髄細胞由来の巨細胞分化では、Ca oscillations の周波数が巧みに制御され、分化が制御される可能性がある。

序文

骨髄細胞由来の多核巨細胞は2種類ある。破骨細胞 Osteoclast と異物巨細胞 Foreign Body Giant Cell (FBGC) である。

破骨細胞分化初期に、immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM)受容体下流でカルシウムオシレーション (Ca oscillations) が起こる現象はよく知られている。しかし Ca oscillations の時系列データの定性的評価に留まっていた。また FBGC 分化における Ca oscillations の報告はなかった。

本論文では、3つのサブテーマに分割し、議論を進めた。

1. 破骨細胞分化における ITAM 下流 Ca oscillations 解析
2. CTLA4-Ig(アバタセプト)が破骨細胞形成を直接抑制する機序
3. 異物巨細胞分化条件の検討、異物巨細胞分化における Ca oscillations

背景

1. 破骨細胞分化における ITAM 下流 Ca oscillations

破骨細胞の起源、分化誘導シグナル

骨組織は、破骨細胞による骨吸収および骨芽細胞による骨形成が精密に制御されることで新陳代謝（リモデリング）を行う組織である。骨吸収を行う破骨細胞の由来は、単球・マクロファージ系の血球系細胞である。破骨細胞分化における必須因子には、マクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF)、Receptor activator of nuclear factor κ B ligand (RANKL) がある¹。RANKL は破骨細胞前駆細胞に発現する受容体 RANK に結合し、アダプター分子である tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6) を介して NF κ B や mitogen-activating protein (MAP) キナーゼなどの細胞内シグナルを活性化し、破骨細胞のマスター転写因子とされる nuclear factor of activated T-cell 1 (NFATc1) の発現を誘導し²、破骨細胞分化を制御する^{3,4}。

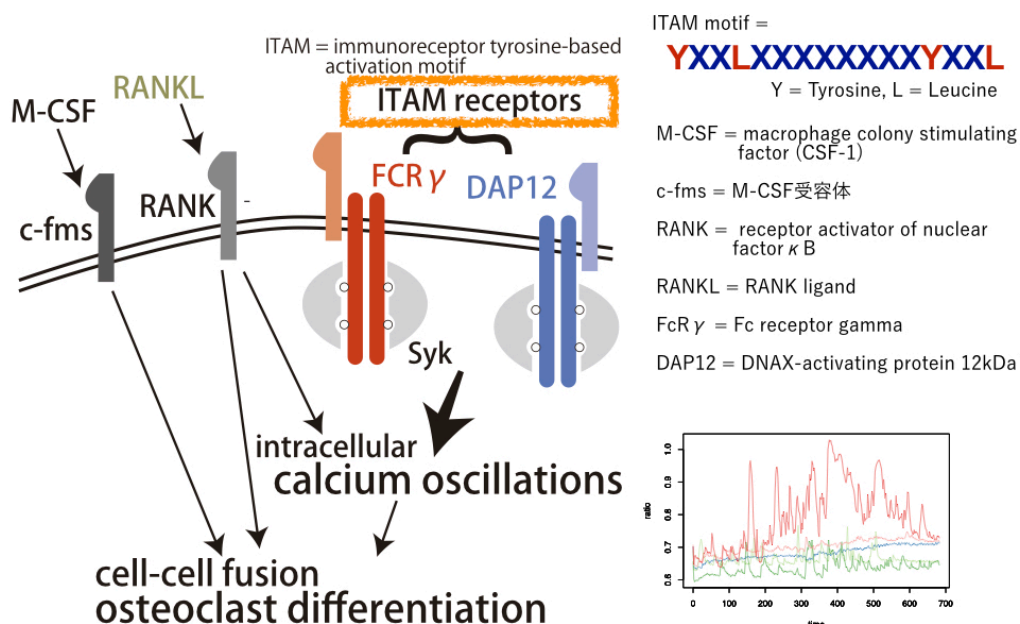


Fig.1 破骨細胞分化の共刺激受容体

破骨細胞分化における immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) の役割

上述のシグナル経路に加えて、RANK の下流において immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) を有する受容体を介した共刺激が破骨細胞分化に重要であることが知られている^{5 6 7}。ITAM motif は、

YXXLXXXXXXXXXXYXXL (Y = tyrosine, L = leucine) という特徴的なアミノ酸配列であり、チロシンキナーゼ活性を持つ。破骨細胞の起源となる単球マクロファージ系に発現する ITAM としては、Fc receptor gamma (FcR γ) および DNAX activating protein 12kDa (DAP12) の 2 種類がある (Fig. 1)。

DAP12 は、M-CSF +

RANKL による *in vitro* の

破骨細胞分化に重要な役

割を果たすことが報告さ

れている⁸。一方 FcR γ

の役割については議論が

あり、破骨細胞による骨

吸収に必要であるとの意

見と⁹、破骨細胞形成に抑

制的に働く¹⁰との相反する意見がある。最近の報告では、細胞外の免疫複合体

の形成状況に応じた制御を受けているとされており¹¹、FcR γ の破骨細胞分化

における役割は未だ確定していない状況である (Fig. 2)。

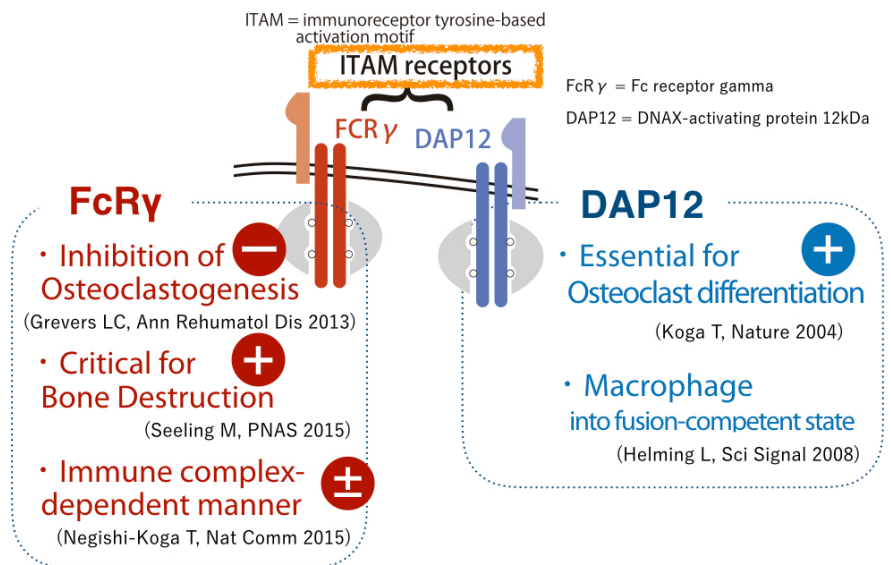


Fig.2 2種のITAMが破骨細胞分化に与える影響に関する既報まとめ

破骨細胞分化における ITAM 下流 Ca oscillations

RANKL によって ITAM 受容体が活性化されると、その下流で spleen tyrosine kinase (Syk) のリン酸化、phospho-lipase C (PLC) γ のリン酸化が起こり、カルシウムシグナルが活性化されることが知られている。Komarova は、ラットの破骨細胞形成において、RANKL 投与により Ca 濃度上昇が誘発される事を示した¹²。古賀らは、マウスの破骨細胞前駆細胞に対して RANKL 投与後 24 時間の Ca 濃度測定により、ITAM 受容体ダブルノックアウトマウス（以下 ITAMs DKO マウス）では、細胞内カルシウムの振動（以下、Ca oscillations）が生じないことを示した⁸。鍛冶屋らは、マウス単球性白血病細胞由来株細胞である RAW264.7 細胞を用いて、破骨細胞前駆細胞における RANKL 誘発性の Ca oscillations には、メカノセンサーとしての機能を持つ Ca チャネル transient receptor potential vanilloid 2 (TRPV2) が必要であることを示した¹³。また増山らは、TRPV4 を介した Ca 流入が破骨細胞分化後期に必要であることを示した¹⁴。

これらの ITAM 受容体下流の Ca oscillations に関する研究は、これまで Ca 濃度変化の定性的理解に留まっており、破骨細胞分化における Ca oscillations に関しては、次の問題が未解決だった。

1. Ca oscillations は、骨髄マクロファージには起こらないのか
2. Ca oscillations は、M-CSF, RANKL いずれの下流で誘発される現象なのか
3. ITAM 受容体がないと Ca oscillations が誘発されないのか
4. 2 種の ITAM 受容体 FcR γ , DAP12 が、Ca oscillations の制御にどう寄与しているのか
5. そもそも Ca oscillations の定義は何なのか

これらの疑問点を解決するために、破骨細胞分化における ITAM 下流 Ca oscillations 解析を行った。申請者は ITAM ノックアウトを用いて Ca oscillations を測定した。また、周波数に着目した解析を行い、2 種の ITAM の Ca oscillations に与える役割の違いが存在することを明らかにした。

2. 関節リウマチ治療薬 CTLA4-Ig (Abatacept) による破骨細胞形成直接抑制

関節リウマチの現在の治療

関節リウマチ (rheumatoid arthritis, RA) は、関節滑膜の炎症を中心とした全身性自己免疫疾患である。発症早期から関節破壊が生じ、日常動作の障害や生活の質の低下へと直結する為、早期から寛解を目指した治療介入が重要となる。薬物療法の進歩によって最近 20 年間で RA 治療戦略は大きな変化を遂げた。中でも抗 TNF- α 製剤をはじめとした生物学的製剤の登場によって、疾患活動性のコントロールは著しく改善し、寛解が RA 治療の現実的なゴールになっている。また Smolen らが提唱した treat to target (T2T) が旗印となり¹⁵、早期介入を意図した診療アルゴリズムは国内外で普及し、RA の治療成績は向上した。しかし生物学的製剤登場後も効果不応例は少なからず見られ、骨破壊が進行する症例も存在するため、効果的な骨破壊予防薬の開発が期待されている。

関節リウマチの病態と治療薬作用点

Fig. 3 は RA 進行に伴い生じる骨破壊に関わる種々の細胞とその治療標的をまとめたものである¹⁶。左側の遺伝的要因および環境要因に暴露された抗原提示細胞は、自己免疫寛容の破綻をきたす。抗原提示細胞は、T 細胞を活性化し、B 細胞による種々の自己抗体産生を促す。関節近傍滑膜組織にはマクロファージなどの炎症細胞が浸潤し、tumor necrosis factor (TNF) α 、interleukin (IL) -1、IL-6 などの炎症性サイトカインを大量に産生する。滑膜線維芽細胞に強く発現する RANKL により分化促進された破骨細胞は滑膜-骨境界面に多く存在し、RA の骨破壊において中心的な役割を果たす。

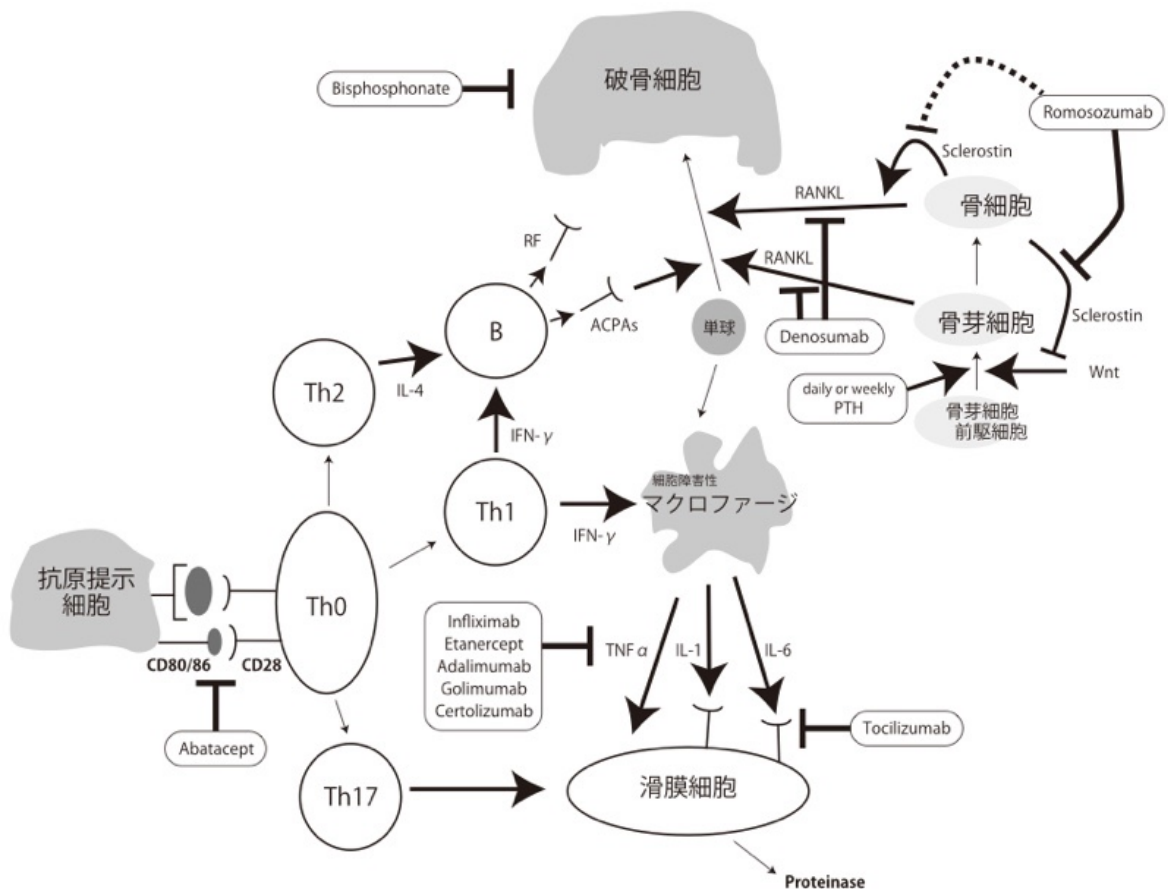


Fig.3 骨と免疫に関わる細胞群のクロストーク

T細胞のうち、Th17細胞はIL-17を産生して局所炎症を活性化し、滑膜線維芽細胞のRANKL発現を促す¹⁷。さらに抗シトルリン化ペプチド(CCP)抗体などACPA(anti-cyclic citrullinated peptide)は、破骨細胞前駆細胞に直接作用して破骨細胞分化を促進する¹⁸。近年、イムノグロブリン免疫複合体が、Fc gamma受容体を介し破骨細胞分化を制御することが報告されている¹¹。

単球・マクロファージ系前駆細胞由来の破骨細胞が、T細胞やB細胞を含む獲得免疫系からのフィードバックによる制御を受ける点は、RAの新たな治療標的になる可能性がある。

ヒト型抗RANKLモノクローナル抗体デノスマブは、RANKLとRANKの結合を阻害して破骨細胞の分化を強力に抑制し、骨粗鬆症における脆弱性骨折予防効果を有するが、RAにおける骨びらん進行抑制にも有用であることが明らかになっている¹⁹。一方、炎症がトリガーとなる軟骨破壊は、滑膜細胞や軟骨細胞によるプロテアーゼ産生が主たる原因である。

RAに対する生物学的製剤のうち、特徴的な作用点を持つものとして、細胞傷害性Tリンパ球抗原(cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen, CTLA)4を利用したアバタセプト(CTLA4-Ig)が挙げられる。CTLA4は制御性T細胞に発現し、抗原提示細胞上のCD80またはCD86に結合することでT細胞受容体の活性化を抑制する分子として知られている。CTLA4と免疫グロブリンの定常部分との融合タンパクであるCTLA4-Igは、T細胞共刺激阻害を競合阻害し、T細胞の活性化を抑制する。

CTLA4-Ig (アバタセプト) による破骨細胞分化抑制機序

CTLA4-Ig はこのよ
うに T 細胞の活性化
を抑制することで
RA 疾患活動性を制
御する治療薬である
が、近年破骨細胞分
化を直接的に抑制す
るというエビデンス
が蓄積している

IDO = indoleamine 2,3-dioxygenase

CTLA4-Ig inhibited osteoclastogenesis.

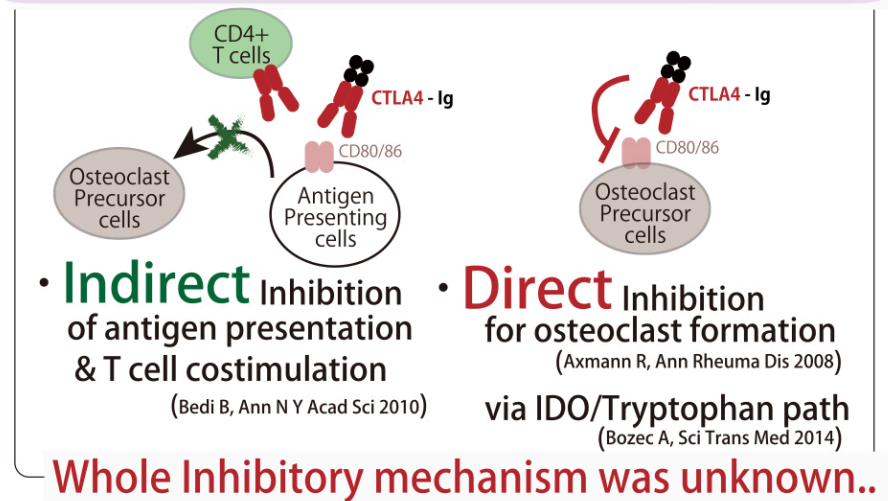


Fig.4 CTLA4-Igによる破骨細胞形成抑制機序

(Fig. 4)。Schettらのグループは、CTLA4-Igが破骨細胞前駆細胞のCD80/86を介して、indoleamine 2,3-dioxygenase/tryptophan経路を活性化し、破骨細胞の分化を抑制すると報告した²⁰。また臨床研究でも、多田らがCTLA4-Igによる大腿骨頸部BMD (bone mineral density) 上昇効果を報告しており、ヒトにおいても破骨細胞の機能を抑制するメカニズムが想定された²¹。しかし、CTLA4-Igはなぜ破骨細胞分化を直接抑制するのか、メカニズムの全貌は明らかではなかった。

申請者は、CTLA4-Igの直接作用機序として、破骨細胞分化のマスター転写因子NFATc1発現経路への影響に着目した。本研究によって、これまで報告のない細胞内Ca oscillationsへの干渉現象を見出した。

3. 異物巨細胞分化と Ca oscillations

インプラント周囲の異物反応

整形外科で汎用される人工関節をはじめ生体内インプラントは、血管内・骨内に移植されるものや・新たな靭帯再建を目的としたものなど様々なバリエーションに富む。生体内でインプラントが固有の効果を発揮するには、物理的に安定することのみならず、周囲に過剰な炎症・感染症など、生体にとって有害な反応を生じないことが求められる。インプラントのゆるみが生じる過程は様々である。破骨細胞による骨吸収は、骨内インプラントゆるみの原因となるが、感染を契機とする場合もあれば、感染が証明されず生体防御の一環として異物を排除する機構のみが賦活化していると考えられる場合もある²²。

生体において異物を認識する細胞としては、好中球、マクロファージ、樹状細胞などの自然免疫系にカテゴライズされる細胞群が挙げられる²³。マクロファージは、細菌、ウイルスから、死細胞、代謝産物、細胞外基質、酸素濃度、温度、pHなどの外的環境まで様々な異物・外的要因を認識する受容体を持っており、これらはパターン認識受容体としてまとめられている。審良らが報告した Toll 様受容体 (TLR) はパターン認識受容体ファミリーであるが、TLR1 から TLR11 まで報告されており、各々DNA、RNA、脂肪化タンパクなど、種々の異物を受容し、細胞内シグナルを惹起する²⁴。

異物反応における異物巨細胞

生体内インプラント周囲には、多核巨細胞である異物巨細胞 (foreign body giant cell, FBGC) が数多く存在する。この現象は古くより知られており、生体内に埋没した骨ロウ周囲に生じた巨細胞が最初の報告である²⁵。電子顕微鏡を用いた詳細な観察では、FBGCは周囲に外套膜構造を複数持つ多核巨細胞であり、破骨細胞とは明らかに形態が異なることが示された²⁶。近年、生体内異物周囲に集まるFBGCのlive imagingに関する報告があり、異物留置後経時的に小細胞が融合して巨細胞ができることも明らかになった²⁷。

FBGCは前述の通り、存在は広く知られているものの、FBGCの生体内における役割は不明なままである (Fig. 5)。FBGCは、インプラントゆるみの原因となる骨吸収を起こすと考えられてきたが²⁸、FBGC自身は骨吸収能を持たないことが証明された²⁹。

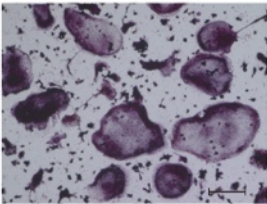
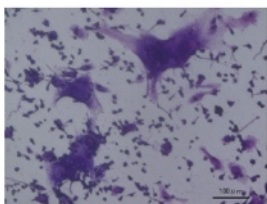
• <u>Monocyte-derived giant cells</u>		
	Osteoclast	Foreign Body Giant Cells (FBGCs)
<i>In vitro</i>		
Differentiation Factor	M-CSF + RANKL	GM-CSF + IL-4
Function	Osteolysis	?

