

博士論文番号： 0581007

初代破骨前駆細胞の新規分化誘導系の開発

川田 滋久

奈良先端科学技術大学院大学
バイオサイエンス研究科 細胞増殖講座
(竹家 達夫 教授)

平成 19 年 12 月 25 日 提出

目次

要旨	3
序論	5
材料と方法	12
結果	18
考察	45
謝辞	52
参考文献	53

所属 (主指導教員)	バイオサイエンス研究科 細胞増殖学講座 (竹家 達夫 教授)		
氏名	川田 滋久	提出	平成 19年 12月 25日
題目	初代破骨前駆細胞の新規分化誘導系の開発		
<p>骨代謝は、破骨細胞による古い骨基質の吸収反応と、骨芽細胞による新しい骨基質の形成反応の相互応答的な機構（骨リモデリング）によって維持されている。骨粗鬆症をはじめとする骨疾患の多くが骨吸収の異常亢進に起因することから、破骨細胞は各種骨疾患の治療法開発における標的細胞として、その分化および骨吸収活性の制御機構に関する研究が盛んに行われている。破骨細胞は単球 - マクロファージ系列の前駆細胞に由来し、生存因子 M-CSF と分化因子 RANKL の作用を受け、単核破骨細胞への分化、細胞融合による多核化、骨吸収能の活性化を経て、成熟破骨細胞へと至る。マウス破骨細胞の分化・成熟過程に関しては、初代細胞や前駆細胞株が利用可能であることから、詳細な研究が多く行われているものの、未だ多くの解明すべき点が残されている。一方、ヒト破骨細胞に関しては、適切な前駆細胞株が無いことや、初代細胞の入手における限界に加え、<i>in vitro</i>での分化・成熟にも 10-14 日間という比較的長期間の培養を必要とすることなどの理由により、あまり研究が進んでいない。このことから、ヒト細胞を用いた効率的な成熟破骨細胞分化誘導系の構築は、骨代謝研究において非常に有用な手段を提供するものと考えられる。</p> <p>そこで私は、1) 初代マウス骨髄細胞からの破骨前駆細胞株樹立と解析を行うことで基本技術を確認し、2) ヒト初代破骨前駆細胞の培養系構築について研究を行い、ヒト破骨細胞の新規分化誘導系の構築を試みた。</p> <p>【結果と考察】</p> <p>1) 初代マウス骨髄細胞からの破骨前駆細胞株樹立と解析</p> <p>マウスの骨髄細胞を調製し、M-CSF と RANKL 添加による成熟破骨細胞への分化誘導系を確立した。マウス骨髄から M-CSF 依存性増殖を示す細胞集団を調製し、温度感受性 SV40 Large T 抗原 (tsLT) 遺伝子の導入による不死化について検討を行った。レトロウィルスベクターを用いて取得した tsLT 安定発現細胞は、tsLT 発現許容温度において M-CSF 依存的な増殖を示し、少なくとも 1 年以上は培養可能であった。フローサイトメトリーにより細胞表面抗原を解析した結果、既に報告されている破骨前駆細胞と同様、抗 CD11b/Mac-1 抗体、抗 F4/80 抗体による染色が、共に陽性であった。次に、得られた不死化細胞の破骨細胞分化能について検討するため、許容温度において分化刺激を行ったところ、分化マーカーである酒石酸耐性酸性フォスファターゼ (TRAP) 活性は陽性を示したものの、多核細胞の形成効率に</p>			

低下が見られた。破骨細胞分化段階での表面抗原を再度解析したところ、各細胞の分化段階に差異が生じていることが認められた。そこで、不死化細胞集団より限外希釈により単一コロニー由来の細胞株を複数取得後、各細胞株の分化能を再度検討した結果、TRAP 陽性多核細胞に分化可能な破骨前駆細胞株の取得に成功した。以上より、マウス初代骨髄細胞中の M-CSF 依存的に生存・増殖する細胞集団は均一ではなく、破骨細胞分化において各細胞間の細胞融合能には差異があることが示唆された。また、マウス破骨細胞の研究上有用なツールとなりうる破骨前駆細胞株を樹立出来たことから、ガン遺伝子導入による不死化法が分化能を有する破骨前駆細胞株の樹立に有効であることも実証された。

2) ヒト初代破骨前駆細胞の培養系構築

マウスでの系の応用を考え、ヒト初代骨髄細胞からヒト成熟破骨細胞への分化を誘導したものの、効率的な分化誘導には至らなかった。この原因として、ヒト細胞とマウス細胞の骨髄中の細胞組成の違いなどが考えられた。そこで、ヒト初代骨髄細胞の中から至適条件下で破骨前駆細胞の存在比率を高め、さらに細胞表面抗原を指標に特定細胞集団を分離することで、破骨前駆細胞取得の効率が改善されるのではないかと考え、Methocult 培養法と抗体標識磁性粒子による細胞分取方法 (MACS) を組み合わせることで、ヒト破骨前駆細胞の純化を試みた。Methocult 培養法により得られた細胞集団は、培養前に比べて細胞数が 80 倍以上に増幅しており、ヒト破骨前駆細胞マーカーの一つである CD14 陽性の細胞の比率も増加していることが確認された。得られた細胞群を破骨細胞分化条件下で培養したところ、6 日間という比較的短期間に TRAP 陽性の多核細胞へと分化誘導可能であることが確認された。またこの細胞群を、破骨細胞分化阻害剤であるシクロスポリン A 存在下で分化誘導を行った結果、1 ug/mL で多核化に阻害が認められた。次に、Methocult 培養法により得られた細胞群に対し、レトロウイルスによる遺伝子の導入を実施し、導入遺伝子の発現を確認した。導入遺伝子発現細胞は CD14 陽性であったため、さらに、MACS により濃縮した CD14 陽性細胞への遺伝子導入について検討した結果、ヒト細胞においても破骨前駆細胞への遺伝子導入が可能であることが実証された。

【まとめ】

本研究では、初代骨髄細胞から効率的に成熟破骨細胞を得る分化誘導系の構築を行った。マウス細胞においては、細胞外からガン遺伝子を導入することで細胞を不死化し、破骨前駆細胞株を得る手法を開発した。この方法により、特定の増殖因子を培地に加えることで、破骨細胞に分化することができる前駆細胞を株化できることを示した。また、株化したマウス破骨前駆細胞には、破骨細胞分化において多核化に違いのあるポピュレーションが含まれることを見出した。ヒト細胞においては、初代ヒト骨髄細胞からの効率的な成熟破骨細胞への分化誘導系を構築した。この系を用いることで初代骨髄細胞に比べ破骨細胞分化能を持つ細胞を 80 倍以上に増幅可能であり、分化日数の短縮も実現できた。また、得られた細胞にレトロウイルスによる遺伝子導入が可能であることを示した。近年、これまでに行われてきたマウス細胞を用いた破骨細胞研究が、ヒト細胞を用いる研究にシフトしてきており、今回の成果はヒト破骨細胞研究を行う上での有用な手段として期待される。また、ヒト破骨細胞を標的とした治療法開発における前臨床試験の代替手段としても期待できると考える。

序論

1) 骨代謝

骨組織は身体を支える支持組織であり、カルシウムの貯蔵庫でもある。また、造血環境の提供という機能もある。骨組織は、身体の成長が停止した後も、骨代謝と呼ばれる代謝を繰り返している。骨代謝は、破骨細胞による古い骨基質の吸収反応と、骨芽細胞による新しい骨基質の形成反応の相互応答的な機構（骨リモデリング）によって維持されている。この骨形成と骨吸収のバランスは、破骨細胞と骨芽細胞という二種類の細胞により厳密に制御されている(Boyle et al., 2003)。この二種類の細胞の活動で保たれているバランスが崩れると、骨粗鬆症や大理石骨病などが発症する(Karsenty, 2003)。骨粗鬆症をはじめとする骨疾患の多くが骨吸収の異常亢進に起因することから、破骨細胞は各種骨疾患の治療法開発における標的細胞として、その分化および骨吸収活性の制御機構に関する研究が盛んに行われている。

2) 破骨細胞

破骨細胞は、骨吸収能を持つ多核の巨細胞である。破骨細胞は単球 - マクロファージ等のミエロイド系列の前駆細胞に由来し、生存因子 M-CSF (macrophage colony-stimulating factor) と分化因子 RANKL (receptor activator of NF-kappaB ligand) の作用を受け、単核破骨細胞への分化、細胞融合による多核化、骨吸収能の活性化を経て、成熟破骨細胞へと至る(参考図.1)。このように破骨細胞の成熟過程は、多くの段階を経ることが知られているが、各過程での分子メカニズムについてはまだ不明な点が多く存在する(Boyle et al., 2003)。

2-1) マウス破骨細胞分化誘導系

株化細胞を用いた、マウス破骨細胞の *in vitro* 分化誘導系としては、マウス単球 - マクロファージ系細胞株である RAW264.7 を用いて、可溶性 RANKL により破骨細胞が分化誘導されることが、最初に報告された(Hsu et al., 1999)。当研究室でも同系統の RAW264 細胞株を、大腸菌で発現させた可溶性 RANKL で刺激することによって、破骨細胞へ分化誘導する系を構築している(Ishida et al., 2002)。この系は破骨細胞の単一培養系として確立されており、前駆細胞から活性型成熟破骨細胞への分化過程における mRNA、タンパク質の発現や活性を厳密に解析できる。

また同様な例として、さまざまな細胞株の樹立(Lidington et al., 2002)

に利用されている SV40 tsT 抗原のトランスジェニックマウス(Jat et al., 1991)を用いた破骨前駆細胞の株化も報告されている(Takeshita et al., 2000; Obinata, 2001)。

2-2) ヒト破骨細胞分化誘導系

ヒト破骨細胞の *in vitro* 分化誘導系としては、抹消血の単球 - マクロファージ系細胞を用いた初代細胞の分化誘導系が報告されている (Matsuzaki et al., 1998)。これまでに解析されてきたヒト破骨細胞の *in vitro* 分化誘導系は、ほとんどが抹消血の単球 - マクロファージ系細胞を用いた初代細胞の分化誘導系であり、成熟破骨細胞への分化日数も 7 日から 20 数日とさまざまである (Matsuzaki et al., 1998; Shalhoub et al., 1999)。

抹消血の単球 - マクロファージ系細胞を用いた初代細胞の分化誘導系では、CD14 陽性細胞が効率良く成熟破骨細胞に分化することが報告されており (Nicholson et al., 2000)、MACS (Magnetic Cell Sorting) を用いて抹消血中の CD14 細胞を純化し、アッセイ系を安定化させる方法も用いられている (Shinoda et al., 2003)。この方法では、成熟破骨細胞への分化に 10 日から 14 日ほどを要している。また、ヒト破骨前駆細胞 (Osteoclast Precursor Cells : OPCs) も販売されており (TaKaRa)、6 日ほどで成熟破骨細胞へ分化するが、分化効率は 20-30% である。また、ヒト破骨前駆細胞 (OPCs) は非常に高価であるため、網羅的な解析を行うには適していない。遺伝子導入に関しても、非常に効率が悪く、ヒト破骨細胞研究を困難にしている要因である。一方、ヒト骨髓細胞を用いた *in vitro* ヒト破骨細胞の分化誘導系としては、ヒト骨髓細胞とヒト骨芽細胞の共培養系が報告されている (Karpov et al., 2007)。しかし、マウスのような破骨前駆細胞株は報告されておらず、ヒト破骨前駆細胞株の樹立が望まれている。

3) SV40 T 抗原

SV40(simian virus 40)は、アカゲザル腎細胞から分離されたポリオーマウイルス属のウイルスである。マウスなどのげっ歯類細胞でトランスフォーメーションを起こすため、がんウイルスとして盛んに研究されてきた (Sullivan and Pipas, 2002)。トランスフォーメーションの際には、SV40 DNA は細胞ゲノムに組み込まれ、オルタネイティブ・スプライシングにより、Large T 抗原 (LT) と Small T 抗原 (ST) という二つの癌遺伝子を発現する (Rundell and Parakati, 2001)。ST は protein phosphatase 2A (PP2A) を不活性化することにより、細胞のシグナル伝達経路に関与していることが報告されている (Pallas et al., 1990)。LT は p53 (Lane and Crawford, 1979)、

pRB(DeCaprio et al., 1988)等の癌抑制遺伝子産物を不活性化し、マウス初代繊維芽細胞を不死化することが知られている(Jat and Sharp, 1986)。近年、このSV40 T抗原の温度感受性変異体(temperature-sensitive T antigen: tsT)を利用し、細胞の不死化を制御する様々な報告がされている(Berns et al., 2004; Hardy et al., 2004)。

温度感受性変異のあるSV40 T抗原は、培養温度条件依存的にウイルス(SV40)感染細胞の溶解速度が変化することで発見された(Tegtmeyer and Ozer, 1971)。また、感染細胞でのウイルス(SV40)産生が培養温度条件依存的に変化することも示された(Tegtmeyer, 1972)。後に、この温度感受性変異(tsA58)のあるSV40 T抗原(tsT抗原)を発現させ、不死化した細胞において、tsT抗原は、許容温度下の33.5℃では安定的に発現し、細胞の増殖を促進するが、非許容温度下の39.0℃では分解され、細胞の増殖を停止することが報告された(Jat and Sharp, 1989)。

4) 造血系細胞の培養 *in vitro*コロニー法

造血細胞(骨髄細胞・脾細胞等)を、各種サイトカイン存在下にメチルセルロース、軟寒天等の半固形培地中で培養し、形成された細胞集団(コロニー)から、造血幹細胞の数や性質を推定する方法である(参考図.2)。このコロニーを分析することにより、*in vitro*において種々の造血前駆細胞や、造血幹細胞の分化・増殖過程の観察および測定が可能である(Spangrude et al., 1988; Ogawa, 1993)。この方法により、*in vitro*において造血幹細胞や、前駆細胞の増殖・分化過程をとらえることができる(Spangrude et al., 1988; Ogawa, 1993)。更に、近年では無血清培地を用いて、造血幹細胞の単細胞培養を行うことにより、造血に關与する種々のサイトカインの作用を推定することができるようになってきている(Morrison et al., 1987)。

Methocult (VERITAS)は、造血系細胞の成育が最適になるように調整された、メチルセルロースをベースとした造血前駆細胞コロニー測定用の培地である。中でもMethocult GF H4534は、顆粒球・マクロファージ系列の前駆細胞であるCFU-GM (Colony Forming Unit Granulocyte Macrophage)を濃縮することが可能である(Shed et al., 2006)。

