

破骨細胞における極性膜現象機構に関する研究

伴 村 一 郎

破骨細胞における極性発現機構に関する研究

仲 村 一 郎

目次

	頁
緒論	1
第1章 破骨細胞の極性化を誘導しうる細胞外基質	5
第1節 実験材料および実験方法	
1.1.1. 実験動物および試薬	5
1.1.2. 細胞培養法	6
1.1.3. マウス初代培養骨芽細胞分離法	6
1.1.4. マウス骨髓細胞分離法	7
1.1.5. マウス破骨細胞の形成・分離法	7
1.1.6. 破骨細胞における極性発現の同定法	7
F-アクチン染色と酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ染色 の2重染色	
第2節 実験結果	
1.2.1. 破骨細胞の極性発現を誘導する細胞外基質	8
1.2.2. 破骨細胞の極性発現を誘導する細胞外基質蛋白質	10
小括	14
第2章 破骨細胞の極性発現における p130Cas の関与	15
第1節 実験材料および実験方法	

2.1.1.	実験動物および試薬	16
2.1.2.	細胞培養法	16
2.1.3.	マウス初代培養骨芽細胞分離法	16
2.1.4.	マウス骨髓細胞分離法	16
2.1.5.	マウス破骨細胞の形成・分離法	16
2.1.6.	マウス破骨細胞の純化法	17
2.1.7.	Src(-/-)マウス由来の破骨細胞の形成・分離法	17
2.1.8.	ウエスタンブロット法	17
2.1.9.	免疫沈降法	17
2.1.10.	細胞染色法	

(a) F-アクチン染色と酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ 染色の2重染色法	19
(b) p130 ^{Cas} に対する細胞免疫染色法	19

第2節 実験結果

2.2.1.	破骨細胞におけるアクチンリング形成過程	19
2.2.2.	破骨細胞のアクチン再構成過程でチロシンリン酸化される 蛋白質	22
2.2.2.	破骨細胞のアクチン再構成過程でチロシンリン酸化される p130の同定	25
2.2.3.	破骨細胞におけるp130 ^{Cas} の細胞内局在	28
2.2.4.	c-Src欠損マウス由来の破骨細胞におけるアクチンの局在及び p130 ^{Cas} のチロシンリン酸化とその細胞内局在	30

小括	33
----	----

総括

35

謝辞

37

掲載論文

38

引用文献

39

緒論

生命が初めて自らの四肢で陸地にその第1歩をしるしたのは、今をさかのぼることおよそ3億6千万年前のことである。このとき骨に課せられた使命は、(1) 重力に抗して自らの体を支えること、(2) 陸上では摂取しにくいミネラル、特にカルシウムを貯蔵すること、(3) 骨の中の骨髓腔なるスペースに造血細胞を宿すことの3つであった(1)。骨組織は一見すると静止した臓器のように思われがちであるが、実際には生涯を通じて常に吸収と形成とが繰り返されている。この動的な骨の改造現象はリモデリングと呼ばれ、正常な骨の形状と機能を維持する上で、また外界の環境の変化に迅速にかつ適切に対応する上で極めて重要な役割を果たしている。私達、整形外科医は長年にわたり、骨を直接見て、触れることによって、骨の生理・病理の解明、骨疾患の治療に携わってきた。しかしながら、今日に至ってもなお骨形成と骨吸収を自らの思うがままに制御することはできていない。すなわち、骨折の癒合不全において、骨形成の遅延もしくは骨吸収の促進がなぜ起こるのかという問題に対する完全な解答を持っていないし、また後縦靭帯骨化症のような病態において、なぜ異所性に骨形成が惹起されるのかという問いにも答えられていない。そこで、昨今の細胞生物学・分子生物学の進歩を念頭に、骨細胞生物学という新しい観点から骨の生理・病態に迫る試みが始まったのである。

細胞生物学という観点から骨のリモデリングを考えると、その主役は骨芽細胞と破骨細胞になる。骨芽細胞は骨形成の中心的役割を担う細胞で、骨膜や骨髓に存在する未分化な間葉系細胞に由来し、骨基質成分を分泌して高度に石灰化した骨組織を形成する。一方、破骨細胞は骨吸収を司る多核巨細胞で蛋白分解酵素と酸を産生して骨組織を脱灰・吸収する。正常の骨のリモデリングにおいて骨吸収と骨形成は決して無秩序には起こらず、常に共役（カップリング）している。すなわち、まず破骨細胞が骨組織を認識し、その部分の骨を吸収する。それに引き続いて骨芽細胞が骨吸収部位をなんらかの機序で認識し骨形成を行う。つまり、骨芽細胞による骨形成は破骨細胞による骨吸収の結果誘導されたものであり、破骨細胞自身が産生する因子あるいは破骨細胞の骨吸収により骨組織から放出され

る何らかの因子がその惹起物質（カップリング因子）になると推定されている。このように骨の正常な形状と機能を維持するために骨形成と骨吸収のカップリングは重要な役割を果たしており、このバランスが崩れることによって、さまざまな代謝性骨疾患が引き起こされる。急激な高齢化社会への移行に伴って、日本でも社会問題になっている骨粗鬆症はその代表例である。こうした代謝性骨疾患の病態を明らかにし、その対策をたてるためにも、骨のリモデリングの主役である骨芽細胞と破骨細胞の機能やそれらの調節機構を解析することはきわめて大切である。

本論文では、上述した破骨細胞と骨芽細胞の連関の中で、破骨細胞に焦点をあて、破骨細胞がいかに骨組織という自らが置かれている環境を認識し、骨吸収を開始するのかという命題について検討した。そこで、まず、これまでの研究で明らかにされている破骨細胞の形態、機能について以下に概説する。

1. 破骨細胞の形態と機能

破骨細胞 *osteoclast* なる名称が初めて記載されたのは1873年、ドイツの Kölliker によるととされている(2)。破骨細胞は骨吸収を行うという点で非常に特殊な細胞であり、形態的に様々な特徴を持っている。図1に破骨細胞の形態と機能のシェーマを示す。核は多核で数個から数十個に及び、細胞質には多数のミトコンドリア、空胞、ライソソーム、ゴルジ装置が存在する。また骨吸収状態にある破骨細胞では、骨と接する側に波状縁(*ruffled border*)とそれを取りまく明帯(*clear zone*, *sealing zone*)が極在している。すなわち破骨細胞は極性を持った細胞といえる(3-6)。波状縁には液胞型の水素ポンプが局在し、細胞質内に存在する *carbonic anhydrase II* という酵素によって産生された水素イオンを細胞外へ放出する(7,8)。一方、明帯は *sealing zone* という名のとおり、波状縁を取りまき周囲と境界することで、破骨細胞直下の空間を pH 4-5 に保っている。この明帯には細胞内小器官がなくアクチン様フィラメントが存在する。骨吸収状態にある破骨細胞に *phalloidin* 染色を行って F-actin を染め出すと明帯に対応するかのように細胞辺縁が ring 状に染まる（アク

チンリング)。詳細な観察の結果このリング状の構造体は細胞周囲に沿って走行するストレスファイバーのごとき構造ではなく、F-actinの斑状の構造体がリング状に配列しているものであることがわかっている。この斑状構造体はその1つ1つがポドソームと呼ばれる接着斑であることも明らかにされている(9-11)。また例えば、骨吸収抑制因子であるカルシトニンを投与すると、このリング構造が直ちに破壊されるとともに骨吸収も停止する(12)。このような所見より、現在ではこのアクチンリングの形成が破骨細胞の極性化、機能発現の1つの指標として用いられている(13,14)。

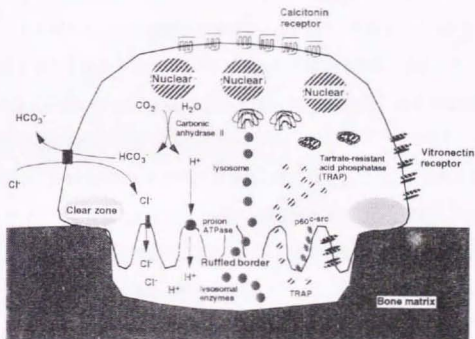


図1 破骨細胞の形態と機能

II. in vitro における破骨細胞形成系の確立

このように破骨細胞に関する研究は古くからなされているが、in vitroでの解析、特に生化学的、分子生物学的な解析はほとんどなされていなかった。その理由としては、破骨細胞が最終分化した分裂能のない細胞であるため株化が困難であること、特に哺乳類では大量の破骨細胞を高純度で集めることが困難であったことなどが挙げられる。1988年、高橋、赤津らはマウスの頭蓋骨より得た骨芽細胞と骨髄細胞を活性型ビタミンD₃、副甲状腺ホルモン、プロスタグランジンといった骨吸収因子の存在下で共存培養することにより、破骨細胞様の多核細胞が形成されることを見出した(15)。形成された多核細胞は、破骨細胞のマーカー酵素の1つである酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ (TRAP)が陽性であり、多数のカルシトニン受容体を有し、象牙質切片上で培養すると吸収窩を形成するなど破骨細胞としての条件をすべて満足する細胞であった(15)。現在ではこの共存培養系で形成された破骨細胞を単離することにより、大量の破骨細胞を容易に集めることが可能となった(16)。本論文においても高橋、赤津らによって開発されたマウス破骨細胞形成系を用いて実験を行った。

そこで本論文では破骨細胞の極性発現機構の解明を目的として、まず第1章では、破骨細胞がアクチンリングを形成するために必要な細胞外基質について検討した。続いて、第2章ではこのアクチンリング形成の過程における細胞内の生化学的变化を主として蛋白質のチロシンリン酸化という観点から検討した。

第1章

破骨細胞の極性化を誘導しうる細胞外基質

緒論で述べたように、破骨細胞は骨組織を認識し、骨と接する側へ水素イオンと蛋白分解酵素を放出して骨吸収を行う細胞である。すなわち、破骨細胞による骨基質の認識は破骨細胞の機能発現にとって最初のステップである。このように、破骨細胞が骨組織上で極性化し骨吸収を行うことは事実である。そして長い間、その逆もまた真なり、つまり破骨細胞の極性化には骨組織が必要である、という考え方が一般的であった。実際、破骨細胞は骨組織を吸収できるがヒドロキシアパタイトは吸収できない、また死んだ骨 (devitalized bone) よりも生きた骨 (living bone) の方が吸収窩を作り易いという報告がなされた(17,18)。その一方で、Jonesらは破骨細胞は骨組織だけでなく象牙質、エナメル質、さらには牡蠣の貝殻や卵殻上にも吸収窩を形成できることを報告した(19,20)。そこで本章では高橋、赤津らのマウス破骨細胞形成系で作成した破骨細胞を用いて(15,16)、どのような細胞外基質が破骨細胞の極性化を誘導できるのかという点を、アクチンリング (明帯) 形成を指標として評価した。

第1節 実験材料および実験方法

1.1.1. 実験動物および試薬

静岡実験動物センター (静岡) より入荷した6~10週令 (雄) と生後1~3日のddy系マウスを実験に供した。活性型ビタミンD₃は和光純薬 (大阪) より購入した製品を用いた。コラーゲンゲル(Cellmatrix type-A)は新田ゼラチン生物科学研究所 (大阪) の製品を使用した。ペニシリンGカリウムは万有製薬 (東京)、硫酸ストレプトマイシンは明治製薬 (東京)、トリプシン-EDTA溶液(x10)、naphtol AS-MX phosphate, fast red violet はシグマ社(St. Louis, MO, USA)の製品をそれぞれ使用した。また細胞分散用コラゲナーゼ

は和光純薬、デイスパーゼは合同酒精（大阪）、 α -modified minimum essential medium (α MEM)はGIBCO社 (New York, NY, USA)、牛胎児血清(FBS)はBiocell laboratories (Carson, CA, USA)の製品をそれぞれ使用した。象牙質切片は西出印材株式会社より供与されたものを用いた。象牙質切片の一部は10% EDTA 溶液で2日間脱灰したのち、PBSで十分に洗浄した上で脱灰象牙質として実験に供した。また、ヒドロキシアパタイトとしては培養用に市販されているMillenium Biologix 社製のcalcium phosphate thin film (Kingston, ON, Canada)を使用した。さらに細胞外基質蛋白質として、フィブロネクチン、ビトロネクチン、I型コラーゲン、ラミニン、ポリ-L-リジン及び牛血清アルブミンをシグマ社から購入して使用した。培養用プレートに細胞外基質蛋白質でコートする際には各々の蛋白質を加えた培養用プレートを4℃で15時間インキュベートした。GRGDS(Gly-Arg-Gly-Asp-Ser)ペプチド及びGRGES(Gly-Arg-Gly-Glu-Ser)ペプチドはペプチド研究所（大阪）より購入した。その他の試薬はすべて特級試薬を使用した。また、培養器具は特に記載のない限り、Corning社の製品を使用した。

1.1.2. 細胞培養法

培地はペニシリンGカリウム(10,000U/liter)と硫酸ストレプトマイシン(0.1g力価/liter)を含む α MEMに、通常、最終濃度が10%になるようにFBSを添加したものを用いた。また、培養は37℃の炭酸ガス培養器中（5%CO₂, 95%空気中）で行った。培地および添加薬物の交換は培養開始3日目に行った。細胞の継代には0.25%のトリプシン-EDTA溶液を用いた。

1.1.3. マウス初代培養骨芽細胞分離法

高橋らの方法(15)に従って行った。哺乳1～3日令のddYマウスから無菌的に取り出した頭蓋骨を0.1%コラゲナーゼと0.2%デイスパーゼを含むリン酸緩衝生理食塩水（PBS: 50個の頭蓋骨につき10 ml）に入れて37℃の恒温槽にて、酵素溶液を交換しながら10分間

ずつ5回消化した。2回目から5回目の消化で得られた細胞を合一した後、10% FBSを含んだ α MEDに懸濁し、 1×10^6 細胞/10cmシャーレにて数日間、confluentになるまで培養した。トリプシン-EDTA溶液で回収した細胞を10% dimethyl sulfoxideと20% FBSを含む α MED培地に-80℃で凍結保存し、要時解凍してマウス初代培養骨芽細胞として使用した。

1.1.4. マウス骨髓細胞分離法

高橋らの方法(15)に従って行った。6~10週令のddYマウスから無菌的に取り出した脛骨の両端を骨端から切り落とした後、脛骨の遠位端から25Gの針をつけたシリンジで α MEDを約1 ml注入し、近位端より骨髓細胞を回収した。得られた細胞を洗浄後、10%のFBSを含む α MEDで懸濁し、マウス骨髓細胞として使用した。