Fig.5 異物巨細胞の分化、機能 (破骨細胞と比較して)

異物巨細胞の分化メカニズム

また、FBGC の分化メカニズムについても、未解明点が多い。破骨細胞と FBGC はいずれも単球・マクロファージ系細胞由来である。破骨細胞の分化誘導においては、M-CSF および RANKL が必須因子であり、Ca oscillations の賦活化が分化において重要である。一方で FBGC の分化には、インターロイキン 4 (IL-4) が必須因子である。IL-4 は FBGC 以外にも、通常のマクロファージとは形態の異なる細胞集団として定義された M2 マクロファージ (組織修復性マクロファージ) 分化も誘導する³⁰。興味深いことに、IL-4 は破骨細胞分化の強力な抑制因子であることが知られている^{31 32}。また IL-4 に加え、顆粒球マクロファージ刺激因子 (GM-CSF) が共存すると、破骨細胞分化が抑制され³³、他の巨細胞が誘導されやすい。

FBGC 分化における ITAM の必要性は、破骨細胞に比べて検討が進んでいない。DAPI2 は、マクロファージが融合する際に必要であると報告されている³⁴。また異物反応に関連して、マクロファージの Fc gamma 受容体は、異物のサイズを認識し、貪食するか否かの判断する役割をしていることが知られている³⁵。

さらに、FBGC の *in vitro* 培養には、破骨細胞に比べて純度高く分化誘導する方法がない。マクロファージは、sorting を行わない限り M1, M2 の subset をいずれも含むヘテロな細胞集団であるように、これまでの FBGC 分化誘導法では、単核の細胞が多く混ざり、FBGC の純度が上がらないばかりか、FBGC の判別が困難であった。さらには、FBGC は巨大な細胞で sorting に耐えない。

よって FBGC の異なる sub population の混在が想定されるものの、分離することができず、結果研究が進まなかった。

そこで申請者は、GM-CSF + IL-4 による *in vitro* の FBGC 誘導系を改良し、新たな分化誘導法にて、ITAM の分化における必要性について検討した。また FBGC 分化においても、破骨細胞同様に Ca oscillations の変動が起こるか、さらには oscillations が起こるならばどのような制御を受けているのか検証した。

目的

本研究の目的は下記の3点である。

- ・ 1. 破骨細胞分化早期において、2種の ITAM 下流の Ca oscillations の違いを明らかにすること。
- ・ 2. CTLA4-Ig が破骨細胞形成を直接抑制する機序を明らかにすること。
- ・ 3. FBGC 分化誘導法を確立し、FBGC 分化における Ca oscillations の存在、ITAM の役割を検証すること。

方法

マウス

C57BL/6 は三共ラボサービス（東京, 日本）より購入した。Fc receptor gamma (FcR γ)ノックアウトマウス（以下、KO マウス）、および DAP12 KO マウスは、東北大学加齢医学研究所高井俊行先生より提供された³⁶。FcR γ KO マウスと DAP12 KO マウスを交配し、FcR γ + DAP12 ダブルノックアウトマウス（以下、ITAMs DKO マウス）を作製した。

初代骨髄細胞培養、*in vitro* 破骨細胞分化誘導試験

マウス両下肢より骨髄細胞を採取した。 α minimum essential medium (α -MEM; Sigma-Aldrich Co., Missouri, 米国)に、10% fetal bovine serum (FBS; JRH Biosciences, Kansas, 米国)、1 % GlutaMax (Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, 米国)、ペニシリン-ストレプトマイシン混合溶液 (Sigma-Aldrich) を加えたものを培養液とした。

M-CSF (R&D Systems, Minnesota, 米国) (50 ng/mL) を培養液に加え、2 ~ 3 日骨髄細胞を培養することで、骨髄マクロファージを得た。

細胞数を 1×10^5 個/mL に調整した上で、骨髄マクロファージを 96 well プレートに各 well 100 μ L ずつ M-CSF (50 ng/mL) および RANKL (25 ng/mL) (PeproTech Ltd., New Jersey, 米国)を加え培養し、破骨細胞を得た。

破骨細胞の分化を確認するため、tartrate resistant acid phosphatase (TRAP) 染色を行った。他の細胞に比べてサイズが大きく、多核の巨細胞を破骨細胞と定義した。

細胞内カルシウム濃度測定

細胞内カルシウム濃度測定は、以下の正規法で行った。カルシウム検出試薬として、Fura-2 (Dojindo, 熊本, 日本) を用いた。蛍光の測定は、34°Cに温めて行った。細胞外液には NaCl 150 mM, KCl 6 mM, CaCl₂ 1 mM, MgCl₂ 1 mM, HEPES 10 mM, and D-glucose (pH 7.4) 10 mM を含めた。

アーチファクトの影響を取り除いて、細胞内カルシウム濃度を測定するため、光電子増倍管 (Aquacosmos; Hamamatsu Photonics, 静岡, 日本) にて 340 nm と 380 nm の 2 波長の蛍光を測定した。測定は蛍光顕微鏡を用い、2~3 秒の間隔で、ほぼ一定のペースで行い、各シリーズ 600 秒以上測定した。蛍光強度比を細胞内カルシウム濃度とした。

細胞内 Ca 濃度測定は、別の条件 (細胞外液中のカルシウムが欠乏状態) でも、簡易的に蛍光顕微鏡で測定した。骨髄マクロファージを 96 well プレート上にサイトカインフリーの条件で 1 晩培養した。1 群には、CTLA4-Ig (25 μg/mL) を加えた。解析 1 時間前に培養液をカルシウムが含まれない PBS に替え、カルシウム検出試薬 Fluo-4 (Fluo-4 NW Calcium Assay Kit, Invitrogen) を試薬取り扱い指示通りに投与した。蛍光顕微鏡にて、494 nm の蛍光を室温で約 10 秒おきに検出した。測定開始 1 分後に、M-CSF (50

ng/mL) および RANKL (50 ng/mL) を添加し、合わせて 6 分間蛍光測定した。

カルシウム濃度変動のデータ解析

各細胞において得られた蛍光強度比の時系列データより 1 階の差分を求め、1 時点少ないデータに変換した。この後に行うフーリエ変換に耐える弱定常過程と見做すためのデータ前処置である。差分のデータは、平均はほぼ 0 で一定とみなせる。続いて、各細胞ごとに、差分データをフーリエ変換し、Ca oscillations の周波数を求めた。薬剤急性投与中の周波数変換には、時系列に沿った周波数解析として、ウェーブレット変換を用いた。

各細胞のカルシウム濃度変動の振幅は、以下のように求めた。実験 2 では簡易的に、差分の最大値を採用した。実験 1 および 3 では、周波数フィルタリングの原理を用いた。フーリエ変換後の周波数データから、特徴的な周波数域に絞り抽出した。逆フーリエ変換によって、固有周波数帯の振動を再構築した。得られた振動の変動量（最大値－最小値）から、個々の細胞の oscillations 振幅を求めた。

データ解析には、R version 3.5.1 を用いた。tidyverse packages を主として用いた。Morlet ウェーブレット変換には、Tarik らが開発したパッケージ ‘biwavelet’ を用いた³⁷。

***In vitro* 破骨細胞分化誘導における CTLA4 の作用検証**

96 well プレートにて骨髄マクロファージを培養した。破骨細胞分化誘導条件において、マウスキメラ CTLA4-Ig (recombinant mouse CTLA4 Fc chimera; R&D Systems) (以下、特に断りがない場合は CTLA4-Ig は、この試薬を指す) を投与した。これはマウス CTLA4 とヒト IgG1 Fc ドメインからなる結合タンパクである。5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の投与を基本とし、濃度依存性を検証する実験では、25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の条件も追加した。

CTLA4-Ig における作用ドメインを確定する実験では、マウス CTLA4/CD152 Human IgG1 (ACRO Biosystems, Delaware, 米国)、Human recombinant IgG1 Fc (R&D Systems) を用いた。

***In vitro* 破骨細胞 survival assay**

破骨細胞の生存期間への影響は、秋山らの手法を適宜変更して検討した³⁸。 *In vitro* で破骨細胞を前述の培養方法で4日間行う際に、1群では CTLA4-Ig を添加した。その後、M-CSF および RANKL をメディウムから除去したタイミングを time 0 とした。図に示した各タイミングまで培養を継続した。各タイミングの TRAP 陽性の多核巨細胞数をカウントし、time 0 の平均値を 100%とした時の割合を生存率と定義し求めた。

培養細胞からの total RNA 抽出および cDNA 合成

骨髄マクロファージに対して 2 日間 RANKL 刺激下に培養した後、RNeasy Mini Kit (Qiagen, Venlo, オランダ) を用いて total RNA を抽出した。プロトコールは Kit の各種指定の条件に従った。Complementary DNA は、Prime Script RT reagent kit (Takara Bio, 滋賀, 日本)を用いた逆転写で作成した。

Quantitative real-time PCR (qPCR) 解析

遺伝子発現レベルは、SYBR Premix Ex Taq (Takara Bio)を用い Thermal Cycler Dice Real-Time System にて定量 PCR にて解析した。 β -Actin を内在性コントロールとし、Change-in-threshold 法にて mRNA 相対発現レベルを求めた。

qPCRs に用いた、primer 配列は以下の通りである。

β -actin-forward: 5-TGAGAGGGAAATCGTGCGTGAC-3'

β -actin-reverse: 5-AAGAAGGAAGGCTGGAAAAGAG-3'

NFATc1-forward: 5-CAAGTCTCACCACAGGGCTCACTA-3'

NFATc1-reverse: 5-GCGTGAGAGGTTTCATTCTCCAAGT-3'.

細胞免疫染色

破骨細胞分化初期の NFATc1 のタンパク発現を細胞免疫染色にて評価した。骨髄マクロファージに対し、M-CSF および RANKL を投与し 2 日経過した段階で、4%中性パラホルムアルデヒドを用いて 10 分間固定した。Bovine serum

albumin を用いてブロッキング処理を行った上で、一次抗体として抗マウス NFATc1 抗体 (1:100 希釈; Santa-Cruz, Texas, 米国) を加え、4°C で一晩おいた。続いて二次抗体として Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG (1:200 希釈; Promega, Wisconsin, 米国) を加えた。DAPI (1:2000 希釈; Wako Pure Chemicals Industries, 大阪, 日本) による核染色を追加し、観察した。

Western blotting によるタンパク発現量解析

前述の骨髄マクロファージを M-CSF + RANKL 存在下で 2 日間培養し *in vitro* で破骨細胞分化誘導した。PBS でよく洗った上で、RIPA buffer (1% Tween20, 0.1% SDS, 150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.25 mM phenylmethylsulfonylfluoride, 10 μ g/mL aprotinin, 10 μ g/mL leupeptin, 1 mM Na₃VO₄, 5 mM NaF) (Sigma-Aldrich Co.) にて細胞を溶解し、タンパクを抽出した。タンパクは SDS-PAGE にて電気泳動した上で、polyvinylidene fluoride メンブレン (Millipore Corp., Massachusetts, 米国) に転写した。ブロッキングを行った上で、一次抗体反応を 1 晩かけて行った。一次抗体として、抗マウス NFATc1 抗体 (1:1000 希釈; Santa-Cruz)、抗マウス β -actin 抗体 (1:1000 希釈; Sigma-Aldrich) を用いた。続いて二次抗体反応を、horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-rabbit IgG (1:10000 希釈; Promega) を用いて行った。化学発光したバンドを enhanced chemiluminescence (GE Healthcare, Illinois, 米国) を用い検出した。

***In vivo* 頭蓋骨骨溶解モデルを用いた CTLA4-Ig の効果検証**

CTLA4-Ig による *in vivo* での骨吸収抑制作用を検証するため、マウス頭蓋骨における LPS 誘導性骨溶解誘発に対する作用を検討した³⁹。

10 週齢雌マウスの頭蓋骨上に、phosphate-buffered saline (PBS) 200 μ L に LPS (25 μ g/g) を添加し注入した。LPS を加えない個体を骨破壊陰性コントロール群とした。CTLA4-Ig 投与群では、マウスキメラ CTLA4-Ig (2.5 μ g/gram 体重) を追加した。投与 5 日後に、マイクロ CT を撮影した。InspeXio SMX-100CT system (島津製作所, 京都, 日本) を用いた。撮影方法は、Huang らの方法を参考にした⁴⁰。スキャンは 90 kV, 40 μ A で行った。解像度は 1,024 \times 1,024 ピクセルとした。頭蓋骨 3D 像の再構築には、TRI/3D-BON (Ratoc System Engineering, 東京, 日本) を用いた。骨吸収面積の推定のために、ImageJ software (version 1.51, Wayne Rasband, National Institutes of Health, 米国) を用いて画像解析を行った。

***In vitro* FBGC 分化誘導試験**

骨髄マクロファージは、破骨細胞の検討実験と同様の方法で得た。FBGC の *in vitro* での分化誘導は、まずは既報の通り行った³⁹。細胞数を 1×10^5 個/mL に調整した上で、96 well プレートに各 well 100 μ L ずつ分注し、GM-CSF (50 ng/mL) (R&D Systems) および IL-4 (50 ng/mL) (R&D Systems) を加え 2~4 日間培養し、FBGC を得た。FBGC の分化を確認するため、May-Grünwald Giemsa (MGG) 二重染色を行った。他の細胞に比べてサイズが

大きく、多核の巨細胞で、破骨細胞と異なり辺縁の歪な構造のものを FBGC と定義した。

上述の FBGC 分化誘導従来法では、染色後に多核巨細胞の同定が困難だったため、新たな FBGC 分化誘導法を検討した。骨髄細胞から M-CSF 刺激下で巨細胞前駆細胞を得る過程で、IL-4 を添加し前処置した。コントロールとして GM-CSF、ないしは無処置の群をおいた。前処置後の FBGC 誘導条件は同じである。前処置を追加することで、FBGC の同定は容易になった。前処置にて添加するサイトカインの濃度検討を行った結果、FBGC 誘導時の半量程度あれば、同定容易な FBGC を比較的均質に分化誘導できることが分かった。よって巨細胞前駆細胞を得る前処置では、IL-4 ないしは GM-CSF を 25 ng/mL ずつ加えた。

***In vivo* マウス腹腔内異物モデル**

*In vivo*での異物反応観察のため、マウス腹腔内異物モデルを用いた³⁹。

腹腔内麻酔を行い、マウス腹部を正中切開し、腹膜を切開し、腹腔内に進入した。1 cm 角に裁断し PBS に浸しておいたポリウレタンスポンジをマウス腹腔内に 3 個留置した。腹膜、皮膚を各層縫合した。腹腔内留置後 6 日後に、マウスを安楽死させ、腹腔内のスポンジを取り出した。

組織像の検討は以下の通り行った。10%中性ホルマリンで固定の上、パラフィン包埋した上で切片を作成し、HE 染色した。スポンジ異物周囲に形成される層状の構造を評価した。

統計学的処理

データは、平均値 ± 標準偏差 (standard deviation, SD) の順に示した。各群の平均値の統計学的検定としては、主に対のない両側 Student's t-test を行った。蛍光強度比差分の最大値、および骨吸収域の比較では、Wilcoxon rank sum test を行った。振幅の多群間比較検定の際は、一元分散分析 (one-way analysis of variance (ANOVA); Tukey-Kramer 法) を行った。有意水準は、 $P < 0.05$ とした。

倫理的配慮

動物実験は、慶應義塾大学動物実験委員会 (Permit Number: 09092) および東京大学動物実験委員会 (Permit Number: Med-P14-096) の承認を得て行った。

1. 破骨細胞分化における ITAM 下流 Ca oscillations 解析

結果

ITAM による *in vitro* 破骨細胞分化への影響

FcR γ および DAP12 という 2 種類の ITAM 受容体 KO マウスを用いた *in vitro* 破骨細胞分化培養系によって、これらの受容体が破骨細胞分化に与える影響を調べた。野生型マウスと比較し、FcR γ KO マウス由来の骨髄細胞からは、同程度破骨細胞が分化誘導された。一方、DAP12 KO および ITAMs DKO マウス由来の骨髄細胞からは、破骨細胞誘導が著しく減少した (**Fig. 6**)。

破骨細胞分化初期の Ca oscillations 測定

骨髄細胞に M-CSF 刺激を 3 日間行い、骨髄マクロファージを得た後、カバーガラス上に播種して接着させた。1 晩サイトカインフリーとした後を day 0 とし、M-CSF 50 ng/mL、RANKL 25 ng/mL、M-CSF + RANKL の各条件で 2 日間刺激した day 2 の 2 つのタイミングで、Ca oscillations を計測した。

Ca oscillations の観察は **Fig. 7A** に示すように行った。観察で得られた蛍光強度比時系列データの解析は、**Fig. 7B** に示すように行った。各細胞から得られた蛍光強度比の時系列を、1 時点差分に変換した。平均値がほぼ 0 であり、弱定常状態となり、その後の周波数変換のため、必要なデータ前処置であった。データ測定間隔はほぼ一定であったが、測定間隔が不均等な時系列データでも

周波数変換が可能な Lomb-Scargle 法を用いて⁴¹、時系列データを周波数データに変換した。各シリーズのデータサンプリング間隔は、2～3秒であったため、最も遅い間隔に合わせ、ナイキスト周波数（サンプリング間隔の周波数の半分）0.16 Hz ($\cong 1/3 \times 1/2$ Hz) より遅い周波数成分を解析対象とした。得られた周波数のデータは periodogram となり、横軸は周波数 (Hz)、縦軸はパワー (dB) として図示した。周波数帯の構成成分の傾向を定性的に評価するため、累積 periodogram（低い周波数成分から足し合わせて、合計が 100%となる）を作成した。

野生型マウス由来破骨細胞分化初期の Ca oscillations

Wild type マウス由来骨髄マクロファージから得られた細胞内カルシウム濃度のデータをまとめた (**Fig. 8**)。まずは蛍光強度比実測データの所見を述べる。骨髄マクロファージにおいては、day0 でも一部の細胞の Ca oscillations は大きく検出は容易だった。day2 では、M-CSF, RANKL, M-CSF + RANKL いずれのサイトカイン刺激条件においても、Ca oscillations は見られた。次に、周波数変換して得られたピリオドグラムの所見を述べる。大別して上に凸になる細胞と下に凸になる細胞の 2 群に分類可能であった。いずれのサイトカイン条件でも同様の傾向が見られた。上に凸の傾向を示した細胞は、元の時系列データを参照すると振幅が大きく変化が見やすいものが多かった。上記結果をまとめると、Ca oscillations は、RANKL 刺激特異的な現象ではないことが分かった。また細胞ごとに周波数パターンが異なることが分かった。

ITAM KO マウス由来破骨細胞分化初期の Ca oscillations

各種 ITAM KO マウス由来の骨髄マクロファージから得られた細胞内カルシウム濃度を測定した。Fig. 9A に時系列データを示す。FcR γ KO 由来細胞では、サイトカイン刺激後に Ca oscillations の振幅が減弱し、特に RANKL を単独投与すると最も減弱することが分かった。他方、DAP12 KO 由来細胞では、サイトカイン刺激後に Ca oscillations の spike が際立って見えることが分かった。ITAMs DKO 由来細胞では、day 0 の Ca 濃度の粗い変動が顕著だった。day2 における Ca 濃度変化は、FcR γ KO より明瞭であり、DAP12 KO のような spike は少なかった。

次に、累積 periodogram のデータをまとめた (Fig. 9B)。day 0 では、ITAMs DKO 細胞において上に凸の傾向が顕著だった。Day 2 では、FcR γ KO 細胞ではいずれのサイトカイン刺激条件下でも下に凸となった。他方、DAP12 KO 細胞では、いずれのサイトカイン刺激条件下でも上に凸の傾向を示した。ITAMs DKO 細胞では、M-CSF 刺激では下に凸、M-CSF + RANKL 刺激では上に凸、RANKL では上に凸が低周波域でのみ見られる特徴的な sigmoidal curve が見られた。

これらの結果から、2種の ITAM には、各種サイトカイン刺激下で、Ca oscillations の周波数帯が変調するのを抑制する役割があることが分かった。

Ca oscillations の周波数フィルタリング、振幅評価

これまでの実験結果から、2種の ITAM が Ca oscillations に対して各周波数帯に与える影響が異なることが分かった。そこで、各周波数帯に含まれる成分を元波形に復元し、即ち、逆フーリエ変換し、変動波のパターンを観察し、比較的均質な波形から振幅を求めた。新たな解析方法の概要は、**Fig. 10** にまとめた。

周波数帯として、0.01 ~ 0.03 Hz を Low frequency、0.03 ~ 0.1 Hz を High frequency と定義した。周波数帯を区切った根拠としては、以下の通りである。蛍光強度比を測定して得られる Ca oscillations の周波数帯のうち、全施行で検出可能だったのは 0.16 Hz 以下であった。0 ~ 0.16 Hz の中で、トレンド成分と考えられる 0.01 Hz 未満の遅い波、および白色ノイズと考えられる 0.10 Hz より大きな速い波を除去した。0.01 ~ 0.10 Hz の中で値の対数をとった際に、ほぼ中間値となる 0.03 Hz ($\log_{10} 0.03 \approx -1.5$) を帯域内のカットオフ値とした。