5) 本研究の目的

破骨細胞の分化や骨吸収の研究を進めるためには、*in vivo*の解析と共に*in vitro*でのアプローチが必要である。マウス破骨細胞の分化・成熟過程に関しては、初代細胞や前駆細胞株が利用可能であることから、詳細な研究が多く行われているものの、未だ多くの解明すべき点が残されている。一方、

ヒト破骨細胞に関しては、適切な前駆細胞株が無いことや、初代細胞の入手における限界に加え、*in vitro*での分化・成熟にも10-14日間という比較的長期間の培養を必要とすることなどの理由により、あまり研究が進んでいない。

以上の課題から、ヒト細胞を用いた効率的な成熟破骨細胞分化誘導系の構築は、骨代謝研究において非常に有用な手段を提供するものと考えられる。

そこで私は、1) 初代マウス骨髄細胞からの破骨前駆細胞株樹立と解析を行うことで基本技術を確立し、2) ヒト初代破骨前駆細胞の培養系構築について研究を行い、ヒト破骨細胞の新規分化誘導系の構築を試みた。

5-1) 初代マウス骨髄細胞からの破骨前駆細胞株樹立と解析

当研究室では、マウス単球・マクロファージ由来のRAW264細胞を、可溶性のRANKLで刺激することにより、*in vitro*で効率的かつ高純度な破骨細胞を分化・誘導できる系が確立している(Ishida et al., 2002)。また、tsT抗原トランスジェニックマウスを用いた破骨前駆細胞株の樹立も報告されている(Takeshita et al., 2000)。しかし、RAW264細胞はガン化したマウスの組織より樹立された細胞であり、tsT抗原トランスジェニックマウスから作成された細胞株と同様に、ヒト細胞株樹立への応用が困難である。

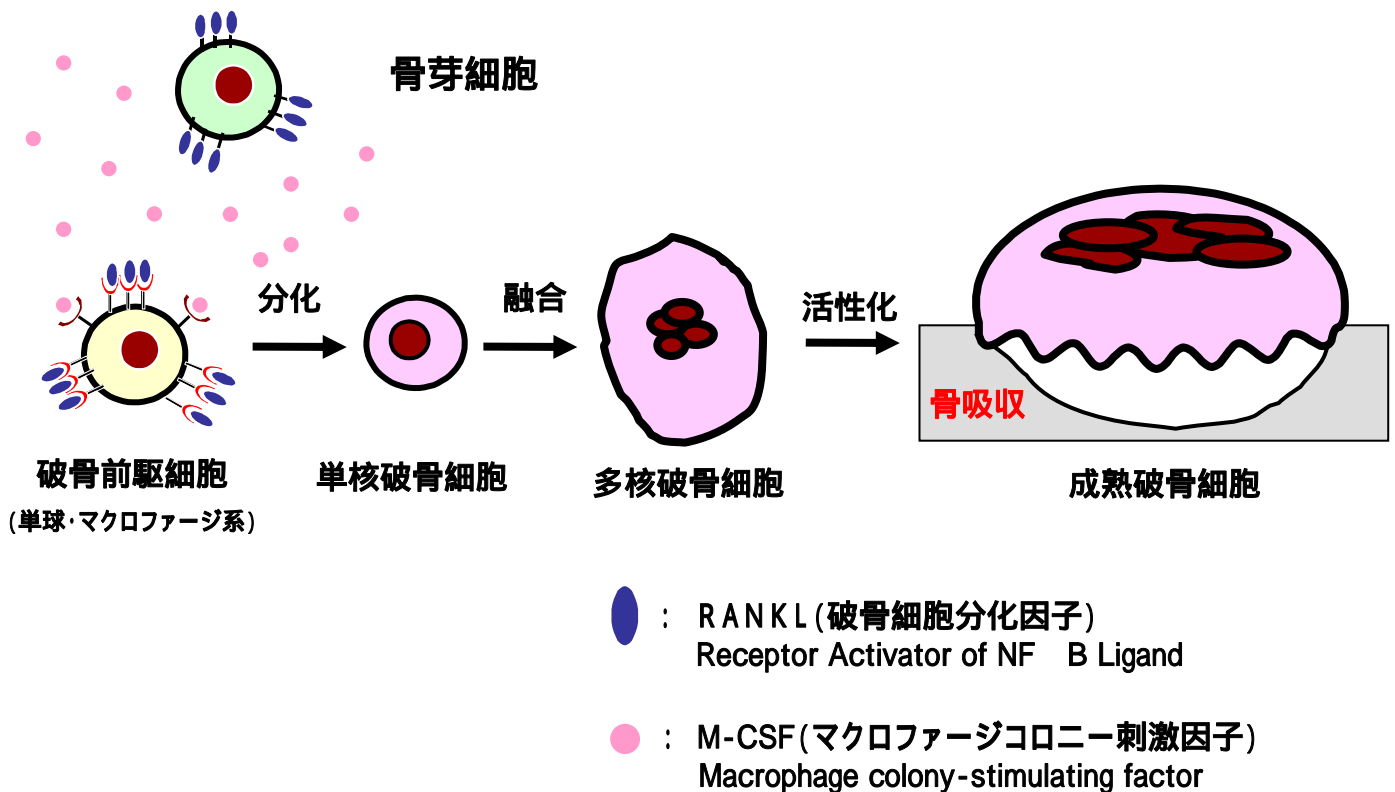
ヒト細胞への応用や、より*in vivo*に近い状態での系の構築という課題から、我々はレトロウィルスを用いてtsT抗原を発現し、培養温度条件依存的に細胞を不死化する手法を構築した。この手法はレトロウィルスを用いることで細胞外から遺伝子を導入できる。この手法を用いて細胞外から遺伝子導入を行い、細胞を不死化することによって、遺伝子欠損マウスへの応用や、初代培養細胞系で行われているヒト破骨細胞研究への応用も期待できた。

5-2) ヒト初代破骨前駆細胞の培養系構築

ヒト破骨細胞の*in vitro*分化誘導系としては、現在までに抹消血の単球・マクロファージ系細胞を用いた初代細胞の分化誘導系が主に用いられている(Shalhoub et al., 1999)。近年、MACS(Magnetic Cell Sorting)を用いて抹消血中のCD14細胞を純化し10-14日前後で分化誘導を行うアッセイ系も用いられている(Shinoda et al., 2003)。また、6日ほどで成熟破骨細胞へ分化するヒト破骨前駆細胞(Osteoclast Precursor Cells: OPCs)も販売されているが(TaKaRa)分化効率は20-30%であり、非常に高価である。これらの系は、遺伝子導入に関しても困難である。

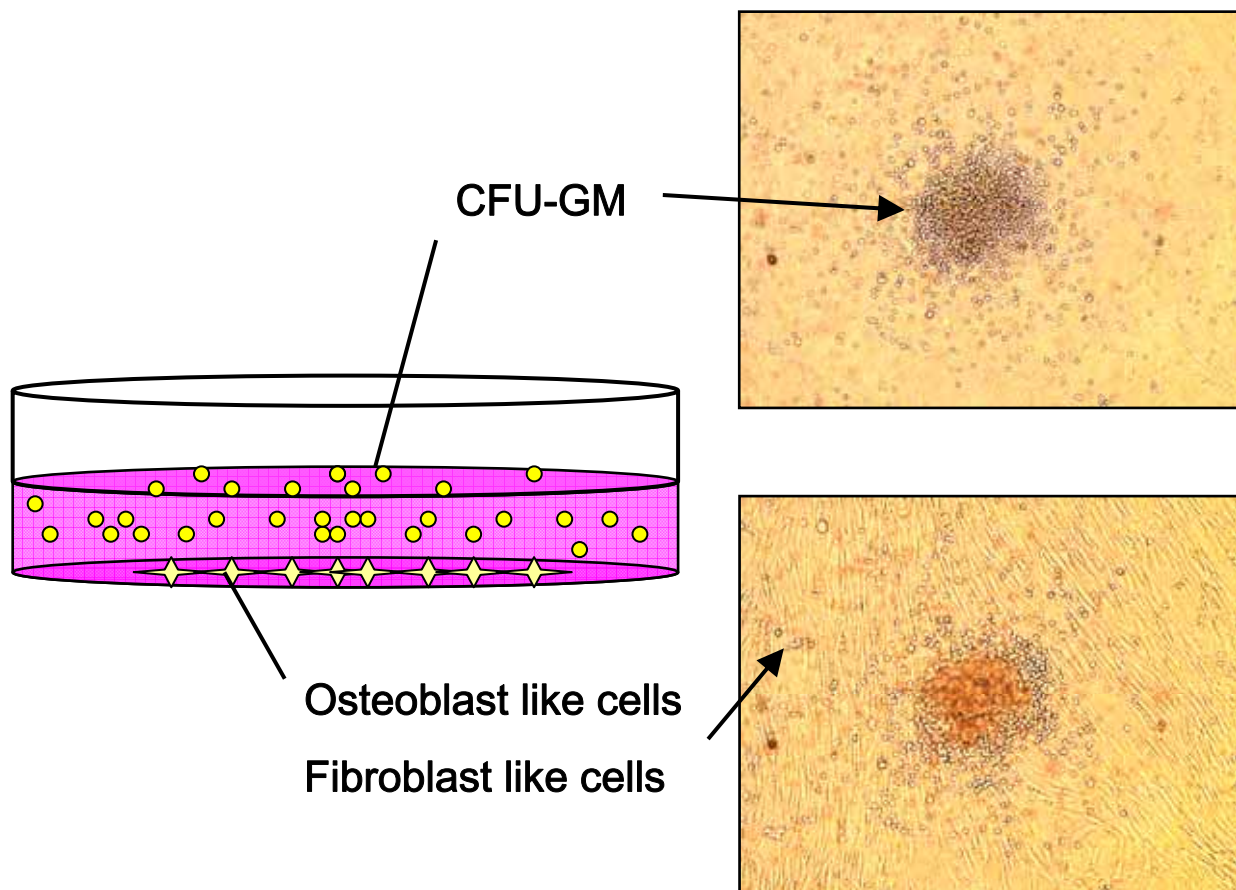
本研究では、レトロウィルスでの遺伝子導入を目的とし、ヒト初代抹消血より増殖能力の高いヒト初代骨髄単核(白血球画分)細胞(Human Bone Marrow

Mononuclear Cells : hBMMNCs) (TaKaRa) を用いて実験を行った。ヒト初代骨髄単核細胞 (hBMMNCs) は、 *in vitro* コロニー法 (Methocult (VERITAS) 培養) を用いて前駆細胞を濃縮し、 MACS (Magnetic Cell Sorting) 法を用いて細胞を純化することで効率良くヒト破骨前駆細胞を得る手法を開発した。また、得られた細胞にレトロウイルスによる遺伝子導入が可能であることを示した。



参考図.1 破骨細胞の分化制御

単球・マクロファージ由来の破骨前駆細胞 (Osteoclast Precursor Cells : OPCs) は、骨芽細胞等が発現する破骨細胞分化因子 (RANKL)、およびマクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF) の刺激により分化を開始する。その分化過程において、破骨前駆細胞は、単核の破骨細胞へと分化し、細胞融合を経て多核破骨細胞へ分化する。多核破骨細胞は、細胞骨格を再構成し、骨吸収能を有する成熟破骨細胞となる。



参考図.2 造血系細胞の培養 *in vitro*コロニー法

造血細胞（骨髄細胞・脾細胞等）を、各種サイトカイン存在下にメチルセルロース、軟寒天等の半固形培地中で培養し、形成された細胞集団（コロニー）から造血幹細胞の数や性質を推定する方法である。Methocult（VERITAS）は、造血系細胞の成育が最適になるように調整された、メチルセルロースをベースとした造血前駆細胞コロニー測定用の培地である。中でもMethocult GF H4534は、顆粒球・マクロファージ系列の前駆細胞であるCFU-GM

（colony-forming unit granulocyte-macrophage）を濃縮することが可能である。繊維芽細胞様細胞や骨芽細胞様細胞は、シャーレの底面に接着することで増殖し（写真下）、顆粒球・マクロファージ系列の前駆細胞であるCFU-GMは、メチルセルロース中に浮遊状態で増殖する（写真上）。

材料と方法

1) tsLT プラスミド作成

pZipneo SV40 tsT ベクター (Jat and Sharp, 1989) を Template とし、インサートを取り除いたエキソン部分 (エキソン 1, 2) を PCR で増幅した。生成したエキソン 1, 2 フラグメントを Template とし、エキソン 1 の 5' 末端プライマーとエキソン 2 の 3' 末端プライマーを用いて PCR で増幅することで tsLT 抗原 (temperature sensitive Large T antigen; tsLT) のフラグメントを作成した。このフラグメントをレトロウィルスベクター pCX4 puro (Akagi et al., 2000) に挿入し、tsLT 抗原を発現するウィルスベクターの構築を行った。使用したプライマーは以下に示した (Suzuki et al., 2004)。挿入配列は DNA シークエンサーによって確認し、遺伝子組み換えウィルス作成に用いた。

プライマー配列

エキソン 1

5' 末端 : ggatccagatggataaagttttaacagagag

3' 末端 : ccataggttggaatctcagttgcatcccagaagcct

エキソン 2

5' 末端 : ggatgcaactgagattccaacctatggaactgatgaat

3' 末端 : ggatccttatgtttcaggttcaggttcagggggag

2) M-CSF conditioned medium (M-CSF CM) 作成

M-CSF 発現ベクター pCAhMCSF (RDB: 1524, RIKEN DNA Bank (Niwa et al., 1991)) を、Fugene 6 (Roche) を用いて、NIF3T3 細胞にトランスフェクションした。発現ベクターを導入した細胞に 1mg/ml の G418 を用いて薬剤選択を行い、クローニングを行った。得られた細胞を播種・培養し、confluent の状態で培地交換を行った。72 時間後、上澄み液を回収し 0.8 μm フィルターを通した液を M-CSF CM とした。

3) マウス初代骨髄細胞採取

15 ~ 21 週令の SPF (specific pathogen-free) マウスの大腿骨より初代骨髄細胞を採取した。細胞は PBS に懸濁させ、Ficoll-Parque Plus (Amersham Biosciences) を用いた遠心分離法により、白血球画分のみを分取した (Noble and Cutts, 1967)。この細胞群をマウス骨髄単核細胞 (mBMMNCs) とした。培地は、非働化した 10% FBS (fetal bovine serum) と 1% antibiotics を加

えた DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) に、2) で作成した M-CSF CM を 2% 添加して使用した。培養には、培養温度 33.5 °C、CO₂ 濃度 5% のインキュベーターを用いた。