1.1.5. マウス破骨細胞様多核細胞の形成・分離法

赤津らの方法(16)に従って行った。10 cmシャーレに5 mlのコラーゲンゲル混合液[cellmatrix Typel-A: 5倍濃度 α MED: 2.2% NaHCO_3 を含む200 mM hepes緩衝液 (pH 7.4)]を7:2:1の割合で混合したものを入れ、37℃で30分間放置してゲルを固化させた。このシャーレ上で、[1.1.3]の方法で分離したマウス初代培養骨芽細胞 (5×10^5)と[1.1.4]の方法で分離したマウス骨髓細胞 (6×10^6)とを 10^{-8} Mの活性型ビタミン D_3 存在下、10% FBSを含む α MED中で6日間共存培養した。培養終了後、シャーレに0.2%コラーゲナーゼを含む α MED 5mlを加え、37℃の恒温槽で20分間振盪して細胞を遊離させた。遊離した細胞を口の広いポリプロピレン製のビベットで穏やかに回収し、5分間遠心分離(250xg)した。得られた細胞を適量の10% FBSを含む α MED中に懸濁し、破骨細胞として実験に供した。

1.1.6. 破骨細胞における極性発現の同定法

破骨細胞の同定と極性発現(アクチンリング形成)の観察を同時に行うために、F-アク

チン染色と酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ(TRAP)染色の2重染色法を考案した。酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ染色は高橋らの方法(15)を一部改め、またF-アクチン染色については金久らの方法(10)に基づいて両者を同時に行った。[1.1.5.]で分離した破骨細胞を10%ホルマリンを含むPBSで10分間固定し、PBSで1回洗浄した後に0.1% Triton X-100を含んだPBSで5分間細胞を処理した。次いで、50 mMの酒石酸を含むTRAP反応液[naphthol AS-MX phosphateを0.1 mg/ml, fast red violet LB saltを0.6 mg/mlの割合で含む0.1 M酢酸緩衝液(pH5.0)]を加え、室温で約10分間放置した。続いて、PBSで1回洗浄した後にPBSで500倍に希釈したMolecular probe社製のrhodamine-conjugated phalloidin溶液を加え、室温で30分間放置した。TRAP陽性細胞は光学顕微鏡により観察し、F-actinの観察はオリンパス社製の蛍光顕微鏡(Olympus BX-FLA)にて行い、アクチンリングを有する破骨細胞(TRAP陽性細胞)の割合を算出した。

第2節 実験結果

1.2.1. 破骨細胞の極性発現(アクチンリング形成)を誘導する細胞外基質

まず、[1.1.5.]で述べたマウス共存培養系で形成された破骨細胞を10% FBS存在下で何種類かの基質上で培養し、破骨細胞がどのような基質の上でアクチンリング(明帯)を形成できるかを検討した。Fig. 1-1(a-d, f)に蛍光顕微鏡による観察像を示した。破骨細胞は培養用プラスチックシャーレ(a)、象牙質(b)およびカルシウムフォスフェート(c)上ではアクチンリングを形成したが、脱灰象牙質(d,e)やI型コラーゲンからなるマトリゲル(f,g)の上ではアクチンリングを形成しなかった。(e)及び(g)には破骨細胞の存在を確認するために光学顕微鏡によるTRAP染色所見を示した(矢頭)。この所見は破骨細胞はシャーレ上、象牙質上、ヒドロキシアパタイト上では明帯形成、すなわち極性化しうるが、脱灰象牙質やコラーゲンゲルの上では極性化できないことを示している。

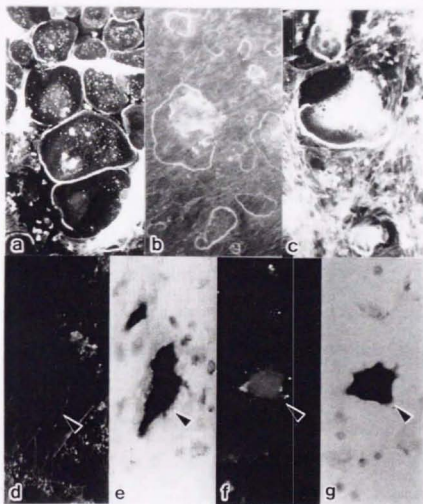


Fig. 1-1. Actin ring formation in osteoclasts (OCLs) placed on various substrates in the presence of 10% FBS. In the presence of 10% FBS, OCL preparations were placed on plastic plates (a), calcified dentine (b), calcium phosphate thin films (c), demineralized dentine (d,e), or collagen gel (f,g). After culture for 8 h, cells were fixed and stained for F-actin with rhodamine-conjugated phalloidin (a-d,f). To recognize OCLs in (d,f), cells were stained for TRAP in (e,g) respectively. Note that actin ring formation was observed in OCLs on plastic plates, calcified dentine and calcium phosphate, but not on demineralized dentine and collagen gel. (a-b, x87.5; c-g, x175)

1.2.2. 破骨細胞の極性発現を誘導する細胞外基質蛋白質

では、破骨細胞は血清中のどの蛋白質を認識して極性化するのだろうか。この点を明らかにする目的で、破骨細胞を何種類かの蛋白質でコートしたプレート上で血清非存在下で培養し、アクチンリング形成を観察した。Fig. 1-2(a-d, f)に示すように、破骨細胞はビトロネクチン(a)、フィブロネクチン(b)、I型コラーゲン(c)をコートしたプレート上ではアクチンリングを形成したが、ラミニン(d)、ウシ血清アルブミン(f)上ではアクチンリングを形成しなかった。Fig. 1-2-hに定量化したデータを、Fig. 1-3にはコートした基質蛋白濃度とアクチンリング形成とが濃度依存的な関係にあることを示した。興味深いことに、I型コラーゲンはマトリゲルとしてはアクチンリングを誘導できなかったが(Fig. 1-1f, g 矢頭)、溶液としてプレートにコートした場合にはアクチンリングを誘導した(Fig. 1-2-f, g)。

さらに、Fig. 1-4に示すように、ビトロネクチン、フィブロネクチン、I型コラーゲン上での破骨細胞のアクチンリング形成は、合成ペプチドであるGRGDS (Gly-Arg-Gly-Asp-Ser) ペプチドを培地中に添加することにより用量依存的に抑制された。一方、コントロールとしてGRGES (Gly-Arg-Gly-Glu-Ser) ペプチドを添加した場合は、アクチンリング形成の抑制はみられなかった。これらの結果より、破骨細胞がビトロネクチンなどの細胞外基質蛋白に含まれる RGD (Arg-Gly-Asp) というアミノ酸配列をそのレセプターであるインテグリンを介して認識し、アクチンリングが形成されることが明らかとなった。インテグリンは細胞表面に発現した α と β の2つのサブユニットからなるヘテロダイマーで、主として細胞-細胞外マトリックス間の接着過程を司る重要な分子である(21)。破骨細胞には $\alpha_v\beta_3$ 、 $\alpha_2\beta_1$ 、 $\alpha_v\beta_1$ の3つのインテグリンが存在するとされている(最も大量に発現しているのは $\alpha_v\beta_3$ インテグリン)(22-26)。興味深いことに、ラミニンにはRGD配列が含まれているにも関わらず、破骨細胞のアクチンリング形成を誘導しなかった。このことはラミニン中のRGD配列を認識できるインテグリンが破骨細胞に発現していないからと考えれば説明がつくが、詳細な検討は行っておらず、あくまで推測の域をでない。

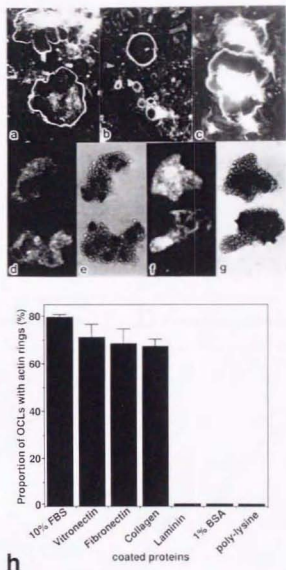


Fig. 1-2. Effects of matrix proteins on actin ring formation in osteoclasts (OCLs). In the absence of FBS, OCL preparations were placed on plastic plates precoated with either 20 µg/ml of vitronectin (a), 20 µg/ml of fibronectin (b), 20 µg/ml of type I collagen (c), 20 µg/ml of laminin (d,e) or 1% BSA (f,g). After culture for 3 h, cells were fixed and stained for F-actin with rhodamine-conjugated phalloidin (a-c,d,f). To recognize OCLs in (d,f), cells were stained for TRAP in (e,g) respectively. Note that actin ring formation in OCLs was induced on plastic plates precoated with vitronectin, fibronectin or type I collagen, but not with BSA or laminin. (h) The proportion of OCLs having actin rings to TRAP-positive OCLs was scored. The results are expressed as the means \pm S.D. in quadruplicate cultures. More than 100 OCLs were evaluated in each well. (a-g, $\times 87.5$)

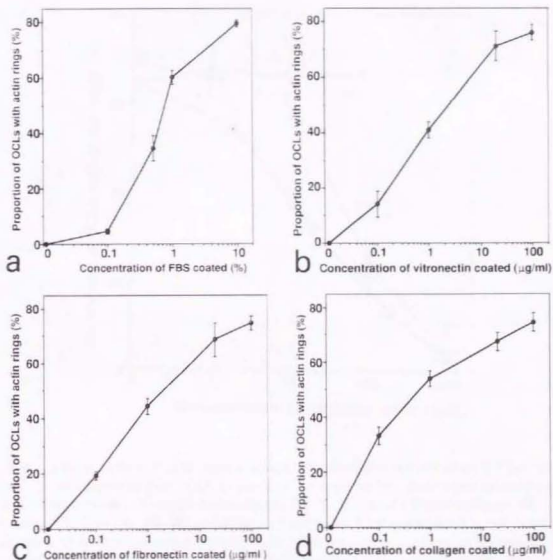


Fig. 1-3. Dose-dependent effects of matrix proteins on actin ring formation in osteoclasts (OCLs). In the absence of FBS, OCL preparations were placed on plastic plates precoated with FBS (a), vitronectin (b), fibronectin (c) and type I collagen (d) diluted to the graded concentrations indicated. After culture for 3 h, cells were fixed and stained with rhodamine-conjugated phalloidin. The results are expressed as the means \pm S.D. of the proportion of OCLs having actin rings to TRAP-positive OCLs in triplicate cultures. More than 50 OCLs were examined in each well.

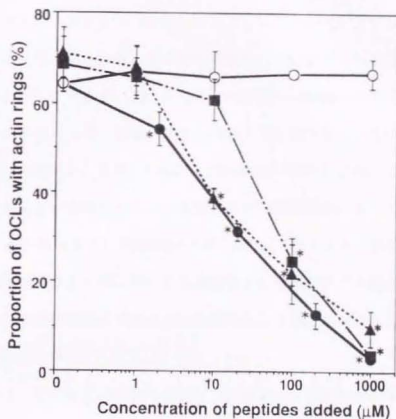


Fig. 1-4. Effects of the GRGDS peptide on actin ring formation in osteoclasts (OCLs) on matrix proteins. In the absence of FBS, OCL preparations were placed on plastic plates precoated with 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of vitronectin (▲), 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of fibronectin (■) or, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of type I collagen (●, ○) with the synthetic GRGDS (▲, ■, ●) or GRGES (○) peptide. After culture for 3 h, cells were fixed and stained with rhodamine-conjugated phalloidin. The results are expressed as the means \pm S.D. of the proportion of OCLs having actin rings to TRAP-positive OCLs in quadruplicate cultures. More than 100 OCLs were evaluated in each well. * Significantly different from the group treated without the peptide, $p < 0.01$.

小括

本章では、破骨細胞の極性化を誘導しうる細胞外基質について、明帯(アクチンリング)形成を指標として検討を行った。その結果、破骨細胞は血清が存在すれば、シャーレ上、象牙質上、ヒドロキシアパタイト(カルシウムフォスフェート)上でも極性化できることが明らかになった。言い換えれば、破骨細胞の極性化には必ずしも骨基質蛋白は必要でないということを示唆しているが、この所見は、1984年にJonesらが報告した、破骨細胞は骨組織だけでなくエナメル質、牡蠣の貝殻や卵殻上でも極性化して吸収窩を形成できるという所見(19,20)と合致する。また、1988年にSilverらが報告した次のような結果とも合致する。彼らはガラス上で培養したラット長管骨由来の破骨細胞の直下に微小電極を挿入してpHを測定し、破骨細胞直下の空間がpH3-4に保たれていることを報告した(27)。彼らの実験結果は破骨細胞がガラス面と相対する細胞膜上に水素ポンプを極在させて酸を分泌している、換言すれば破骨細胞はガラス上でも極性化しうることを意味しており、本章で得られた結果とも矛盾しない。

さらに本章では、破骨細胞が細胞外基質蛋白に含まれる RGD (Arg-Gly-Asp) というアミノ酸配列をインテグリンを介して認識して極性化することを明らかにした。破骨細胞表面には大量の $\alpha_v\beta_3$ インテグリン(ビトロネクチンレセプター)が発現していることが報告されており(22-26)、このインテグリンを利用して細胞外基質を認識していることが予想される。その一方で、脱灰象牙質やコラーゲンゲル上でのアクチンリング形成が観察されなかったことから、たとえRGD (Arg-Gly-Asp) 配列を含む基質蛋白が存在していてもそれだけでは不十分であることがわかった。しかしながら、細胞外基質のどのような性質が破骨細胞の極性発現に重要な役割を果たしているのかについては不明である。弾性、硬度といった物性が関与している可能性もあるが、詳細な検討は今後の課題としたい。

第2章

破骨細胞の極性発現における p130^{Cas}の関与

第1章では、破骨細胞の極性発現の第1ステップがインテグリンを介する細胞外マトリックスの認識であることを、アクチンリング（明帯）形成を指標として示した。一般的に、インテグリンと細胞外基質との相互作用は、胎発生、創傷治癒、腫瘍の転移、免疫反応といった様々な生体反応に重要な役割を果たしていると考えられている(21,28)。インテグリンが細胞外基質と介合することによって、細胞内では細胞内カルシウムの上昇、脂質ターンオーバーの亢進、チロシンリン酸化の亢進といった現象が惹起され、その結果として細胞骨格の再構築や特定の遺伝子の発現が引き起こされる(29)。それでは、破骨細胞ではインテグリンによる細胞外基質の認識の後、どのような細胞内シグナル伝達系を介して極性が発現されるのだろうか。本章ではこの点に焦点を当てる。

これまで、細胞外基質の認識に始まり波状線・明帯の形成に終わる破骨細胞の極性発現過程についてはほとんど明らかでなかったが、1991年、Sorianoらによって1つの breakthrough がなされた。gene-targeting法により c-src という遺伝子をノックアウトしたマウスでは破骨細胞の機能不全のために骨吸収が行われず、いわゆる大理石骨病が発症することが報告されたのである(30)。c-src はもともと Rous 肉腫ウイルスが持つ癌遺伝子 v-src の正常細胞内ホモログとして見い出されたプロト癌遺伝子で、その遺伝子産物である p60^{c-src}(c-Src) 自身が膜結合型・非受容体型のチロシンキナーゼとなっている(31)。その後、正常の破骨細胞には c-Src が大量に発現していること(32,33)、c-src ノックアウトマウスの骨組織には破骨細胞が存在するものの、それらには波状線、明帯が形成されていないことが明らかにされた(34)。これらの結果は c-Src が破骨細胞の分化過程ではなく、成熟破骨細胞の機能発現過程、とりわけ極性発現の過程に関与していることを意味している。そこで本章では、明帯形成、アクチンリング形成に関与する c-Src 以外の蛋白分子の検索を試み、さらにこの分子と c-Src との関連についても検討を加えた。