Fig. 11A は、Fig.9A の蛍光強度比時系列データを変換し得られた周波数データをもとに、Low frequency の成分を抽出した上で、フーリエ逆変換し、復元された 1 時点差分データを表す。**Fig. 11B** は、1 時点差分データを累積加算し、元の蛍光強度比の推移に変換した。**Fig. 11C,D** は、6B の振動の最大値から最小値を引き求めた振幅を図示した。Fig.11C では野生型マウスにおける各種サイトカイン条件下の振幅を比較したが、有意差はなかった。Fig.11D では各種サイトカイン条件下における、各種ノックアウトマウス間の振幅を比較検

討した。Low frequency の振幅は、day0 で有意差はつかないものの、FcR γ KO マウスで減少し、ITAMs DKO マウスで増加する傾向が見られた。day 2 M-CSF 刺激後は、KO マウスは全て振幅が減少した。RANKL 刺激後は、single KO マウスでは振幅が減少した。FcR γ KO マウスでは、M-CSF + RANKL 条件下でも振幅が減少した。

続いて、High frequency に限定した元データ復元を試みた。Fig. 11E は、High frequency を抽出し復元した 1 階差分データであり、Fig. 11F は加算変換し得られたカルシウム濃度変化である。Fig. 11G,H はその振幅である。High frequency 域でも野生型は各種サイトカイン刺激で振幅に有意差はなかった。各種ノックアウトマウスの検討では、M-CSF 刺激群のみ、KO マウスは全て振幅減弱が見られた。

まとめると、ITAM はいずれの周波数帯においても M-CSF 刺激中の振幅維持に関わっている可能性が示唆された。また RANKL 刺激中は、低周波域の維持に ITAM が 2 種揃っていることが必要であると考えられた。

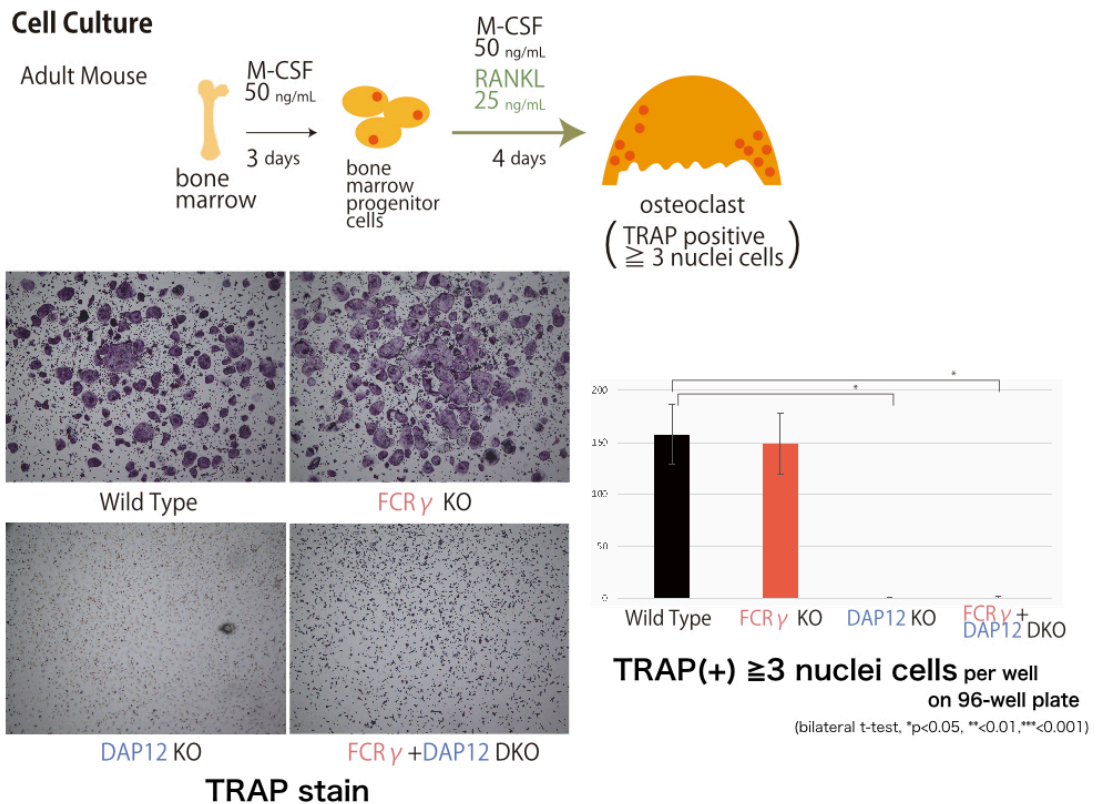


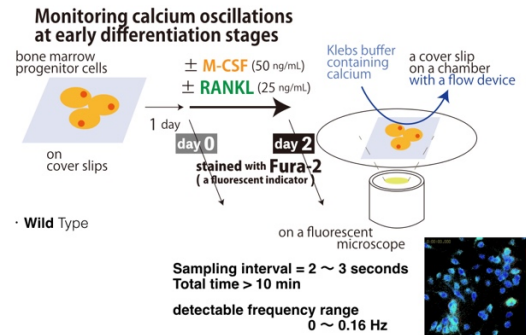
Fig. 6 *in vitro* 破骨細胞分化誘導と ITAM

In vitro 破骨細胞誘導において ITAM が与える影響。野生型マウス、FcR γ KO マウス、DAP12 KO マウス、ITAMs DKO マウスより得られた骨髄マクロファージを用い、96 well プレートにて、M-CSF (50 ng/mL) + RANKL (25 ng/mL) 投与 4 日間で破骨細胞を誘導した (シエマとして上段に示した)。下段左に 4 日目の TRAP 陽性染色像の代表像を示す。下段右図では、各 well における破骨細胞数を由来マウスごとに比較した (bilateral t-test; p *<0.05)。

骨髄マクロファージからの破骨細胞形成は、野生型マウスと比較し、DAP12 KO マウスないし ITAMs DKO マウスでは、著減した。

A

Method of detection



B

Method of analyses

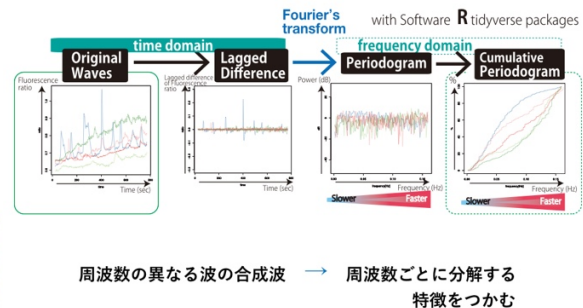


Fig. 7 Ca oscillations 測定および解析の概要

(A) Ca oscillations 測定の実際をシエマにまとめた。骨髄マクロファージをカバーガラス上に接着させた。1 晩サイトカインフリーとした時点を day 0 とした。その後各種サイトカインを 2 日間加えた。観察前に Fura-2 で前処置を行った。蛍光顕微鏡下で、蛍光強度を細胞ごとに 2 波長同時に測定した。サンプリング間隔は、2~3 秒おきに行い、600 秒以上記録した。算出された蛍光強度比を細胞内カルシウム濃度とした。

(B) Ca oscillations 解析の実際をシエマにまとめた。各細胞の蛍光強度比の時系列データを 1 階差分列に変換し、周波数変換可能な弱定常状態を仮定できた。フーリエ変換にて、時系列データを周波数に変換した。periodogram では、横軸は周波数 (Hz)、縦軸は各々の周波数のパワー (dB) を表す。ナイキスト周波数を参考に、0.16Hz 以下を解析対象とした。累積 periodogram では、横軸は周波数 (Hz)、縦軸は低周波から高周波へと加算した累積度数 (%) を縦軸に表している。

細胞ごとに得られた蛍光強度比の時系列データは、周波数の異なる波からなる合成波と考える。フーリエ変換にて周波数データに置換することで、どのような周波数の波の成分が多く含まれているのか、特徴を掴むことができる。

Wild Type

day 0

day 2

M

R

M+R

original wave

lagged difference

Lomb-Scargle Periodogram of lagged difference

Lomb-Scargle cpgram of lagged difference

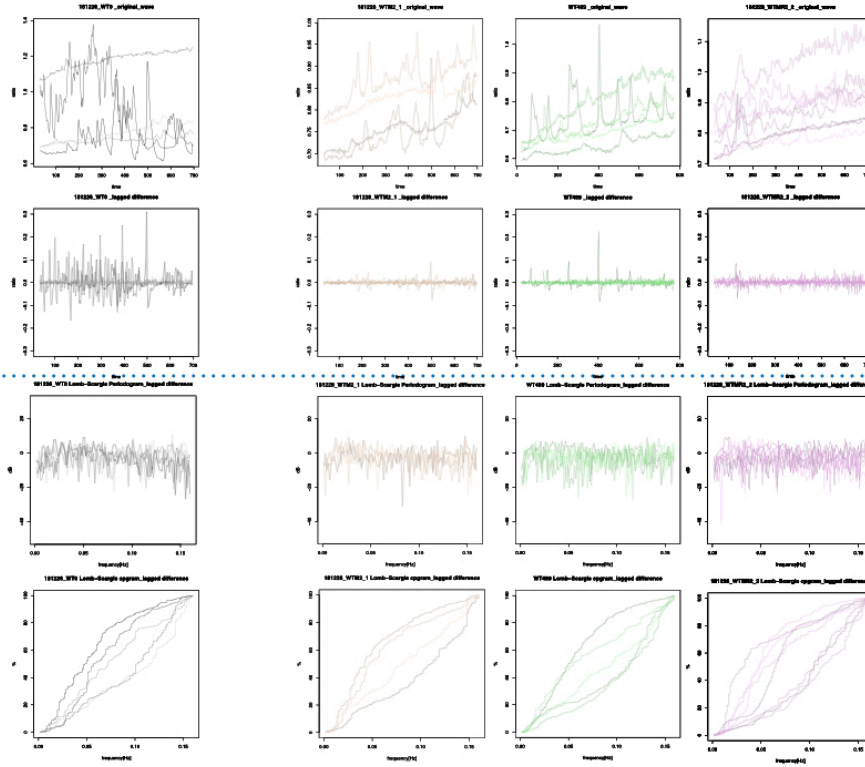
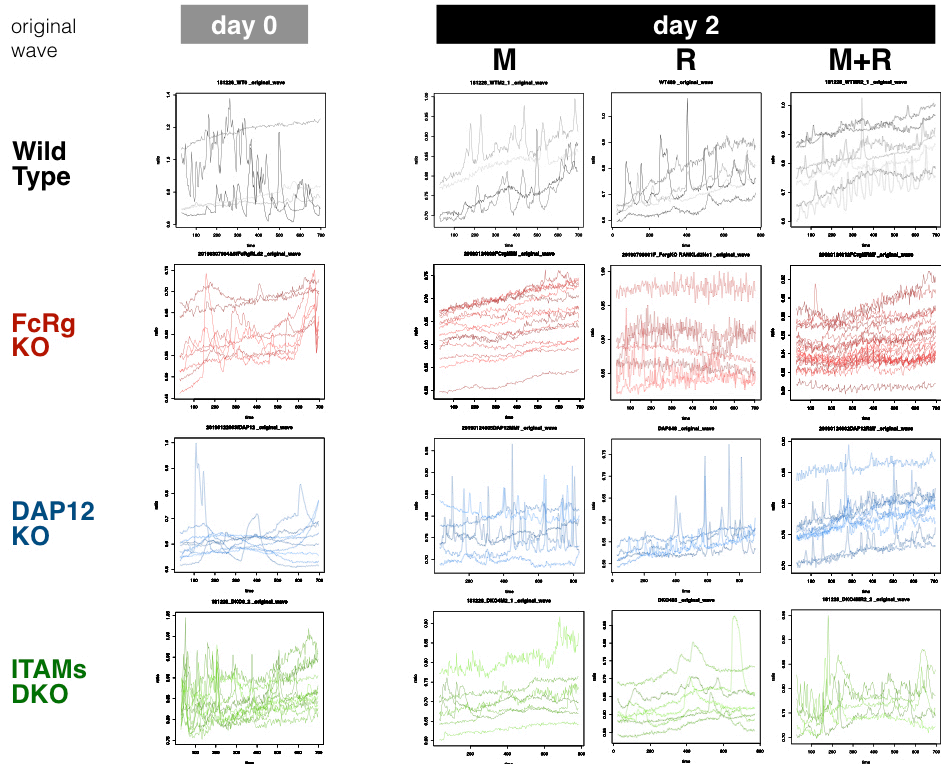


Fig. 8 破骨細胞分化初期の Ca oscillations

骨髄マクロファージを1晩サイトカインフリーでカバーガラスに接着させた後、day 0とし、各種サイトカイン（M-CSF、RANKL、M-CSF + RANKL）を2日間投与した時点（day 2）とともに、Ca oscillationsの自発波を計測した。

計測された時系列データをもとに、周波数解析を行った。各列は、タイミング（day 0 ないし day 2）、day 2は各種サイトカイン投与条件を示している。最上行は蛍光強度比の元データである。細胞ごとに異なる色を用いて表示している。2行目は、対応する細胞の蛍光強度比の1時点差分である。3行目は、periodogramであり、周波数（0～0.16 Hz）ごとのパワー（dB）を表す。4行目は、累積periodogramであり、低周波から高周波に至る累積度数を表している。

A



B

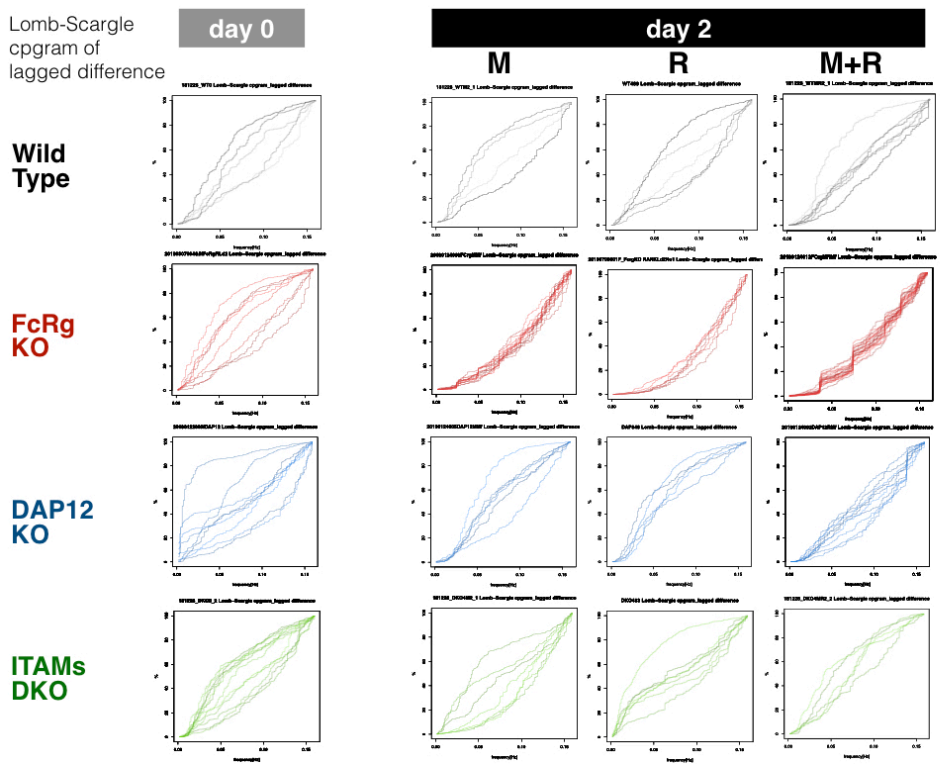


Fig. 9 各種 ITAM KO マウス、破骨細胞分化初期の Ca oscillations

各種 ITAM KO マウス由来の骨髄マクロファージを用いて検討した。1 晩サイトカインフリーでカバーガラスに接着させたタイミングを day_0 とし、各種サイトカイン (M-CSF、RANKL、M-CSF + RANKL) を 2 日間投与した時点 (day 2) とした。day_0 および day_2 の各種サイトカイン刺激条件下において、Ca oscillations の自発波を計測した。

1 行目には野生型マウス (コントロール)、2 行目は FcR γ KO マウス、3 行目は DAPI2 KO マウス、4 行目は ITAMs DKO マウスのデータを示す。各列は、タイミング (day 0 ないし day 2)、day2 は各種サイトカイン投与条件を示している。

(A) Ca oscillations を反映する蛍光強度比の元データ。各図内、細胞ごとに異なる色を用いて表示した。

(B) 図 A の蛍光強度比データを前処置し、周波数変換を行うことによって得られた累積 periodogram。低周波から高周波に至る (0 ~ 0.16 Hz) 累積度数 (%) を表す。Ca oscillations の周波数の偏りの傾向が分かる。

Method of analyses

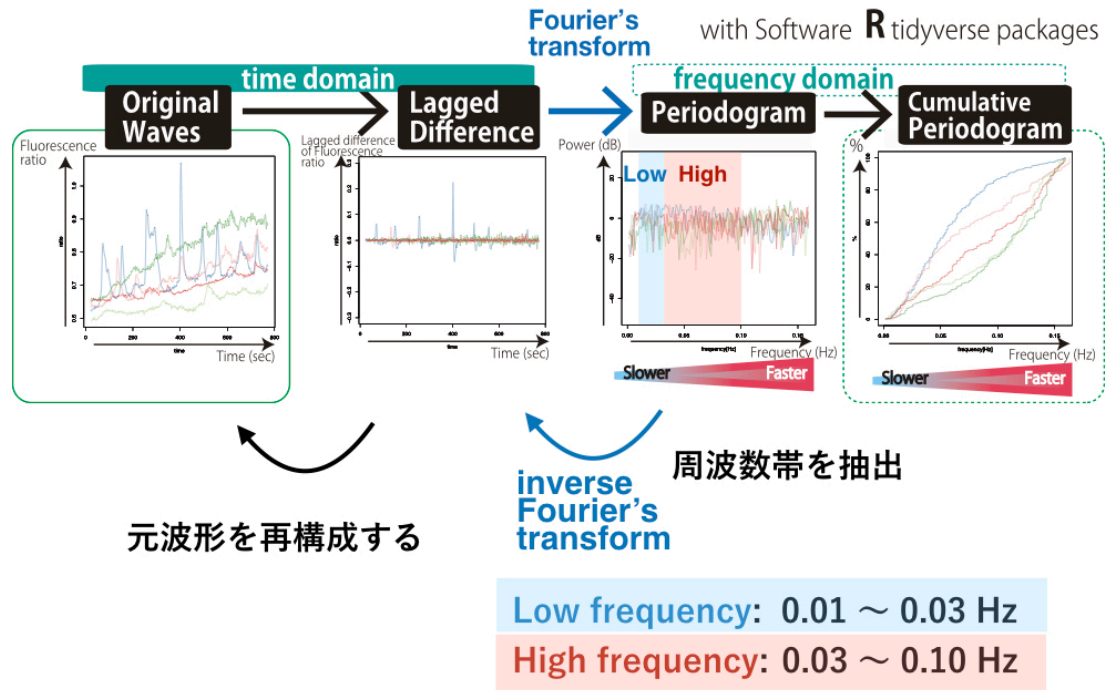


Fig. 10 Ca oscillations 周波数フィルタと復元の概要

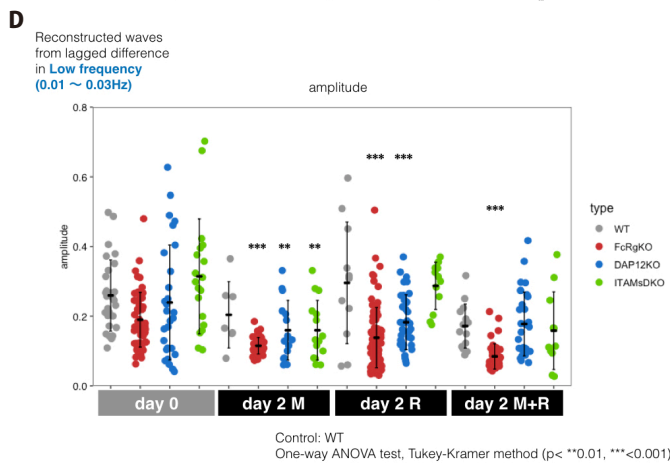
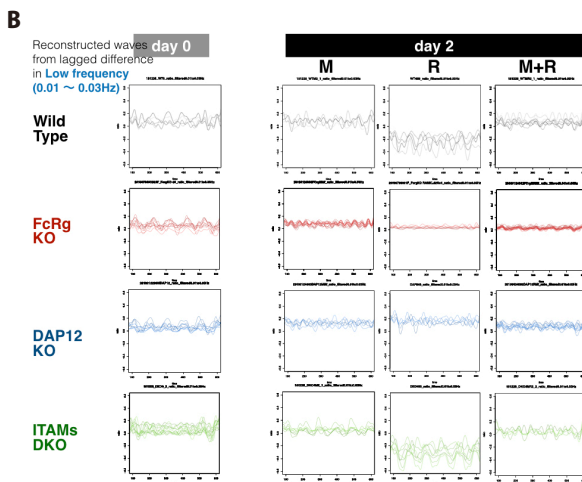
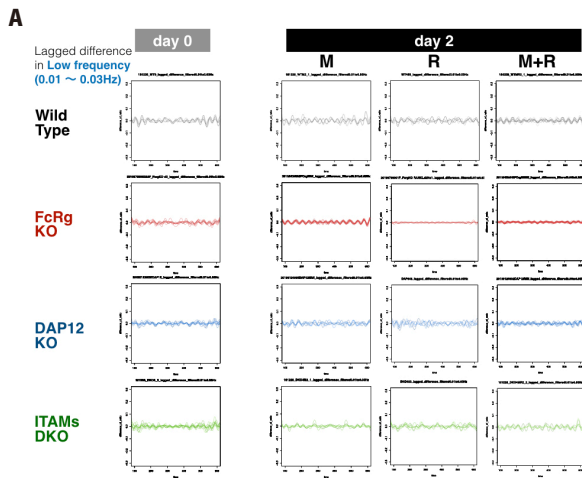
Ca oscillations の周波数フィルタおよびフィルタリング後元波形復元の概要をシエマとして示す。