4) 遺伝子組み換えウイルス作成

pCX4 puro tsLT ベクターと、組み換えウイルス作成に必要な gag, pol を発現する pGP ベクターと、マウス細胞に対してはエコトロピック env を発現する pEco ベクター、ヒト細胞に対してはアンフォトロピック env を発現する pEanpho ベクターを、Fugene 6 (Roche) を用いて、Platinum-E 細胞 (東大 北村先生より分与) (Morita et al., 2000) にトランスフェクションした。33.5 °C、CO₂ 濃度 5% で 48 時間培養した上澄み液を回収した後、0.2 μm フィルターを通しウイルス液を作成した。ウイルス実験は全て P2 実験室で行った。

5) 遺伝子組み換えエコトロピックウイルスを用いた遺伝子導入

採取・培養したマウス初代骨髄単核細胞 (mBMMNCs) を 5×10^4 cells/ml で 35mm プレートに 2ml 播種し、24 時間培養後、遺伝子組み換えエコトロピックウイルス 200 μl を添加し 72 時間感染させた。新しい培地に交換し、72 時間培養した後、3 μg/ml puromycin で 48 時間薬剤選択を行い、不死化細胞 MDBMT (M-CSF dependent bone marrow cells immortalized by tsLT) を得た。

6) 不死化細胞 (MDBMT) のクローニング

細胞 (MDBMT) をトリプシン処理し、スクレーパーで掻きとった後、限界希釈法により、96well プレートに 1 細胞が播種されるように調整し、クローン細胞を得た。得られた 7 つのクローン細胞は、フェノタイプにより二つの細胞株に分類し、MBC-1 と MBC-2 とした。

7) 培養温度条件依存的な細胞増殖実験

細胞 (MDBMT、MBC-1、MBC-2) をトリプシン処理し、スクレーパーで掻きとった後、 5×10^4 cells/ml で 35mm プレートに 2ml 播種した。播種して 24 時間後の細胞を、33.5 °C、CO₂ 濃度 5% と 39.0 °C、CO₂ 濃度 5% のインキュベーターで培養し、24, 48, 72 時間後の細胞数をカウントした。それぞれの培養細胞サンプルは独立した 3 つの実験で行い、平均値を示した。

8) 免疫プロット

培養温度条件依存的細胞増殖実験で用いた培養細胞サンプルを免疫プロットした (Suzuki et al., 2004)。各培養細胞サンプルは、プレートの培地を

取り除き、PBS で洗淨後、MAPK Lysis Buffer (1% Triton X-100, 10mM tris-Cl pH 7.6, 50mM Sodium Chloride, 30mM Sodium Diphosphate Decahydrate, 50mM Sodium Fluoride, 20mM β -glycero phosphate, 1mM EDTA, 1mM EGTA) に 1mM Sodium Vanadate, 1mM PMSF in isopropanol, 1/1000 aprotinin を添加した Lysis Buffer に溶解し抽出液を得た。得られた抽出液の濃度を BCA Protein Assay Reagent (PIERCE) で測定し、定量した。濃度を調整した抽出液サンプルに Sample buffer (20% Glycerol, 10% SDS, 250mM Tris-HCl pH6.7, β -Mercaptoethanol, Bromophenol Blue) を加え、105 °C で 5 分ボイルした。分析を行いたい大きさのタンパク質に合わせた濃度のアクリルアミドゲルを作成し、30mA で泳動を行った。泳動の終わったゲルと濾紙、及びメタノール処理を行った転写膜 (PVDF) をトランスファーバッファー (3.025% Tris, 14.4% Glycine, 0.1% SDS) に 5 分間浸し、転写装置 (Trans-blot SD semi-dry transfer cell: BIO-RAD) に濾紙、転写膜、ゲル、濾紙の順でセットし、ゲル 1 枚につき 40mA で 90 分間転写した。転写終了後、転写膜をブロッキング液で 1 時間ブロッキングした後、一次抗体と 2 時間以上反応させた。ブロッキング液と、一次抗体反応液 [抗 Large T 抗体 (PharMingen pAB101)、抗 NFAT2 抗体 (Santa Cruz Biotechnology 7A6) と抗 actin 抗体 (Sigma Ac-74)] は、5% スキムミルクを添加した TBST (50mM Tris pH7.6, 137mM NaCl, 0.1% Tween20) と 5% BSA を添加した PBS を用いた。反応終了後、TBST で転写膜を十分洗淨し、TBST で 10000 倍希釈した二次抗体で 1 時間反応させた。TBST で転写膜を十分洗淨した後、ECL plus (Amersham Pharmacia) を用い、X 線フィルム (FUJI FILM) でシグナルを検出した。

9) 表面抗原の解析

FACSCan (BD Biosciences) を用いて細胞の表面抗原解析を行った。操作は機器付属のマニュアルに従った。細胞はトリプシン処理し、スクレーパーで掻きとった後、 5×10^6 cells/ml で PBS に懸濁し、 $0.5 \mu\text{g/ml}$ に調整した抗表面抗原抗体を氷上で 60 分間反応させた。PBS で洗淨後、 1×10^5 cells/ml で PBS に懸濁し、FACSCan で測定した。

使用した抗表面抗原抗体

[マウス]

anti-CD11b(Mac-1)-PE (PharMingen)

anti-F4/80(BM8)-FITC (BMA)

anti-CD25-PE-Cy5 (eBiosciences)

[ヒト]

anti-CD4-PE (eBiosciences)

anti-CD8a-PE-Cy7 (eBiosciences)
anti-CD11b-PE (eBiosciences)
anti-CD14-PerCP (BD Biosciences)
anti-CD19- PE-Cy7 (eBiosciences)
anti-CD34- PerCP-Cy5.5 (BD Biosciences)

10) *in vitro* マウス破骨細胞分化誘導系

細胞 (MDBMT、MBC-1、MBC-2) をトリプシン処理し、スクレーパーで掻きとった後、 1×10^5 cells/ml で 35mm プレートに 2ml 播種した。播種して 24 時間後に、当研究室で調整された可溶性 GST-RANKL (Meiyanto et al., 2001) 250 μ g/ml と、比較標準として GST を 250 μ g/ml 添加した培地に交換し、破骨細胞への分化誘導を開始した。4 日後に GST-RANKL または GST を含む新鮮な培地と交換し、24 時間後 TRAP 染色を行った。

11) 酒石酸耐性酸生フォスファターゼ (TRAP) 染色

Tartrate acetate buffer (1M acetic acid, 0.026M tartaric acid pH5.2) と Naphtol AB-BI phosphate (12.5mg/ml in Tartrate acetate buffer) を 24:1 の容積比率で混合し、Fast garnet GBC を適量加えて 0.8 μ m のフィルターに通し、TRAP 染色液を作成した。破骨細胞への分化誘導後、培地を取り除き PBS で洗浄し、MeOH を加え細胞を固定した。MeOH を取り除き乾燥させた後、TRAP 染色液を加え、37 °C で 30 分間反応させた。TRAP 染色液を取り除き、洗浄した後、乾燥させ光学顕微鏡で観察した。

12) 細胞周期解析

細胞培養を行っている培地に 2 μ g/ml BrdU (bromo-deoxy-uridine) を添加し、30 分間培養を行い細胞に BrdU を取り込ませた。トリプシン処理し、スクレーパーで掻きとった後、氷冷 70% EtOH を加え、-30 °C で細胞を 1 時間固定した。PBS で洗浄し、2N HCl で 20 分間反応させ DNA を単鎖化した後、ホウ酸・ホウ砂緩衝液 (pH9.0) で中和した。PBS で洗浄し、0.5% TritonX100 を添加した PBS に懸濁した後、0.5 μ g/ml anti-BrdU FITC (Chemicon) を添加し 10 分間、反応を行った。さらに 0.5 μ g/ml RNase を添加し、30 分間反応し RNA を分解した後、0.5 μ g/ml PI (propidium iodide) を添加し DNA を染色した。10 分後、PBS で洗浄し、適量の PBS で懸濁した後、FACSCan にて測定した。

13) 細胞老化解析

4) で作成した MDBMT をトリプシン処理し、スクレーパーで掻きとった後、 1×10^5 cells/ml で 35mm プレートに 2ml 播種した。播種して 24 時間後に、39.0、CO₂ 濃度 5% のインキュベーターで培養した。72 時間後に senescence detection kit (BioVision Inc.) を用いて、細胞固定し、 α -galactosidase (SA- β -gal) 活性を測定した。SA- β -gal 陽性率は、100 細胞中の陽性細胞をカウントした。それぞれの培養細胞サンプルは独立した 3 つの実験で行い、平均値を示した。

14) 細胞遊走

細胞 (MBC-1、MBC-2) をトリプシン処理し、スクレーパーで掻きとった後、 5×10^6 cells/ml になるように無血清の DMEM にサスペンドし、24well chemotaxis chamber (5- μ m pore size; Corning Coaster) の upper chamber に 100 μ l 播種した。lower chamber には、100 ng/ml M-CSF (SIGMA) を添加した無血清の DMEM を入れ、33.5、CO₂ 濃度 5% で 3 時間培養した。培養後、遊走していない細胞を綿棒で取り除き、Deff-Quick (Kokusai-Shiyaku) を用いて遊走細胞を固定・染色し、光学顕微鏡で観察した。遊走細胞は、任意に区切ったエリアの細胞をカウントした。それぞれの培養細胞サンプルは独立した 3 つの実験で行い、平均値を示した。

15) *in vitro* ヒト破骨細胞分化誘導系

ヒト細胞 (ヒト初代骨髄単核 (白血球画分) 細胞 [Human Bone Marrow Mononuclear Cells: hBMMNCs] (TaKaRa))、Methocult 培養法により得た CFU-GM (Colony Forming Unit Granulocyte Macrophage) 細胞、CD14 陽性細胞を、 1×10^5 cells/ml で 96well プレートに 100 μ l 播種した。培地には、MEM [10%FBS, 1%antibio] に 30ng/ml の rh(recombinant human)M-CSF (PEPROTECH) を添加して用いた。播種して 24 時間後に、ヒト破骨前駆細胞分化培地 (TaKaRa) に交換し、破骨細胞への分化誘導を開始した。3 日後に新鮮な培地と交換し、さらに 3 日後 TRAP 染色を行った。

16) Methocult 培養法による細胞濃縮

ヒト初代骨髄単核細胞 (hBMMNCs) 2.5×10^7 cells (TaKaRa) を MEM [10%FBS, 1%antibio, 200pg/ml rhGM-CSF (TechnoGene)] 25ml/15cm plate で 7 日間培養した。浮遊細胞のみ回収し、 5×10^5 cells/ml に細胞溶液を調整後、Methocult GF H4534 (Iscoves MDM, 1% Methylcellulose, 30% FBS, 1% BSA, 10^{-4} M 2-ME, 2mM L-glutamine, 50ng/ml Stem cell factor, 10ng/ml GM-CSF, 10ng/ml IL-3 含有) 1ml に対して細胞溶液 0.1ml を入れ、注射器を用いて混

合した。混合液は 6cm plate に 2ml 播種し、15cm plate に 3 枚入れて、1 枚は水を入れることで湿度を保った。37℃、5% CO₂、湿度 95% で 14-16 日間培養した後、冷 PBS によって培地をシャーレより剥がし、CFU-GM (Colony Forming Unit Granulocyte Macrophage) 細胞を回収した。

17) MACS (Magnetic Cell Sorting) による細胞分取

Methocult 培養法によって得られた CFU-GM (Colony Forming Unit Granulocyte Macrophage) 細胞を、80 μl の MACS バッファー (×1 PBS pH7.2, 0.5% BSA (FBS 等でも良い), 2mM EDTA) にサスペンドし (MAX 1×10⁷ cells)、20 μl の CD14 マイクロビーズ溶液を加えた。十分に攪拌し、15 分間、4-8℃ でインキュベート後、1-2ml の MACS バッファーを加え、洗浄した。反応後の細胞を 500 μl の MACS バッファーにサスペンドし (MAX 1×10⁸ cells)、MACS 用カラムを磁石にセットした。MACS 用カラムを MACS バッファーでリンスし、細胞懸濁液をアプライした。ラベルされていない細胞を回収後、MACS バッファーで三回、洗浄後、MACS 用カラムを磁石から外し、固定した回収用チューブにセットした。1ml の MACS バッファーをアプライし、すぐにフランジャー (注射器の押す部分) で細胞懸濁液を押し出すことで CD14 陽性細胞を回収した。

18) 遺伝子組み換えアンフォトロピックウイルスを用いた遺伝子導入

15) 16) によって採取・培養した細胞を 1×10⁵ cells/ml で 12well プレートに 1ml 播種し、24 時間培養後、遺伝子組み換えアンフォトロピックウイルス 50 μl を添加し、72 時間感染させた。新しい培地に交換し、24 時間培養した後、トリプシン処理し、スクレーパーで掻きとり、FACScan を用いて GFP の蛍光を測定した。

結果

1) tsLT 抗原を用いたマウス初代骨髄細胞からの不死化細胞の樹立

マウスの初代骨髄細胞中には、破骨細胞に分化する能力がある細胞が含まれており、その細胞は M-CSF 依存的に生存・増殖する(Takahashi et al., 1991)。また、tsT トランスジェニックマウスからの破骨前駆細胞株樹立も報告されている(Takeshita et al., 2000)。このマウスから採取された細胞には恒常的に T 抗原が発現しているが、Large T 抗原だけでなく Small T 抗原も発現している。Small T 抗原の能力については不明な点が多く、現在研究が進められているが、Large T 抗原の存在下で、Small T 抗原は細胞の増殖能力や足場非依存性に関与するとの報告もある(Hahn et al., 2002)。そこで私は、Large T 抗原のみを培養温度条件依存的に発現する tsLT 遺伝子(Fig.1)を作成した。tsLT 抗原タンパク質は、LT 抗原タンパク質と比べて、438 番目の Ala が Val になっている (Fig.2 A)。作成した tsLT 抗原のゲノム配列には、LT 抗原ゲノムに対して 888, 1063, 1313 番目の塩基配列にサイレントミューテーションがあった (Fig.2 B)。げっ歯類細胞に感染する遺伝子組み換え(エコトロピック)レトロウィルスを用いることで、細胞外から tsLT 遺伝子を初代マウス繊維芽細胞 (MEF) に導入した。tsLT 抗原を導入することで MEF が温度条件依存的に不死化するのを確認した (data not shown)。