第1節 実験材料および実験方法

2.1.1. 実験動物および試薬

Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA)から購入したc-*Src*(+/+)-マウスの雌雄を交配させ、誕生したマウスを以下の実験に供した。交配によって、確率的には25%の割合で*Src*(-/-)-マウスの誕生が期待されたが、生まれたマウスが大理石骨病すなわち*Src*(-/-)-マウスであるか、正常すなわち*Src*(+/+)マウスもしくは*Src*(+/-)-マウスであるかは、軟X線で撮影したそれらの骨所見（骨髓腔が存在しないこと）及び歯牙の萌出が見られないことより判断した。また、破骨細胞を純化するためにCalbiochem社製 (La Jolla, CA, USA) のプロナーゼを用いた。サイトカラシンDはシグマ社から購入したものをジメチルスルフォキシドに要時調製して使用した。その他の動物および試薬は[1.1.1.]に記載したものを使用した。

2.1.2. 細胞培養法

[1.1.2.]に記載した方法に従って細胞培養を行った。

2.1.3. マウス初代培養骨芽細胞分離法

[1.1.3.]に記載した方法に従ってマウス初代培養骨芽細胞を分離した。

2.1.4. マウス骨髓細胞分離法

[1.1.4.]に記載した方法に従ってマウス骨髓細胞を分離した。

2.1.5. マウス破骨細胞の形成・分離法

[1.1.5.]に記載した方法に従って破骨細胞の形成、分離を行った。

2.1.6. マウス破骨細胞の純化法

[2.1.5.]で得られた破骨細胞画分には骨芽細胞が含まれているため、破骨細胞の純度はわずかに5%にすぎない。そこで、破骨細胞に関する生化学的な解析を行うためには、破骨細胞を純化する操作が必要になる。自見らの方法(35)に従って破骨細胞の純化を行った。

[2.1.5.]で得られた破骨細胞画分を培養用シャーレ上に播種し2～6時間培養する。破骨細胞が十分に広がったことを位相差顕微鏡で確認し、 α MEM培地で一度洗浄した上で、0.001% pronaseを含んだPBSを加え37℃で5～10分間インキュベートした。次いで愛護的なピペティングを行い骨芽細胞を取り除くと純化破骨細胞画分が得られた。

2.1.7. Src(-/-)マウス由来の破骨細胞の形成・分離法

[1.1.5.]に記載した方法に従って破骨細胞の形成、分離を行ったが、Src(-/-)マウスは大理石骨病マウスであるために、骨髓腔がきわめて乏しく骨髓細胞の採取が困難であるため、代わりに脾臓細胞を使用した。生後2週令のSrc(-/-)マウスおよび対照群としてSrc(+/?)マウスから脾臓を無菌的に取り出し、メッシュ上ですりつぶして脾臓細胞採取し、細胞を洗浄後、10% FBSを含む α MEM中に懸濁し実験に使用した。骨芽細胞としては正常初代培養骨芽細胞を用いた。

2.1.8. ウェスタンブロット法

[2.1.5.]、[2.1.6.]および[2.1.7.]で得られた細胞をice-cold PBSで2度洗浄した後に、1Xのsodium dodecyl sulfate (SDS) サンプルバッファーで可溶化した。直ちに5分間煮沸して蛋白質をdenaturedした後に、7.5% SDSポリアクリルアミドゲルにて電気泳動し、次いでゲル中の蛋白質をMillipore社製 (Bedford, MA, USA)のPVDF膜 Immobilon-P に転写した。PVDF膜上の非特異的結合部位を、0.1% Tween 20を含むトリス緩衝生理食塩水 (TBS-T)を用いて2%に溶解した牛血清アルブミン (BSA)を用いて室温で2時間ブロッキングした。Upstate Biotechnology社製の抗リン酸化チロシンモノクローナル抗体 (抗pTyr 抗体) との反応を2時間行った後に、TBS-Tで5分間、3回洗浄し、続いてペルオキシダ

ーゼを結合させた抗マウスイムノグロブリン抗体と1時間反応させた。TBS-Tで15分間3回洗浄した後に、Amersham社製(Amersham place, UK)のenhanced chemiluminescence (ECL) detection kitを用いて目的の蛋白を検出した。

PVDF膜を別の抗体を用いて再度蛋白の検出をするためには、62.5 mM Tris-HCl (pH 6.7), 2% SDSおよび100 mM 2-mercaptoethanolを含んだバッファーでPVDF膜を40分間、55℃で処理し、1次および2次抗体をストリップした上で、上述したブロッキング以降の操作を繰り返した。

2.1.9. 免疫沈降法

すべての操作は4℃で行われた。[2.1.5.]、[2.1.6.]および[2.1.7.]で得られた細胞をice-cold PBSで2度洗浄した後に、20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% NP-40, 10 mg/ml aprotinin, 2 mM Na_3VO_4 および1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)を含む可溶性バッファーで可溶化した。得られた細胞溶解液(セルライゼート)を12,000 gで20分間遠心分離した後に、その上清にZymed社製(CA, USA)のprotein G-Sepharose beadsを加え1時間穏やかに振蕩した。続いてこの上清に抗 Cas 抗体 (Transduction Laboratories社, Lexington, KY, USA), 抗 paxillin 抗体 (Transduction Laboratories社), 抗 Src 抗体 (Oncogene Science社, Manhasset, NY, USA)、もしくは抗 pTyr抗体を加え2時間静置した後に、protein G-Sepharose beadsを加え1時間穏やかに振蕩した。得られた免疫沈降物を可溶性バッファーで5回洗浄した後に2XのSDSサンプルバッファーを加えて5分間煮沸し電気泳動に供した。以後の操作は[2.1.8.]に記載した方法に従って行い、目的の蛋白質の検出を行った。

2.1.10. 細胞染色法

(a) F-アクチン染色と酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ染色の2重染色法

[1.1.6.]に記載した方法に従って行った。

(b) p130Casに対する細胞免疫染色法

[2.1.5.]および[2.1.7.]で得られた細胞をカバーガラス上で2~7時間培養した後に、4%パラホルムアルデヒドで、15分間、室温で固定した。PBSで1回洗浄した後に1%Triton X-100を含んだPBSで細胞を10分間処理した。次いで、5%スキムミルクで30分間ブロッキングした後に、100倍希釈した抗Cas抗体を加えて37℃で1時間反応させた。続いて、細胞をPBSで洗浄した後に、FITC（もしくはCy3）を結合させたヤギ抗マウスIgGロブリンおよびrhodamine（もしくはFITC）-conjugated phalloidin溶液（いずれもMolecular probe社製）を加えて37℃で30分間反応させた。反応終了後、オリンパス社製の蛍光顕微鏡（Olympus BX-FLA）で観察を行った。

第2節 実験結果

2.2.1. 破骨細胞におけるアクチンリング形成過程

明帯形成、すなわちアクチンリング形成に関与する蛋白分子を検索するにあたって、まず破骨細胞のアクチンリング形成がどのような時間経過で進むのかという点を最初に検討した。[2.1.5.]で得られた破骨細胞を10% FBS存在下で培養用シャーレ上に播種すると、Fig. 2-1に示したように、アクチンリングは当初きわめて小さなリングとして出現し、時間経過とともに大きく広がっていくことが明らかになった。定量化したデータをFig. 2-1h, iに示すが、アクチンリングを有する破骨細胞の割合およびリングの直径は、細胞がシャーレ上に接着した後、漸次増加し、培養2時間の時点で80%以上のTRAP陽性細胞がアクチンリングを有し、その平均直径は175 μm に到った。さらにこの状態はその後約10時間維持された。

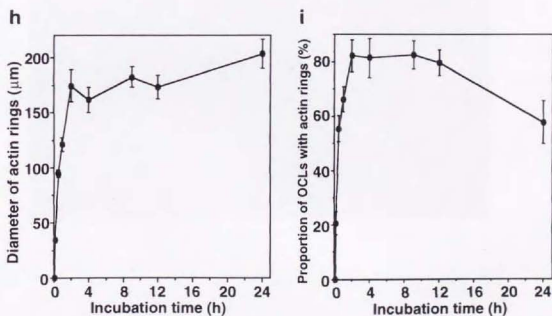
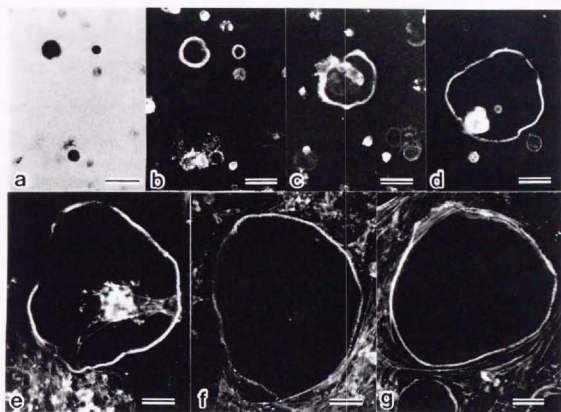


Fig. 2-1. Time course of actin ring formation in osteoclasts (OCLs). Crude OCL preparations were placed on culture plates in the presence of 10% FBS. After culture for 10 min (a and b), 30 min (c), 1 h (d), 2 h (e), 7 h (f), and 12 h (g), cells were fixed and stained with rhodamine-conjugated phalloidin to detect F-actin (b-g). TRAP staining was added to identify OCLs (a). Bars=40 μ m. (h) The diameter of the actin rings of the OCLs was measured after culture for indicated periods. Data are expressed as the means \pm S.E. of 60 rings. (i) The percentage of the number of TRAP-positive OCLs having actin rings to the total TRAP-positive OCLs was determined after culture for indicated periods. Data are expressed as the means \pm S.D. of four cultures. 60 OCLs were evaluated in each group.

しかしながら、[2.1.6.]でも述べたように[2.1.5.]で得られる破骨細胞画分には骨芽細胞が含まれている。そこで、骨芽細胞を除いた純化破骨細胞においてもなおアクチンリングが形成されているか否かを検討した。[2.1.6.]で述べた方法でプロナーゼを用いて破骨細胞を純化すると、Fig. 2-2aの如く、ほぼ完全に純化された破骨細胞画分が得られ、さらにFig. 2-2bに示す通り、純化してもなおほとんどの破骨細胞がアクチンリングを有していることが明らかとなった。

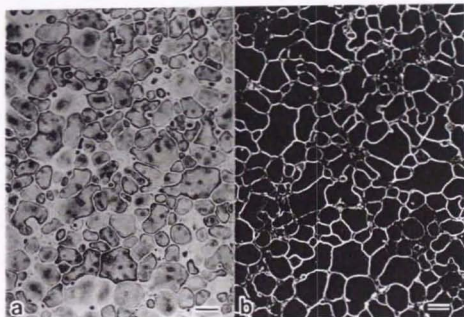


Fig. 2-2. Actin ring formation in purified osteoclasts (OCLs). After crude OCL preparations were cultured for 6 h, osteoblasts were removed with 0.001% pronase to obtain purified OCL preparations as described in Materials and Methods. After culture for another hour, purified OCLs were fixed and stained with rhodamine-conjugated phalloidin (b), then subjected to TRAP staining (a). Note that the purity of the OCLs is more than 90% and that almost all of the OCLs have actin rings. Bars= 100 μ m.

2.2.2. 破骨細胞のアクチン再構成過程でチロシンリン酸化される蛋白質

次に、Fig. 2-1に示したようなアクチンリング形成過程における、チロシンリン酸化蛋白質の経時的变化を抗pTyr抗体を用いたウエスタンブロット法により検討した。Fig. 2-3aのレーン1-5に示すように、[2.1.5.]で得られた破骨細胞画分を10% FBS存在下でシャーレ上に播種すると、経時的にいくつかの蛋白質のチロシンリン酸化が亢進することが明らかとなった。ただし、上述したようにこの破骨細胞画分には骨芽細胞が含まれているために、どのチロシンリン酸化蛋白質が破骨細胞由来で、どの蛋白質が骨芽細胞由来であるかを区別することができない。そこで、Fig. 2-2に示した純化破骨細胞画分を用いて同様の検討を行った。その結果、Fig. 2-3aのレーン6および7に示すように、少なくとも4つのチロシンリン酸化蛋白質(p130, p89, p85, p74; 矢頭)が骨芽細胞を除いた後になお残った。しかも、これらのバンドは細胞が細胞浮遊液としてある状態(レーン1)では存在しなかったことから、これら4つの蛋白質が破骨細胞由来であること、しかも細胞接着に伴うアクチンリング形成過程でチロシンリン酸化される蛋白質であることが明らかとなった。Fig. 2-3bにはクマシー染色による蛋白染色の結果を示し、上記の変化が実験に供した蛋白の量に由来するものではないことを確認した。

さらに、アクチン重合阻害剤であるサイトカラシンDのアクチンリングおよびチロシンリン酸化蛋白質に対する効果を検討した。Fig. 2-4aおよびbに示すように、5 μ MのサイトカラシンDを20分間投与したところ、破骨細胞のアクチンリングは完全に破壊された。この時、純化破骨細胞から調製したセルライゼットを用いて、チロシンリン酸化蛋白質の変化を検討したところ、上記の4つの蛋白質(p130, p89, p85, p74)の中で、130 kDaの蛋白質p130のチロシンリン酸化がもっとも顕著に減少することが明らかとなった(Fig. 2-4c 矢頭)。以上の結果より、このp130はアクチンリング形成に伴ってチロシンリン酸化され、アクチンリングの破壊とともに脱リン酸化される蛋白質であり、破骨細胞におけるアクチンの構成、再構成に密接に関連している蛋白質であることが示唆された。

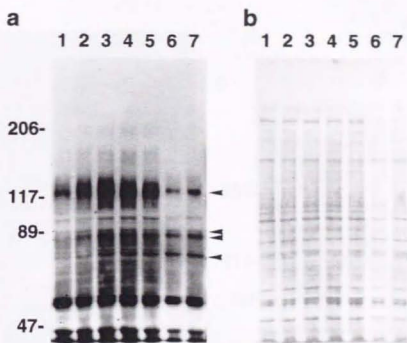


Fig. 2-3. Time course of the general pattern of tyrosine phosphorylation in osteoclasts (OCLs) during actin ring formation. (a) Crude OCL preparations were held in suspension (lane 1), or plated on culture dishes (lanes 2-5). After culture for 0 min (lane 1), 30 min (lane 2), 1 h (lane 3), 2 h (lane 4), 7 h (lane 5), total cell lysates were collected. Purified OCL preparations were obtained from crude OCL preparations by removing osteoblastic cells after culture for 2 h (lane 6) or 6 h (lane 7). After culture for another hour, total cell lysates were collected from the purified OCLs. These total cell lysates were separated by 7.5% SDS-PAGE, transferred onto Immobilon-P, and probed with anti-phosphotyrosine antibody. The molecular masses of marker proteins are indicated in kilodaltons on the left. Arrowheads show the positions of highly tyrosine-phosphorylated proteins. (b) Total proteins were stained with Coomassie Brilliant Blue to confirm equal loading.