Low frequency は 0.01 ~ 0.03 Hz、High frequency は 0.03 ~ 0.1 Hz と定義した。

まずはこれまで通り、蛍光強度比時系列データを前処置の上、周波数データに置換した。次に、Low および High frequency として定義した周波数帯に含まれる成分のみを各々抽出した。

抽出された周波数データに、逆フーリエ変換を施し、1 時点差分のデータを復元した。記録開始前および記録終了後のデータは欠損してしまう時系列データの制約上、開始直後および終了直前の修復データには乱れが生じ、信頼性は欠けてしまう。本解析では、記録開始後 100 秒間および終了前の 600 秒以降のおよそ 100 秒間をカットすることで、相対的に安定した振幅の波を復元しえた。復元した 1 時点差分データを累積加算することにより、Low ないし High frequency に含まれる波を再構成した。

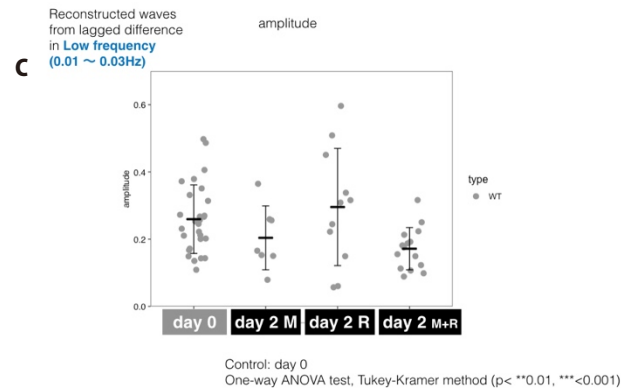
この手法は、時系列データの周波数フィルタとして、特徴的な周波数の成分を抽出するために、汎用されている。本研究では、Ca oscillations を特定の周波数帯でフィルタリングすることで、均質な波を再構築ができ、結果、振幅を求めることができた。



1 行目には野生型マウス (コントロール)、2 行目は FcR γ KO マウス、3 行目は DAP12 KO マウス、4 行目は ITAMs DKO マウスのデータを示す。各列は、タイミング (day 0 ないし day 2)、day2 は各種サイトカイン投与条件を示す。

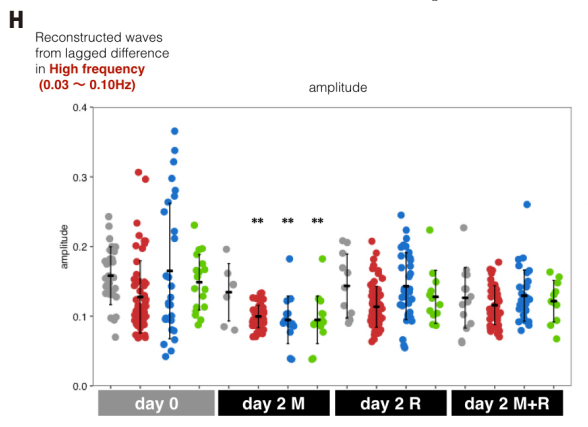
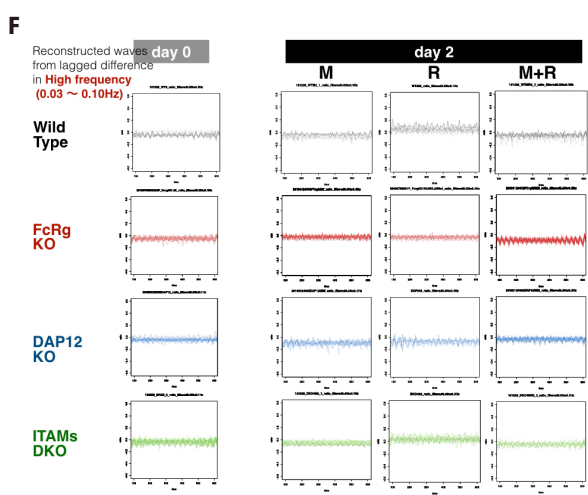
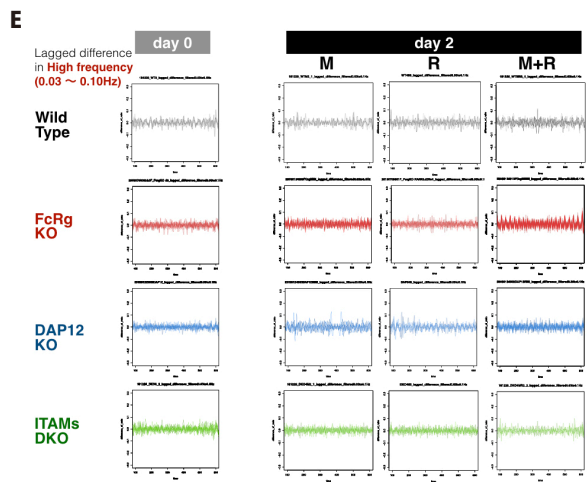
(A) Low frequency フィルタリング (0.01 ~ 0.03Hz) し復元した 1 階差分。

(B) 1 階差分を累積加算し得られたフィルタリング後元波形。



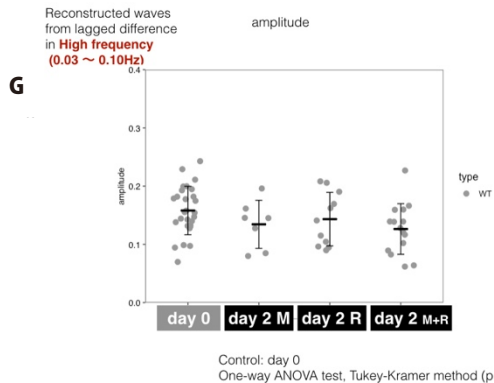
(C,D) Low frequency に含まれる波の振幅の比較 (One-way ANOVA test; $p < ** < 0.01, *** < 0.001$)
各群中央の実線は平均値 \pm S.D.、各点は細胞ごとの振幅の値を表す。

(C) 野生型マウス における各種サイトカイン刺激条件の振幅比較。
(D) 各種ノックアウトマウス における各種サイトカイン刺激条件下振幅比較。



1 行目には野生型マウス (コントロール)、2 行目は FcR γ KO マウス、3 行目は DAP12 KO マウス、4 行目は ITAMs DKO マウスのデータを示す。各列は、タイミング (day 0 ないし day 2)、day 2 は各種サイトカイン投与条件を示す。

(E) High frequency フィルタリング (0.03 ~ 0.10Hz) し復元した 1 階差分。
(F) 1 階差分を累積加算し得られたフィルタリング後元波形。



(G,H) High frequency に含まれる波の振幅の比較 (One-way ANOVA test; p < **<0.01)。各群中央の実線は平均値 \pm S.D.、各点は細胞ごとの振幅の値を表す。

(G) 野生型マウス における各種サイトカイン刺激条件の振幅比較。
(H) ノックアウトマウスにおける各サイトカイン刺激条件の振幅比較。

Fig. 11 周波数フィルタリングで復元した Ca oscillations 波形 ~ 各種 ITAM KO マウスごとに

考察

本研究では、破骨細胞分化初期における Ca oscillations を計測した。破骨細胞分化において、ITAM は co-stimulatory signal の細胞内への入力ゲートであり、ITAM がないと Ca oscillations が起こらないと考えられてきた⁸。しかしながら本研究によって、破骨細胞分化が抑制されない FcR γ KO マウス骨髄マクロファージにおいて、むしろ Ca oscillations の振幅が減少すること、DAP12 KO マウス、特に ITAMs DKO マウスでは、RANKL 刺激前から粗雑な Ca oscillations が起こることが示された。

細胞内の Ca oscillations は、細胞外の環境により変化することが知られているため、本研究では還流液を加温し一定に保った。また、生体の骨髄環境では Ca 濃度が高いと考えられ、Ca 豊富な生理的環境を再現することで、本研究では従来の手法よりも Ca oscillations が検出されやすかったと考える。また、Fura-2 を用いた 2 波長同時計測の正規法を用い、蛍光強度比を細胞内 Ca 濃度と定義しているが、これはノイズの影響をキャンセルするため Ca oscillations の正規化された標準的測定方法である。

既報と結果が異なった理由は、Ca を高濃度に維持したこと以外にも、ITAM 受容体のリガンドによる影響が考えられる。Fetal bovine serum には FcR γ を含む Fc 受容体のリガンド、イムノグロブリンが含まれる。また DAP12 に結合する受容体 OSCAR はコラーゲンを認識する⁴²。本研究ではカバーガラスに骨髄マクロファージを接着させており、細胞培養環境の違いが結果の相違につながった可能性がある。

従来の研究では Ca 濃度時系列変動の定性的な理解に留まっていたが^{8,14,2}、本研究は周波数に着目した解析を追加し、Ca oscillations の理解を深めた。

FcR γ は高周波への遷移を抑制する傾向があること、他方 DAP12 は低周波への遷移を抑制する傾向に働くことが分かった。周波数解析から得られた2種の ITAM の役割相違の解釈を **Fig. 12** に示す。

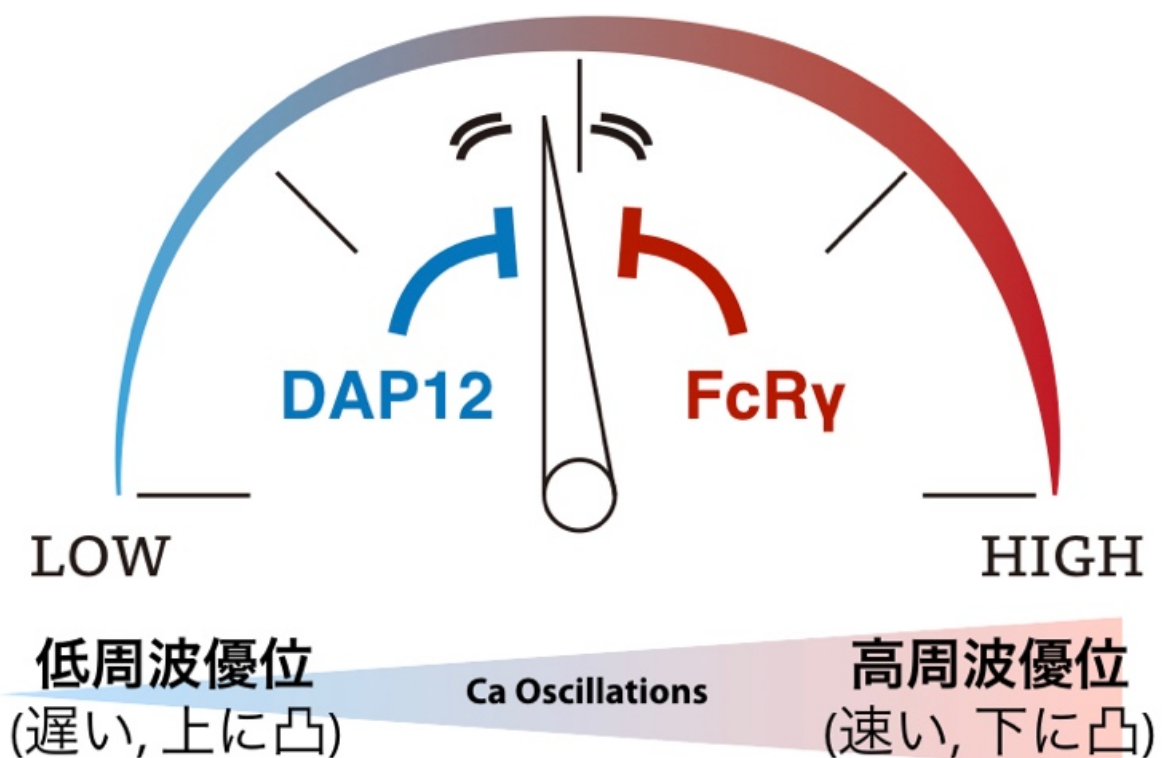


Fig.12 破骨細胞分化時、共刺激受容体の Ca oscillations 調節の役割シエマ 1 (周波数解析を踏まえて)

さらに、Ca oscillations を Low frequency および High frequency の 2 群に分けて周波数フィルタリングした。即ち、いったん Ca oscillations を周波数領域に変換し、特定の周波数域のみ切り出し、部分的に元の時系列データを復元した。結果、Low frequency oscillations には双方の ITAM が、振幅の維持に関わることが分かった。M-CSF + RANKL の条件では、低周波域の振幅は野生型でも減衰し、有意差がつきにくい中、それでも FcR γ KO は頑強に振幅を減少させており、低周波域の維持にも FcR γ が関与していることが分かった。他方 High frequency oscillations は、M-CSF 刺激時に、2 つの ITAM が揃わないと減弱することが分かった。周波数帯フィルタリングを用いた復元したデータの振幅解析により、2 種の ITAM が各周波数帯に与える影響が異なることが分かった。追加解析により明らかになった 2 種の ITAM の Ca oscillations における役割の解釈を **Fig. 13** に示す。

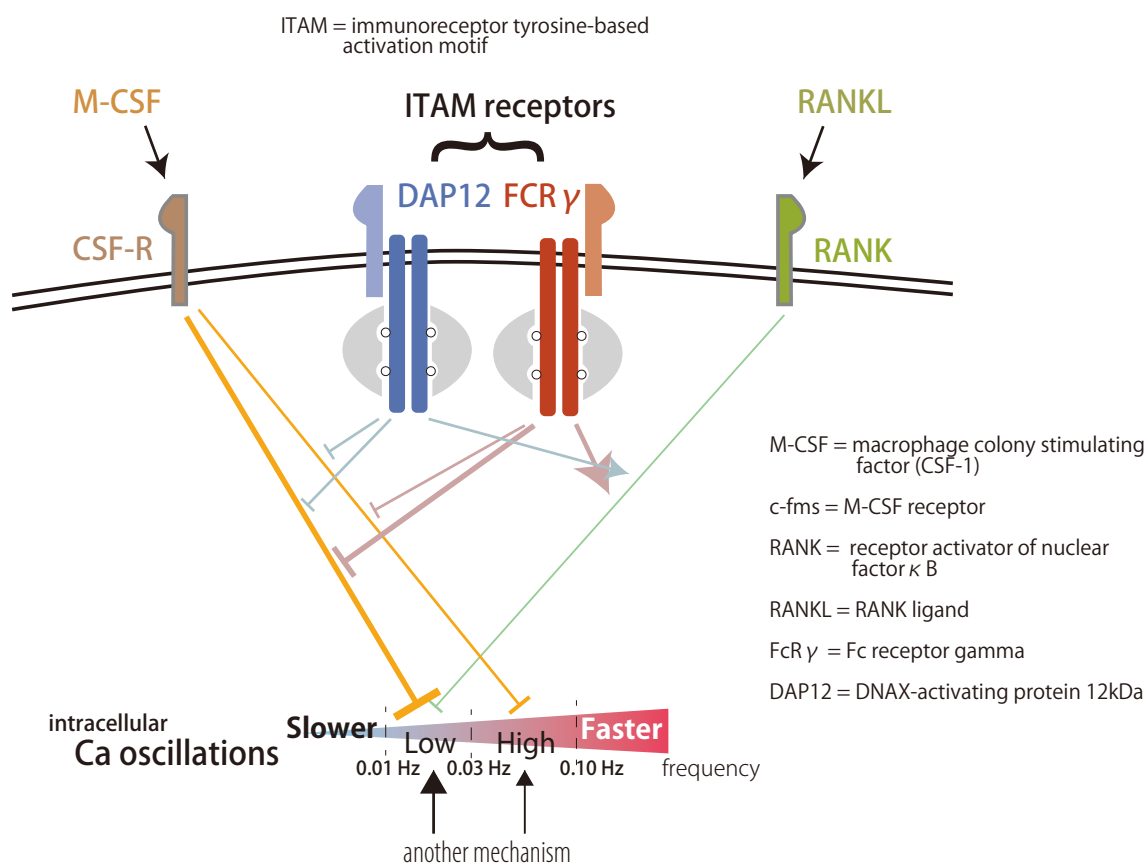


Fig.13 破骨細胞分化時、共刺激受容体の Ca oscillations 調節の役割シエマ 2 (周波数フィルタ後振幅比較を踏まえて)

M-CSF、RANKL、ITAM と各周波数帯の Ca oscillations の関係を統合的に説明するシエマ。

M-CSF、RANKL とも Ca oscillations に対して抑制的に働く。
M-CSF による Ca oscillations 抑制に対して、FcR γ および DAP12 は別の作用点で独立し、各々が抑制的に作用する。
他方、RANKL 下流の Ca oscillations 抑制系では、FcR γ と DAP12 は同じ作用点で拮抗し、その作用を打ち消し合いながら、促進的に作用する。

Ca oscillations は破骨細胞分化の過程で、振幅を維持する機構が存在する。
Ca oscillations の低周波は、M-CSF、RANKL が拮抗し、振幅を抑制する。
Ca oscillations の高周波は、M-CSF のみが振幅を抑制する。

2種のITAMのうち、DAPI2はM-CSFとRANKLによる*in vitro*の破骨細胞分化に必須である。一方、DAPI2 KOマウスの骨内には破骨細胞が観察されており、生体においては骨芽細胞に固相化されたRANKLが破骨細胞分化をレスキューすると理解されている^{8, 43}。FcR γ KOマウスにおいては、*in vitro*および*in vivo*とも、破骨細胞形成に影響はない。ITAMs DKOマウスでは、破骨細胞形成が抑制され、*in vivo*では、大理石病様の骨病変を示す⁸。過去の報告によると、FcR γ 複合体が活性化されると、破骨細胞が形成され、RAにおける骨びらんが促進する^{44, 9, 45}。また、破骨細胞形成は、FcR γ を介したco-stimulatory signalの強度により調節されるとの報告もある¹¹。

本研究結果から、co-stimulatory signal誘発における2種のITAMの役割を切り分けることが可能となり、周波数帯により、Ca oscillationsは異なる制御を行っていることが明らかになった。破骨細胞分化誘導因子であるRANKLが、2種のITAMを介し、低周波域のコントロールを巧みに行っていると考えた。本研究で用いた手法は、破骨細胞のみならず、非興奮性細胞におけるCa oscillations解析に応用可能なものとする。神経・筋などの興奮性細胞では、細胞外刺激とCalcium spikeが1:1対応するため、spike波形に着目すれば定量的解析も容易である。一方、非興奮性細胞では、1:1対応する細胞外刺激がなく、Ca oscillations解析には別のフレームワークが必要だった。本研究で実践したoscillationsの周波数解析は、細胞生理学に新たな展開を生む可能性がある。

本研究の limitation は以下の通りである。まず Ca oscillations の現象の理解に留まっている。破骨細胞分化の原因か、結果なのか、不明瞭である。周波数の違いを人工的に改変し、リズムを作るだけで破骨細胞を分化誘導できるのか、検討するには新たな手法の開発が求められる。また、特定のリズムを生み出す責任チャンネル（細胞膜上ないしは小胞体上）は同定できていない。個々のチャンネルの阻害ないしはロックアウトによる oscillations の解析の事例はこれまでもあった。しかし、複数のチャンネルが細胞全体の oscillations 調律に各々どの程度寄与しているのか、さらには各分化段階における重要性を知るためには、さらなる研究が必要であり、今後検討すべき課題と考えている。

本研究の結果、破骨細胞分化において生じる Ca oscillations の周波数が、2種の ITAM 分子により、巧みに制御されていることが分かった。今後、各種イオンチャンネル、受容体を含む、破骨細胞分化メカニズム解明の一步となり、さらには、破骨細胞分化を抑制する新たな治療標的が発見される可能性がある。