次に、マウスの初代骨髄細胞を採取し、Ficoll-Parque Plus (Amersham Biosciences)を用いた遠心分離法により、白血球画分のみを分取した(Noble and Cutts, 1967)。この細胞群をマウス骨髄単核細胞 (Mouse Bone Marrow Mononuclear Cells: mBMMNCs) とし、以降の実験を行った。

mBMMNCs に、M-CSF と RANKL を加えることで、mBMMNCs からの成熟破骨細胞への分化誘導系を確立した。mBMMNCs に、M-CSF 存在下で組み換えレトロウィルスを感染し、細胞外から tsLT 抗原を導入することで、マウス破骨前駆細胞群を培養温度条件依存的に不死化した。この不死化細胞群は、M-CSF 存在下で 1 年以上培養することが可能であった。また、M-CSF 非存在下では、増殖・生存しなかった (data not shown)。不死化したマウス骨髄単核細胞 (mBMMNCs) を MDBMT (M-CSF dependent bone marrow cells immortalized by tsLT) と名づけ、以降の実験を行った。

まず始めに MDBMT が培養温度条件依存的に増殖制御するかを確認するため、細胞増殖実験を行った (Fig.3 A)。35mm プレートに細胞を播種し、33.5 と 39.0 の温度条件で 24 時間ごとの細胞数を計測した。結果から 33.5 の温度条件では細胞の増殖が観察された。一方、39.0 の温度条件では細胞は増

殖せず、若干減少傾向が観察された (Fig.3 A)。さらに、33.5 と 39.0 の温度条件で 24 時間ごとの細胞抽出液を回収し、Large T 抗原の発現レベルをウエスタンブロットにより確認したところ、33.5 の温度条件では恒常的に発現していた。一方、39.0 の温度条件では 24 時間後から消失が始まり、72 時間後にほとんど消失した (Fig.3 B)。

2) マウス骨髄由来 M-CSF 依存性不死化細胞 MDBMT の培養温度変化における細胞周期変化

樹立した不死化細胞群 MDBMT が、培養温度条件依存的に増殖・あるいは増殖が停止している時点で、細胞周期の状態を確認するために、DNA の PI 染色による DNA content の割合と、BrdU の取り込み量の変化を調べた。

33.5 の温度条件で、24 時間培養した細胞では、G0/G1 期状態の細胞分布が 49.5%、G2/M 期状態の細胞分布が 16.6%であった。また、BrdU を取り込み、DNA の合成を行っていると考えられる S 期状態の細胞分布は 30.3%であった。さらに、Sub G1 と思われる細胞分布が 0.1%確認された。39.0 の温度条件で、24 時間培養した細胞では、G0/G1 期状態が 53.4%と若干上昇した。また、G2/M 期状態が 30.1%であり、上昇傾向が見られた。一方、S 期状態は 7.6%となり、BrdU の取り込み低下が見られた。さらに、Sub G1 と思われる細胞分布は 0.9%となり上昇傾向が確認された (Fig.4 A)。

同様に、72 時間後の各温度条件の細胞状態を調べた。33.5 の温度条件では、G0/G1 期状態が 55.4%となり、24 時間後に比べて若干増加傾向であった。また、G2/M 期状態は 16.0%であり、24 時間後に比べて若干減少傾向であった。また、S 期状態は 26.6%であった。さらに、Sub G1 と思われる細胞分布が 0.1%確認された。33.5 の温度条件では、24 時間後と 72 時間後において、大きな差異は見いだせなかった。39.0 の温度条件では、G0/G1 期状態が 45.7%とかなりの低下が見られた。また、G2/M 期状態は 35.5%と若干増加傾向であったが、S 期状態は 7.0%であり、大きな変化は観察されなかった。しかし、Sub G1 と思われる細胞分布は 1.8%と上昇傾向であった (Fig.4 A)。

MDBMT が 39.0 の温度条件において、72 時間後も完全に死滅しなかったことから (Fig.3 A) 細胞老化状態を調べた。結果、39.0 の温度条件において、72 時間後の細胞の状態は、細胞老化の指標の一つである α -galactosidase (α -gal) 活性において陽性反応を示した (Fig.4 B)。この条件での陽性細胞率を測定したところ、100 細胞中の陽性細胞率が 94.7%であった (Fig.4 B)。

3) MDBMT の表面抗原の解析

マウス破骨前駆細胞株樹立研究で、表面抗原マーカーとしては、単球-マクロファージ系細胞の表面抗原マーカーである抗 CD11b 抗体 (Mac-1) と抗 F4/80 抗体 (BM8) を用いて実験を行っており、破骨前駆細胞では Mac-1 陽性、F4/80 陽性であることが報告されている (Takeshita et al., 2000)。また、活性化した成熟マクロファージは、破骨細胞に分化しないと考え、活性化マクロファージの表面抗原マーカーとして抗 CD25 抗体を用いた (Nelson et al., 1992)。RAW264 細胞 (Raschke et al., 1978) をポジティブコントロール (Fig. 5 A) とし、マウス初代骨髄単核細胞 (hBMMNCs) (Fig. 5 B) と、採取した hBMMNCs を M-CSF 存在下で 72 時間培養した細胞 (Fig. 5 C)、MDBMT (Fig. 5 D) の表面抗原の解析を行った。結果から、MDBMT の表面抗原は Mac-1 陽性、F4/80 陽性、CD25 陰性の細胞群が観察された。RAW264 細胞、hBMMNCs を M-CSF 存在下で 72 時間培養した細胞との比較でも大きな差異は見られなかった。また、マウス初代骨髄単核細胞 (hBMMNCs) 中の Mac-1 と F4/80 の分布は、様々な細胞が含有されていることを示唆する (Fig. 5 B)。

4) MDBMT の破骨細胞分化の検討と破骨細胞分化での表面抗原の変化

tsT トランスジェニックマウスの骨髄細胞を用いた破骨細胞分化誘導系 (Takeshita et al., 2000) と、当研究室で確立している RAW264 細胞を用いた破骨細胞分化誘導系 (Meiyanto et al., 2001) の条件を参考に、MDBMT の破骨細胞分化を検討した (data not shown)。結果、33.5 °C での培養では、播種 (-24 時間)、一回目の RANKL 刺激 (0 時間)、二回目の RANKL 刺激 (96 時間)、TRAP 染色 (120 時間) の条件 (Fig. 6 A) で TRAP 陽性の破骨細胞に分化した (Fig. 6 B, Fig. 6 B 下段グラフ)。

次に、tsLT 抗原の性質を利用し、温度制御下での破骨細胞の分化効率を検討した。RANKL 添加後に温度シフトを行い、破骨細胞への分化効率変化を確認した。一回目の RANKL 添加と同時に、39.0 °C で培養した条件 (Fig. 6 A) では、RANKL 添加なしの条件 (Fig. 6 A) と同様に、TRAP 陽性の細胞は見られなかった (Fig. 6 B, Fig. 6 B 下段グラフ)。

破骨細胞に分化が進むと、破骨前駆細胞の表面抗原の状態 Mac-1 陽性、F4/80 陽性が、Mac-1 陰性、F4/80 陰性にシフトしていくことが報告されている (Takeshita et al., 2000)。MDBMT の破骨細胞への分化を、表面抗原においても確認するために、MDBMT を 33.5 °C の温度条件 (Fig. 6 A) と TRAP 陰性であった一回目の RANKL 添加と同時に、39.0 °C で培養した条件 (Fig. 6 A) で、RANKL 添加 72 時間後の表面抗原の変化を確認した (Fig. 7,)。結果から、33.5 °C の温度条件 (Fig. 6 A) において Mac-1 陰性、F4/80

陰性へシフトする傾向が見られたが、F4/80 の傾向強度においてピークが二つとなり、分化しているポピュレーションとしていないポピュレーションが観察された (Fig.7)。TRAP 陰性であった条件 (Fig.6 A) では Mac-1 陰性、F4/80 陰性へシフトする細胞がほとんど無く、分化していない傾向が観察された (Fig.7)。

5) MDBMT のクローニングと細胞株の解析

MDBMT に成熟破骨細胞への分化において、少なくとも二つのポピュレーションがあることが観察されたため、不死化細胞集団 (MDBMT) から限外希釈により単一コロニー由来の細胞株を 7 株取得した。各細胞株は、M-CSF 依存的に 8 ヶ月以上培養することが可能であった (data not shown)。各細胞株は顕微鏡観察から、丸い形で増殖するタイプ (3 クローン) と、細長い形で増殖するタイプ (4 クローン) に大別することができた (Fig.8)。各タイプの細胞株の中から、一クローンを選び出し、丸い形で増殖するタイプを MBC-1、細長い形で増殖するタイプを MBC-2 とし、以降の実験を行った (Fig.8)。

まず始めに MBC-1 と MBC-2 が、培養温度条件依存的に増殖制御するかを確認するため、細胞増殖実験を行った。35mm プレートに細胞を播種し、33.5 と 39.0 の温度条件で 24 時間ごとの細胞数を計測した。結果から、MBC-1、MBC-2 共、MDBMT と同様に 33.5 の温度条件では細胞の増殖が観察された。また、MBC-1 においては、MDBMT と同様に 39.0 の温度条件において細胞は増殖せず、若干減少傾向が観察された。しかし MBC-2 に関しては、39.0 の温度条件での細胞の増殖は観察されなかったが、減少傾向も観察されなかった (Fig.9 A)。MBC-1、MBC-2 について、M-CSF 依存性を調べたところ、M-CSF 非存在下では細胞の増殖が観察されなかった (Fig.9 B)。

取得した細胞株 (MBC-1、MBC-2) について、成熟破骨細胞への分化誘導を行った。33.5 での培養において、播種 (-24 時間)、一回目の RANKL 刺激 (0 時間) 二回目の RANKL 刺激 (96 時間) までは MDBMT と同様に行ったが、成熟破骨細胞への分化段階での差を明確にするため、TRAP 染色においては 192 時間後に実施した。結果、33.5 での培養において、MBC-1、MBC-2 共に TRAP 陽性の破骨細胞への分化が観察された (Fig.10 A , , Fig.10 A 下段グラフ) が、多核化した細胞株は MBC-2 のみであり、MBC-1 においては多核化しなかった (Fig.10 A)。破骨細胞への分化段階を、表面抗原においても確認するために、MBC-1、MBC-2 を 33.5 の温度条件で RANKL 刺激し、168 時間後の表面抗原の変化を確認した (Fig.10 B)。結果から、MBC-2 においては Mac-1 陰性、F4/80 陰性へ均一にシフトする傾向が見られたが、MBC-1 において Mac-1 陰性、F4/80 陰性へシフトする細胞がほとんど無く、多核化が進行

していない傾向が観察された (Fig. 10 B)。

これまでに当研究室において、破骨細胞分化における必須の転写因子である NFAT2 (NFATc1) が同定されている (Ishida et al., 2002; Takayanagi et al., 2002) そこで、破骨細胞における多核化に差異が認められた MBC-1、MBC-2 において、NFAT2 の発現を調べた。MBC-1、MBC-2 の各細胞株において、RANKL 添加とネガティブコントロールとして GST 添加し、培養後 168 時間の細胞抽出液を回収した。NFAT2 の発現レベルをウエスタンブロットにより確認したところ、MBC-1、MBC-2 の各細胞株において差異は認められなかった (Fig. 11 A)。さらに、各細胞株の M-CSF に対する遊走能力を確認するため、トランスウェルマイグレーションアッセイを行ったが、MBC-1、MBC-2 の各細胞株において差異は認められなかった (Fig. 11 B)。

6) ヒト初代骨髄細胞からヒト成熟破骨細胞への分化誘導系の構築

ヒト初代骨髄単核細胞 (Human Bone Marrow Mononuclear Cells : hBMMNCs) に、ヒト M-CSF を添加し、ヒト RANKL 刺激を行うことで成熟破骨細胞への分化誘導を試みた (data not shown)。しかし、マウスの系とは違い、hBMMNCs は、成熟破骨細胞へと分化しなかった (Fig. 12 A)。条件検討を行い、hBMMNCs からの成熟破骨細胞の誘導を試みたが、主に増殖するのは繊維芽細胞様の細胞であった (data not shown)。繊維芽細胞様の細胞と周辺に存在する単球 - マクロファージ系細胞は、TRAP 染色の結果、陽性反応が見られたことから、骨芽細胞様の細胞と考えられた (Fig. 12 B 矢印部分)。そこで、骨芽細胞様の細胞と破骨前駆細胞を分離し、破骨細胞分化能力のある前駆細胞のみを濃縮するために、Methocult 培養によって、CFU-GM (Colony Forming Unit Granulocyte Macrophage) の濃縮を行った (参考図.2)。CFU-GM は、これまでに効率良く破骨細胞に分化できることが報告されている (Menea et al., 2000, Shead et al., 2006)。得られた CFU-GM は、Methocult 培養前の細胞数に比べて、80 倍以上の細胞数に増幅させることができた。得られた細胞群 (CFU-GM) に対し、RANKL 刺激による成熟破骨細胞への分化誘導を行ったところ、播種 (-24 時間) 一回目の RANKL 刺激 (0 時間) 二回目の RANKL 刺激 (72 時間) TRAP 染色 (144 時間) の条件で、TRAP 陽性の多核成熟破骨細胞に分化した (Fig. 13)。

抹消血由来の単球 - マクロファージ系細胞を用いた成熟破骨細胞への分化誘導系において、破骨細胞分化阻害剤であるシクロスポリン A による細胞融合阻害が報告されている (Shinoda et al., 2003)。そこで、CFU-GM によって樹立したヒト破骨細胞分化誘導系を用いて、破骨細胞分化阻害剤であるシクロスポリン A 存在下での分化阻害を確認した。結果、100 ng/mL の濃度に

において、若干の分化阻害が確認された (Fig.14)。また、1 ug/mL、3 ug/mL の各濃度では、多核化を完全に阻害することが確認された (Fig.14)。