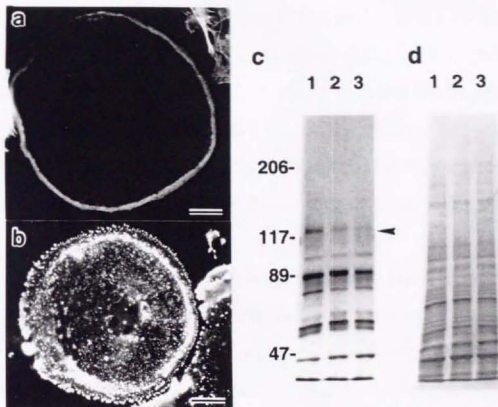


Fig. 2-4. Effects of cytochalasin D on actin rings and general pattern of tyrosine phosphorylation in osteoclasts (OCLs). After crude OCL preparations were cultured for 2 h, cells were treated with (b) or without (a) 5 μ M cytochalasin D for 20 min. Cells were fixed and stained with rhodamine-conjugated phalloidin. Bars= 40 μ m. (c) Purified OCL preparations were obtained from crude OCL preparations by removing osteoblastic cells after culture for 2 h. After culture for another hour, purified OCLs were treated with cytochalasin D at a concentration of 0 μ M (lane 1), 0.5 μ M (lane 2) or 5 μ M (lane 3) for 20 min. Total cell lysates were separated by 7.5% SDS-PAGE, transferred onto Immobilon-P, and probed with anti-phosphotyrosine antibody. The molecular masses of marker proteins are indicated in kilodaltons on the left. The arrowhead shows the position of a 130 kDa-tyrosine-phosphorylated protein. (d) Total proteins were stained with Coomassie Brilliant Blue to confirm equal loading.

2.2.3. 破骨細胞のアクチン再構成過程でチロシンリン酸化される p130 の同定

次に、このアクチンリング形成に伴ってチロシンリン酸化される 130 kDa の蛋白質の同定を試みた。まず[2.1.6.]で得られる純化破骨細胞のセルライゼートを抗 pTyr 抗体でイムノブロットした後に、いくつかの蛋白質に対する抗体で再ブロットするという操作を繰り返した。Fig. 2-5 に結果を示すが、例えば c-Cbl に対する抗体で再ブロットした場合には、1 本のバンドが検出できたものの（レーン 3 および 4、矢頭）、このバンドの電気泳動上の移動度は p130 の移動度（レーン 1 および 2）とは明らかに異なっており、p130 は少なくとも c-Cbl ではないということがわかった。データはここには示さないが、p130 が focal adhesion kinase (FAK) や Src substrate p120 と異なる分子であることも明らかとなった。同様な操作を繰り返した結果、最終的にこの p130 の移動度が p130^{Cas} (Crk associated substrate of tyrosine kinase: Cas) という蛋白質のうちの CasB に一致することがわかった（レーン 5 ~ 8、矢印）。

そこで、p130 が本当に Cas であるかどうかを免疫沈降法により検討した。Fig. 2-6 に結果を示す。純化破骨細胞のセルライゼートを抗 Cas 抗体によって免疫沈降すると、確かに CasB がチロシンリン酸化されており（レーン 1 ~ 4）、また逆に抗 pTyr 抗体による免疫沈降物の中には CasB が含まれていること（レーン 5 および 6）、さらに破骨細胞を予めサイトカラシン D で処理しておけば、抗 Cas 抗体によって免疫沈降された Cas のチロシンリン酸化が著しく抑制されていることもわかった（レーン 7 ~ 10）。これらの結果より、破骨細胞においてアクチンリング形成に伴いチロシンリン酸化される 130 kDa の蛋白質は Cas であることが明らかになった。



Fig. 2-5. Candidates for the p130 that is tyrosine-phosphorylated during actin ring formation in osteoclasts (OCLs). Purified OCL preparations were obtained from crude OCL preparations by removing osteoblasts after culture for 2 h. After culture for another hour, total cell lysates were collected, separated by 7.5% SDS-PAGE, transferred onto Immobilon-P, and probed with anti-phosphotyrosine antibody (lanes 1,2,5,6). The same membrane was stripped and reprobed with anti-c-Cbl antibody (lanes 3,4) or anti-Cas antibody (lanes 7,8). The molecular masses of marker proteins are indicated in kilodaltons on the left. The arrowhead and arrows show the positions of c-Cbl and Cas, respectively.

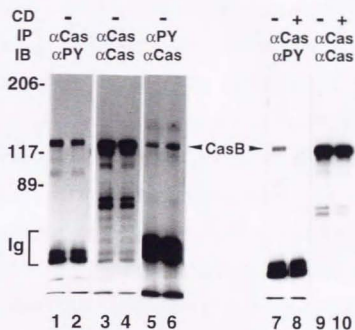


Fig. 2-6. Identification of p130 that is tyrosine-phosphorylated during actin ring formation in osteoclasts (OCLs). Purified OCL preparations were obtained from crude OCL preparations by removing osteoblastic cells after culture for 2 h. After culture for another hour, purified OCLs were treated with (lanes 8,10) or without (lanes 1-7, 9) 5 μ M cytochalasin D for 20 min. Proteins immunoprecipitated from total cell lysates using anti-Cas antibody (lanes 1,2,7,8) or anti-phosphotyrosine antibody (lanes 5,6) were separated by 7.5% SDS-PAGE, transferred onto Immobilon-P, and probed with anti-Cas antibody (lanes 5,6) or anti-phosphotyrosine antibody (lanes 1,2,7,8). The same membrane was stripped and reprobed with anti-Cas antibody (lanes 3,4,9,10). The molecular masses of marker proteins are indicated in kilodaltons on the left, and CD, IP, IB and Ig stand for cytochalasin D, immunoprecipitation, immunoblotting and immunoglobulins, respectively. Arrowheads show the position of Cas.

Casはもともとv-Crk(36-38)やv-Src(39-41)でトランスフォームした線維芽細胞において極度にチロシン酸化される蛋白質として1989年頃よりその存在が確認されていたが、その同定はなかなか成功しなかった。1994年に平井らのグループがクローニングに成功しCasと名付けられた(42,43)。CasはN末端が若干異なる968個(Cas B)ないし874個(Cas A)のアミノ酸からなる蛋白質で、N末端側にSH3ドメインが1つ存在し、それに隣接してチロシン残基を中心とするモチーフが合計15個連続してクラスターを形成する。これらのモチーフはいずれも特定のSH2結合への結合能を持つ配列であり、特に9つのYDXPモチーフはCrk-SH2領域との結合配列と考えられた。C末端付近には、他の分子のSH3領域に結合すると考えられるproline-rich 領域とそれに隣接するSH2結合モチーフが存在している。現在ではこの2つの領域がSrcキナーゼのSH3およびSH2領域との結合領域であることがわかっている(44)。また、N末端側のSH3ドメインにはFAK (focal adhesion kinase)やFRNK (FAK-related nonkinase)さらにPTP1B (protein tyrosine phosphatase 1B)といった分子が結合することが知られている(45-47)。このような構造上の特徴よりCasは細胞内情報伝達経路におけるドッキング分子として機能すると考えられている。

2.2.4. 破骨細胞におけるp130^{Cas}の細胞内局在

続いて、破骨細胞におけるCasの細胞内局在を細胞免疫染色によって検討した。Fig. 2-7a-cに示すようにCas (緑色)は主に細胞辺縁と核周囲の細胞質に存在すること、特に細胞辺縁における分布はF-actinの分布 (赤色)と完全に一致する (黄色) ことがわかった。また、Casの分布はサイトカラシンDの投与で乱れ、細胞質にびまん性に分布するようになった(Fig. 2-7d)。これらの結果は、Casが破骨細胞のアクチンリング形成に関与することを示唆した生化学的データを形態学的に裏付けるものであると考えられた。

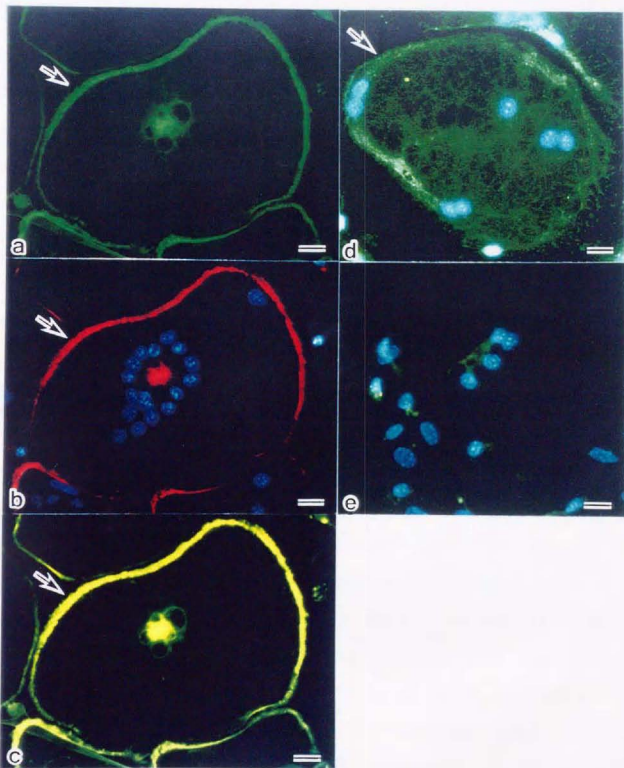


Fig. 2-7. Intracellular localization of Cas in osteoclasts (OCLs). After crude OCL preparations were cultured for 2 h, cells were treated with (d) or without (a-c, e) 5 μ M cytochalasin D for 20 min and fixed. (a) Cells were stained with anti-Cas monoclonal antibody. In an OCL (arrow), Cas is present in the peripheral and perinuclear regions. (b) The same field as in (a), double-stained with rhodamine-conjugated phalloidin to visualize F-actin. (c) The overlaid image of (a) and (b). Note that Cas (green) and F-actin (red) are in the same positions in the peripheral region, demonstrating yellow structures. (d) Cells treated with cytochalasin D were stained with anti-Cas monoclonal antibody. Note that Cas is distributed throughout the cytoplasm in an OCL treated with cytochalasin D (arrow). (e) When non-immune mouse serum is used as the first antibody, no specific immunolabeling is detected. In (b), (d) and (e), the position of the nucleus is indicated by DAPI staining. Bars = 20 μ m.

2.2.5. c-Src欠損マウス由来の破骨細胞におけるアクチンの局在、及びp130Casのチロシンリン酸化とその細胞内局在

最近、様々なノックアウトマウス由来の線維芽細胞を用いた研究から、Casをチロシンリン酸化するキナーゼについての知見が集積しつつある。1996年、Ruoslahtiらのグループと野島らのグループはほぼ同時に次のような報告を行った(48,49)。FAKノックアウトマウス由来の線維芽細胞では接着に伴うCasのチロシンリン酸化が、コントロールの線維芽細胞と同様に生じたのに対して、Fynノックアウトマウス由来の線維芽細胞ではごくわずかに、Srcノックアウトマウス由来の線維芽細胞ではCasのチロシンリン酸化が全く生じなかった。このことは少なくとも線維芽細胞においては、接着に伴うCasのチロシンリン酸化にFAKは直接的には関与しておらず、Srcが重要な役割を果たしていることを意味している。

そこで、[2.1.7.]で得られたSrcノックアウトマウス由来の破骨細胞を用いて、Src欠損状態の破骨細胞におけるアクチンの局在、及びCasのチロシンリン酸化とその細胞内局在について検討した。まず、Fig. 2-8aに示したようにSrc(+/-)マウスおよびSrc(-/-)マウス由来の純化破骨細胞から得たセルライセートを、抗Cas抗体および抗pTyr抗体でイムノブロットすると、Src(-/-)マウス由来の破骨細胞ではSrcに相当するバンドが検出されず、確かにこの破骨細胞がSrc欠損の破骨細胞であることが確認できた。この時コントロールの破骨細胞に比べて、Src欠損の破骨細胞では蛋白レベルでのCas（特にCasA）の発現が亢進していた。この現象の理由はわからないが、同様の現象が線維芽細胞でも報告されている(50)。次に免疫沈降法によってSrc欠損破骨細胞におけるCasのチロシンリン酸化を検討した。Fig. 2-8b上段に示したように、Src欠損の破骨細胞において抗Cas抗体によって免疫沈降されたCasはチロシンリン酸化されていなかった。またこのとき、Fig. 2-8b中段に示すように、paxillinのリン酸化はSrc欠損破骨細胞においても保たれていたため、この現象はCasに特異的なものと考えられた。

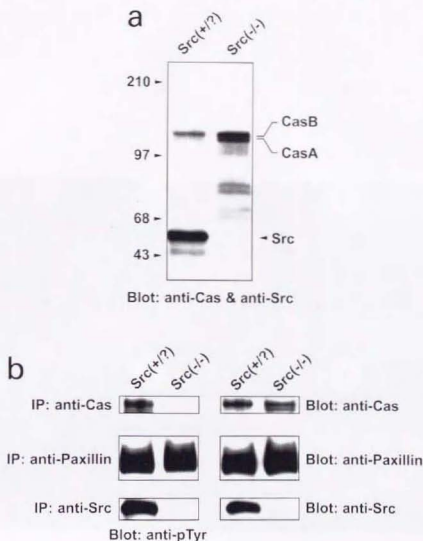


Fig. 2-8. Tyrosine phosphorylation of Cas in Src(-/-) osteoclasts (OCLs). Src(-/-) and Src(+/?) OCLs were obtained from co-cultures of normal primary osteoblasts and spleen cells from c-Src-deficient mice and their normal littermates in the presence of 10 nM $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, respectively. Purified OCL preparations were obtained as described in Materials and Methods and lysed to obtain total cell lysates. (a) Expression of Cas in Src(+/?) and Src(-/-) OCLs. Total cell lysates were separated by 12% SDS-PAGE, transferred onto Immobilon-P, and probed with both anti-Cas and anti-Src antibody. The molecular masses of marker proteins are indicated in kilodaltons on the left. (b) Tyrosine phosphorylation of Cas in Src(-/-) OCLs. Total cell lysates from purified Src(-/-) and Src(+/?) OCLs were immunoprecipitated with anti-Cas, anti-paxillin, and anti-Src antibodies, separated by 12% SDS-PAGE, transferred onto Immobilon-P, and probed with anti-pTyr antibody (left panels). The same membranes were stripped and reprobed with anti-Cas (right upper panel), anti-paxillin (right middle panel), and anti-Src (right lower panel) antibodies.