2. CTLA4-Ig(アバタセプト)が破骨細胞形成を直接抑制する機序研究

結果

CTLA4-Ig は NFATc1 発現を抑制し、破骨細胞形成を抑制する

CTLA4-Ig が RANKL 誘導性破骨細胞形成におよぼす効果を検討した。野生型 C57BL/6 マウスから得られた骨髄マクロファージを M-CSF + RANKL 存在下で 4 日間培養し、破骨細胞分化誘導した。分化誘導の際に、マウスキメラ CTLA4-Ig を 5 $\mu\text{g/mL}$ ないしは 25 $\mu\text{g/mL}$ で投与した。CTLA4-Ig は濃度依存性に破骨細胞分化を抑制した(**Fig. 14A**)。

次に破骨細胞分化初期に着目し、M-CSF + RANKL 投与後 2 日目における NFATc1 発現に対する CTLA4-Ig の作用を検討した。qPCR による mRNA 発現評価、細胞免疫染色、western blotting によるタンパクレベルの発現評価のいずれにおいて、CTLA4-Ig は NFATc1 発現を抑制した (**Fig. 14B-D**)。一方 CTLA4-Ig は破骨細胞の生存期間に影響を与えなかった (**Fig. 14E**)。

続いてマウスキメラ CTLA4-Ig の構成ドメインである、マウス CTLA4 およびヒト IgG1 の Fc ドメインを個別に用い、RANKL 誘導性破骨細胞分化への影響を調べた。その結果、マウス CTLA4 は NFATc1 の発現を低下し、破骨細胞分化を抑制する一方で、ヒト IgG1 Fc ドメインは上述の効果は示さなかった (**Fig. 14F-I**)。

骨髄マクロファージの細胞内 Ca oscillations は、 CTLA4-Ig に 1 日間暴露されると抑制効果が持続する

続いて、CTLA4-Ig による破骨細胞分化直接抑制の機序として、NFATc1 のシグナル上流にある Ca oscillations に着目した。骨髄マクロファージを 1 日間 CTLA4-Ig に暴露した後の細胞内 Ca oscillations に対する効果を調べた。

細胞内カルシウム濃度計測の概要を説明する。対象の骨髄由来細胞をカバーガラス上に 1 晩かけて接着させた。この間は M-CSF ないし RANKL は加えていない。計測前に Fura-2 による前処置を行った。蛍光顕微鏡で計測する際は、細胞外液中の条件を一定に保つため、34°C に保温したカルシウム含有 Krebs 液を還流させながら行った。

Fig. 15A は、3 つの異なる前処置を行った各群で、各細胞における Fura-2 の蛍光強度比を図に示したものである。**Fig. 15B** では、得られた蛍光強度比を、個々の細胞ごとに、時系列に沿って 1 時点間の差分 (lagged difference) に変換した。**Fig. 15C** では、Fig. 15B で得られた個々の細胞の差分の絶対値の最大値を、Ca oscillations の振幅とみなし、3 つの異なる前処置群間で比較した。CTLA4-Ig 前処置を行った群では、Ca oscillations の振幅が減少した。CTLA4-Ig による骨髄マクロファージの Ca oscillations への抑制効果は、Ca が欠乏した別の細胞外液条件でも確認された。1 晩サイトカインフリーとする際に、CTLA4-Ig による前処置を追加した群と前処置なしの対照群をおいた。前処置なしの群では、自発的 Ca 濃度変動を反映した蛍光の変動が観察された。一方、CTLA4-Ig で前処置をした群では、蛍光は対照群に比べ全体的に抑

制されており、蛍光の変動はほぼ見られず、M-CSF + RANKL 刺激を加えても変動は惹起されなかった。

破骨細胞前駆細胞の細胞内 Ca oscillations は、CTLA4-Ig の急性投与により抑制される

次に、骨髄マクロファージに対して CTLA4-Ig を急性投与した際に、Ca oscillations に与える影響を検出した。1 晩サイトカインフリーとした骨髄マクロファージを Fura-2 で染色した。蛍光強度を観測する際に、還流液に各種サイトカインを追加ないしは除去する事によって、quick response を検出する事に成功した。コントロールとしては、ヒト IgG1 Fc を用いた。

サイトカイン投与による蛍光強度比の時系列変化をまとめた (**Fig. 16A**)。前実験のフーリエ変換は、時間軸の情報を圧縮し、全時間帯をまとめて周波数ごとの分布を見た。急性投与の効果をみる本実験では、時間軸に沿って周波数帯の変化をみるため、Morlet ウェーブレット解析を行った。**Fig. 16B** は、各サイトカイン投与条件の代表的 2 細胞のウェーブレット解析の結果である。

CTLA4-Ig の投与に応じて、Ca oscillations の周波数帯変化が見られ、特に高周波域の減弱が顕著だった。他方、RANKL ないしは ヒト IgG1 Fc ドメインの投与期間に応じた Ca oscillations 周波数の変化は見られなかった。

FcR γ は、CTLA4-Ig が細胞内 Ca oscillations に干渉し、破骨細胞形成を抑制するのに必要である

CTLA4-Ig が破骨細胞前駆細胞の Ca oscillations に関与する機序として、ITAM 受容体の関与を考えた。FcR γ KO マウス由来の骨髄マクロファージから、M-CSF + RANKL 刺激によって *in vitro* で破骨細胞は分化誘導される。CTLA4-Ig 投与による破骨細胞分化抑制効果は、FcR γ KO マウスでは見られず、NFATc1 の発現変化も見られなかった (**Fig. 17A,B**)。FcR γ KO 由来の骨髄マクロファージでは、CTLA4-Ig を 1 日投与しても、Ca oscillations の振幅減弱は見られなかった(**Fig. 17C-E**)。また、サイトカイン急性投与条件でも、FcR γ KO マウス由来の骨髄マクロファージには、野生型マウスのような周波数の急激な変化が見られなかった (**Fig. 17F,G**)。

CTLA4-Ig は、LPS 誘導性頭蓋骨骨吸収を抑制し、*in vivo* でも効果を示す

最後に、CTLA4-Ig の破骨細胞抑制作用を *in vivo* で検証した。LPS のマウス頭蓋骨上への投与によって炎症性骨破壊が生じる。この時 CTLA4-Ig を追加投与すると、野生型マウスでは、micro CT による三次元構築画像の骨吸収面積が減少した。同じ実験を FcR γ KO マウスで行ったところ、骨吸収面積の減少は見られなかった (**Fig. 18A, B**)。

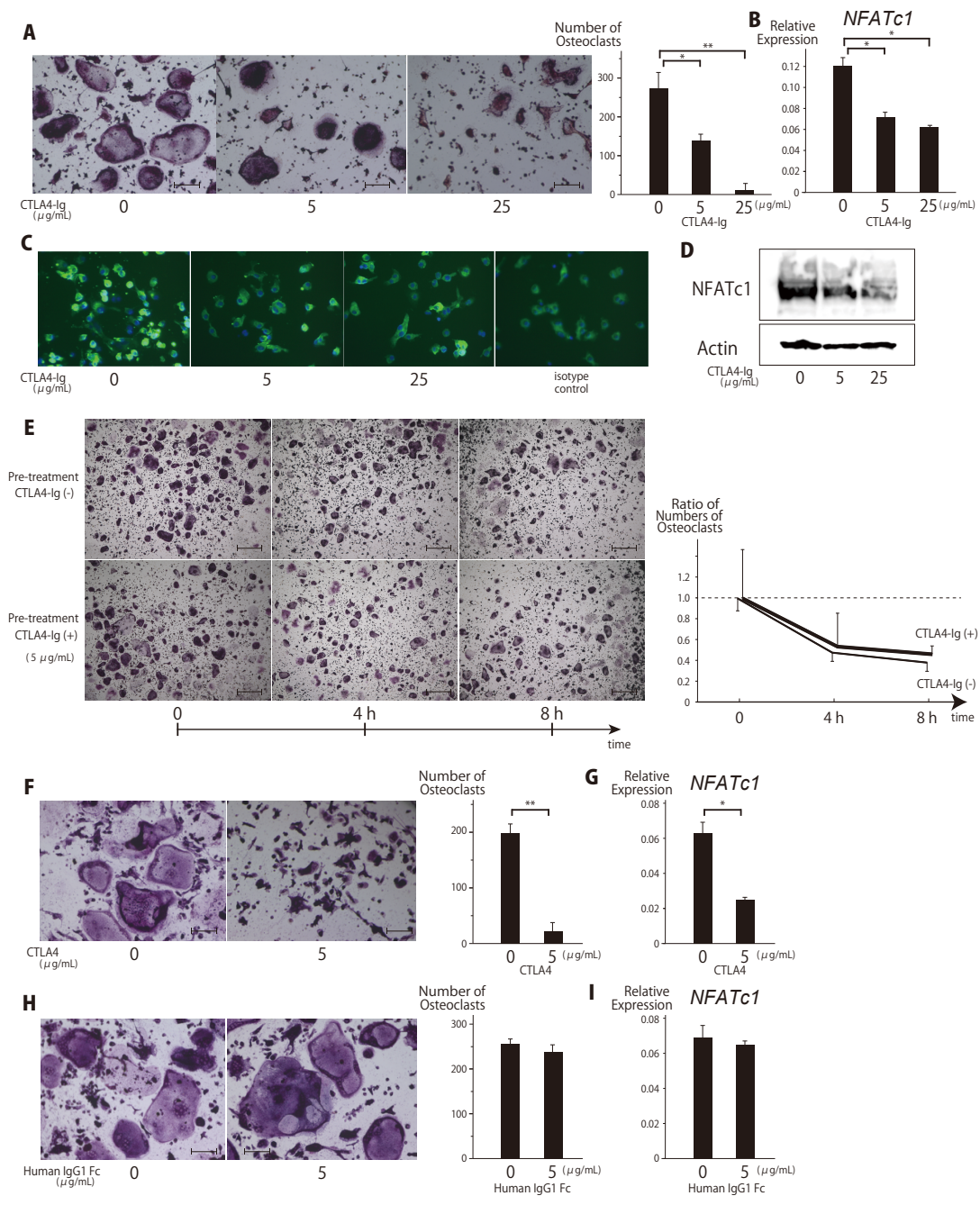


Fig. 14 CTLA4 は、NFATc1 発現を抑制し、破骨細胞形成を直接抑制する

(A) *in vitro* 破骨細胞誘導における CTLA4-Ig の効果。96well プレートにて、M-CSF (50 ng/mL) + RANKL (25 ng/mL) 投与 4 日間で破骨細胞を誘導する際に、マウスキメラ CTLA4-Ig (5 μ g/mL or 25 μ g/mL) を加えた。TRAP 陽性多核巨細胞である破骨細胞を各 well 内で数えた。Bar = 100 μ m。

(B) 破骨細胞分化誘導 2 日目の Nfatc1 mRNA 発現レベルの qPCR 結果。骨髄マクロファージに対して M-CSF + RANKL 刺激を 2 日間行い、一部の群には、分化誘導中にマウスキメラ CTLA4-Ig を 5 μ g/mL ないしは 25 μ g/mL 加えた。 β -actin を内在性コントロールとした(*P<0.05, **P<0.01; unpaired two-tailed Student's t-test)。少なくとも 3 回の繰返し試行で得られた代表データを示す。

(C) 破骨細胞分化誘導 2 日目の NFATc1 細胞免疫染色。骨髄マクロファージに対して M-CSF + RANKL にて 2 日間刺激した。一部の群にはマウスキメラ CTLA4-Ig を 5 μ g/mL ないしは 25 μ g/mL 加えた。一次抗体として rabbit anti-NFATc1 antibodies (Santa Cruz)、二次抗体として Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-rabbit antibodies を用い、DAPI 核染色を追加し蛍光顕微鏡で観察した。

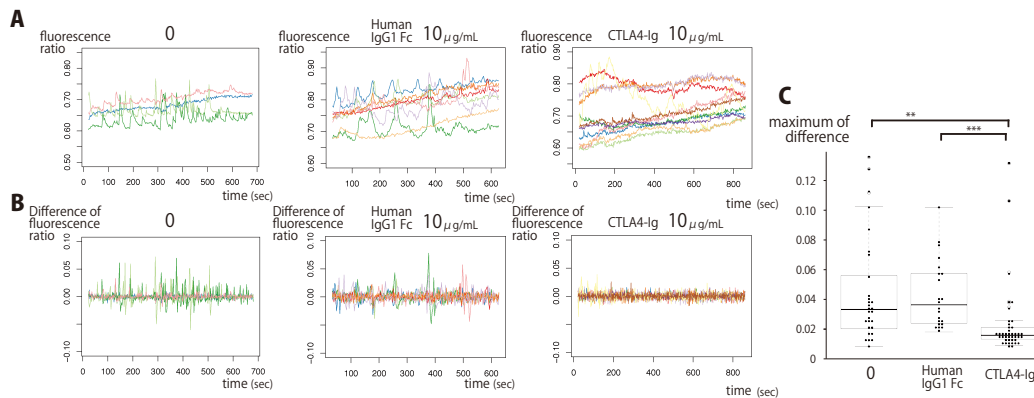
(D) 破骨細胞分化誘導 2 日目の NFATc1 タンパク発現レベル。破骨細胞分化誘導を 2 日間行った際、各条件で CTLA4-Ig 投与を行った後、RIPA buffer に溶解し上清としてタンパクを回収し、western blotting を行った。rabbit anti-NFATc1 antibodies を一次抗体とし、 β -actin を内在性コントロールとした。

(E) 破骨細胞の survival assay。骨髄マクロファージを M-CSF + RANKL にて *in vitro* で 4 日間培養し、破骨細胞に分化させる際に、マウスキメラ CTLA4-Ig (5 μ g/mL) を一部の群に加えた。M-CSF および RANKL を培養液から除去したタイミングを time 0 とし、グラフの横軸のタイミングまで各々培養を継続した。破骨細胞の生存率は、TRAP 陽性の多核巨細胞の個数について、time 0 における個数に対する割合とした。少なくとも 2 回の繰返し試行で得られた代表データを示す。Bar = 500 μ m。

(F-I) 96 well プレートにて、骨髄マクロファージを M-CSF (50 ng/mL) + RANKL (25 ng/mL) の存在下で培養する際に、E,F では マウス CTLA4 with His tag (5 μ g/mL) を G,H では ヒト IgG1 Fc (5 μ g/mL) を一部に加えた。

(F,H) 破骨細胞分化誘導 4 日目の各 well 内、破骨細胞数カウント。Bar = 100 μ m。

(G,I) 破骨細胞分化誘導 2 日目、qPCR による NFATc1 発現 (β -actin を内在性コントロールとして) (*P<0.05, **P<0.01; unpaired two-tailed Student's t-test)。少なくとも 3 回の繰返し試行で得られた代表データを示す。



**Fig. 15 CTLA4-Ig 単回投与により持続する
骨髄マクロファージ内 Ca oscillations 減弱効果**

骨髄マクロファージを観察 1 日前にカバーグラス上に、各条件で播種した。カルシウム検出試薬 Fura-2 で観察前に前処置した後、蛍光顕微鏡で各細胞の蛍光強度を 2 波長同時に計測し、蛍光強度比を求めた。

(A) Fura-2 蛍光強度比の時系列データ。以下の 3 つの前処置条件; サイトカインフリー、ヒト IgG1 Fc ドメイン、マウスキメラ CTLA4-Ig (左から右へ)。細胞ごとに異なる色の線で表示した。

(B) 各細胞蛍光強度比の時系列データから算出した 1 時点差分データ。対応のある細胞ごとに、(A) と同じ色の線で表示した。

(C) 各条件下で、各細胞の 1 時点差分絶対値(振幅最大値の代替マーカー)の最大値の箱ひげ図。縦軸は、各細胞の蛍光強度比の最大値(振幅の代替マーカー)。縦軸は Fig. 3B における各細胞の蛍光強度の差分値を表す。このデータは、少なくとも 2 回の実験施行の上、代表的なデータを表す (** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; Wilcoxon rank sum test)。

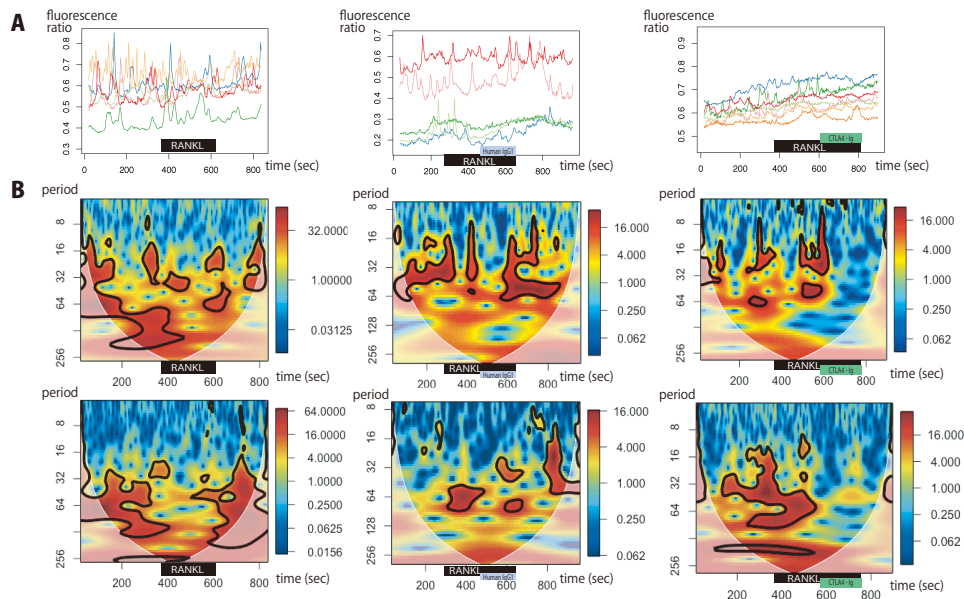


Fig. 16 CTLA4-Ig 急性投与による骨髄マクロファージ内 Ca oscillations 抑制

Ca oscillations 解析 1 日前に、骨髄マクロファージをカバーガラス上に播種し、M-CSF を培養液から抜いた。解析前にカルシウム検出試薬 Fura-2 にて前処置した。蛍光顕微鏡で、細胞ごとに蛍光強度を 2 波長同時に測定した。

(A) 蛍光強度比の時系列データ。以下の 3 つの薬剤投与プロトコルで得られた。RANKL (25 ng/mL) のみ (左), RANKL に加えて、ヒト IgG1 Fc ドメイン (10 μ g/mL) (中央), or RANKL に加えて、マウスキメラ CTLA4-Ig (10 μ g/mL) (右)。細胞ごとに異なる色を用いて表示している。

(B) 各群代表 2 細胞の蛍光強度比、周波数ウェーブレット解析結果。横軸は時間を表す。縦軸は Ca oscillations の周波数を表す。蛍光強度比の時系列変化は、各周波数の波が複合してできると考え、周波数ごとの重なりを密度をカラースケールで表した。図中の黒い囲み線は、その周波数帯の重なり密度が大きく一定以上に飽和していることを示している。下に凸の線より下方の白色に霞んだ領域は、時系列データの開始点および終了点を越えたデータを補って計算した領域であることを示す。時系列のうち中央の周波数は、開始点から終了点まで全てのデータを用いて計算されるので、この補正は適応されない。

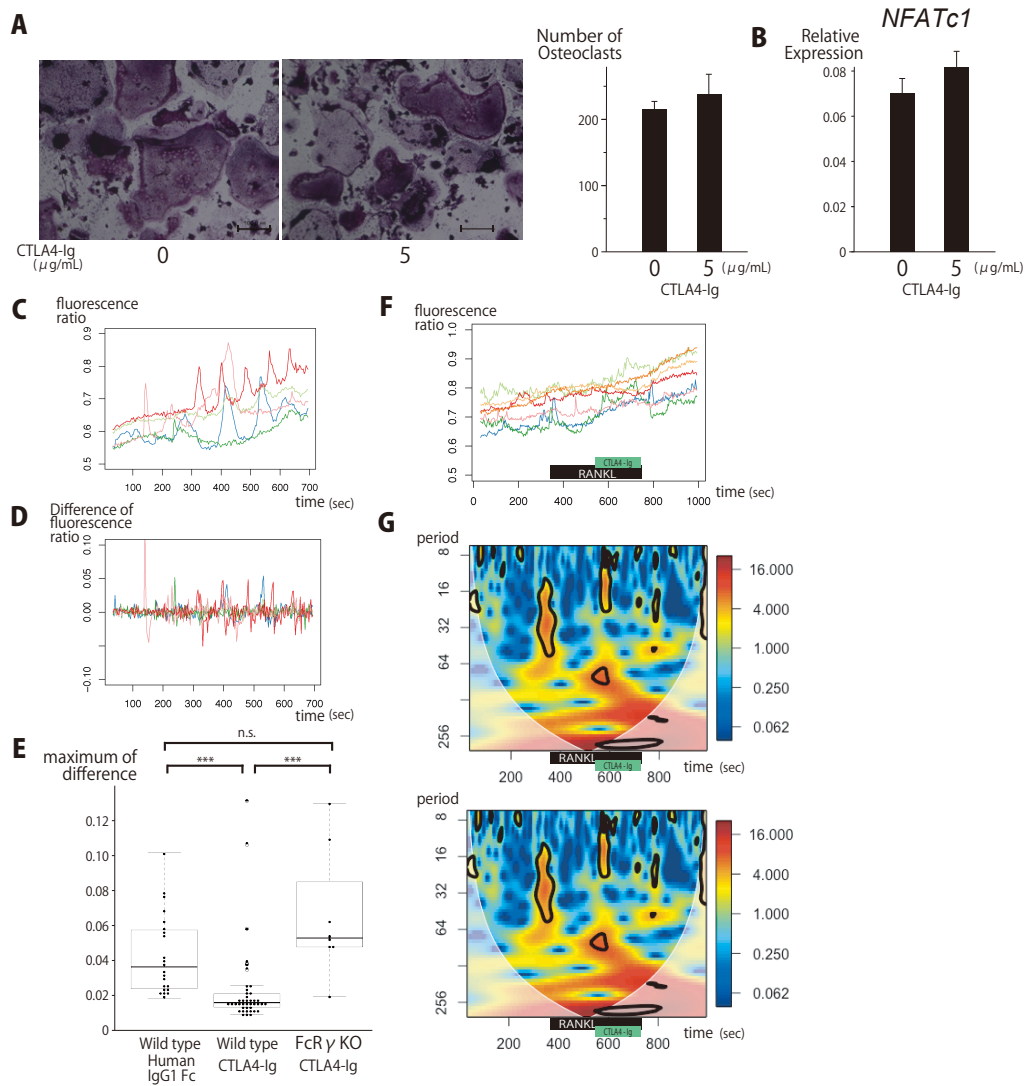


Fig. 17 CTLA4-Ig は FcR γ 依存性に骨髄マクロファージ内 Ca oscillations に干渉し、破骨細胞形成を抑制する

(A,B) FcR γ KO 由来の骨髄マクロファージを 96well プレートに播種し、M-CSF (50 ng/mL) and RANKL (25 ng/mL)を加え、マウスキメラ CTLA4-Ig (5 μ g/mL)を一部の群に加えた。