7) ヒト初代骨髄細胞と CFU-GM の表面抗原の解析

抹消血細胞を用いたヒト破骨細胞研究において、破骨前駆細胞の表面抗原マーカーとして、単球-マクロファージ系細胞の表面抗原マーカーである抗 CD14 抗体が用いられている (Purton et al., 1996; Nicholson et al., 2000)。そこで、ヒト初代骨髄単核細胞 (hBMMNCs) に比べて CFU-GM 細胞の表面抗原マーカーの変化を調べた。用いた表面抗原マーカーは、1) ヒト T 細胞やヒト単球-マクロファージ系細胞に発現する抗 CD4 抗体 (Knapp et al., 1989; Schlossman et al., 1995) 2) ヒト T 細胞、ヒト NK 細胞に発現する抗 CD8a 抗体 (Knapp et al., 1989;) 3) ヒト T 細胞、ヒト B 細胞、ヒト樹状細胞、ヒト NK 細胞、ヒト単球-マクロファージ系細胞、ヒト顆粒球細胞に発現する抗 CD11b 抗体 (Knapp et al., 1989; Barclay et al., 1997) 4) ヒト単球-マクロファージ系細胞、ヒト顆粒球細胞に発現する抗 CD14 抗体 (Goyert et al., 1987; Jayaram et al., 1989) 5) ヒト B 細胞、ヒト樹状細胞に発現する抗 CD19 抗体 (Nadler et al., 1983; Schlossman et al., 1995) 6) ヒト血球系幹細胞に発現する抗 CD34 抗体 (Ryan et al., 1986; Lansdorp et al., 1989) を用いた。結果、ヒト単球-マクロファージ系細胞以外の細胞に発現する抗 CD8a 抗体抗、抗 CD19 抗体、抗 CD34 抗体について、陽性細胞の増加傾向は観察されなかったが (Fig.16) ヒト単球-マクロファージ系細胞に発現する抗 CD4 抗体、抗 CD11b 抗体、抗 CD14 抗体について、陽性細胞数が増加している傾向が確認された (Fig.15)。

8) ヒト破骨前駆細胞群への遺伝子の導入

Methocult 培養によって、ヒト初代骨髄単核細胞 (hBMMNCs) から増幅されたヒト破骨前駆細胞群 (CFU-GM) に対して、レトロウィルスベクターによる遺伝子導入を試みた。ベクターには、当研究室で構築した GFP 遺伝子を発現するベクターを用いた (Suzuki et al., 2006)。組み換えレトロウィルスベクターは、ヒト細胞においてもレトロウィルスの感染が可能なアンフォロトピックレトロウィルスを用いて、細胞外から GFP 遺伝子を導入した。結果、ウィルス感染なしの細胞 (Fig.17 A) に比べ、ウィルス感染させた細胞群において、1.5%程度ではあるが、GFP 陽性細胞を検出した (Fig.17 B 黒枠内)。同じ細胞群に対して、抗 CD14 抗体で染色したところ GFP 陽性細胞の CD14 陽性へのシフトが観察された (Fig.17 C 赤枠内)。Fig.17 B の黒枠と Fig.17 C の赤枠で囲った部分のみのデータを抽出し、ヒストグラムとして編集した

ところ、GFP 陽性細胞の CD14 陽性へのシフトが確認できた (Fig.17 D)。これらの細胞群に対し継代培養を行ったところ、骨芽細胞様 (繊維芽細胞様) の細胞のみが増殖し、破骨前駆細胞の増幅は確認できなかった (data not shown)。

9) 破骨前駆細胞の濃縮

破骨前駆細胞群 (CFU-GM) に対して、レトロウィルスベクターによる遺伝子導入が確認された事と、遺伝子導入された細胞が CD14 陽性であったことから、MACS (Magnetic Cell Sorting) 法により、破骨前駆細胞群 (CFU-GM) から CD14 陽性細胞を分取することで破骨前駆細胞の濃縮を試みた。結果、CFU-GM (Fig.18 A) よりも CD14 陽性細胞の純度を向上させることができた (Fig.18 B)。また、抗 CD11b 抗体も染色したところ、CD14 陽性細胞は CD11b も陽性であることが確認された (Fig.18 B)。この CD14 陽性細胞に対して、RANKL 刺激による成熟破骨細胞への分化誘導を行ったところ、CFU-GM と同条件である播種 (-24 時間) 一回目の RANKL 刺激 (0 時間) 二回目の RANKL 刺激 (72 時間) TRAP 染色 (144 時間) で、TRAP 陽性の多核成熟破骨細胞に分化した (Fig.19 A)。また、CD14 陽性細胞に対して、レトロウィルスベクターによる GFP 遺伝子導入を試みたところ、1.0%程度ではあるが GFP 陽性細胞を検出した (Fig.19 B 左)。さらに、CD14 陽性細胞を用いて、破骨細胞分化阻害剤であるシクロスポリン A 存在下での分化阻害を確認した。結果、CFU-GM と同様に 100 ng/mL の濃度において若干の分化阻害が確認された (Fig.20)。また、1 ug/mL、3 ug/mL の各濃度では多核化を完全に阻害することが確認された (Fig.20)。

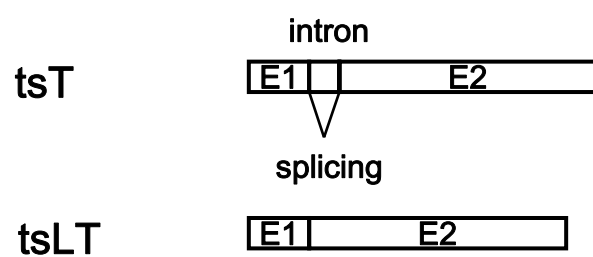
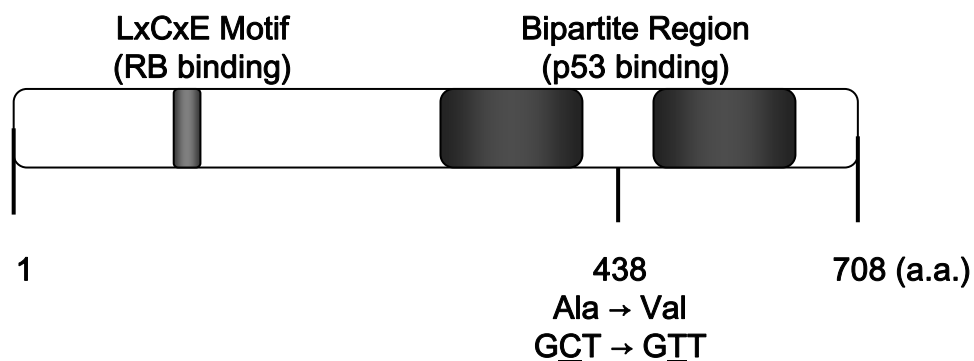


Fig.1 tsLT抗原の構築

tsT抗原とtsLT抗原を示した。tsLT抗原は、tsT抗原のイントロン部分が削除されている。E1、E2はそれぞれエクソン1とエクソン2を示している。

A



(Tegtmeyer et al., 1975; Loeber et al., 1989)

B

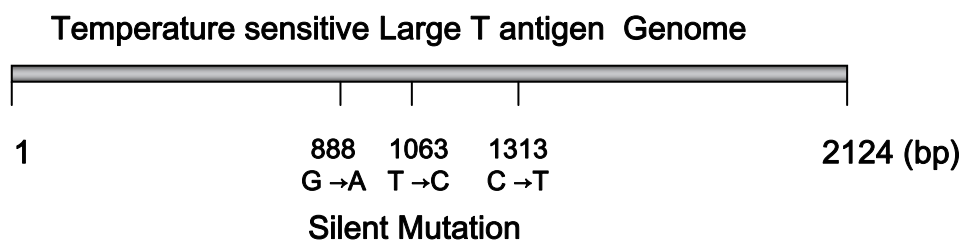


Fig.2 tsLT抗原

A) tsLT抗原タンパク質を示した。RB結合部位であるLxCxEモチーフとp53結合部位であるBipartite領域を持つタンパク質である。LT抗原タンパク質に対して438番目のAlaがValになっている。

B) tsLT抗原のゲノム配列を示した。LT抗原ゲノムに対して888, 1063, 1313番目の塩基配列にサイレントミューテーションがある。

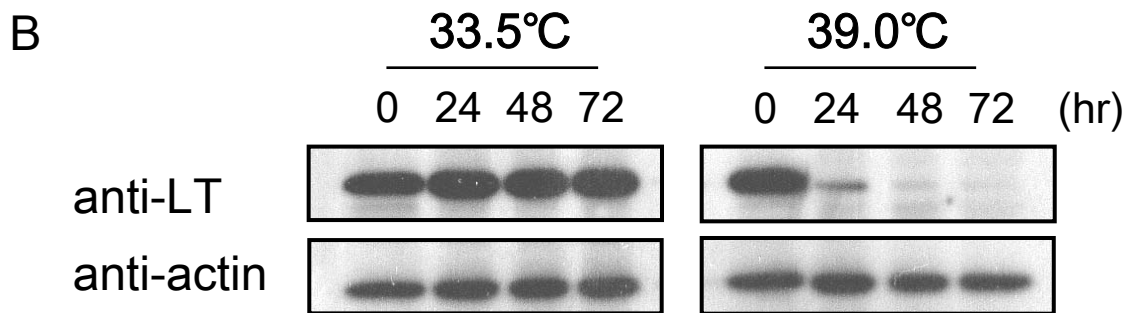
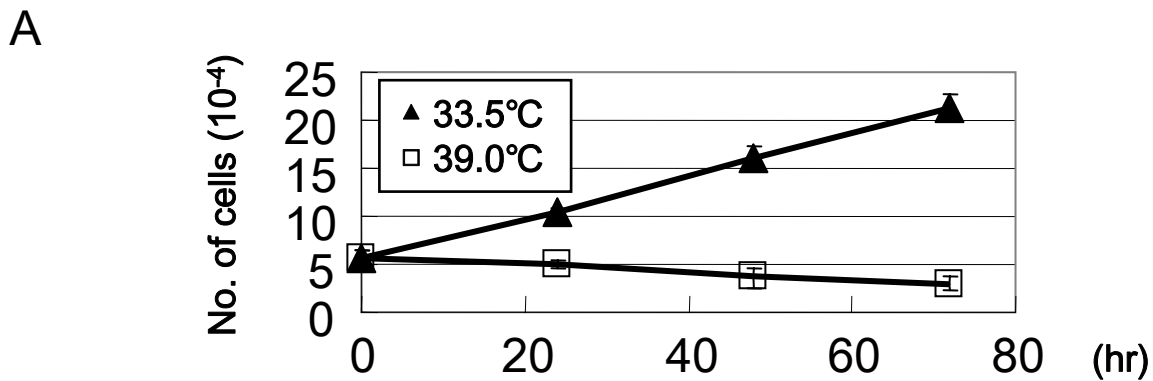
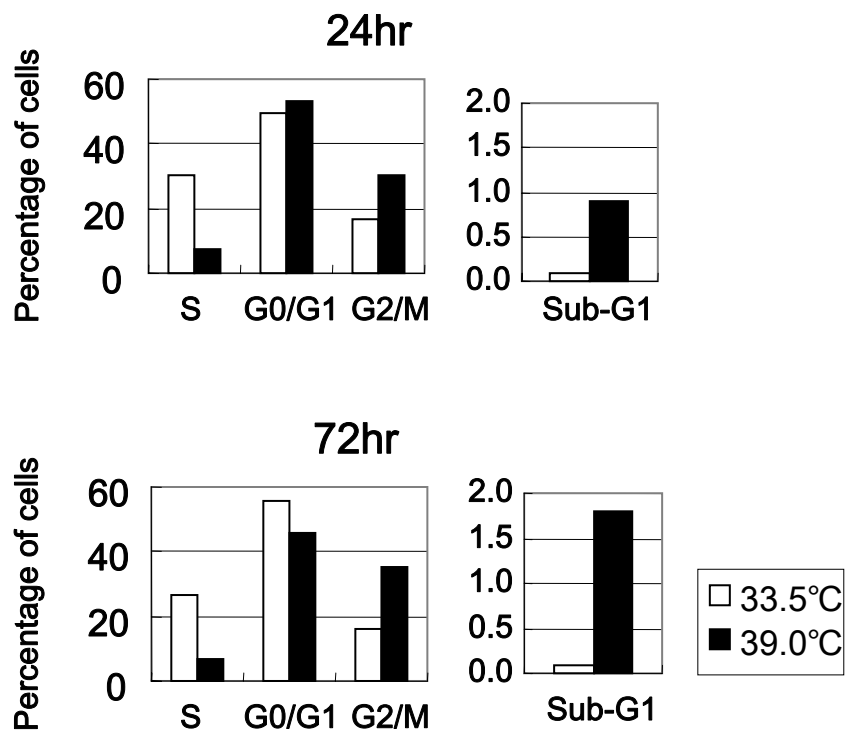


Fig.3 tsLT抗原の発現による不死化細胞の樹立

A) tsLT抗原を発現しているMDBMT(M-CSF dependent bone marrow cells immortalized by tsLT)の増殖曲線を示した。各サンプルは独立した3回の実験の平均値を示した。三角()は33.5 で培養した時のMDBMCTの増殖曲線、四角()は39.0 で培養した時のMDBMTの増殖曲線を示した。

B) tsLT抗原を発現しているMDBMTの免疫プロットを示した。左側に33.5 で培養した時のMDBMTの免疫プロット、右側に39.0 で培養した時のMDBMTの免疫プロットを示した。LTは Large T抗原である。内部標準として -アクチンの発現量を確認した。

A



B

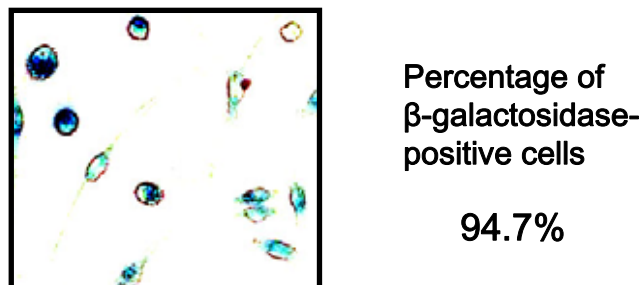


Fig.4 MDBMTの細胞周期分析

A) MDBMTを33.5℃で培養した時(白抜きグラフ:)と、39.0℃で培養した時(黒塗りグラフ:)の24hr、72hr後の細胞周期をグラフ化した。SはS期の細胞集団、G0/G1はG0/G1期の細胞集団、G2/MはG2/M期の細胞集団を示している。右の図は、Sub G1(アポトーシスを起こしている)と考えられる細胞集団を示している。

B) MDBMTの39.0℃条件培養のSA-β-galactosidase(SA-β-gal)活性測定結果を示した。顕微鏡写真と、SA-β-gal陽性率を示した。SA-β-gal陽性率は、100細胞中の陽性細胞をカウントした。それぞれの培養細胞サンプルは独立した3つの実験で行い、平均値を示した。