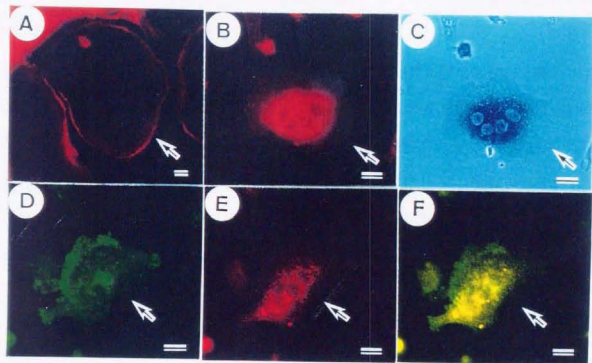


Fig. 2-9. Localization of F-actin and Cas in *Src*^{-/-} osteoclasts (OCLs). (A, B) *Src*^(+/+) (A) and *Src*^(-/-) OCLs (B) were stained with rhodamine-conjugated phalloidin to visualize F-actin. Note that an *Src*^(-/-) OCL cannot form the actin ring (B, arrow), whereas *Src*^(+/+) OCLs form actin rings (A, arrows). (C) The same field as in (B), double-stained for TRAP to identify osteoclasts (arrow). (D-F) *Src*^(-/-) OCLs were double-stained with FITC-conjugated phalloidin to visualize F-actin (D) and with anti-Cas polyclonal antibody (E). (F) is the overlaid image of (D) and (E). Bars= 10 μ m.

それではCasがチロシンリン酸化されていない状態で、破骨細胞のアクチンリング形成およびCasの局在はどのようなになっているのだろうか。Fig. 2-9に細胞染色の結果を示した。パネルBとCにはSrc欠損破骨細胞のF-アクチン染色とTRAP染色の2重染色の所見を示した。コントロールの破骨細胞(パネルA)とは対照的にSrc欠損の破骨細胞ではアクチンリングは形成されていなかった。200個以上のSrc欠損破骨細胞を観察したがアクチンリングを持つものは1つも観察されなかった。一方、コントロールの破骨細胞では200個中167個(83.5%)のTRAP陽性細胞にアクチンリングの形成が見られた。パネルD、EおよびFにはCasとF-actinの2重染色の所見を示した。Casは細胞質にびまん性に分布しており(E)、Cas(赤色)とF-actin(緑色)の分布には一部の重なりがあるものの、Fig. 2-8に示したような正常破骨細胞に見られる両者の完全な一致は観察されなかった(F)。

以上の結果は、破骨細胞においてもSrc依存的なCasのチロシンリン酸化が起きており、このプロセスが破骨細胞のアクチンリング形成に過程に重要な役割を果たすことを示唆するものである。

小括

本章では、破骨細胞がアクチンリングを形成する際に細胞内で生じる現象について蛋白質のチロシンリン酸化という点から検討を加えた。その結果、細胞内シグナル伝達におけるアダプター分子であるCasが破骨細胞のアクチンリング形成にともなってチロシンリン酸化されること、その局在もアクチンリングに一致することが明らかとなった。さらに、アクチン重合阻害剤であるサイトカラシンDによってアクチンリングの破壊とともに、Casのチロシン脱リン酸化が起こったことから、Casのチロシンリン酸化・脱リン酸化はアクチンリング形成・破壊に密接に関与していることが明らかにされた。Casは自身にはキナーゼ活性やフォスファターゼ活性を含まないが、SH3領域、SH2結合モチーフ、proline-rich 領域を持つアダプター分子としてクローニングされた蛋白である(42,43)。いくつかのグループから線維芽細胞においても、接着に伴うインテグリンからのシグナルに

よってCasがチロシンリン酸化されること(51-53)、Casが接着細胞の接着斑に存在すること(46,53)が報告されている。

Casをチロシンリン酸化するキナーゼについては、いくつかの議論があった。まず最初の候補となったのはFAKであった。というのも線維芽細胞において、細胞接着に伴うCasとFAKのチロシンリン酸化の経時的变化がきわめて類似していること(51-53)、さらには、FAKのproline-rich 領域とCasのSH3領域とが直接介合することが明らかになったからである(45,46)。しかしながら、その後、SrcのSH3およびSH2領域がCasのC末端領域のproline-rich 領域およびSH2結合モチーフにそれぞれ直接結合できること(44)、さらに、FAKノックアウトマウス由来の線維芽細胞では接着に伴うCasのチロシンリン酸化がコントロールの線維芽細胞と同様に生じるのに対して、Srcノックアウトマウス由来の線維芽細胞ではCasのチロシンリン酸化が全く生じないという所見が報告されるにいたり(48,49)、現在ではCasをチロシンリン酸化するキナーゼはSrcもしくはFynであろうと考えられるようになった。本章で示したように、Srcノックアウトマウス由来の破骨細胞でCasのチロシンリン酸化が著しく低下していたことを考えれば、破骨細胞においてもCasのチロシンリン酸化はSrcキナーゼ依存的であると考えられる。さらに、このようなCasのチロシンリン酸化が著しく減少した状態では、破骨細胞はアクチンリングを形成することができなかった。Srcノックアウトマウスの破骨細胞は極性化できず、骨吸収を行うことができないことが知られているが、SrcによるCasのチロシンリン酸化の過程が損なわれることが、Srcノックアウトマウスにおける大理石骨病の発症原因の一つになっているのかもしれない。この可能性はSrcノックアウトマウスの大理石骨病をCasもしくはCas関連の蛋白分子を用いて治癒せしめて初めて証明できる命題であるが、今後の研究課題としたい。また、一般的にインテグリンと細胞外基質の相互作用によってチロシンリン酸化が亢進する蛋白質には、Casの他にもFAK(54)、paxillin (55)、tensin(56)、cortactin(52)などが知られている。破骨細胞の極性発現過程における、CasおよびSrcとこれらの分子の間の相互関係についても今後の課題とするものである。

総括

本論文では、破骨細胞の極性発現過程を、破骨細胞による細胞外基質の認識という点(第1章)とそれに引き続いて細胞内で生じる蛋白質のチロシンリン酸化という点(第2章)から論じた。

1873年にドイツの Kölliker が、骨表面に存在する多核巨細胞を破骨細胞 osteoclast と命名して以来(2)、破骨細胞が骨のみを認識する特殊な細胞であるという考え方が一般的になっていた。この考え方に疑問を投げかけ、破骨細胞が骨のみを吸収する細胞にあらずとすることを初めて報告したのは英国の破骨細胞研究者 Jones と Boyde であった(19,20)。

1984年のことである。彼らは破骨細胞が骨組織や象牙質だけでなく、エナメル質、さらには牡蠣の貝殻や卵殻上にも吸収窩を形成できること走査電子顕微鏡を用いて証明した。第1章では彼らの考え方を進めて、アクチンリング形成という観点から、破骨細胞の極性化に最低限必要な細胞外基質は何であるのかということを検討した。その結果、破骨細胞は RGD というアミノ酸配列を含んだ蛋白質がある種の物性を備えた基質の表面に存在していれば極性化しうることが明らかになった(図2)。それでは、どのような物性が必要なのかという問題については現在のところ解析は全く進んでいない。基質の硬度なのか、弾性なのか今後の課題としたい。

一方、Soriano らが c-src 遺伝子をノックアウトしたマウスを作成し、このマウスに破骨細胞機能不全による大理石骨病が発症していることを報告してから6年の歳月が経過した(30)。この報告はそれまでブラックボックスとされていた破骨細胞の極性発現機構、すなわち細胞外マトリックスの認識に始まり、明帯、波状縁の形成に終わる一連のプロセスの解明に1つのきっかけを与えた。またこの6年間は分子生物学の爆発的な進歩の時期と重なったため、これまでの120年間に蓄積された破骨細胞に関する知見をしのぐ勢いで、破骨細胞に関する新知見が集積した。実際、著者らは Src のシグナルの一部は phosphatidylinositol-3 kinase (PI-3 kinase) という脂質キナーゼを介している可能性を示し(57,58)、田

中らはやはりSrcノックアウトマウス由来の破骨細胞を利用してc-Cblという分子がSrcによるチロシンリン酸化を受け、細胞内の膜輸送に関与しうる可能性を示した(59)。また、Zhangらも低分子GTPase結合蛋白質の1つであるRhoが破骨細胞の明帯形成に重要であることを報告した(60)。そこで、第2章では、破骨細胞の機能発現に関与するSrc、PI-3 kinase、c-Cbl、Rho以外の分子について検討を行った。その結果、アダプター分子であるCasが破骨細胞のアクチンリング形成にともなってチロシンリン酸化されること、その局在もアクチンリングに一致することが明らかとなった。

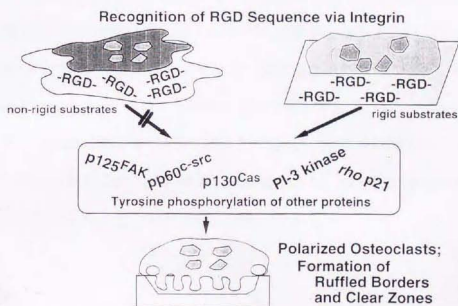


図2 破骨細胞の極性発現機構

これらの所見はCasのチロシンリン酸化が接着に伴う破骨細胞のアクチンリング形成すなわち、明帯形成に関与している可能性を示唆した。しかも、Src欠損の破骨細胞を用いた検討から、Casのチロシンリン酸化もc-Cblと同様にSrc依存的であることが明らかとなった。これらの知見を考えあわせると、Srcは破骨細胞の極性発現機構における1つのクロスロードになっていることが想像される。すなわち、接着に伴うインテグリンからのシグナルが何らかの分子を経由してSrcに伝達される。Srcに入ったシグナルはCas、PI-3

kinase, c-Cblといった分子に振り分けられて、明帯形成および波状縁形成を惹起する。Casは本論文で述べた所見より主として明帯形成に関与し、一方で、PI-3 kinaseおよびc-Cblは膜輸送に関与するという所見から主として波状縁形成に関与すると予想される(図2)。どのような分子がインテグリンからのシグナルをSrcに伝えるのか、Cas、PI-3 kinase、c-Cblといった分子の下流にはいかなる分子が存在して破骨細胞の機能発現に関与しているのか、さらにRhoとこれらの分子との相互関係はいかなるものなのか、これらの点は今後明らかにされていくものと思われる。

本研究の将来的な目標の1つは、破骨細胞の機能発現のプロセスを解析することで骨粗鬆症などの代謝性骨疾患の病態を明らかにし、その治療法を模索することであった。一般的に、創薬に際しての大きな課題は、いかにして標的臓器以外への作用、いわゆる副作用を減らすかにある。Srcノックアウトマウスの唯一の異常が破骨細胞の機能不全に伴う大理石骨病であることを逆に利用すれば、SrcおよびCasなどのSrcに関連した分子を標的にした薬物は破骨細胞機能を特異的に抑制する可能性がある。本研究が将来、代謝性骨疾患の治療に新しい可能性を与えることができれば幸いである。

謝辞

本論文の作成に当たり次の先生方に感謝いたします。

まず、基礎研究に従事する機会を与えてくださり、さらに終始御懇篤なる御指導と御鞭撻を賜りました東京大学医学部整形外科学教室 黒川高秀教授に心より感謝いたします。また、本研究の遂行に当たり、基礎研究の初歩から指導していただきました昭和大学歯学部生化学教室 須田立雄教授に謹んで感謝いたします。

さらに、終始、御指導と有益な御助言を賜った昭和大学歯学部生化学教室 高橋直之助教授、宇田川信之講師、自見英治郎博士、同病理学教室 山口 朗助教授および東京大学医学部整形外科学教室 田中 栄博士に厚く感謝いたします。また、本論文の作成に当たり、有益な御助言のみならず、終始、暖かい励ましのお言葉をかけていただいた東京大学農学部農芸化学科生物化学教室 福井泰久教授、昭和大学歯学部解剖学教室 佐々木崇寿教授に深謝いたします。

掲載論文

本研究の内容は以下の形で発表した。

第1章

Nakamura, I., Takahashi, N., Sasaki, T., Jimi, E., Kurokawa, T. and Suda, T. (1996).

Chemical and physical properties of the extracellular matrix are required for the actin ring formation in osteoclasts. *J. Bone Miner. Res.* 11, 1873-1879.

第2章

Nakamura, I., Jimi, E., Sasaki, T., Takahashi, N., and Suda, T. (1996). Tyrosine

phosphorylation of p130^{Cas} is involved in the actin reorganization of osteoclasts.

J. Bone Miner. Res. 12, S4 (abstract).

Nakamura, I., Jimi, E., Duong, L. T., Sasaki, T., Takahashi, N., Kurokawa, T., Rodan, G.

A., and Suda, T. Src-dependent tyrosine phosphorylation of p130^{Cas} is required for actin ring

formation in osteoclasts. (*Journal of Cell Science* 誌に投稿中)

引用文献

1. 須田立雄、小沢英浩、高橋英明：骨の科学、医歯薬出版、東京、1985.
2. Kölliker, A. :Die normale Resorption des Knochengewebes und ihre Bedeutung für die Entstehung der typischen Knochenformen. F.C.W. Vogel, Leipzig, 1873.
3. Baron, R. (1989). Molecular mechanisms of bone resorption by the osteoclast. *Anat. Rec.* 224, 317-324.
4. Athanasou, N. A. (1996). Cellular biology of bone-resorbing cells. *J. Bone Joint Surg.* 78A, 1096-1112.
5. Roodman, G. D. (1996). Advances in bone biology: The osteoclast. *Endocr. Rev.* 17, 308-332.
6. Suda, T., Udagawa, N., Takahashi, N. (1996). Cells of bone: Osteoclast generation. *In Principles of bone biology* (ed. J. P. Bilezikian, L. G. Raisz and G. A. Rodan), pp. 87-102. Academic Press, San Diego.
7. Blair, H. C., Teitelbaum, S. L., Ghiselli, R., and Gluck, S. (1989). Osteoclastic bone resorption by a polarized vacuolar proton pump. *Science* 245, 855-857.
8. Väänänen, H. K., Karhukorpi, E. K., Sundquist, K., Wallmark, B., Roininen, I., Hentunen, T., Tuukkanen, J., Lakkakorpi, P. T. (1990). Evidence for the presence of a proton pump of the vacuolar H⁺-ATPase type in the ruffled borders of osteoclasts. *J. Cell Biol.* 111, 1305-1311.
9. Zamboni-Zallone, A., Teti, A., Carano, A. and Marchisio, P. C. (1988). The distribution of podosomes in osteoclasts cultured on bone laminae: Effect of retinol. *J. Bone Miner. Res.* 5, 517-523.
10. Kanehisa, J., Yamanaka, T., Doi, S., Turksen, K., Heersche, J. N. M., Aubin, J. E. and Takeuchi, H. (1990). A band of F-actin containing podosomes is involved in bone resorption by osteoclasts. *Bone* 11, 287-293.
11. Lakkakorpi, P. T. and Väänänen, H. K. (1991). Kinetics of the osteoclast cytoskeleton during the

- resorption cycle in vitro. *J. Bone Miner. Res.* 6, 817-826.
12. Suzuki, H., Nakamura, I., Takahashi, N., Ikuhara, T., Matsuzaki, K., Isogai, Y., Hori, M. and Suda, T. (1996) Calcitonin-induced changes in the cytoskeleton are mediated by a signal pathway associated with protein kinase A in osteoclasts. *Endocrinology* 137, 4685-4690.
13. Teti, A., Marchisio, P. C. and Zamboni-Zallon, A. (1991). Clear zone in osteoclast function: role of podosomes in regulation of bone-resorbing activity. *Am. J. Physiol.* 261, C1-C7.
14. Väänänen, H.K. and Horton, M. (1995). The osteoclast clear zone is a specialized cell-extracellular matrix adhesion structure. *J. Cell Sci.* 108, 2729-2732.
15. Takahashi, N., Akatsu, T., Udagawa, N., Sasaki, T., Yamaguchi, A., Moseley, J. M., Martin, T. J. and Suda, T. (1988). Osteoblastic cells are involved in osteoclast formation. *Endocrinology* 123, 2600-2602.
16. Akatsu, T., Tamura, T., Takahashi, N., Udagawa, N., Tanaka, S., Sasaki, S., Yamaguchi, A., Nagata, N. and Suda, T. (1992). Preparation and characterization of a mouse osteoclast-like multinucleated cell population. *J. Bone Miner. Res.* 7, 1297-1306.
17. Shimizu, H., Sakamoto, S., Sakamoto, M., and Lee, D. D. (1989). The effect of substrate composition and condition on resorption by isolated osteoclasts. *Bone Miner.* 6, 261-275.
18. Shimizu, H., Sakamoto, S., and Sakamoto, M. (1989). Matrix collagen of devitalized bone is resistant to osteoclastic bone resorption. *Conn. Tissue Res.* 20, 169-175.
19. Jones, S. J., Boyde, A., and Ali, N. N. (1984). The resorption of biological and non-biological substrates by cultured avian and mammalian osteoclasts. *Anat. Embryol.* 170, 247-256.
20. Jones, S. J., Boyde, A., Ali, N. N., Maconnachie, E. (1985). A review of bone cell and substratum interactions: An illustration of the role of scanning electron microscopy. *Scanning* 7, 5-24.
21. Hynes, R. O. (1992) Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 69, 11-25.