(A) 4 日間 M-CSF + RANKL 刺激した後の各 well 内破骨細胞数。Bar = 100 μ m。

(B) 2 日間 M-CSF + RANKL 刺激した後、定量 real-time PCR による Nfatc1 mRNA 発現レベル。 β -actin を内在コントロールとした。少なくとも 3 回の独立した試行のうち、代表的データを挙げた。

(C) FcR γ KO マウス由来の骨髄マクロファージに対して、マウスキメラ CTLA4-Ig (10 μ g/mL)を投与し 24 時間後の蛍光強度比の時系列データ。

(D) データ(C)から算出した、各細胞の蛍光強度比の 1 時点間差。

(E) 蛍光強度比の 1 時点間差の絶対値の最大値（蛍光強度比振幅の代理マーカー）、箱ひげ図（散布図とともに）。FcR γ KO マウス由来骨髄マクロファージに CTLA4-Ig 前処置した群を野生型マウスにヒト IgG1 Fc ドメインを投与した群、マウスキメラ CTLA4-Ig を投与した群と比較した(**P<0.001; Wilcoxon rank sum test)。

(F) FcR γ KO マウス由来の骨髄マクロファージに対して、RANKL (25 ng/mL) および murine chimera CTLA4-Ig (10 μ g/mL) を投与した際の蛍光強度比の時系列データ。色の違いは、異なる細胞であることを表す。

(G) 蛍光強度比の時系列データのウェーブレット解析結果。CTLA4-Ig 急性投与時間帯のある代表的な 2 細胞の結果を挙げた。横軸は時間軸、縦軸は Ca oscillations の周波数を反映している。

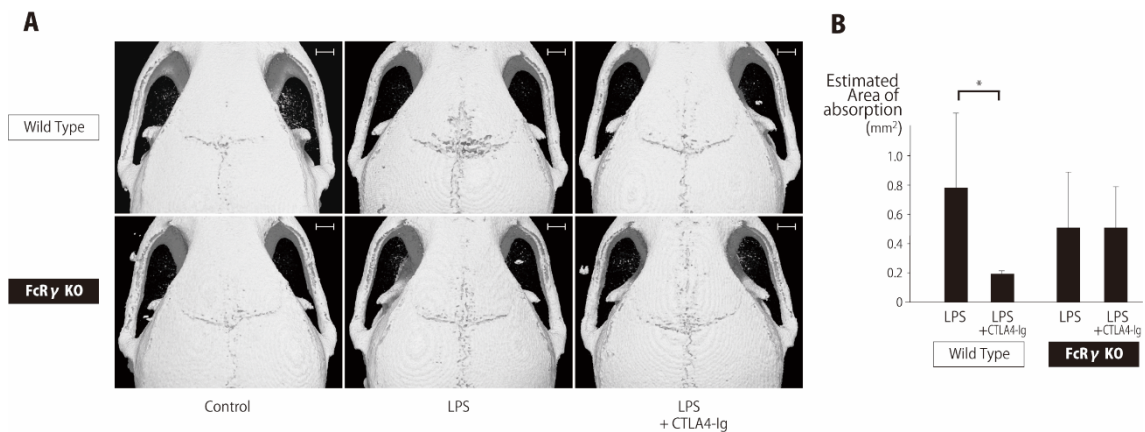


Fig. 18 LPS 誘導性マウス頭蓋骨溶解モデルを用いた CTLA4-Ig の骨吸収抑制効果検証

(A) micro CT 頭蓋骨 3D 再構築画像。10 週齢雌マウス頭蓋骨上に、PBS 200 μ L、PBS 200 μ L + LPS (25 μ g/gram body weight)、PBS 200 μ L + LPS (25 μ g/gram body weight) + マウスキメラ CTLA4-Ig (2.5 μ g/gram body weight)を投与した (左から右へ)。投与 5 日後、頭蓋骨骨吸収面積を評価した。Bars = 1 mm。

(B) 頭蓋骨骨吸収面積の定量評価 (mm², *P<0.05; Wilcoxon rank sum test, n = 3)。2 値化画像を作成し、(A)最左列のコントロール群との差分で、骨吸収面積を算出した。

考察

本研究では、CTLA4-Ig が、骨髄マクロファージの細胞内 Ca oscillations に干渉し、RANKL 誘導性の破骨細胞形成を直接抑制する機序を明らかにした。

CTLA4-Ig による破骨細胞形成抑制効果は、*in vitro* および *in vivo* で確認した。また、CTLA4-Ig のうち、作用のあるドメインは CTLA4 であることを示した。CTLA4-Ig による細胞内 Ca oscillations に対する干渉は、速効性があり、かつ持続性があることも示した。

薬剤の急性投与が Ca oscillations に与える影響を調べるため、研究 1 とは異なり、時間軸の情報を残した新たな解析が必要だったため、ウェーブレット解析を行った。ウェーブレット解析は、経済学、気象、生態学や神経細胞の興奮解析などの時系列解析で応用事例がある^{46 47 48}。ウェーブレット解析により、破骨細胞前駆細胞の細胞内 Ca oscillations が、CTLA4-Ig 投与に呼応して、急速に周波数パターンが変化することが分かった。特に Ca oscillations の中でも、高周波域の減弱が顕著であったため、前研究の結果を踏まえると、CTLA4-Ig の Ca oscillations による干渉効果において、FcR γ が重要な役割を果たすことが示された。これまでに破骨細胞形成が FcR γ を介した co-stimulatory signal の強度により調節されていることが報告されており¹¹、FcR γ には Ca oscillations を調整する何らかの追加制御機構があると予測された。

本研究では、FcR γ KO 由来の骨髄マクロファージには、CTLA4-Ig による Ca oscillations 干渉効果や破骨細胞形成抑制効果が見られなかった。CTLA4 の受

容体である CD80/86 は、細胞内機能的ドメインを持たない。よって CD80/86 は、細胞膜上ないしは細胞外で FcR γ と相互作用を引き起こし、破骨細胞分化を制御していると考えられる。CD80 (B7-1)、CD86 (B7-2)は、B7 イムノグロブリンスーパーファミリーに属する分子であり、IgV および IgC ドメインからなる⁴⁹。CD80/86 のイムノグロブリンドメインが、イムノグロブリン受容体である FcR γ 受容体と何からの競合作用があり、CTLA4 が競合作用に干渉する可能性があるが、本研究ではこれらの分子の相互作用は直接証明できていない。CTLA4 と FcR γ の関連については、さらなる研究が必要である。

本研究の結果、CTLA4-Ig は、骨髄マクロファージに対して、FcR γ を介して細胞内 Ca oscillations に干渉し、*NFATc1* 発現を減らし、破骨細胞形成を直接抑制することが分かった (**Fig. 19**)⁵⁰。

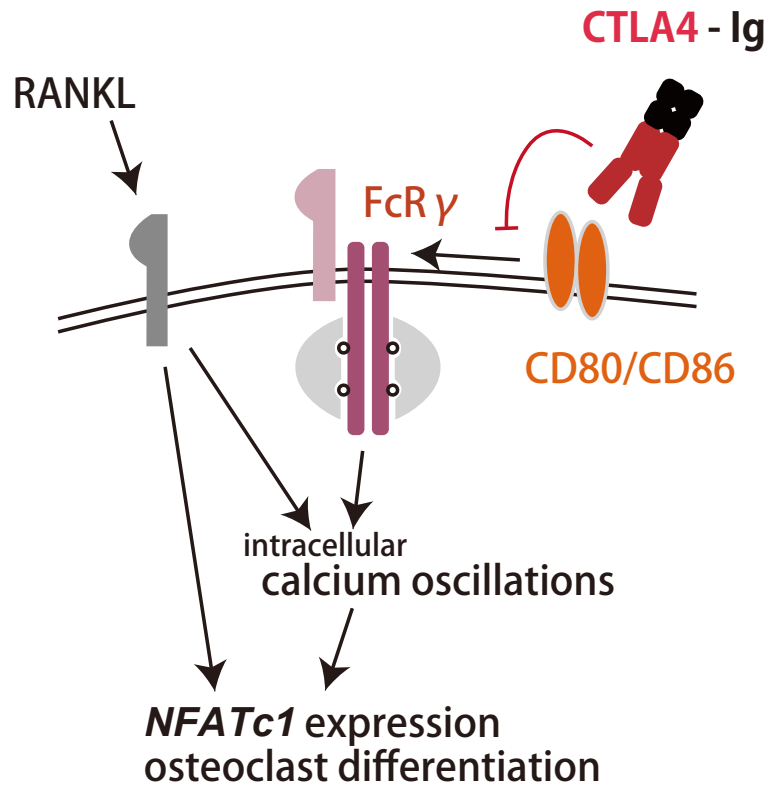


Fig. 19 CTLA4-Ig による破骨細胞形成直接抑制の機序シエマ

CTLA4-Ig は、FcR γ 依存性に、骨髄マクロファージの細胞内カルシウム振動に干渉し、*NFATc1* 発現を抑制し、破骨細胞分化を抑制する。

3. FBGC 分化条件の検討、FBGC 分化における Ca oscillations の検討

結果

In vitro FBGC 分化に ITAM が与える影響 - 新分化誘導法を含めて

まずは、GM-CSF + IL-4 による *in vitro* FBGC 分化培養系を用いて、FBGC の分化誘導を確認した (**Fig. 20A**)。 **Fig. 20B** は光学顕微鏡強拡大像を示す。従来の FBGC 分化誘導法では、形態学的に 2 種に分かれる巨細胞が混在することが分かった。小細胞が凝集したように見える巨細胞を M1 FBGC、核が中心に集まり細胞質が抜けてみえ辺縁に波状縁が見られる多核巨細胞を M2 FBGC と命名した。

M1 FBGC と M2 FBGC を明瞭に分ける分化誘導法を検討した。骨髓細胞を前培養し骨髓マクロファージを得る前処置の過程で、M-CSF に加えて GM-CSF ないしは IL-4 を添加しておき、前駆細胞からは従来の条件で FBGC を誘導すると、前述の M1 FBGC および M2 FBGC が共存しないことが分かった。この新たな分化誘導条件では、M2 FBGC の分化の有無の判定が容易になった。

次に、2 種類の ITAM 受容体が FBGC 分化に与える影響を調べた。従来の M-CSF 添加のみで骨髓マクロファージを得る方法に加え、GM-CSF ないし IL-4 で前処置を追加した方法で誘導した (**Fig. 20C**)。96 well プレートで得られた 2 種の FBGC 細胞数の計測データを示す (**Fig. 20D**)。従来の培養条件より、前処置を追加した群で差が明瞭であった。pre-GM-CSF treatment 条件で

得られやすい M1 FBGC は、種々の ITAM KO マウスでは減少した。また pre-IL-4 treatment 条件で増加する M2 FBGC は、野生型および DAP12 KO マウスで見られ、FcR γ KO マウス、ITAMs DKO マウスではほぼ見られなかった。

In vivo 異物反応に ITAM が与える影響

続いて、マウス腹腔内異物（スポンジ）投与モデルを用いて、ITAM が異物反応に与える影響を調べた。HE 染色像にてスポンジ周囲には、スポンジを取り囲むように細胞の層状構造ができる (**Fig. 21A**)。この層状構造内に多核細胞が存在することから、層状構造の形成を異物反応および FBGC の指標とした。**Fig. 21B** には、各種 ITAM KO マウスから得られたスポンジ異物組織像を示す。ITAMs DKO マウスでは、スポンジへの細胞侵入が少なく、異物を囲む層状構造はほぼ見られなかった。また DAP12 KO マウス由来の組織では、スポンジを囲む厚い層状構造が見られた。FcR γ KO マウスでは層状構造形成は、やや少ないものの存在した。

FBGC 分化における Ca oscillations

これまでの検討で、FBGC の分化誘導には ITAM（特に FcR γ ）が関わっていた。これまでの研究で、破骨細胞分化における 2 種の ITAM が Ca oscillations の周波数に与える影響が分かっており、同一起源である FBGC 誘導条件においても Ca oscillations の関与が示唆された。

野生型マウス由来の骨髄マクロファージに対し、サイトカイン投与前 (day 0) および GM-CSF, IL-4, GM-CSF + IL-4 投与 2 日後 (day 2) の Ca oscillations を検討した。Ca 濃度の検出方法は **Fig. 22A** に、解析方法は **Fig. 22B** にまとめた。**Fig. 22C** は各細胞で得られた蛍光強度比をもとに、1 時点差分を計算し、periodogram、累積 periodogram と算出した結果を示す。IL-4 の単回投与により、元波形の振幅は減少し、累積 periodogram は下に凸になることが分かった。同様の傾向が GM-CSF + IL-4 の条件でも見られた。**Fig. 22D** は周波数フィルタ後の復元波である。Low frequency、High frequency とも IL-4 群および GM-CSF + IL-4 群で振幅が減弱していた。

Fig. 22E,F は、各周波数帯の波の振幅を各種サイトカイン条件下で比較したものである。いずれの周波数帯においても IL-4 は振幅を減少させることが分かった。高周波帯では GM-CSF 単独では振幅を増加させるが、IL-4 は GM-CSF による賦活効果を帳消しにし、振幅を減少させた。

これらの結果から、IL-4 に暴露することで、Ca oscillations の周波数変動効果は持続し、また oscillations の振幅は減少することが明らかになった。

次に骨髄マクロファージに対して、IL-4 を急速投与した際に、Ca oscillations の周波数が変化するかを調べた (**Fig. 23A**)。ウェーブレット解析の結果を **Fig. 23B** に示す。各種投与実験で行った結果、IL-4 投与期間中に、Ca oscillations の周波数が高周波を中心に減弱する細胞が見られた。IL-4 naive な細胞の中には、Ca oscillations が急激に変動する細胞があると分かった。

ITAM KO マウス由来 FBGC 分化初期の Ca oscillations

各種 ITAM KO マウス由来の骨髄マクロファージを用い、GM-CSF 50 ng/mL + IL-4 50 ng/mL を 3 日間投与した際の Ca oscillations を測定し、野生型と比較した。代表的な 1 施行の時系列データおよび周波数フィルタリング後のデータを示す (**Fig. 24A**)。定性的な評価では、FcR γ KO マウスおよび ITAMs DKO マウスでは、Low frequency の振幅減弱が見られた。より詳細な検討として、Ca oscillations を周波数帯に分けフィルタリングを行なった上で、各周波数帯成分の振幅を比較した (**Fig. 24B, C**)。低周波帯では、FcR γ KO マウスおよび ITAMs DKO マウスで振幅が減少した。高周波帯では、ITAMs DKO マウスで振幅が増加した。

これらの結果から、FBGC 誘導条件では、FcR γ が低周波域の Ca oscillations を維持することで分化に影響を与える可能性が示された。

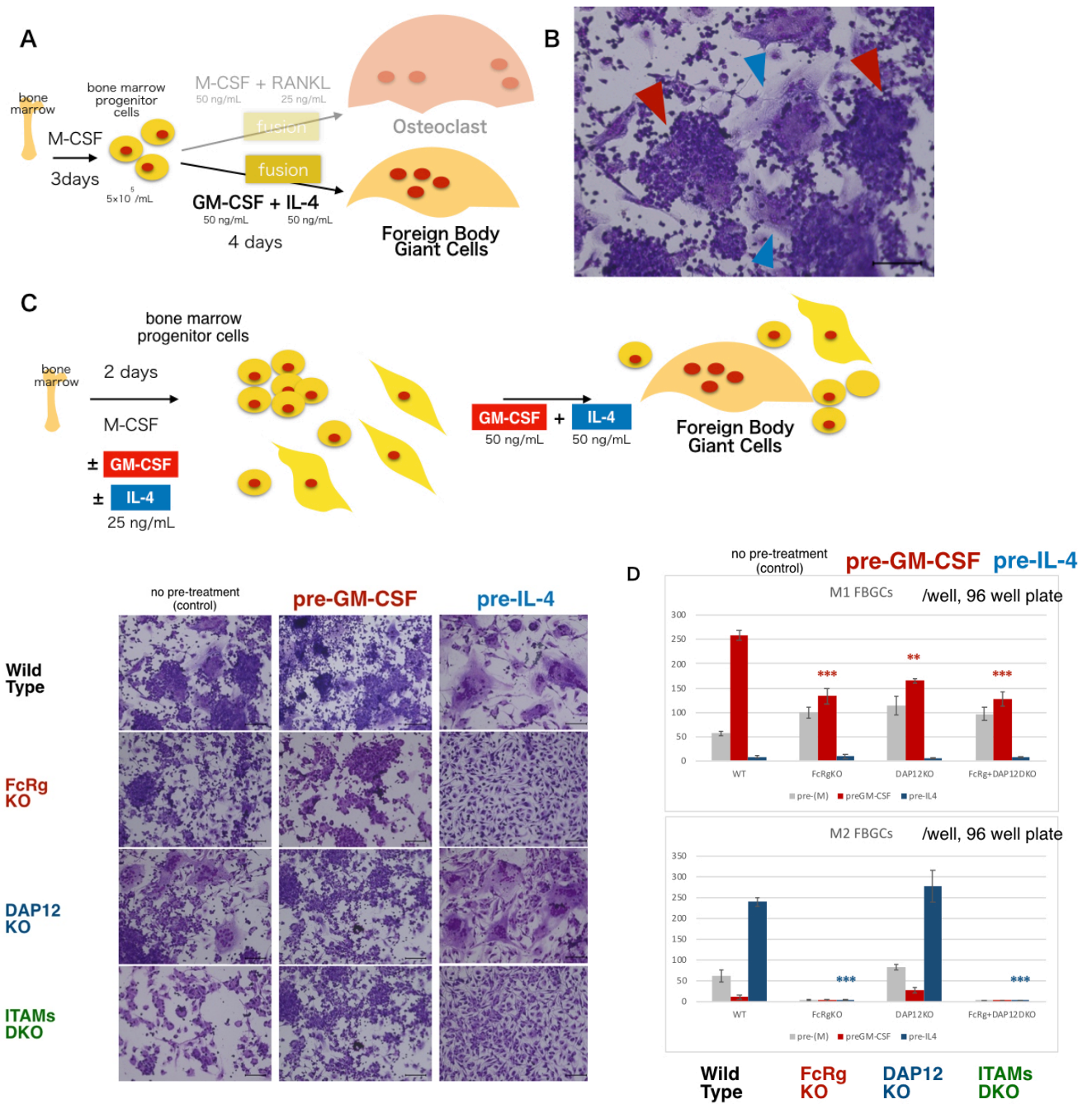


Fig. 20 *In vitro* FBGC 分化誘導と ITAM

(A) *In vitro* FBGC 誘導において ITAM が与える影響。野生型マウスをコントロールとし、FcR γ KO マウス、DAP12 KO マウス、ITAMs DKO マウスを用いた。96well プレートにて、骨髄マクロファージに対して、GM-CSF (50 ng/mL) + IL-4 (25 ng/mL) 投与 4 日間で FBGC を誘導した。

(B) 野生型マウスを用いて得られた FBGC、May-Grünwald Giemsa (MGG) 染色、光学顕微鏡強拡大像。Bar = 100 μ m。M1 FBGC (Foreign Body Giant Cells) (▶で示す) は、小細胞が凝集しているように見える巨細胞と定義した。M2 FBGC (▶で示す) は、核が中心に集まり、細胞質が透明で抜けてみえ、辺縁に波状縁が見られることの多い多核巨細胞と定義した。