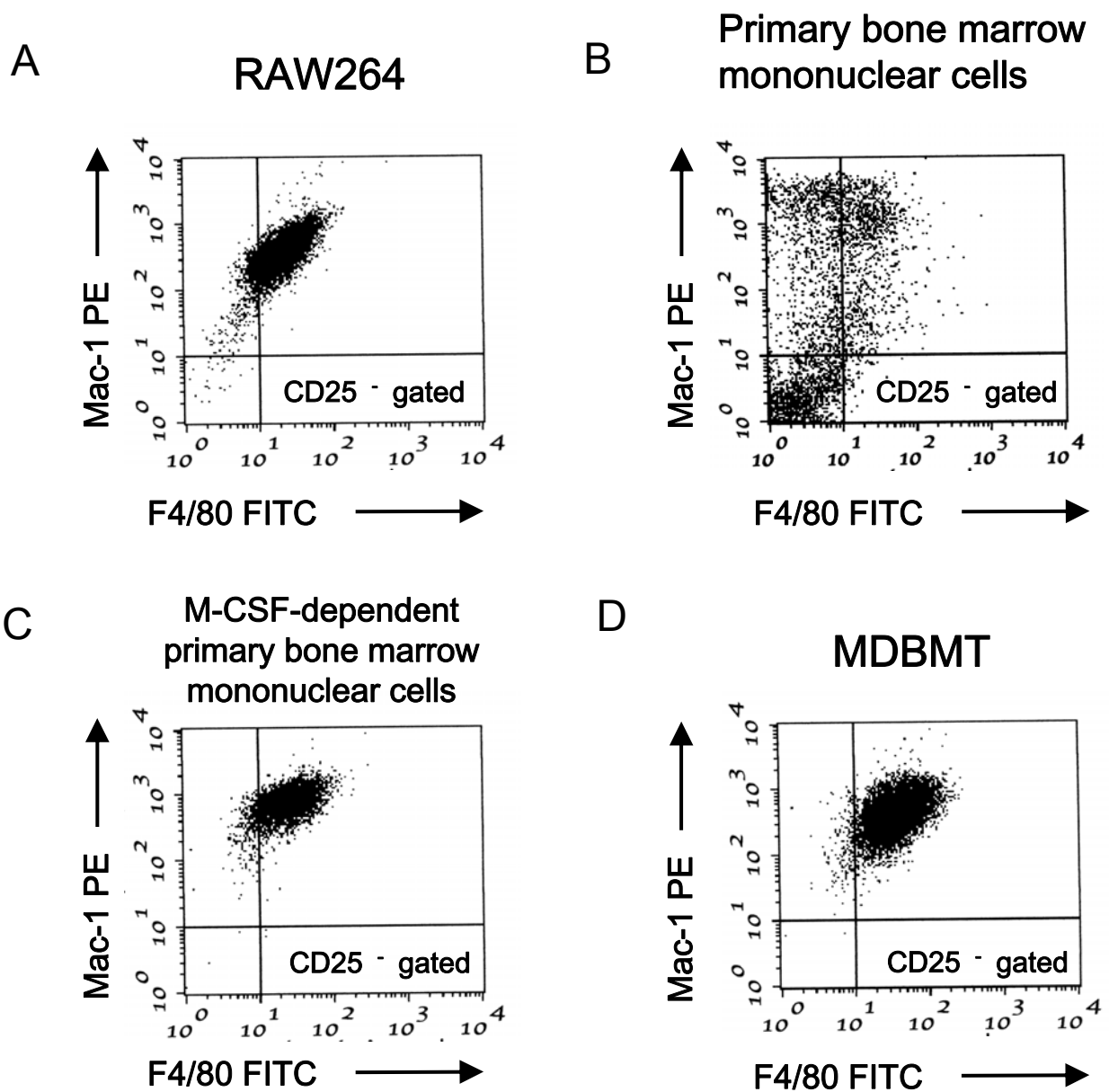


Fig.5 MDBMTの表面抗原の分析

FACSCanを用いて各細胞の表面抗原マーカーを調べた。横軸はF4/80 (BM8) FITCの蛍光強度、縦軸はMac-1 (CD11b) PEの蛍光強度を示し、CD25陰性の細胞のみを表示している。グラフはドットプロット図で示した。A) RAW264細胞 (ポジティブコントロール)、B) マウス初代骨髄単核細胞 (mBMMNCs)、C) M-CSF存在下で72hr培養したマウス初代骨髄単核細胞、D) MDBMTの表面抗原分析結果を示した。

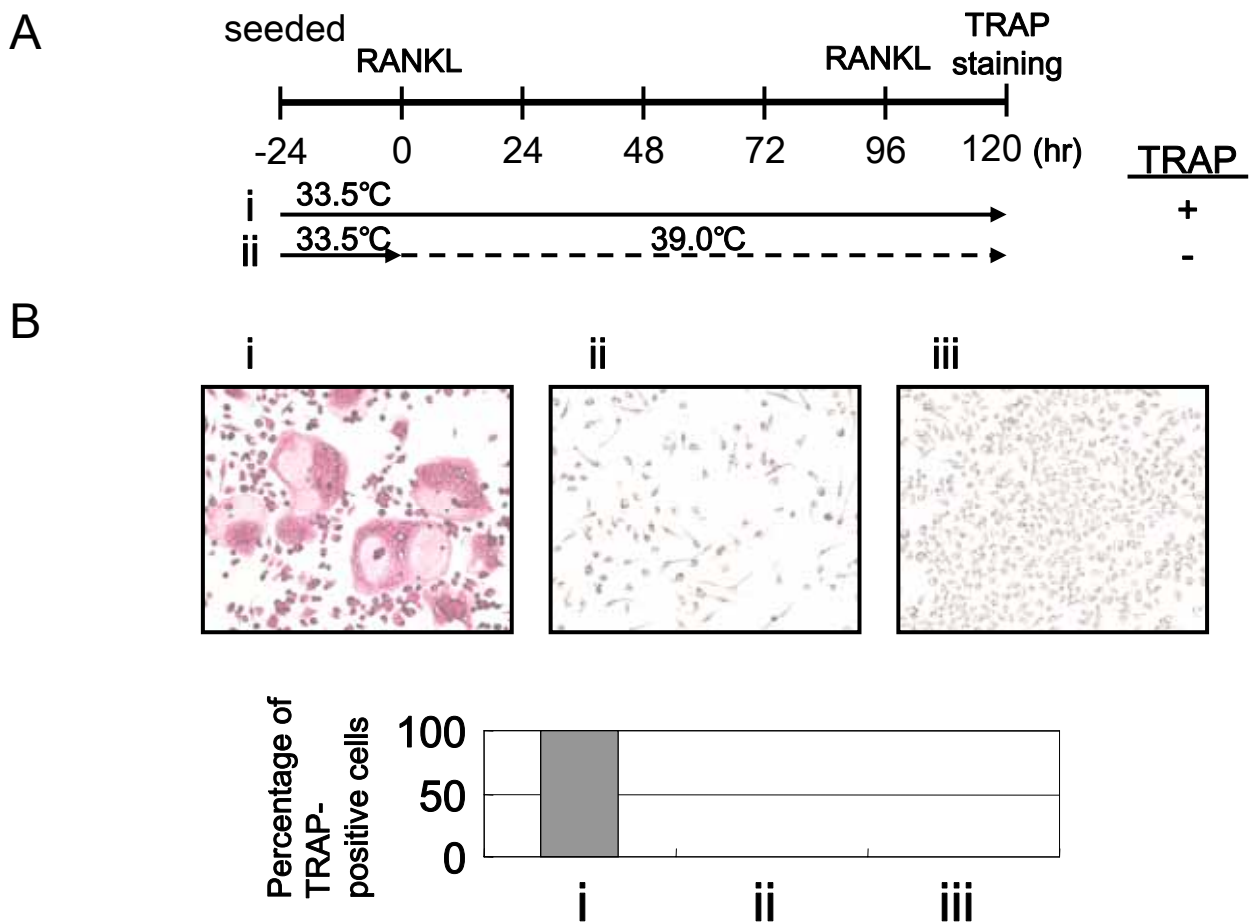


Fig.6 MDBMTの破骨細胞分化

A) MDBMTの分化誘導条件を示した。0hrと96hrでRANKL添加し、() 温度変化なし、() RANKL添加後、39.0 の温度条件で培養した。

B) 上記各条件()、()で分化誘導した時のTRAP染色結果の顕微鏡写真を示した。また、()は、()の条件で、RANKLではなくGSTを添加した結果(ネガティブコントロール)を示した。上記各条件で分化したTRAP陽性細胞の数をカウントし、TRAP陽性率を下段グラフに示した。各サンプルは独立した3つの視野での平均値を示した。

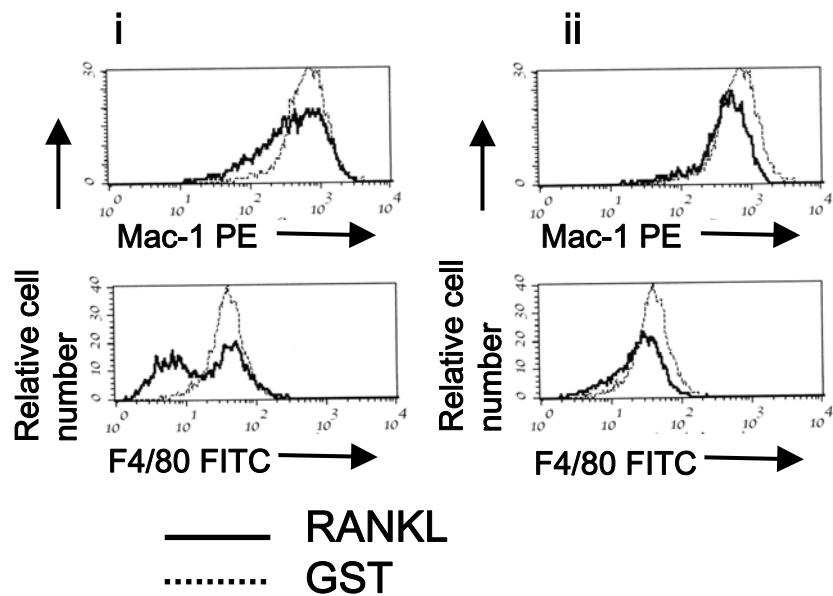


Fig.7 破骨細胞分化誘導時のMDMBTの表面抗原の分析

FACSCanを用いて、MDMBTの破骨細胞分化過程での表面抗原マーカーを調べた。横軸は上段がMac-1 (CD11b) PEの蛍光強度、下段がF4/80 (BM8) FITCの蛍光強度を示した。縦軸は細胞数を示し、グラフはヒストグラム図で示している。実線はRANKL添加、破線はGST添加 (ネガティブコントロール) 後、Fig.6の) と) の条件で72hr培養した結果を示した。

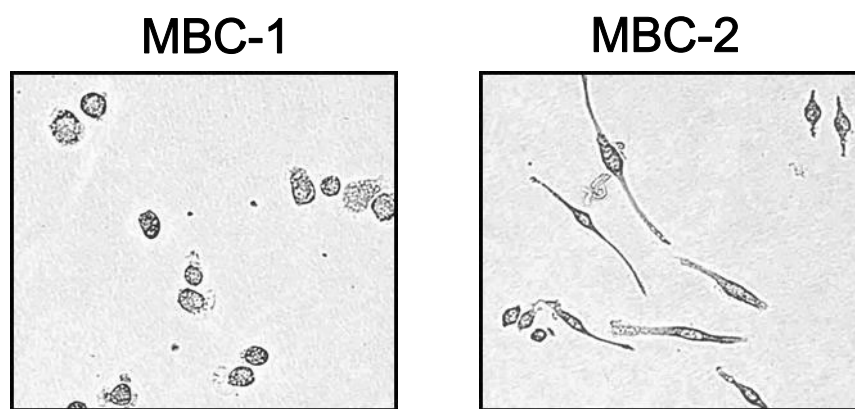


Fig.8 クローン細胞 (MBC-1, MBC-2)

限外希釈法によりMDBMTから取得した細胞株 (MBC-1, MBC-2) の顕微鏡写真を示した。

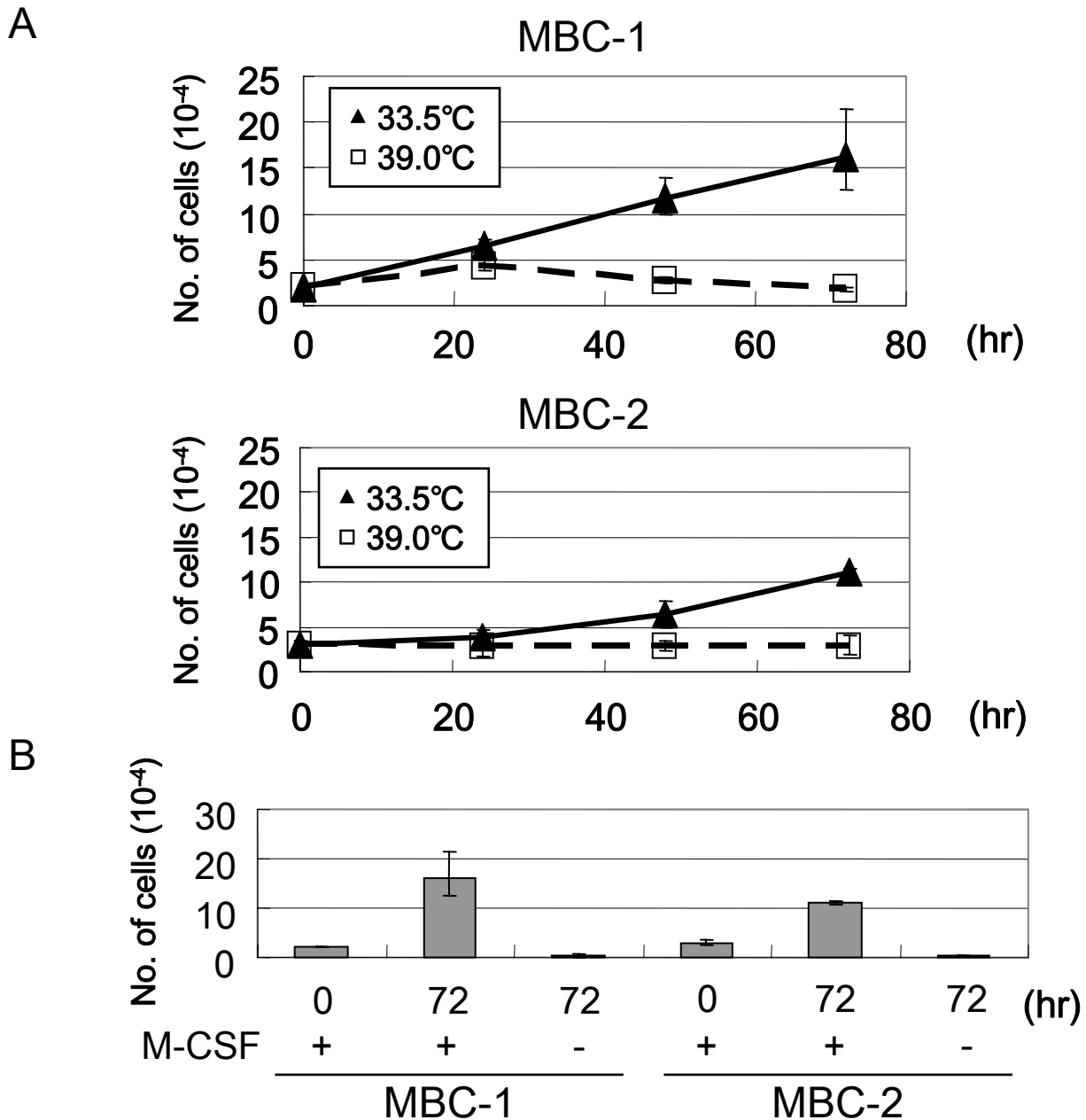


Fig.9 クローン細胞 (MBC-1, MBC-2) の増殖制御とM-CSF依存性

A) 取得した細胞株 (MBC-1, MBC-2) の増殖曲線を示した。各サンプルは独立した3回の実験の平均値を示した。三角 () は33.5 °C で培養した時の増殖曲線、四角 () は39.0 °C で培養した時の増殖曲線を示した。