22. Davies, J., Warwick, J., Totty, N., Philp, R., Helfrich, M. and Horton, M. (1989). The osteoclast functional antigen, implicated in the regulation of bone resorption, is biochemically related to the vitronectin receptor. *J. Cell Biol.* 109, 1817-1826.
23. Reinholt, F. P., Hultenby, K., Oldberg, A., Heinegard, D. (1990). Osteopontin: a possible anchor of osteoclasts to bone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87, 4473-4475.
24. Lakkakorpi, P. T., Horton, M. A., Helfrich, M. H. and Väänänen, H. K. (1991). Vitronectin receptor has a role in bone resorption but does not mediate tight sealing zone attachment of osteoclasts to the bone surface. *J. Cell Biol.* 115, 1179-1186.
25. Nesbitt, S., Nesbit, A., Helfrich, M. and Horton, M. (1993). Biochemical characterization of human osteoclast integrins: osteoclasts express $\alpha_V\beta_3$, $\alpha_2\beta_1$, and $\alpha_V\beta_1$ integrins. *J. Biol. Chem.* 268, 16737-16745.
26. Nakamura, I., Gailit, J. and Sasaki, T. (1996). Osteoclast integrin $\alpha_V\beta_3$ is present in the clear zone and contributes to cellular polarization. *Cell Tissue Res.* 286, 507-515.
27. Silver, I. A., Murrills, R. J. and Etherington, D. J. (1988). Microelectrode studies on the acid microenvironment beneath adherent macrophages and osteoclasts. *Exp. Cell Res.* 175, 266-276.
28. Juliano, R. L. and Haskill, S. (1993). Signal transduction from the extracellular matrix. *J. Cell Biol.* 120, 577-585.
29. Clark, E. A. and Brugge, J. S. (1995). Integrins and signal transduction pathways: The road taken. *Science* 268, 233-239.
30. Soriano, P., Montgomery, C., Geske, R. and Bradley, A. (1992). Targeted disruption of c-src proto-oncogene leads to osteopetrosis in mice. *Cell* 64, 693-702.
31. Hunter, T. and Cooper, J. A. (1985). Protein-tyrosine kinases. *Annu. Rev. Biochem.* 54, 897-930.
32. Horne, W. C., Neff, L., Chatterjee, D., Lomri, A., Levy, J. B. and Baron, R. (1992). Osteoclasts express high levels of pp60^{c-src} in association with intracellular membranes. *J. Cell*

- Biol. 119, 1003-1013.
33. Tanaka, S., Takahashi, N., Udagawa, N., Sasaki, T., Fukui, Y., Kurokawa, T. and Suda, T. (1992). Osteoclasts express high levels of p60^{c-src}, preferentially on ruffled border membranes. FEBS Lett. 313, 85-89.
34. Boyce, B. F., Yoneda, T., Lowe, C., Soriano, P. and Mundy, G. R. (1992). Requirement of pp60^{c-src} expression for osteoclasts to form ruffled border and resorb bone in mice. J. Clin. Invest. 90, 1622-1627.
35. Jimi, E., Ikebe, T., Takahashi, N., Hirata, M., Suda, T. and Koga, T. (1996). Interleukin-1 α activates an NF- κ B-like factor in osteoclast-like cells. J. Biol. Chem. 271, 4605-4608.
36. Matsuda, M., Mayer, B. J., Fukui, Y. and Hanafusa, H. (1990). Binding of transforming protein, p47^{gag-crk}, to a broad range of phosphotyrosine-containing proteins. Science 248, 1537-1539.
37. Mayer, B. J. and Hanafusa, H. (1990). Association of the v-crk oncogene product with phosphotyrosine-containing proteins and protein kinase activity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 87, 2638-2642.
38. Birge, R. B., Fajardo, J. E., Mayer, B. J. and Hanafusa, H. (1992). Tyrosine-phosphorylated epidermal growth factor receptor and cellular p130 provide high affinity binding substrates to analyze crk-phosphotyrosine-dependent interactions in vitro. J. Biol. Chem. 267, 10588-10595.
39. Reynolds, A. B., Kanner, S. B., Wang, H.-C. R. and Parsons, J. T. (1989). Stable association of activated pp60^{src} with two tyrosine-phosphorylated cellular proteins. Mol. Cell. Biol. 9, 3951-3958.
40. Kanner, S. B., Reynolds, A. B., Vines, R. R. and Parsons, J. T. (1990). Monoclonal antibodies to individual tyrosine-phosphorylated protein substrates of oncogene-encoded tyrosine kinases. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 87, 3328-3332.
41. Kanner, S. B., Reynolds, A. B., Wang, H.-C. R., Vines, R. R. and Parsons, J. T. (1991). The

- SH2 and SH3 domains of pp60^{src} direct stable association with tyrosine phosphorylated proteins p130 and p110. *EMBO J.* 10, 1689-1698.
42. Sakai, R., Iwamatsu, A., Hirano, N., Ogawa, S., Tanaka, T., Nishida, J., Yazaki, Y. and Hirai, H. (1994). Characterization, partial purification, and peptide sequencing of p130, the main phosphoprotein associated with v-Crk oncoprotein. *J. Biol. Chem.* 269, 32740-32746.
43. Sakai, R., Iwamatsu, A., Hirano, N., Ogawa, S., Tanaka, T., Mano, H., Yazaki, Y. and Hirai, H. (1994). A novel signaling molecule, p130, forms stable complexes in vivo with v-Crk and v-Src in a tyrosine phosphorylation-dependent manner. *EMBO J.* 13, 3748-3756.
44. Nakamoto, T., Sakai, R., Ozawa, K., Yazaki, Y. and Hirai, H. (1996). Direct binding of C-terminal region of p130^{Cas} to SH2 and SH3 domains of Src kinase. *J. Biol. Chem.* 271, 8959-8965.
45. Polte, T. R. and Hanks, S. K. (1995). Interaction between focal adhesion kinase and Crk-associated tyrosine kinase substrate p130^{Cas}. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92, 10678-10682.
46. Harte, M. T., Hildebrand, J. D., Burnham, M. R., Bouton, A. H. and Parsons, J. T. (1996). p130^{Cas}, a substrate associated with v-Src and v-Crk, localizes to focal adhesions and binds to focal adhesion kinase. *J. Biol. Chem.* 271, 13649-13655.
47. Liu, F., Hill, D. E. and Chernoff, J. (1996). Direct binding of the proline-rich region of protein tyrosine phosphatase 1B to the Src homology 3 domain of p130^{Cas}. *J. Biol. Chem.* 271, 31290-31295.
48. Vuori, K., Hirai, H., Aizawa, S. and Ruoslahti, E. (1996). Induction of p130^{Cas} signaling complex formation upon integrin-mediated cell adhesion; a role for Src family kinases. *Mol. Cell. Biol.* 16, 2606-2613.
49. Hamasaki, K., Mimura, T., Morino, N., Furuya, H., Nakamoto, T., Aizawa, S., Morimoto, C., Yazaki, Y., Hirai, H. and Nojima, Y. (1996). Src kinase plays an essential role in integrin-mediated tyrosine phosphorylation of Crk-associated substrate p130^{Cas}. *Biochem. Biophys. Res.*

Commun. 222, 338-343.

50. Sakai, R., Nakamoto, T., Ozawa, K., Aizawa, S. and Hirai, H. (1997). Characterization of the kinase activity essential for tyrosine phosphorylation of p130^{Cas} in fibroblasts. *Oncogene* 14, 1419-1426.
51. Nojima, Y., Morino, N., Mimura, T., Hamasaki, K., Furuya, H., Sakai, R., Sato, T., Tachibana, K., Morimoto, C., Yazaki, Y. and Hirai, H. (1995). Integrin-mediated cell adhesion promotes tyrosine phosphorylation of p130^{Cas}, a src homology 3-containing molecule having multiple src homology 2-binding motifs. *J. Biol. Chem.* 270, 15398-15402.
52. Vuori, K. and Ruoslahti, E. (1995). Tyrosine phosphorylation of p130^{Cas} and cortactin accompanies integrin-mediated cell adhesion to extracellular matrix. *J. Biol. Chem.* 270, 22259-22262.
53. Petch, L. A., Bockholt, S. M., Bouton, A., Parsons, J. T. and Burridge, K. (1995). Adhesion-induced tyrosine phosphorylation of the p130 SRC substrate. *J. Cell Sci.* 108, 1371-1379.
54. Guan, J. L. and Shalloway, D. (1992). Regulation of focal adhesion-associated protein tyrosine kinase by cellular adhesion and oncogenic transformation. *Nature* 358, 690-692.
55. Burridge, K., Turner, C. E. and Romer, L. H. (1992). Tyrosine phosphorylation of paxillin and p125^{FAK} accompanies cell adhesion to extracellular matrix: a role in cytoskeletal assembly. *J. Cell Biol.* 119, 893-903.
56. Bockholt, S. M. and Burridge, K. (1993). Cell spreading on extracellular matrix proteins induces tyrosine phosphorylation of tensin. *J. Biol. Chem.* 268, 14565-14567.
57. Nakamura, I., Takahashi, N., Sasaki, T., Tanaka, S., Udagawa, N., Murakami, H., Kimura, K., Kabuyama, Y., Kurokawa, T., Suda, T. and Fukui, Y. (1995). Wortmannin, a specific inhibitor of phosphatidylinositol-3 kinase, blocks osteoclastic bone resorption. *FEBS Lett.* 361, 79-84.
58. Nakamura, I., Sasaki, T., Tanaka, S., Takahashi, N., Jimi, E., Kurokawa, T., Kita, Y., Ihara,

- S., Suda T. and Fukui, Y. (1997). Phosphatidylinositol-3 kinase is involved in ruffled border formation in osteoclasts. *J. Cell. Physiol.* 172, 230-239.
59. Tanaka, S., Amling, M., Neff, L., Uhlmann, E., Levy, J. B. and Baron, R. (1996). c-Cbl acts downstream of c-Src in osteoclasts and is required for bone resorption. *Nature* 383, 528-531.
60. Zhang, D., Udagawa, N., Nakamura, I., Murakami, H., Saito, S., Yamasaki, K., Shibasaki, Y., Morii, N., Narumiya, S., Takahashi, N. and Suda, T. (1995). The small GTP-binding protein, rho, is involved in bone resorption by regulating cytoskeletal organization in osteoclasts. *J. Cell Sci.* 108, 2285-2292.

Chemical and Physical Properties of the Extracellular Matrix Are Required for the Actin Ring Formation in Osteoclasts*

ICHIRO NAKAMURA,^{1,2} NAOYUKI TAKAHASHI,¹ TAKAHISA SASAKI,³ EIJIRO JIMI,¹
TAKAHIDE KUROKAWA,² and TATSUO SUDA¹

ABSTRACT

To examine the effect of extracellular matrix on osteoclast polarization, we focused on the actin organization in osteoclasts, using murine osteoclast-like multinucleated cells (OCLs) formed in cocultures of osteoblastic cells and bone marrow cells. When OCLs were cultured on either a plastic plate, calcified dentine, or calcium phosphate thin films in the presence of fetal bovine serum (FBS), they similarly formed ringed structures of F-actin dots (actin rings). However, OCLs placed on demineralized dentine or type I collagen gel matrix (collagen gel) failed to form actin rings. In the absence of FBS, actin ring formation in OCLs was induced on plastic plates coated with vitronectin, fibronectin, or type I collagen, but not on those coated with laminin, poly-L-lysine, or bovine serum albumin. Actin ring formation appeared to depend on integrins, since the GRGDS, but not the GRGES, peptide inhibited it in a dose-dependent manner. Moreover, immunoelectron microscopic examination revealed that vacuolar proton ATPase (V-ATPase) was localized along the apical membrane in much higher densities than the basolateral membrane in OCLs placed on plastic coverslips. In OCLs placed on collagen gel, however, V-ATPase was found to be distributed throughout the cytoplasm without polarity. These results suggest that actin ring formation in osteoclasts was dependent on matrix substrates, matrix proteins and integrins, and was closely related to osteoclast function. (*J Bone Miner Res* 1996;11:1873-1879)

INTRODUCTION

OSTEOCLASTS are primary bone-resorbing cells that play a critical role in bone remodeling.⁽¹⁻⁴⁾ After adhesion to the bone surface, osteoclasts exhibit highly polarized cytoplasmic organizations, forming ruffled borders and clear zones. Therefore, the recognition of extracellular matrix components is an important initial step in osteoclast polarization.⁽⁵⁻⁹⁾ Ruffled borders are formed by numerous deep membrane invaginations, on which vacuolar H⁺-ATPase

(V-ATPase) localizes in much higher densities than on the basolateral membrane.⁽¹⁰⁻¹²⁾ In this sense, V-ATPase is a typical marker of ruffled borders and therefore of polarization in osteoclasts.