(C) 新たな FBGC 分化誘導法。骨髄細胞を培養する際 M-CSF に GM-CSF ないし IL-4 で pre-treatment を追加し、従来の増幅法とは異なる骨髄マクロファージを得た。骨髄マクロファージからの FBGC 誘導は(A)と同じである。

(D) 2 種の FBGC 細胞数の計測データ。野生型マウスをコントロールとして、FcR γ KO マウス、DAP12 KO マウス、ITAMs DKO マウス骨髄細胞由来のものを比較した。(Student's t-test; ** $p < 0.01$, *** < 0.001)

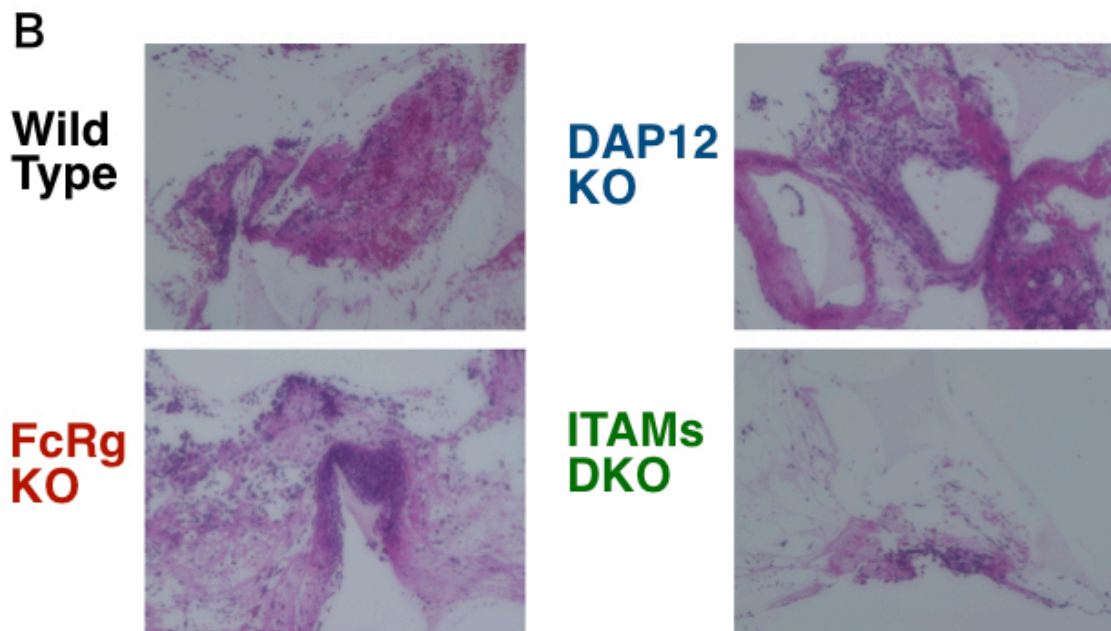
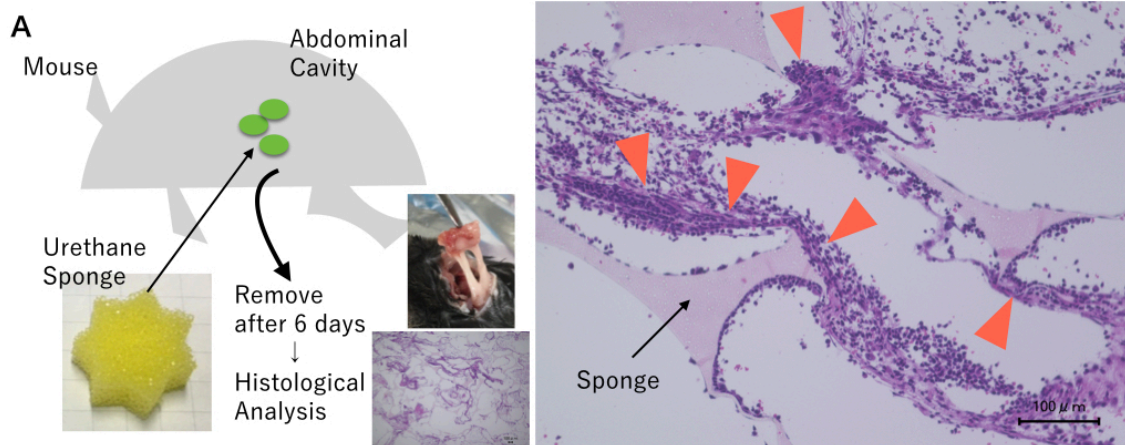


Fig. 21 *In vivo* 異物反応と ITAM

(A) マウス腹腔内異物投与モデル。マウス腹腔内に 1cm 角のスポンジ 3 個を留置し、6 日後に取り出した。ホルマリン固定後、パラフィン切片作成、HE 染色像。野生型マウスを用いた組織像を示す。スポンジ周囲を取り囲むように細胞の層状構造が形成される (▶ で示す)。

(B) 野生型マウスをコントロールとして、FcR γ KO マウス、DAPI2 KO マウス、ITAMs DKO マウスを用いたスポンジ組織 HE 染色像の代表例。少なくとも 3 回の施行を繰り返した代表的所見を供覧する。

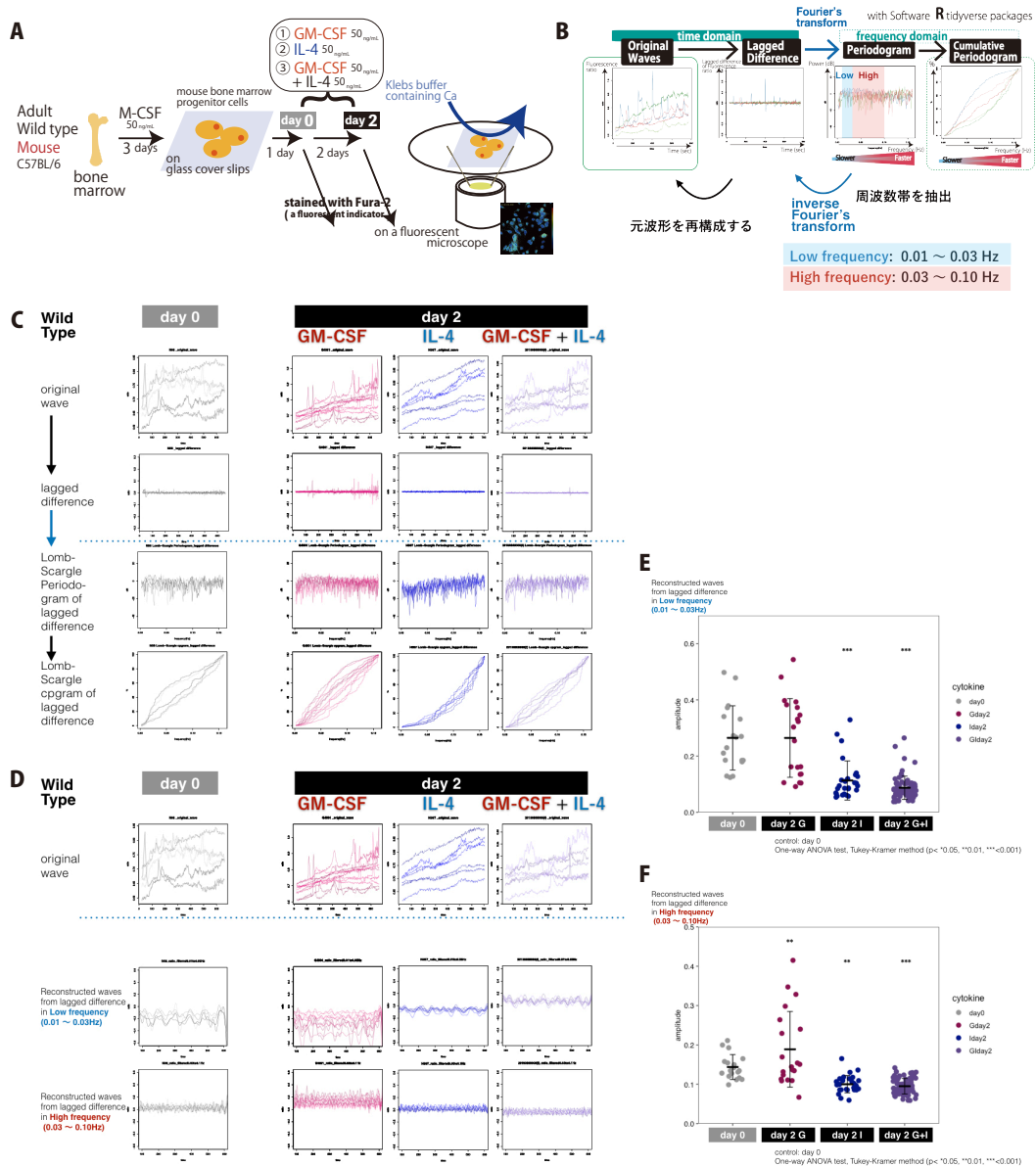


Fig. 22 FBGC 分化初期の Ca oscillations

(A) Ca oscillations 測定の概要。骨髓マクロファージを1晩サイトカインフリーでカバーガラスに接着させた後、各種サイトカイン (GM-CSF、IL-4、GM-CSF + IL-4) を2日間投与した時点の Ca oscillations の自発波を計測した。計測された時系列データをもとに、周波数解析を行った。

(B) Ca oscillations 解析の概要。蛍光強度比の元データから、蛍光強度比の1時点差分を求め、フーリエ変換を行い、周波数領域に展開した。periodogram では、周波数 (0 ~ 0.16 Hz) ごとのパワー (dB) を表す。さらに周波数ごとの分布を明瞭にするために、累積 periodogram にて、低周波から高周波に至る累積度数を示した。さらに、0.01~0.03 Hz を Low frequency、0.03~0.10 Hz を High frequency と定義し、各周波数帯成分を抽出した上で、逆フーリエ変換を行い、各周波数帯の元波形を再構成した。

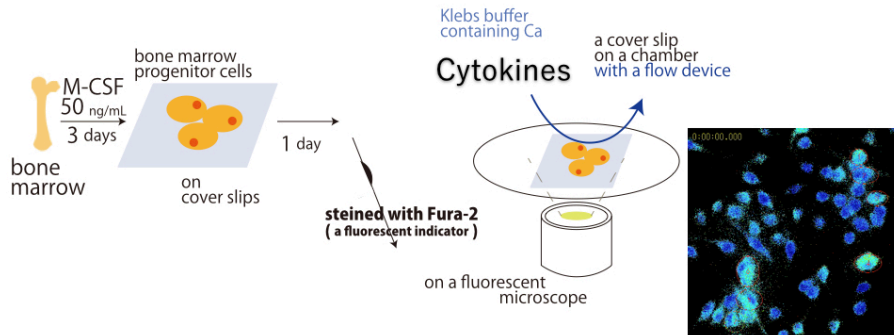
(C) 野生型マウス由来の骨髓マクロファージに対して、day 0、および day 2 各種サイトカイン刺激 (GM-CSF, IL-4, GM-CSF + IL-4) した細胞における Ca oscillations。最上行が蛍光強度比のデータ。細胞ごとに異なる色を用いた。第2行は、対応する1時点差分。第3行はフーリエ変換にて得られた周波数データより算出した periodogram。第4行は累積 periodogram。

(D) 周波数フィルタ後に、逆フーリエ変換にて復元した各周波数帯の元波形。最上行は、元の蛍光強度比のデータ。第2行は、Low frequency (0.01~0.03 Hz)成分の復元波。第3行は High frequency (0.03~0.10 Hz)成分の復元波。

(E) Low frequency に含まれる波の振幅を各種サイトカイン条件下で比較した (One-way ANOVA test; $p^{***}<0.001$)。各群中央の実線は平均値 \pm S.D.、各点は細胞ごとの振幅の値を表す。

(F) High frequency に含まれる波の振幅を各種サイトカイン条件下で比較した (One-way ANOVA test; $p^{**}<0.01$, $^{***}<0.001$)。各群中央の実線は平均値 \pm S.D.、各点は細胞ごとの振幅の値を表す。

A Acute administration of GM-CSF or IL-4 for Osteoclast precursor cells



Protocol of cytokine administration

GM-CSF → GM-CSF + IL-4 → wash
 IL-4 → GM-CSF + IL-4 → wash

B GM-CSF → GM-CSF + IL-4 IL-4 → GM-CSF + IL-4

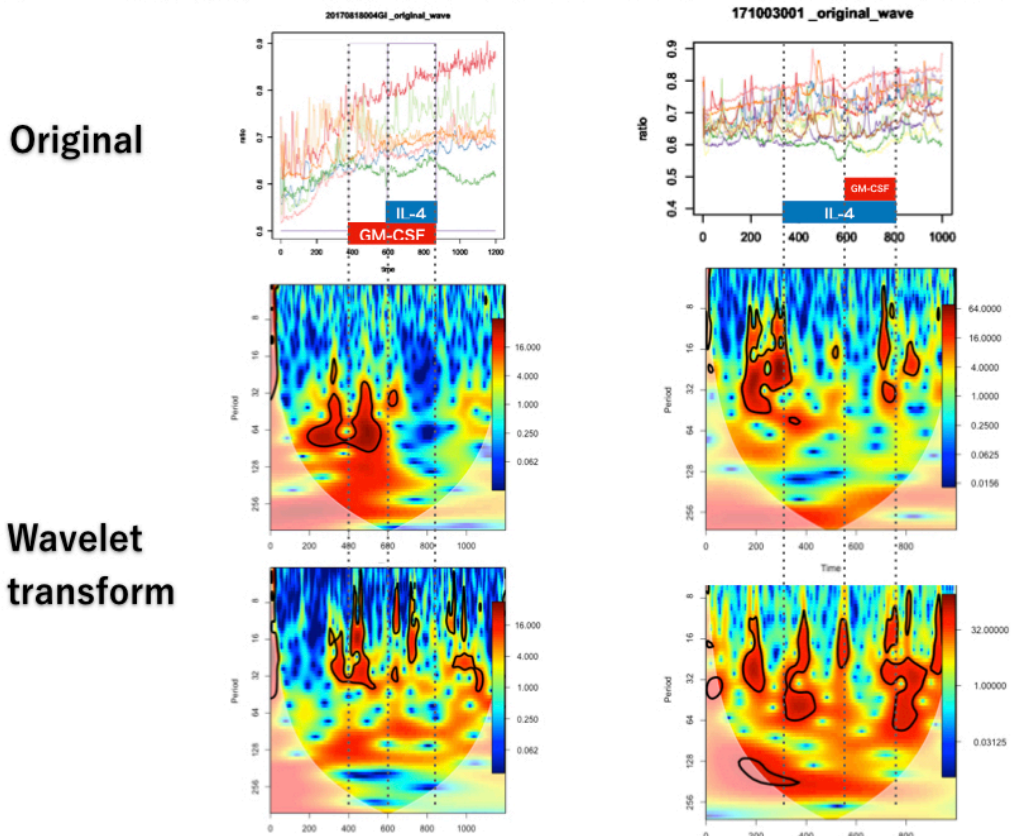


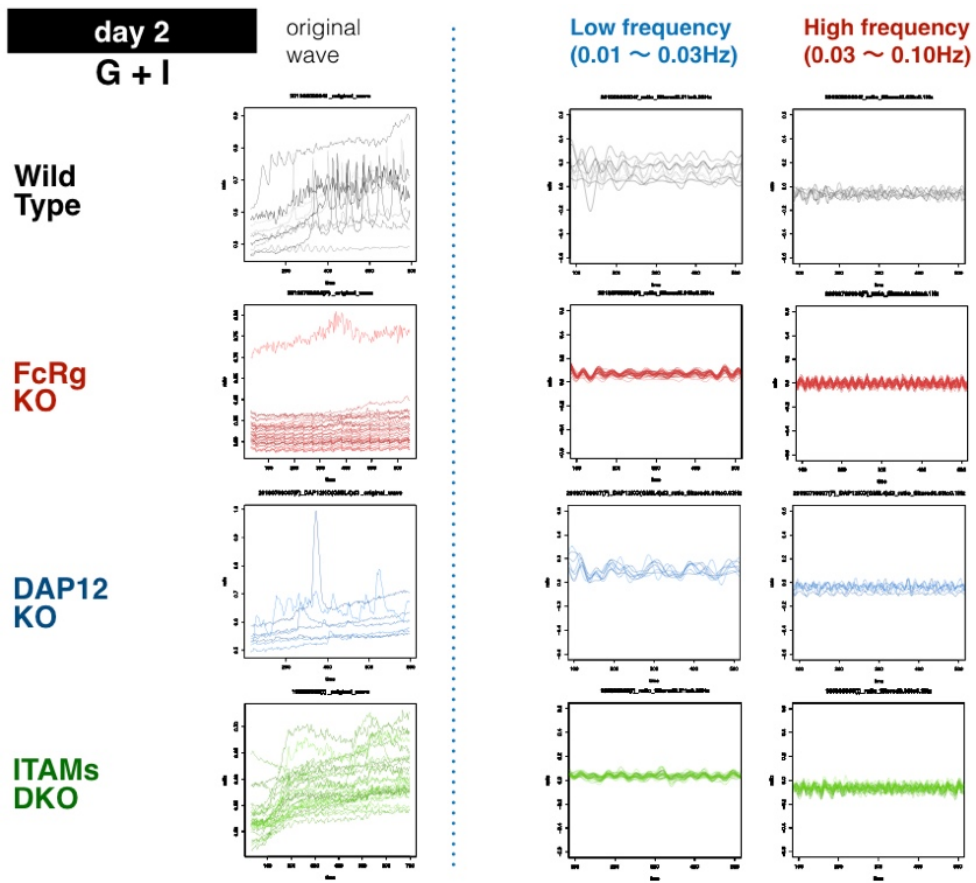
Fig. 23 GM-CSF, IL-4 急性投与による Ca oscillations 変動

Ca oscillations 解析 1 日前に、骨髄マクロファージをカバーガラス上に播種し、M-CSF を培養液から抜いた。解析前にカルシウム検出試薬 Fura-2 にて前処置した。蛍光顕微鏡で、細胞ごとに蛍光強度を 2 波長同時に測定した。

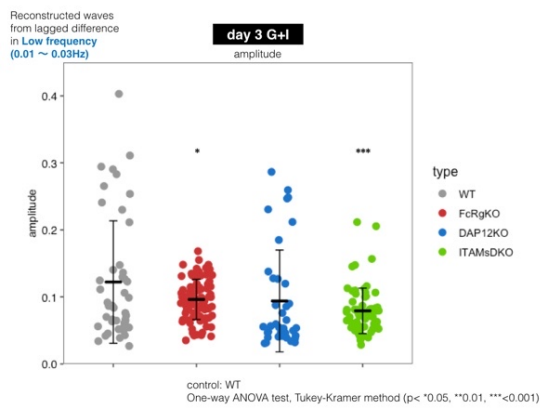
(A) 蛍光強度比の時系列データ。以下の 3 つの薬剤投与プロトコールで得られた。GM-CSF 50 ng/mL に加えて、IL-4 50 ng/mL (左)、IL-4 50 ng/mL に加えて、GM-CSF 50 ng/mL (右)。細胞ごとに異なる色を用いて表示している。

(B) 代表的な 2 細胞の蛍光強度比、周波数ウェーブレット解析結果。横軸は時間を表す。縦軸は Ca oscillations の周波数を表す。蛍光強度比の時系列変化は、各周波数の波が複合してできると考え、周波数ごとの重なり密度をカラースケールで表した。図中の黒い囲み線は、その周波数帯の重なり密度が大きく一定以上に飽和していることを示している。下に凸の線より下方の白色に霞んだ領域は、時系列データの開始点および終了点を越えたデータを補って計算した領域であることを示す。時系列のうち中央の周波数は、開始点から終了点まで全てのデータを用いて計算されるので、この補正は適応されない。

A



B



C

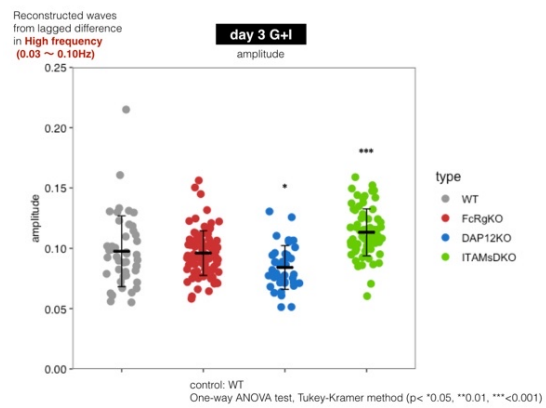


Fig. 24 FBGC 分化初期の Ca oscillations と ITAM

GM-CSF 50 ng/mL + IL-4 50 ng/mL 投与 2 日後に蛍光強度を測定した。野生型をコントロールとし、FcR γ KO、DAP12 KO、ITAMs DKO マウス由来の骨髄マクロファージの場合を比較した。

(A) 最左列は、蛍光強度比の元データである。細胞ごとに異なる色を用いた。2 列目以降は、Low frequency (0.01~0.03 Hz) および High frequency (0.03~0.10 Hz) フィルタリング後復元した、各周波数帯の蛍光強度比時系列。