B) 取得した細胞株 (MBC-1, MBC-2) に対するM-CSF依存性を示した。細胞播種24時間後の細胞数を0とし、M-CSF添加培地と添加なしの培地で72hr培養後の細胞数を示した。各サンプルは独立した3回の実験の平均値を示した。

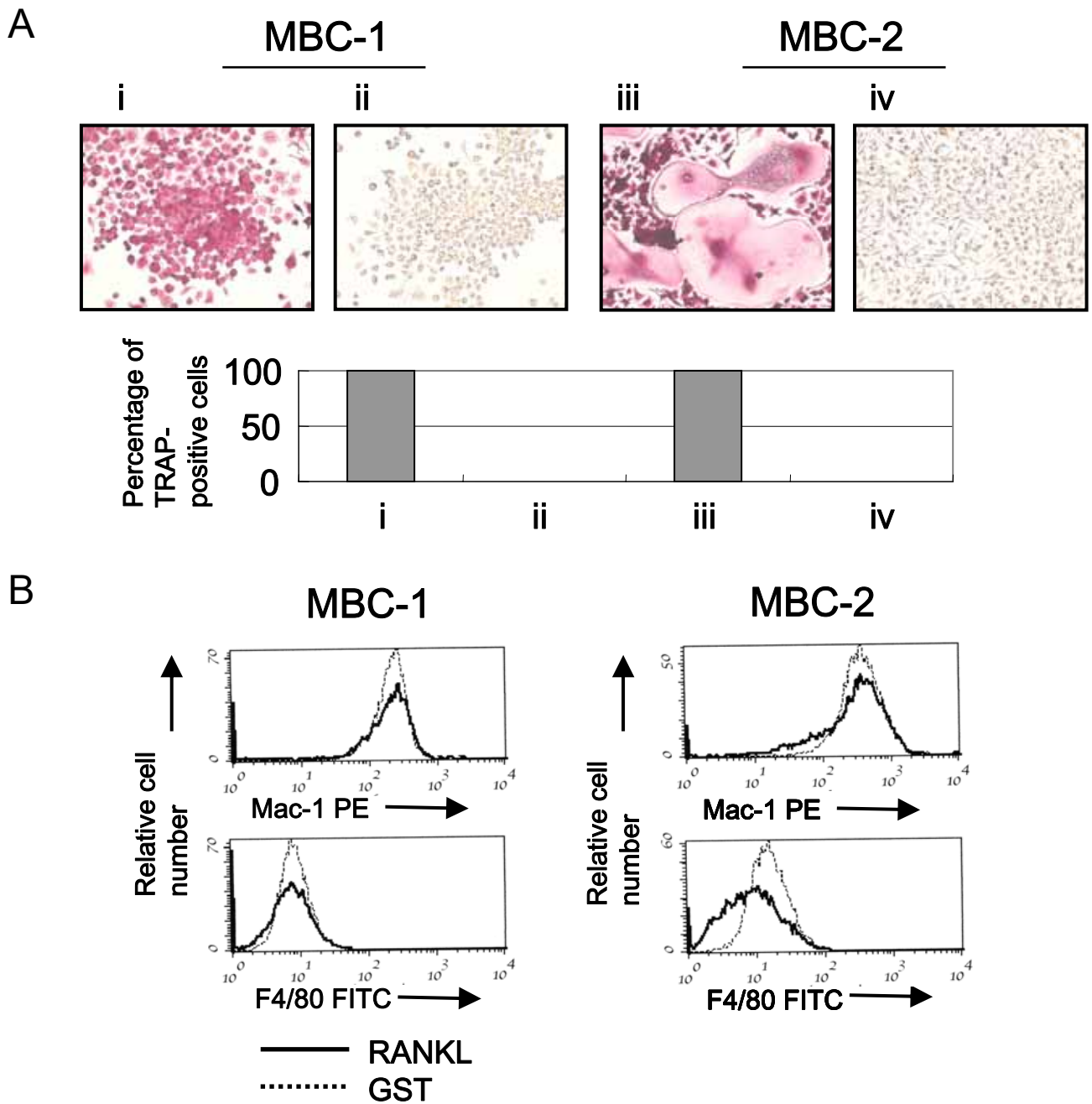
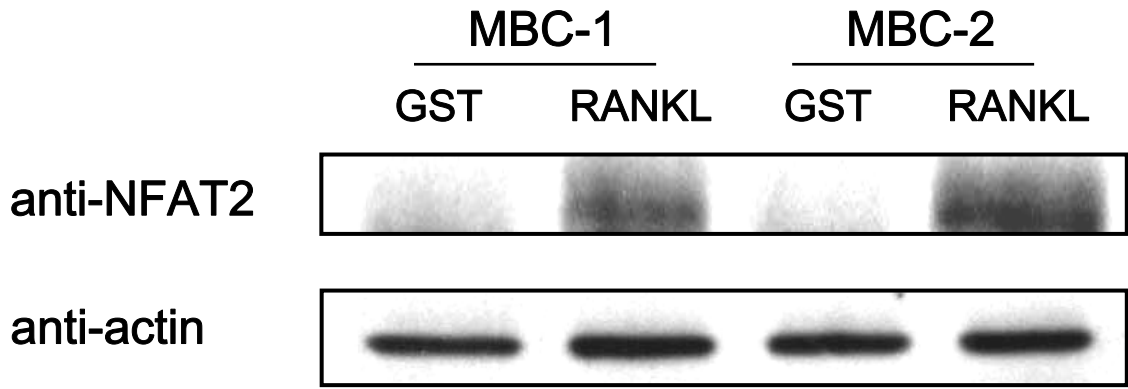


Fig.10 クローン細胞 (MBC-1, MBC-2) の破骨細胞分化と表面抗原の分析

A) 分化誘導したMBC-1、MBC-2のTRAP染色結果の顕微鏡写真を示した。() RANKL添加、() GST添加(ネガティブコントロール)後で培養した。分化した各細胞株のTRAP陽性細胞数をカウントし、TRAP陽性率を下段グラフに示した。各サンプルは独立した3つの視野での平均値を示した。

B) FACScanを用いてMBC-1、MBC-2の破骨細胞分化過程での表面抗原マーカーを調べた。横軸は上段がMac-1 (CD11b) PEの蛍光強度、下段がF4/80 (BM8) FITCの蛍光強度を示した。縦軸は細胞数を示し、グラフはヒストグラム図で示している。実線はRANKL添加、破線はGST添加で培養した結果を示した。

A



B

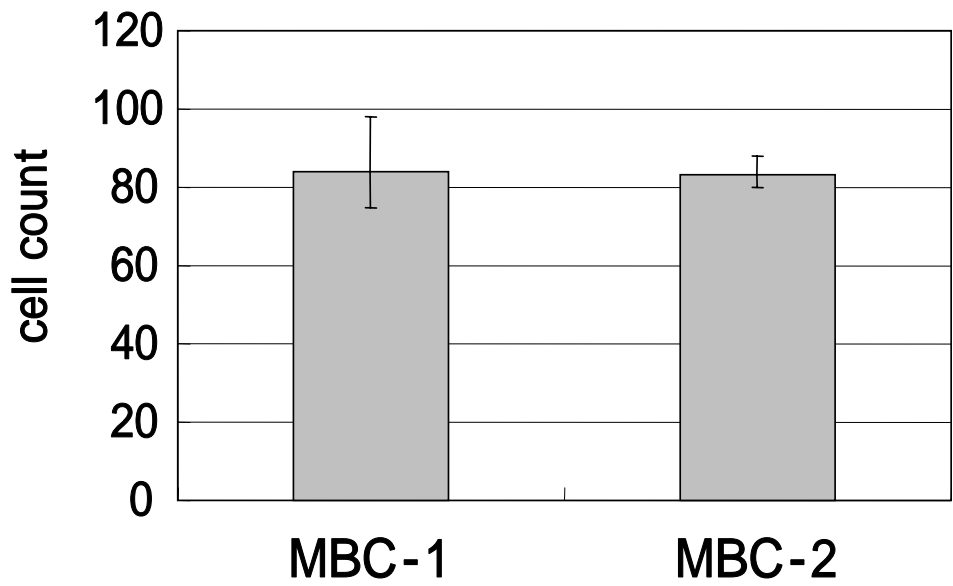


Fig.11 MBC-1, MBC-2における破骨細胞分化時の転写因子と細胞遊走能の分析

A) 分化誘導したMBC-1、MBC-2における転写因子NFAT2 (NFATc1) の免疫プロットを示した。内部標準として β -アクチンの発現量を確認した。

B) MBC-1、MBC-2のM-CSFに対するトランスウェルマイグレーションアッセイ結果を示した。縦軸は細胞数を示している。各サンプルは独立した3つの視野での平均値を示した。

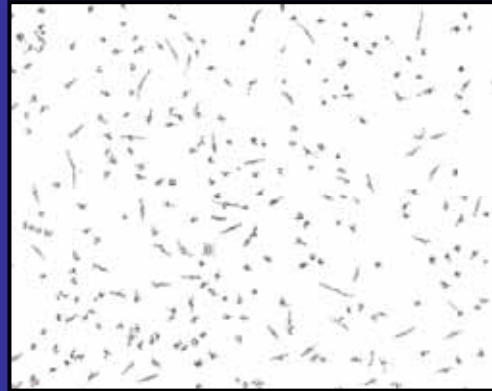
A

hBMMNCs

hRANKL (+)



hRANKL (-)



B



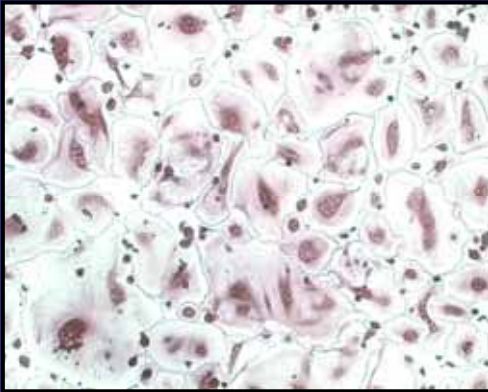
Fig.12 ヒト初代骨髄単核細胞 (hBMMNCs) の破骨細胞分化

A) 分化誘導したhBMMNCsのTRAP染色結果の顕微鏡写真を示した。左はhRANKL添加、右はhRANKL添加なしの培地で培養した。

B) hRANKL添加なしの培地で培養し、TRAP染色を行った結果を示した。シャーレ中のTRAP陽性部分のみを選択して顕微鏡写真を取得した。矢印部分がTRAP陽性部分である。

CFU-GM

hRANKL (+)



hRANKL (-)

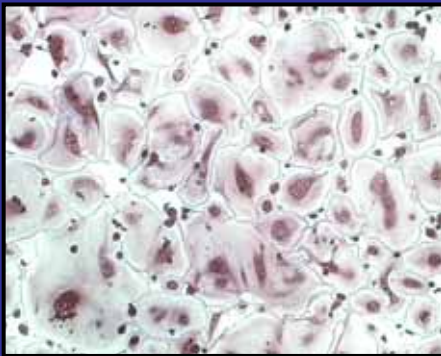


Fig.13 CFU-GMの破骨細胞分化

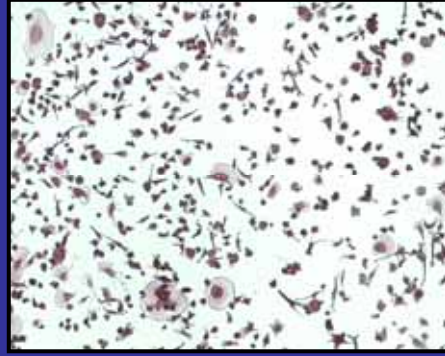
分化誘導したCFU-GM (Colony-Forming Unit Granulocyte-Macrophage) のTRAP染色結果の顕微鏡写真を示した。左はhRANKL添加、右はhRANKL添加なしの培地で培養した。

CFU-GM

hRANKL (+)

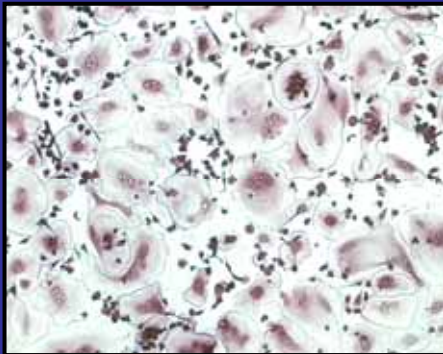


hRANKL (-)



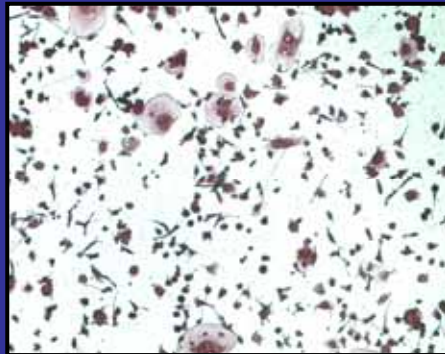
hRANKL (+)

+ CsA 100ng/ml



hRANKL (+)

+ CsA 1μg/ml



hRANKL (+)