The clear zone is formed around the ruffled border and is recognized as a region where the cell membrane comes into very close contact with the surface of the extracellular matrix. This zone actually consists of many distinct close contact points called podosomes, and is observed as a ringed structure of F-actin dots (actin ring) in osteoclasts cultured *in vitro*.⁽¹³⁻¹⁵⁾ Many investigators including our group have reported that osteoclasts exhibit actin rings in a bone-resorbing state,^(13,16-18) but not in a migrating state.^(16,17) Moreover, it has been reported that the disruption of actin rings by calcitonin, dibutyryl cyclic AMP or

*A part of this work was presented at the 16th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research in Baltimore, 1995.

¹Department of Biochemistry, School of Dentistry, Showa University, Tokyo, Japan.

²Department of Orthopedic Surgery, School of Medicine, University of Tokyo, Tokyo, Japan.

³Department of Oral Anatomy, School of Dentistry, Showa University, Tokyo, Japan.

various inhibitors always results in the suppression of pit-forming activity of osteoclasts.⁽¹⁸⁻²¹⁾

In this study, we focused on the actin ring formation and the localization of V-ATPase in osteoclasts to explore the effect of extracellular matrix on osteoclast polarization. Using murine osteoclast-like multinucleated cells formed in cocultures of osteoblastic cells and bone marrow cells, we examined what is essential to actin ring formation and what actin ring formation means in osteoclasts. Here we show that actin ring formation in osteoclasts is dependent on matrix substrates, matrix proteins and integrins, and is closely related to osteoclast function.

MATERIALS AND METHODS

Culture substrates, antibody, and chemicals

Five different substrates were prepared for cell cultures: (1) plastic plates (Corning, Corning, NY, U.S.A.), (2) calcified dentine slices, (3) calcium phosphate thin films formed on quartz plates (Millenium Biologix Inc., Kingston, ON, Canada),⁽²²⁾ (4) type I collagen gel matrix (collagen gel) (Nitta Gelatin Co., Osaka, Japan), and (5) demineralized dentine slices. Dentine slices were prepared as described previously.⁽²³⁾ Some of them were demineralized with 10% EDTA for 3 days and then washed thoroughly in distilled water. Plastic coverslips were obtained from Sumitomo Bakelite Co., Ltd. (Tokyo, Japan). Fibronectin, vitronectin, laminin, and poly-L-lysine were obtained from Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, U.S.A.). Type I collagen solution and 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ (1 α ,25(OH)₂D₃) were purchased from Wako Pure Chemical Co. (Osaka, Japan). GRGDS (Gly-Arg-Gly-Asp-Ser) and GRGES (Gly-Arg-Gly-Glu-Ser) peptides were purchased from the Peptide Institute (Osaka, Japan). Polyclonal antibody against the 72 kD subunit of V-ATPase was kindly provided by Dr. Y. Moriyama (Hiroshima University, Hiroshima, Japan).⁽²⁴⁾ Other chemicals and reagents used in this study were of an analytical grade.

Cell culture

Murine osteoclast-like multinucleated cells (OCLs) were prepared from ddY mice, as reported previously.^(25,26) In short, primary osteoblastic cells obtained from the calvaria of newborn mice, and bone marrow cells obtained from tibiae of 7- to 9-week-old male mice were cocultured in alpha minimum essential medium (α -MEM) containing 10% fetal bovine serum (FBS) and 10 nM 1 α ,25(OH)₂D₃ on culture dishes precoated with 5 ml of 0.2% collagen gel. OCLs were formed within 7 days in culture, removed from the dishes by treatment with 5 ml of 0.2% collagenase (Wako Pure Chemical Co.), and collected by centrifugation at 250g for 5 minutes. The purity of OCLs in this fraction (OCL preparation) was about 2-3%. This preparation was replated on various substrates, such as plastic plates, calcified dentine slices, calcium phosphate thin films, demineralized dentine slices, and collagen gel. Some plastic plates (24 wells) were coated with various proteins for 2 h at 37°C. The plates were then washed three times with α -MEM.

Actin ring formation in OCLs

Actin rings formed in OCLs were visualized with rhodamine-conjugated phalloidin as described before.⁽¹⁸⁾ OCL preparations, cultured either on various substrates for 8 h in the presence of 10% FBS or on plastic plates precoated with various proteins for 3 h in the absence of FBS, were fixed with 3.7% formaldehyde in phosphate buffered saline (PBS) for 10 minutes and permeated with 0.1% Triton X-100 in PBS for 5 minutes. OCLs were stained for tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP), a marker enzyme of osteoclasts. After washing with PBS, F-actin was stained with 0.3 μ M rhodamine-conjugated phalloidin. The distribution of F-actin was detected under a fluorescence microscope (Olympus BX-FLA, Osaka, Japan). An inhibition assay for actin ring formation with the GRGDS peptide was also conducted as described below. OCL preparations were placed on vitronectin, fibronectin, or type I collagen-coated plates in the presence of the GRGDS or GRGES peptide at graded concentrations from 1 to 1000 μ M. After culture for 3 h, cells were fixed and stained as described above.

Electronmicroscopic examination

Immunocytochemical localization of V-ATPase was examined in OCLs placed on plastic coverslips and collagen gel with anti-V-ATPase antibody. OCLs, cultured on either coverslips or collagen gel-coated coverslips for 8 h, were fixed with a mixture of 4% formaldehyde and 0.1% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH 7.3). After fixation, they were dehydrated through a graded ethanol series and embedded in medium grade LR gold resin (London Resin Co., Basingstoke, U.K.). The resin was polymerized below 0°C under ultraviolet rays. Ultrathin sections were prepared with a diamond knife on a Reichert-Jung Ultracut OmU-4 (Tokyo, Japan), mounted on formvar-coated nickel grids, and processed for immunocytochemistry as described below. The sections were first treated with saturated aqueous sodium meta-periodate for 30 minutes, followed by blocking nonspecific binding of antiserum with 1% bovine serum albumin (BSA) in PBS for 60 minutes. The sections were then incubated overnight at 4°C with rabbit polyclonal antibody against V-ATPase diluted to 1:250 with 10% BSA in PBS. After incubation and washing with PBS, the sections were incubated for 1 h with goat anti-rabbit IgG conjugated with 10 nm colloidal gold particles (BioCell Research Laboratories, Cardiff, U.K.) for detecting the localization of anti-V-ATPase antibody. Immunogold particle solution was diluted to 1:100 with PBS. All of these procedures were carried out in a moisture chamber. After rinsing with PBS and distilled water, the sections were stained with 2% uranyl acetate and examined in a Hitachi HU-12A electron microscope (Tokyo, Japan) at 75 kV.

Semiquantification was performed on the pictures. The length of the plasma membrane was measured with a Cosmosome program (Nikon, Tokyo, Japan), and immunogold particles were counted within 0.5- μ m-wide areas along the plasma membrane in OCLs.

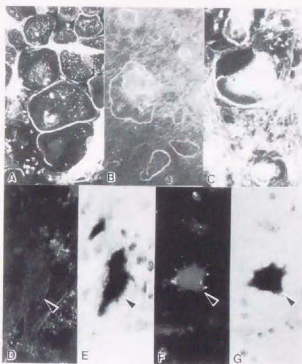


FIG. 1. Actin ring formation in OCLs placed on various substrates in the presence of 10% FBS. In the presence of 10% FBS, OCL preparations were placed on (A) plastic plates, (B) calcified dentine, (C) calcium phosphate thin films, (D, E) demineralized dentine, or (F, G) collagen gel. After culture for 8 h, cells were fixed and stained for F-actin with rhodamine-conjugated phalloidin (A-D, F). To recognize OCLs in (D, F), cells were stained for TRAP in (E, G), respectively. Note that actin ring formation was observed in OCLs on plastic plates, calcified dentine and calcium phosphate, but not on demineralized dentine and collagen gel. (A, B, $\times 87.5$; C-G, $\times 175$).

RESULTS

Actin ring formation is dependent on extracellular matrix

To examine the effects of extracellular matrix on actin ring formation in OCLs, OCL preparations were placed on various substrates in the presence of 10% FBS. When OCL preparations were placed on dentine slices, actin ring formation was first observed after culture for 4 h, and the number of OCLs having actin rings reached maximum at 8 h (data not shown). Therefore, cells were stained for F-actin after culture for 8 h. Actin ring formation was observed in OCLs on plastic plates, calcified dentine, and calcium phosphate, but not on demineralized dentine and collagen gel (Fig. 1). OCLs formed resorption pits on both dentine slices and calcium phosphate thin films (data not shown).

Actin ring formation is dependent on matrix proteins

The effects of matrix proteins on actin ring formation in OCLs were examined using plastic plates precoated with

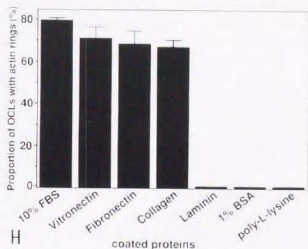
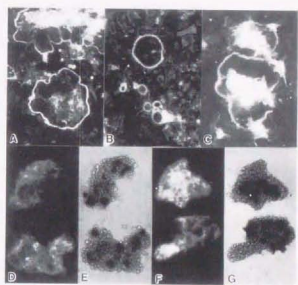


FIG. 2. Effects of matrix proteins on actin ring formation in OCLs. In the absence of FBS, OCL preparations were placed on plastic plates precoated with either (A) 20 μ g/ml of vitronectin, (B) 20 μ g/ml of fibronectin, (C) 20 μ g/ml of type I collagen, (D, E) 20 μ g/ml of laminin, or (F, G) 1% BSA. After culture for 3 h, cells were fixed and stained for F-actin with rhodamine-conjugated phalloidin (A-C, D, F). To recognize OCLs in (D, F), cells were stained for TRAP in (E, G), respectively. Note that actin ring formation in OCLs was induced on plastic plates precoated with vitronectin, fibronectin, or type I collagen, but not with BSA or laminin. (H) The proportion of OCLs having actin rings to TRAP-positive OCLs was scored. The results are expressed as the means \pm SD in quadruplicate cultures. More than 100 OCLs were evaluated in each well. (A-G, $\times 87.5$).

various proteins. In the presence of 10% FBS, more than 80% of OCLs formed actin rings on plastic plates after culture for 3 h. Therefore, actin ring formation was evaluated at 3 h. In the absence of FBS, approximately 70% of OCLs formed actin rings on vitronectin (20 μ g/ml), fi-

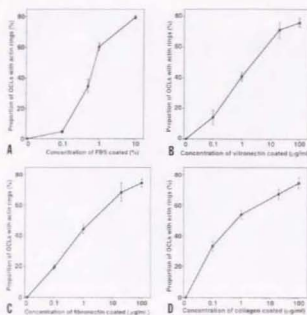


FIG. 3. Dose-dependent effects of matrix proteins on actin ring formation in OCLs. In the absence of FBS, OCL preparations were placed on plastic plates precoated with (A) FBS, (B) vitronectin, (C) fibronectin, and (D) type I collagen diluted to the graded concentrations indicated. After culture for 3 h, cells were fixed and stained with rhodamine-conjugated phalloidin. The results are expressed as the means \pm SD of the proportion of OCLs having actin rings to TRAP-positive OCLs in triplicate cultures. More than 50 OCLs were examined in each well. *Significantly different from the control group, $p < 0.01$.

bronectin (20 μ g/ml), or type I collagen (20 μ g/ml)-coated plates (Figs. 2A–2C and 2H). These proteins induced actin ring formation in a dose-dependent manner, and these dose-dependent profiles were very similar (Fig. 3). In contrast, on laminin (20 μ g/ml), 1% BSA, or poly-L-lysine-coated plates, no OCLs having actin rings were observed (Figs. 2D–2G and 2H). The total number of TRAP-positive OCLs on all these proteins was not changed significantly (data not shown).

Effects of the GRGDS peptide on actin ring formation in OCLs

Several studies have indicated that integrin $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_1$, and β_3 subunits are expressed in osteoclasts.^{17,27–29} Therefore, we tested the inhibitory effects of the RGD peptide on actin ring formation in OCLs on vitronectin, fibronectin, or type I collagen-coated plates. Actin ring formation on these proteins was inhibited dose dependently by the synthetic peptide GRGDS (Fig. 4). However, the GRGDS peptide did not affect actin ring formation in OCLs on type I collagen-coated plates. Similar results were obtained in OCLs on vitronectin and fibronectin-coated plates (data not shown). These findings suggest that actin ring formation in osteoclasts is dependent on the RGD sequence present

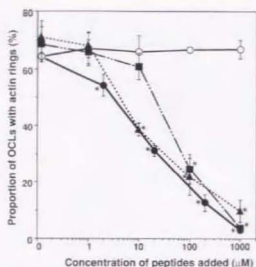


FIG. 4. Effects of the GRGDS peptide on actin ring formation in OCLs on matrix proteins. In the absence of FBS, OCL preparations were placed on plastic plates precoated with 20 μ g/ml of vitronectin (A), 20 μ g/ml of fibronectin (B), or 20 μ g/ml of type I collagen (C) with the synthetic GRGDS (A, B, C) or GRGES (C) peptide. After culture for 3 h, cells were fixed and stained with rhodamine-conjugated phalloidin. The results are expressed as the means \pm SD of the proportion of OCLs having actin rings to TRAP-positive OCLs in quadruplicate cultures. More than 100 OCLs were evaluated in each well. *Significantly different from the group treated without the peptide, $p < 0.01$.

in vitronectin, fibronectin and type I collagen, and is mediated by integrins expressed on osteoclasts.

Distribution of vacuolar proton ATPase in OCLs placed on plastic coverslips and collagen gel

Osteoclasts in a bone-resorbing state express V-ATPase on their ruffled border membranes with polarity.^{139–142} To examine polarization of OCLs, the localization of V-ATPase was examined in OCLs on plastic coverslips and collagen gel-coated coverslips by immunoelectron microscopy with anti-V-ATPase antibody. In OCLs on plastic coverslips, specific labeling with immunogold particles was detected in higher densities along the apical membrane than along the basolateral membrane (Figs. 5A and 5C). However, in OCLs on collagen gel, V-ATPase was distributed without polarity (Figs. 5B and 5D). Table I shows the semiquantification of immunoreactivity of V-ATPase. In OCLs on plastic coverslips, the density of gold particles observed along the apical membrane (42.9 gold particles/ μ m² of the membrane) was much greater than the density observed along the basolateral membrane (13.0 gold particles/ μ m² of the membrane). In OCLs on collagen gel, the density of gold particles along the apical membrane (16.2 gold particles/ μ m² of the membrane) was not significantly different from that along the basolateral membrane (16.0 gold particles/ μ m² of the membrane).