(B) Low frequency に含まれる波の振幅を各種ノックアウトマウスで比較した (One-way ANOVA test; $p < 0.05$, $*** < 0.001$)。各群中央の実線は平均値 \pm S.D.、各点は細胞ごとの振幅の値を表す。

(C) High frequency に含まれる波の振幅を各種ノックアウトマウスで比較した (One-way ANOVA test; $p < 0.05$, $*** < 0.001$)。各群中央の実線は平均値 \pm S.D.、各点は細胞ごとの振幅の値を表す。

考察

本研究の結果から、FBGC 分化においても、ITAM 受容体を介した co-stimulatory signal が重要であることが明らかになった。また 2 種の ITAM の中でも、*in vitro* の分化誘導では FcR γ が重要な役割を果たすことが示された。このように単球マクロファージ系細胞を起源とする 2 種の巨細胞は、co-stimulatory signal を巧みに使い分けていることが明らかになった。

これまでに同一起源のマクロファージには細胞障害性を持つ M1 と、組織修復性を持つ M2 があるように、FBGC にも M1/M2 のように異なる細胞集団が想定されること⁵¹、また環境に合わせて FBGC が形質転換する可能性が報告されている⁵²。しかし、2 種の FBGC subset に関するエビデンスは乏しく、そもそも FBGC 分化メカニズムの詳細が不明であった²⁹。

本研究の結果、FBGC にも形態的に異なる subpopulation があり、安定して分離培養が可能となった。今後、機能解析を進め、これまで確立されていなかった表面マーカー確立を目指し、異物反応における FBGC の真の役割を明らかにする予定である。

また本研究では FBGC 分化においても、Ca oscillations の変動が起きていることが明らかになった。特に FBGC 分化に必須のサイトカインである IL-4 の単回投与により、Ca oscillations の振幅は減弱した。IL-4 による周波数変動は、時系列に沿った周波数解析であるウェーブレット解析でも一部の骨髄マクロファージで急速に見られた。さらに、周波数フィルタを行った結果、FcR γ による低周波 oscillations の維持が分化誘導に重要な可能性が示唆された。

FBGC 分化時、共刺激受容体の Ca oscillations 調節の役割シエマを **Fig. 25** に示す。FcR γ は IL-4 による高周波シフト（下に凸変化）にブレーキをかけ、低周波数帯の減弱を抑制する効果があると考えられた。

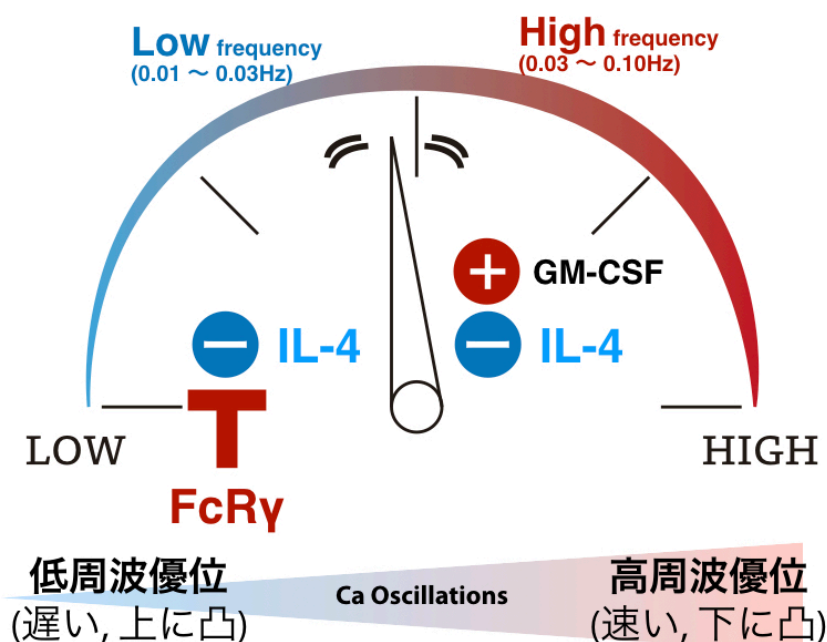


Fig. 25 異物巨細胞分化時、共刺激受容体の Ca oscillations 調節の役割シエマ

申請者の予備検討では、Ca 関連チャンネルの阻害でもマクロファージ分化への影響が確認されており、今後分化の各段階におけるカルシウム関連チャンネルによる Ca oscillations への寄与度を検証する必要がある。

FBGC は破骨細胞と共通した分子メカニズムを持つ一方、ITAM の Ca oscillations や分化に対する寄与が明瞭に異なることが示された。今後、FBGC の理解を進めることで、生体親和性の高いインプラント開発の一助としたい。

結語

骨髓細胞由来の巨細胞分化過程において、2種の ITAM 下流で Ca oscillations の周波数が巧みに制御されていた。

本研究を通して、非興奮性細胞における Ca oscillations 解析法を考案した。

倫理面への配慮

本研究では、東京大学、慶應義塾大学、福岡歯科大学にて、動物実験委員会の承認を得た計画にもとづき、マウスを用いた（「マウスモデルを用いた運動器疾患の分子メカニズムの解析」（東京大学承認番号：医-P17-091））。また、動物愛護の観点に最大限配慮し、マウスを安楽死させた後、両下肢骨から骨髓液を採取し、破骨細胞誘導実験を行った。破骨細胞分化におけるカルシウム振動測定実験も、骨髓液由来の培養細胞を用いて行った。破骨細胞の分化メカニズム、および、カルシウム振動の詳細に迫るために必要な手法と考えた。

動物実験および遺伝子組換えマウスを用いた研究について、遺伝子組換え実験等安全委員会および動物実験委員会で本研究実施の妥当性について承認を受けた上で、研究を行った。「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」に準じ実験設備（P2レベル）を備えた両大学および委託施設内で取り扱い、安全主任者の監督・指導のもと適切に行った。

謝辞

本研究は、東京大学整形外科にて、田中栄教授をはじめ諸先生方にご指導頂き、行うことができた。また、慶應義塾大学整形外科、宮本健史先生らの協力・指導の元、遺伝子組換えマウスを用いた研究を行うことができた。カルシウムオシレーション測定に関しては、福岡歯科大学細胞分子生物学講座細胞生理学分野の岡部幸司教授、鍛冶屋浩先生を中心とした協力のもと実施することができた。

本研究の遂行にあたり、ご支援頂いた先生方に、心より御礼申し上げます。

共同研究者一覧

鍛冶屋浩^{*2}、小俣康德^{*1}、松本卓巳^{*1}、佐藤結子^{*3}、
小林多美^{*3}、中村賢^{*3}、金子陽介^{*3}、中村伸哉^{*1}、
小山卓摩^{*1}、首藤俊一^{*2}、進正史^{*2}、岡本富士雄^{*2}、
渡邊寿人^{*1}、立花直寛^{*1}、廣瀬旬^{*1}、齋藤琢^{*1}、
高井俊行^{*4}、松本守雄^{*3}、中村雅也^{*3}、岡部幸司^{*2}、
宮本健史^{*3,5}、田中栄^{*1}

*1 東京大学 整形外科

*2 福岡歯科大学 細胞分子生物学講座細胞生理学分野

*3 慶應義塾大学 整形外科

*4 東北大学 加齢医学研究所 遺伝子導入研究分野

*5 熊本大学大学院生命科学研究部 整形外科

引用文献

1. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, Mochizuki S, et al. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Mar 31;95(7):3597-602. Epub 1998/05/09.
2. Takayanagi H, Kim S, Koga T, Nishina H, Isshiki M, Yoshida H, et al. Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts. *Dev Cell*. 2002 Dec;3(6):889-901. Epub 2002/12/14.
3. Darnay BG, Haridas V, Ni J, Moore PA, Aggarwal BB. Characterization of the intracellular domain of receptor activator of NF-kappaB (RANK). Interaction with tumor necrosis factor receptor-associated factors and activation of NF-kappaB and c-Jun N-terminal kinase. *The Journal of biological chemistry*. 1998 Aug 7;273(32):20551-5. Epub 1998/08/01.
4. Kobayashi N, Kadono Y, Naito A, Matsumoto K, Yamamoto T, Tanaka S, et al. Segregation of TRAF6-mediated signaling pathways clarifies its role in osteoclastogenesis. *The EMBO journal*. 2001 Mar 15;20(6):1271-80. Epub 2001/03/17.
5. Zou W, Kitaura H, Reeve J, Long F, Tybulewicz VL, Shattil SJ, et al. Syk, c-Src, the alphavbeta3 integrin, and ITAM immunoreceptors, in concert, regulate osteoclastic bone resorption. *The Journal of cell biology*. 2007 Mar 12;176(6):877-88. Epub 2007/03/14.
6. Mocsai A, Humphrey MB, Van Ziffle JA, Hu Y, Burghardt A, Spusta SC, et al. The immunomodulatory adapter proteins DAP12 and Fc receptor gamma-chain (FcRgamma) regulate development of functional osteoclasts through the Syk tyrosine kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Apr 20;101(16):6158-63. Epub 2004/04/10.
7. Nakashima T, Takayanagi H. New regulation mechanisms of osteoclast differentiation. *Ann N Y Acad Sci*. 2011 Dec;1240:E13-8.
8. Koga T, Inui M, Inoue K, Kim S, Suematsu A, Kobayashi E, et al. Costimulatory signals mediated by the ITAM motif cooperate with RANKL for bone homeostasis. *Nature*. 2004 Apr 15;428(6984):758-63. Epub 2004/04/16.
9. Seeling M, Hillen hoff U, David JP, Schett G, Tuckermann J, Lux A, et al. Inflammatory monocytes and Fc gamma receptor IV on osteoclasts are critical for bone destruction during inflammatory arthritis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Jun 25;110(26):10729-34. Epub 2013/06/12.
10. Grevers LC, de Vries TJ, Everts V, Verbeek JS, van den Berg WB, van Lent PL. Immune complex-induced inhibition of osteoclastogenesis is mediated via activating but not inhibitory Fc gamma receptors on myeloid precursor cells. *Ann Rheum Dis*. 2013 Feb;72(2):278-85. Epub 2012/08/25.
11. Negishi-Koga T, Gober HJ, Sumiya E, Komatsu N, Okamoto K, Sawa S, et al. Immune complexes regulate bone metabolism through FcRgamma signalling. *Nat Commun*. 2015 Mar 31;6:6637. Epub 2015/04/01.
12. Komarova SV, Pilkington MF, Weidema AF, Dixon SJ, Sims SM. RANK ligand-induced elevation of cytosolic Ca²⁺ accelerates nuclear translocation of nuclear factor kappa B in osteoclasts. *The Journal of biological chemistry*. 2003 Mar 7;278(10):8286-93. Epub 2002/12/24.

13. Kajiya H, Okamoto F, Nemoto T, Kimachi K, Toh-Goto K, Nakayana S, et al. RANKL-induced TRPV2 expression regulates osteoclastogenesis via calcium oscillations. *Cell Calcium*. 2010 Nov;48(5):260-9. Epub 2010/10/29.
14. Masuyama R, Mizuno A, Komori H, Kajiya H, Uekawa A, Kitaura H, et al. Calcium/calmodulin-signaling supports TRPV4 activation in osteoclasts and regulates bone mass. *J Bone Miner Res*. 2012 Aug;27(8):1708-21. Epub 2012/04/12.
15. Smolen JS, Aletaha D, Bijlsma JW, Breedveld FC, Boumpas D, Burmester G, et al. Treating rheumatoid arthritis to target: recommendations of an international task force. *Ann Rheum Dis*. 2010 Apr;69(4):631-7. Epub 2010/03/11.
16. McInnes IB, Schett G. Pathogenetic insights from the treatment of rheumatoid arthritis. *Lancet*. 2017 Jun 10;389(10086):2328-37. Epub 2017/06/15.
17. Sato K, Suematsu A, Okamoto K, Yamaguchi A, Morishita Y, Kadono Y, et al. Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction. *J Exp Med*. 2006 Nov 27;203(12):2673-82. Epub 2006/11/08.
18. Hecht C, Schett G, Finzel S. The impact of rheumatoid factor and ACPA on bone erosion in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2015 Jan;74(1):e4. Epub 2014/10/19.
19. Takeuchi T, Tanaka Y, Ishiguro N, Yamanaka H, Yoneda T, Ohira T, et al. Effect of denosumab on Japanese patients with rheumatoid arthritis: a dose-response study of AMG 162 (Denosumab) in patients with Rheumatoid arthritis on methotrexate to Validate inhibitory effect on bone Erosion (DRIVE)-a 12-month, multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase II clinical trial. *Ann Rheum Dis*. 2016 Jun;75(6):983-90. Epub 2015/11/21.
20. Bozec A, Zaiss MM, Kagwiria R, Voll R, Rauh M, Chen Z, et al. T cell costimulation molecules CD80/86 inhibit osteoclast differentiation by inducing the IDO/tryptophan pathway. *Sci Transl Med*. 2014 May 7;6(235):235ra60. Epub 2014/05/09.
21. Tada M, Inui K, Sugioka Y, Mamoto K, Okano T, Koike T. Abatacept might increase bone mineral density at femoral neck for patients with rheumatoid arthritis in clinical practice: AIRTIGHT study. *Rheumatol Int*. 2018 May;38(5):777-84. Epub 2018/01/03.
22. Gibon E, Goodman SB. The Biologic Response to Bearing Materials. *Orthop Knowl Online*. 2016 Jun;14(6). Epub 2016/06/01.
23. Akira S. Innate immunity and adjuvants. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2011 Oct 12;366(1579):2748-55. Epub 2011/09/07.
24. Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*. 2010 Mar 19;140(6):805-20. Epub 2010/03/23.
25. Sabin FR, Smithburn KC, Thomas RM. Cellular Reactions to Waxes from *Mycobacterium Leprae*. *J Exp Med*. 1935 Nov 30;62(6):771-86. Epub 1935/11/30.
26. Ten Harkel B, Koopsen J, van Putten SM, van Veen H, Picavet DI, de Vries TJ, et al. Ultrastructural aspects of foreign body giant cells generated on different substrates. *J Struct Biol*. 2016 Jul;195(1):31-40. Epub 2016/05/08.
27. Dondossola E, Holzapfel BM, Alexander S, Filippini S, Huttmacher DW, Friedl P. Examination of the foreign body response to biomaterials by nonlinear intravital microscopy. *Nat Biomed Eng*. 2016;1. Epub 2016/01/01.
28. Klopffleisch R, Jung F. The pathology of the foreign body reaction against biomaterials. *J Biomed Mater Res A*. 2017 Mar;105(3):927-40. Epub 2016/11/05.

29. ten Harkel B, Schoenmaker T, Picavet DI, Davison NL, de Vries TJ, Everts V. The Foreign Body Giant Cell Cannot Resorb Bone, But Dissolves Hydroxyapatite Like Osteoclasts. *PLoS One*. 2015;10(10):e0139564. Epub 2015/10/02.
30. Stein M, Keshav S, Harris N, Gordon S. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *J Exp Med*. 1992 Jul 1;176(1):287-92. Epub 1992/07/01.
31. Shioi A, Teitelbaum SL, Ross FP, Welgus HG, Suzuki H, Ohara J, et al. Interleukin 4 inhibits murine osteoclast formation in vitro. *J Cell Biochem*. 1991 Nov;47(3):272-7. Epub 1991/11/01.
32. Wei S, Wang MW, Teitelbaum SL, Ross FP. Interleukin-4 reversibly inhibits osteoclastogenesis via inhibition of NF-kappa B and mitogen-activated protein kinase signaling. *The Journal of biological chemistry*. 2002 Feb 22;277(8):6622-30. Epub 2001/11/24.
33. Mochizuki A, Takami M, Kawawa T, Suzumoto R, Sasaki T, Shiba A, et al. Identification and characterization of the precursors committed to osteoclasts induced by TNF-related activation-induced cytokine/receptor activator of NF-kappa B ligand. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2006 Oct 1;177(7):4360-8. Epub 2006/09/20.
34. Helming L, Tomasello E, Kyriakides TR, Martinez FO, Takai T, Gordon S, et al. Essential role of DAP12 signaling in macrophage programming into a fusion-competent state. *Sci Signal*. 2008 Oct 28;1(43):ra11. Epub 2008/10/30.
35. Bakalar MH, Joffe AM, Schmid EM, Son S, Podolski M, Fletcher DA. Size-Dependent Segregation Controls Macrophage Phagocytosis of Antibody-Opsonized Targets. *Cell*. 2018 Jun 28;174(1):131-42 e13. Epub 2018/06/30.
36. Takai T, Li M, Sylvestre D, Clynes R, Ravetch JV. FcR gamma chain deletion results in pleiotrophic effector cell defects. *Cell*. 1994 Feb 11;76(3):519-29. Epub 1994/02/11.
37. Tarik C. Gouhier, Aslak Grinsted, Viliam Simko. R package biwavelet: Conduct Univariate and Bivariate Wavelet Analyses (Version 0.20.17).
38. Akiyama T, Miyazaki T, Bouillet P, Nakamura K, Strasser A, Tanaka S. In vitro and in vivo assays for osteoclast apoptosis. *Biol Proced Online*. 2005;7:48-59. Epub 2005/09/02.
39. Oya A, Katsuyama E, Morita M, Sato Y, Kobayashi T, Miyamoto K, et al. Tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 is required to inhibit foreign body giant cell formation and activate osteoclasts under inflammatory and infectious conditions. *J Bone Miner Metab*. 2018 Nov;36(6):679-90. Epub 2017/12/24.
40. Huang KC, Yano F, Murahashi Y, Takano S, Kitaura Y, Chang SH, et al. Sandwich-type PLLA-nanosheets loaded with BMP-2 induce bone regeneration in critical-sized mouse calvarial defects. *Acta Biomater*. 2017 Sep 1;59:12-20. Epub 2017/07/02.
41. Hocke K, Kämpfer N. Gap filling and noise reduction of unevenly sampled data by means of the Lomb-Scargle periodogram. *Atmos Chem Phys*. 2009;9:4197-206.
42. Barrow AD, Raynal N, Andersen TL, Slatter DA, Bihan D, Pugh N, et al. OSCAR is a collagen receptor that costimulates osteoclastogenesis in DAP12-deficient humans and mice. *J Clin Invest*. 2011 Sep;121(9):3505-16. Epub 2011/08/16.

43. Kaifu T, Nakahara J, Inui M, Mishima K, Momiyama T, Kaji M, et al. Osteopetrosis and thalamic hypomyelination with synaptic degeneration in DAP12-deficient mice. *J Clin Invest*. 2003 Feb;111(3):323-32. Epub 2003/02/06.
44. Nabbe KC, Blom AB, Holthuysen AE, Boross P, Roth J, Verbeek S, et al. Coordinate expression of activating Fc gamma receptors I and III and inhibiting Fc gamma receptor type II in the determination of joint inflammation and cartilage destruction during immune complex-mediated arthritis. *Arthritis Rheum*. 2003 Jan;48(1):255-65. Epub 2003/01/16.
45. van Lent PL, Grevers L, Lubberts E, de Vries TJ, Nabbe KC, Verbeek S, et al. Fc gamma receptors directly mediate cartilage, but not bone, destruction in murine antigen-induced arthritis: uncoupling of cartilage damage from bone erosion and joint inflammation. *Arthritis Rheum*. 2006 Dec;54(12):3868-77. Epub 2006/11/30.
46. Ruffinatti FA, Lovisolo D, Distasi C, Ariano P, Erriquez J, Ferraro M. Calcium signals: analysis in time and frequency domains. *J Neurosci Methods*. 2011 Aug 15;199(2):310-20. Epub 2011/06/11.
47. Tigaret CM, Tsaneva-Atanasova K, Collingridge GL, Mellor JR. Wavelet transform-based de-noising for two-photon imaging of synaptic Ca²⁺ transients. *Biophys J*. 2013 Mar 5;104(5):1006-17. Epub 2013/03/12.
48. Ruffinatti FA, Gilardino A, Lovisolo D, Ferraro M. Spatial wavelet analysis of calcium oscillations in developing neurons. *PLoS One*. 2013;8(10):e75986. Epub 2013/10/25.
49. Sharpe AH, Freeman GJ. The B7-CD28 superfamily. *Nature reviews Immunology*. 2002 Feb;2(2):116-26. Epub 2002/03/26.
50. Okada H, Kajiya H, Omata Y, Matsumoto T, Sato Y, Kobayashi T, et al. CTLA4-Ig directly inhibits osteoclastogenesis by interfering with intracellular calcium oscillations in bone marrow macrophages. *J Bone Miner Res*. 2019 May 8. Epub 2019/05/09.
51. Miron RJ, Bosshardt DD. Multinucleated Giant Cells: Good Guys or Bad Guys? *Tissue Eng Part B Rev*. 2018 Feb;24(1):53-65. Epub 2017/08/22.
52. Spiller KL, Nassiri S, Witherel CE, Anfang RR, Ng J, Nakazawa KR, et al. Sequential delivery of immunomodulatory cytokines to facilitate the M1-to-M2 transition of macrophages and enhance vascularization of bone scaffolds. *Biomaterials*. 2015 Jan;37:194-207. Epub 2014/12/03.