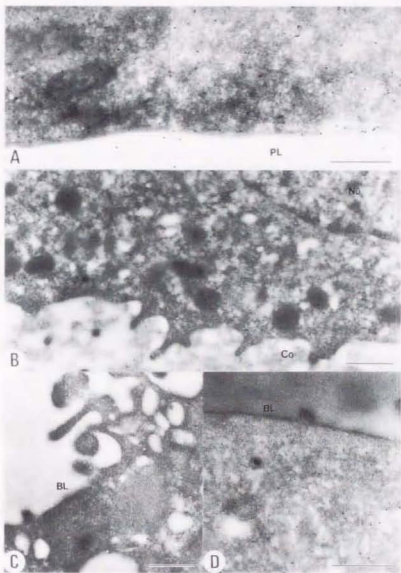


FIG. 5. Localization of vacuolar proton ATPase in OCLs placed on plastic coverslips and collagen gel. OCL preparations were cultured on (A, C) plastic coverslips or collagen (B, D) gel-coated coverslips for 8 h. Ultrathin sections of cells were incubated with rabbit polyclonal anti-vacuolar proton ATPase antibody and processed for immunocytochemical localization of vacuolar proton ATPase with goat anti-rabbit IgG conjugated with 10 nm colloidal gold particles. BL, basolateral membrane; PL, plastic coverlip; Co, collagen gel; Nu, nucleus. Bars = 0.5 μ m. (A, D \times 50,000; B, C \times 37,500).

DISCUSSION

In this study, we have shown what is essential to actin ring formation in osteoclasts. We first showed that OCLs formed actin rings on plastic plates, calcified dentine, and calcium phosphate in the presence of 10% FBS, but not on demineralized dentine or collagen gel (Fig. 1). This suggests that actin ring formation in OCLs is substrate dependent. Second, we examined which proteins are necessary for actin ring formation. In the absence of FBS, OCLs formed actin rings on plastic plates coated with vitronectin, fibronectin, or type I collagen, but not on those coated with laminin, BSA, or poly-L-lysine (Figs. 2 and 3). Moreover, actin ring formation was inhibited by adding the synthetic peptide GRGDS (Fig. 4), suggesting that actin ring formation in OCLs was dependent on the RGD sequence and mediated by integrins. Third, OCLs on plastic plates formed actin rings and exhibits polarity as to the distribution of V-ATPase (Figs. 1 and 5). Since actin rings have been thought to correspond to

clear zones, which are the polarized cell-to-extracellular matrix adhesion structures,¹³⁵ these findings suggest that OCLs polarize even on plastic plates, and that actin ring formation is one of the indicators of osteoclast functional activity.

The present study appears important in the following two issues. First, bone matrix proteins are not necessarily required for actin ring formation and polarization in osteoclasts. There have been some reports that bone matrix is essential for osteoclast polarization.^{136,137} However, Chambers et al. reported that rabbit osteoclasts could form resorption pits on anorganic bone.¹³⁷ Jones et al. also reported that osteoclasts could resorb not only bone and dentine, but also enamel, avian egg shells, and oyster shells.^{133,134} We showed here that OCLs could form actin rings even on calcium phosphate. These previous findings, together with our own, indicate that bone matrix proteins are not necessarily required for osteoclasts to obtain their polarity and to exhibit bone-resorbing activity. Moreover,

TABLE 1. SEMIQUANTIFICATION OF THE IMMUNOREACTIVITY FOR VACUOLAR PROTON ATPase IN OCLs*

Substrates	Observed areas	Number of gold particles per μm^2 of membranes (mean \pm SD)	Total length of membranes measured (μm)
OCLs on plastic coverslip	basolateral ($n = 8$)	$13.0 \pm 1.4^{\dagger}$	44.6
	apical ($n = 8$)	$42.9 \pm 8.4^{\dagger}$	34.7
OCLs on collagen gel	basolateral ($n = 10$)	16.0 ± 3.1	42.3
	apical ($n = 10$)	16.2 ± 2.8	39.3

* Semiquantification of the immunoreactivity for vacuolar proton ATPase in osteoclasts was performed on the pictures. The length of the plasma membrane was measured with a Cosmosem program (Nickon) and immunogold particles were counted within 0.5- μm -wide areas along the plasma membrane in osteoclasts.

[†] Significantly different from the group † , $p < 0.01$.

the present study showed that OCLs could form actin rings and polarize, even on plastic plates, as long as some specific proteins containing the RGD sequence are present. Silver et al. demonstrated that the space between firmly attached osteoclasts and glass cover slips was kept at a lower pH than that of the culture medium.⁽³⁵⁾ All these findings suggest that some proteins containing the RGD sequence are necessary for actin ring formation and polarization in osteoclasts. Recently it was reported that adhesion of avian osteocytes to collagens was RGD independent.⁽³⁶⁾ Another different adhesive mechanism may be operating in osteocytes. Further studies are needed to answer the difference of the adhesion mechanisms between the two cells.

The second point is that the RGD sequence contained in proteins is necessary but not sufficient for actin ring formation and polarization in osteoclasts. Although OCLs formed actin rings on plastic plates coated with type I collagen solution, they could not form actin rings on collagen gel even in the presence of FBS, which contains proteins having the RGD sequence such as vitronectin. Also, OCLs could not form actin rings on demineralized dentine. Chambers et al. reported that osteoclasts formed resorption pits on dentine, but not on demineralized bone and osteoid, suggesting that osteoclasts do not polarize on demineralized tissues.⁽³⁷⁾ These findings suggest that some physical properties of the matrix components, such as rigidity, hardness, or roughness, may be necessary for actin ring formation and polarization in osteoclasts, in addition to the RGD sequence. There is another possibility that collagen gel or demineralized dentine form a mesh-like structure on which focal adhesion points of cells may be spaced too far apart and that OCLs can not adhere to these substrates in a fashion allowing for actin ring formation. Interestingly, dentine could induce both actin ring formation in OCLs and stress fiber formation in osteoblastic cells (Fig. 1B). However, demineralized dentine could not induce actin ring formation but could induce stress fiber formation (Fig. 1D). Moreover, BSA-coated plastic plates could induce neither actin rings nor stress fibers (Fig. 2F). These findings suggest that various substrates have different effects on different cells. In the future, it may be necessary to explore what kinds of substrate properties

are most critical for the cytoskeletal reorganization in various cells.

In conclusion, our study indicates that both several proteins containing the RGD sequence and some physical properties of the matrix components are essential for actin ring formation and polarization in osteoclasts, and that actin ring formation in osteoclasts is closely related to osteoclast function.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Yoshinori Moriyama (Hiroshima University) for providing us with the anti-vacuolar H⁺-ATPase antibody. This work was supported partially by Grants-in-Aid (0544507, 05557082, and 07557118) from the Ministry of Education, Science, and Culture of Japan.

REFERENCES

- Chambers TJ, Revell PA, Fuller K, Athanasou NA 1984 Resorption of bone by isolated rabbit osteoclasts. *J Cell Sci* 66:383-399.
- Baron R, Neff L, Louvard D, Courty JP 1985 Cell-mediated extracellular acidification and bone resorption: Evidence for a low pH in resorbing lacunae and localization of a 100-kD lysosomal membrane protein at the osteoclast ruffled border. *J Cell Biol* 101:2210-2222.
- Blair HC, Kahn AJ, Crouch EC, Jeffrey JJ, Teitelbaum L 1986 Isolated osteoclasts resorb the organic and inorganic components of bone. *J Cell Biol* 102:1164-1172.
- Suda T, Takahashi N, Martin TJ 1992. Modulation of osteoclast differentiation. *Endocrine Rev* 13:66-80.
- Oldberg A, Franzen A, Heinegard D 1986 Cloning and sequence analysis of rat bone sialoprotein (osteopontin) cDNA reveals an Arg-Gly-Asp cell-binding sequence. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:8819-8823.
- Davies J, Warwick J, Totty N, Philp R, Helfrich M, Horton M 1989 The osteoclast functional antigen, implicated in the regulation of bone resorption, is biochemically related to the vitronectin receptor. *J Cell Biol* 109:1817-1826.
- Reinholt FP, Hultenby K, Oldberg A, Heinegard D 1990 Osteopontin: A possible anchor of osteoclasts to bone. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:4473-4475.
- Lakkakorpi PT, Horton MA, Helfrich MH, Väänänen HK 1991 Vitronectin receptor has a role in bone resorption but

- does not mediate tight sealing zone attachment of osteoclasts to the bone surface. *J Cell Biol* 115:1179-1186.
9. Helfrich MH, Nesbitt SA, Dorey EL, Horton MA 1992 Rat osteoclasts adhere to a wide range of RGD (Arg-Gly-Asp) peptide-containing proteins, including the bone sialoproteins and fibronectin, via a $\beta 3$ integrin. *J Bone Miner Res* 7:335-343.
 10. Blair HC, Teitelbaum SL, Ghiselli R, Gluck S 1989 Osteoclastic bone resorption by a polarized vacuolar proton pump. *Science* 245:855-857.
 11. Väänänen HK, Karhukorpi EK, Sundquist K, Wallmark B, Rönkänen I, Hentunen T, Tuukkanen J, Lakkakorpi PT 1990 Evidence for the presence of a proton pump of the vacuolar H^+ -ATPase type in the ruffled borders of osteoclasts. *J Cell Biol* 111:1305-1311.
 12. Sasaki T, Hong MH, Udagawa N, Moriyama Y 1994 Expression of vacuolar H^+ -ATPase in osteoclasts during cytodifferentiation and its role in resorption. *Cell Tissue Res* 278:265-271.
 13. Turksen K, Kanelisa J, Opas M, Heersche JNM, Aubin JE 1988 Adhesion patterns and cytoskeleton of rabbit osteoclasts on bone slices and glass. *J Bone Miner Res* 4:389-400.
 14. Teti A, Marchisio PC, Zamboni-Zallone A 1991 Clear zone in osteoclast function: Role of podosomes in regulation of bone-resorbing activity. *Am J Physiol* 261:C1-C7.
 15. Väänänen HK, Horton M 1995 The osteoclast clear zone is a specialized cell-extracellular matrix adhesion structure. *J Cell Sci* 108:2729-2732.
 16. Lakkakorpi PT, Väänänen HK 1996 Cytoskeletal changes in osteoclasts during the resorption cycle. *Microsc Res Tech* 33: 171-181.
 17. Lakkakorpi PT, Väänänen HK 1991 Kinetics of the osteoclast cytoskeleton during the resorption cycle in vitro. *J Bone Miner Res* 6:817-826.
 18. Zhang D, Udagawa N, Nakamura I, Murakami H, Saito S, Yamasaki K, Shibasaki Y, Morii N, Narumiya S, Takahashi N, Suda T 1995 The small GTP-binding protein, rho, is involved in bone resorption by regulating cytoskeletal organization in osteoclasts. *J Cell Sci* 108:2285-2292.
 19. Tanaka S, Takahashi N, Udagawa N, Murakami H, Nakamura I, Kurokawa T, Suda T 1995 Possible involvement of focal adhesion kinase, p125^{FAK}, in osteoclastic bone resorption. *J Cell Biochem* 58:424-435.
 20. Nakamura I, Takahashi N, Sasaki T, Tanaka S, Udagawa N, Murakami H, Kimura K, Kihayama Y, Kurokawa T, Suda T, Fukui Y 1995 Wortmannin, a specific inhibitor of phosphatidylinositol-3 kinase, blocks osteoclastic bone resorption. *FEBS Lett* 361:79-84.
 21. Lakkakorpi PT, Väänänen HK 1990 Calcitonin, prostaglandin E_2 , and dibutyryl cyclic adenosine 3',5'-monophosphate disperse the specific microfilament structure in resorbing osteoclasts. *J Histochem Cytochem* 38:1487-1493.
 22. Davies JE, Shapiro G, Lowenberg BF 1993 Osteoclastic resorption of calcium phosphate ceramic thin films. *Cells Mater* 13:245-256.
 23. Tamura T, Takahashi N, Akatsu T, Sasaki T, Udagawa N, Tanaka S, Suda T 1995 A new resorption assay with mouse osteoclast-like multinucleated cells formed in vitro. *J Bone Miner Res* 8:953-960.
 24. Moriyama Y, Nelson N 1989 Cold inactivation of vacuolar proton-ATPases. *J Biol Chem* 264:3577-3582.
 25. Takahashi N, Akatsu T, Udagawa N, Sasaki T, Yamaguchi A, Moseley JM, Martin TJ, Suda T 1988 Osteoblastic cells are involved in osteoclast formation. *Endocrinology* 123:2600-2602.
 26. Akatsu T, Tamura T, Takahashi N, Udagawa N, Tanaka S, Sasaki T, Yamaguchi A, Nagata N, Suda T 1992 Preparation and characterization of a mouse osteoclast-like multinucleated cell population. *J Bone Miner Res* 7:1297-1306.
 27. Zamboni-Zallone A, Teti A, Grano M, Rubianacci A, Abbadini M, Gaboli M, Marchisio P 1989 Immunohistochemical distribution of extracellular receptors in human osteoclasts: a integrin colocalized with vinculin and talin in the podosomes of osteosarcoma giant cells. *Exp Cell Res* 182:645-652.
 28. Hughes DE, Salter DM, Dedhar S, Simpson R 1993 Integrin expression in human bone. *J Bone Miner Res* 8:527-533.
 29. Nesbitt S, Nesbitt A, Helfrich M, Horton M 1993 Biochemical characterization of human osteoclast integrins: Osteoclasts express $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_2\beta_1$, and $\alpha_3\beta_1$ integrins. *J Biol Chem* 268:16737-16745.
 30. Shimizu H, Sakamoto S, Sakamoto M, Lee DD 1989 The effect of substrate composition and condition on resorption by isolated osteoclasts. *Bone Miner* 6:261-275.
 31. Zimolo Z, Wesolowski G, Rodan GA 1995 Acid extrusion is induced by osteoclast attachment to bone: Inhibition by alendronate and calcitonin. *J Clin Invest* 96:2277-2283.
 32. Chambers TJ, Thomson BM, Fuller K 1984 Effect of substrate composition on bone resorption by rabbit osteoclasts. *J Cell Sci* 70:61-71.
 33. Jones SJ, Boyde A, Ali NN 1984 The resorption of biological and non-biological substrates by cultured avian and mammalian osteoclasts. *Anat Embryol* 170:247-256.
 34. Jones SJ, Boyde A, Ali NN, Macconnachie E 1985 A review of bone cell and substratum interactions: An illustration of the role of scanning electron microscopy. *Scanning* 7:5-24.
 35. Silver IA, Murrills RJ, Etherington DJ 1988 Microelectrode studies on the acid micro-environment beneath adherent macrophages and osteoclasts. *Exp Cell Res* 175:266-276.
 36. Aarden EM, Nijweide PJ, Van Der Plas A, Alblas MJ, Mackie EJ, Horton MA, Helfrich MH 1996 Adhesive properties of isolated chick osteocytes in vitro. *Bone* 18:305-313.

Address reprint requests to:
Tatsuo Suda, D.D.Sc., Ph.D.
Department of Biochemistry
School of Dentistry
Showa University
1-5-8 Hatanodai
Shinjyawa-ku, Tokyo 142, Japan

Received in original form May 6, 1996; in revised form July 5, 1996; accepted July 23, 1996.