+ CsA 3μg/ml

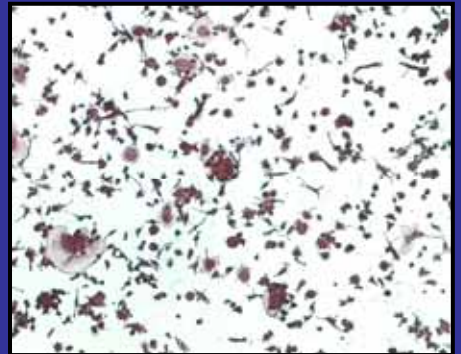


Fig.14 CFU-GMのシクロスポリンAによる破骨細胞分化阻害

CFU-GMを用いた破骨細胞分化誘導系に対する破骨細胞分化阻害剤（シクロスポリンA：CsA）の効果を調べた。分化培地にCsAを添加し、分化誘導結果のTRAP染色結果の顕微鏡写真を示した。CsA濃度は下段左（100ng/ml）、下段中（1μg/ml）、下段右（3μg/ml）で、上段左はhRANKL添加のみ、上段右はhRANKL添加なしの培地で培養した。

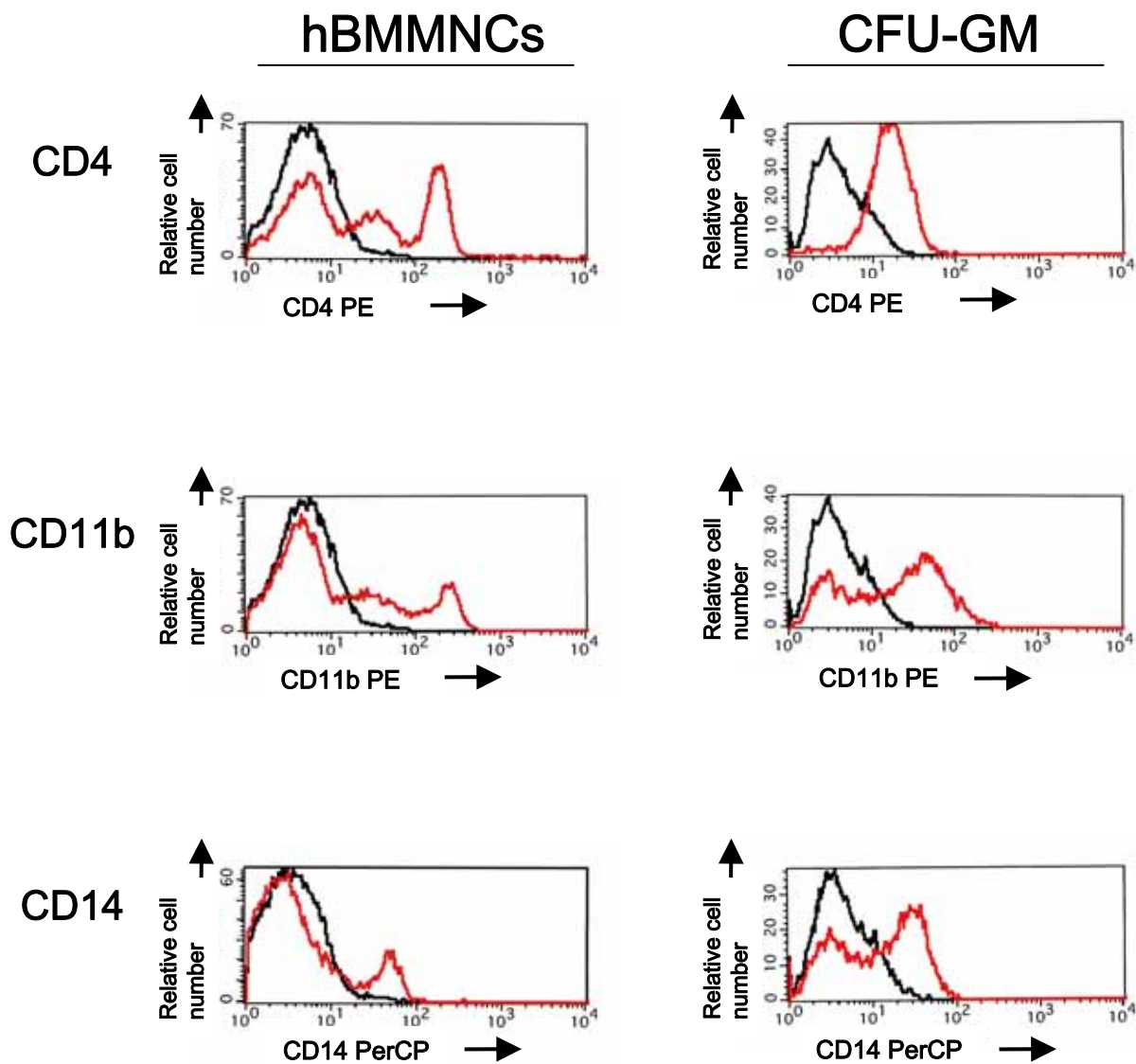


Fig.15 hBMMNCsとCFU-GMの表面抗原の分析（1）

FACSCanを用いて、hBMMNCsとCFU-GMについて単球-マクロファージ系細胞の表面抗原マーカーを調べた。右側の列がCFU-GM、左側の列がhBMMNCsを示している。横軸は、上段がCD4 PEの蛍光強度、中段がCD11b PEの蛍光強度、下段がCD14 PerCPの蛍光強度を示した。縦軸は細胞数を示し、グラフはヒストグラム図で示している。赤線は抗表面抗原抗体を反応させた細胞の分析結果、黒線は抗表面抗原抗体の反応なし（ネガティブコントロール）の結果を示した。

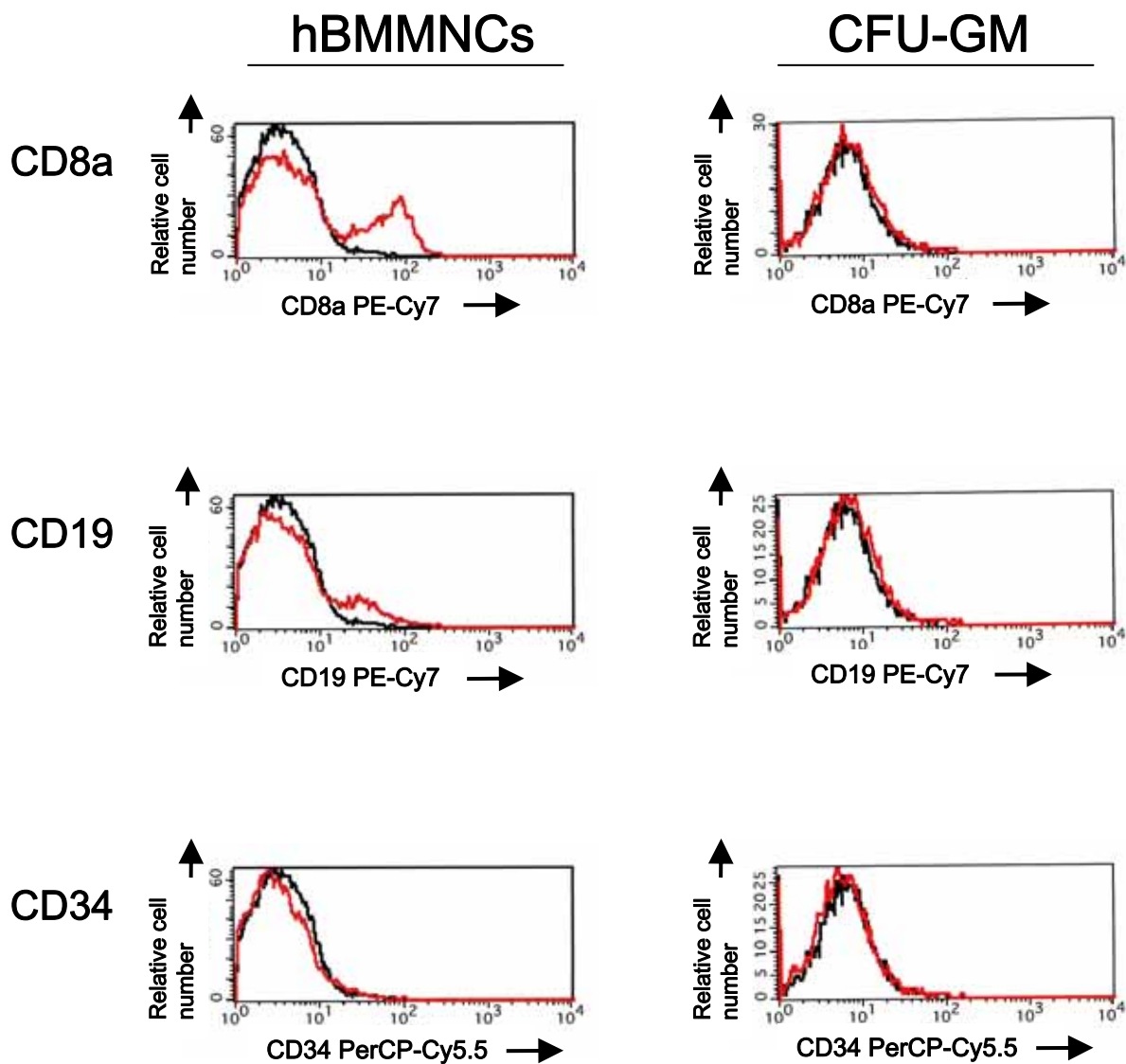


Fig.16 hBMMNCsとCFU-GMの表面抗原の分析（2）

FACSCanを用いて、hBMMNCsとCFU-GMについて単球-マクロファージ系細胞以外の表面抗原マーカーを調べた。右側の列がCFU-GM、左側の列がhBMMNCsを示している。横軸は、上段がCD8a PE-Cy7の蛍光強度、中段がCD19 PE-Cy7の蛍光強度、下段がCD34 PerCP-Cy5.5の蛍光強度を示した。縦軸は細胞数を示し、グラフはヒストグラム図で示している。赤線は抗表面抗原抗体を反応させた細胞の分析結果、黒線は抗表面抗原抗体の反応なし（ネガティブコントロール）の結果を示した。

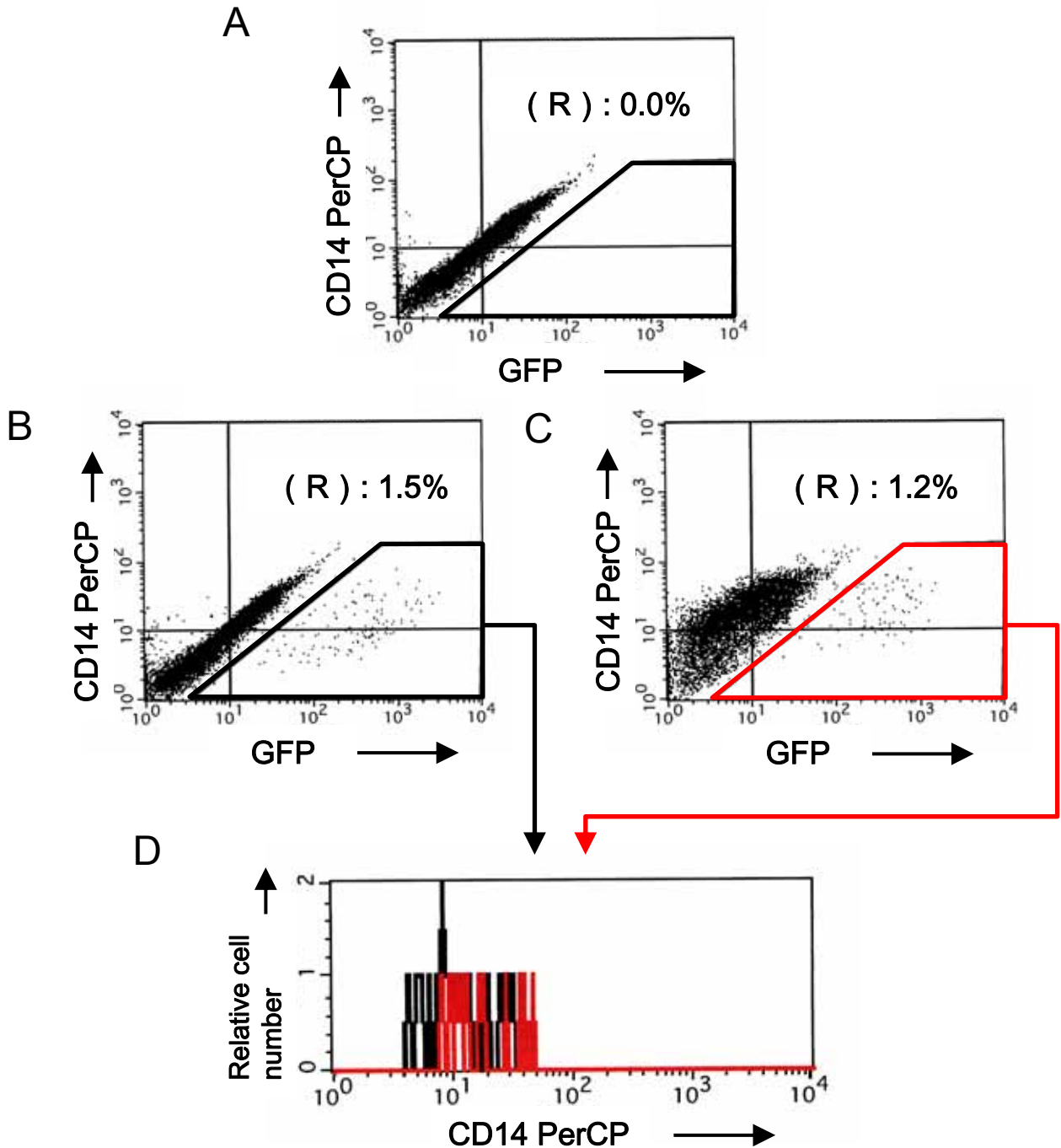


Fig.17 CFU-GMへの遺伝子導入

レトロウイルスベクターによるCFU-GMへのGFP遺伝子導入について調べた。遺伝子導入効率は、FACSCanを用いて測定した。

A) レトロウイルス感染なし(ネガティブコントロール)、抗CD14抗体染色なし(ネガティブコントロール)、B) レトロウイルス感染あり、抗CD14抗体染色なし(ネガティブコントロール)、C) レトロウイルス感染あり、抗CD14抗体染色ありのドットプロット図を示した。縦軸はCD14 PerCPの蛍光強度、横軸はGFPの蛍光強度を示している。(R)は、黒枠内あるいは赤枠内の細胞分布(%)を示している。

D) B)の黒枠、C)の赤枠で囲われた部分の細胞のデータを抽出し、ヒストグラム図で示した。横軸は、CD14 PerCPの蛍光強度、縦軸は細胞数を示した。黒線はB)のグラフからのデータ、赤線はC)のグラフからのデータでオーバーレイ表示した。

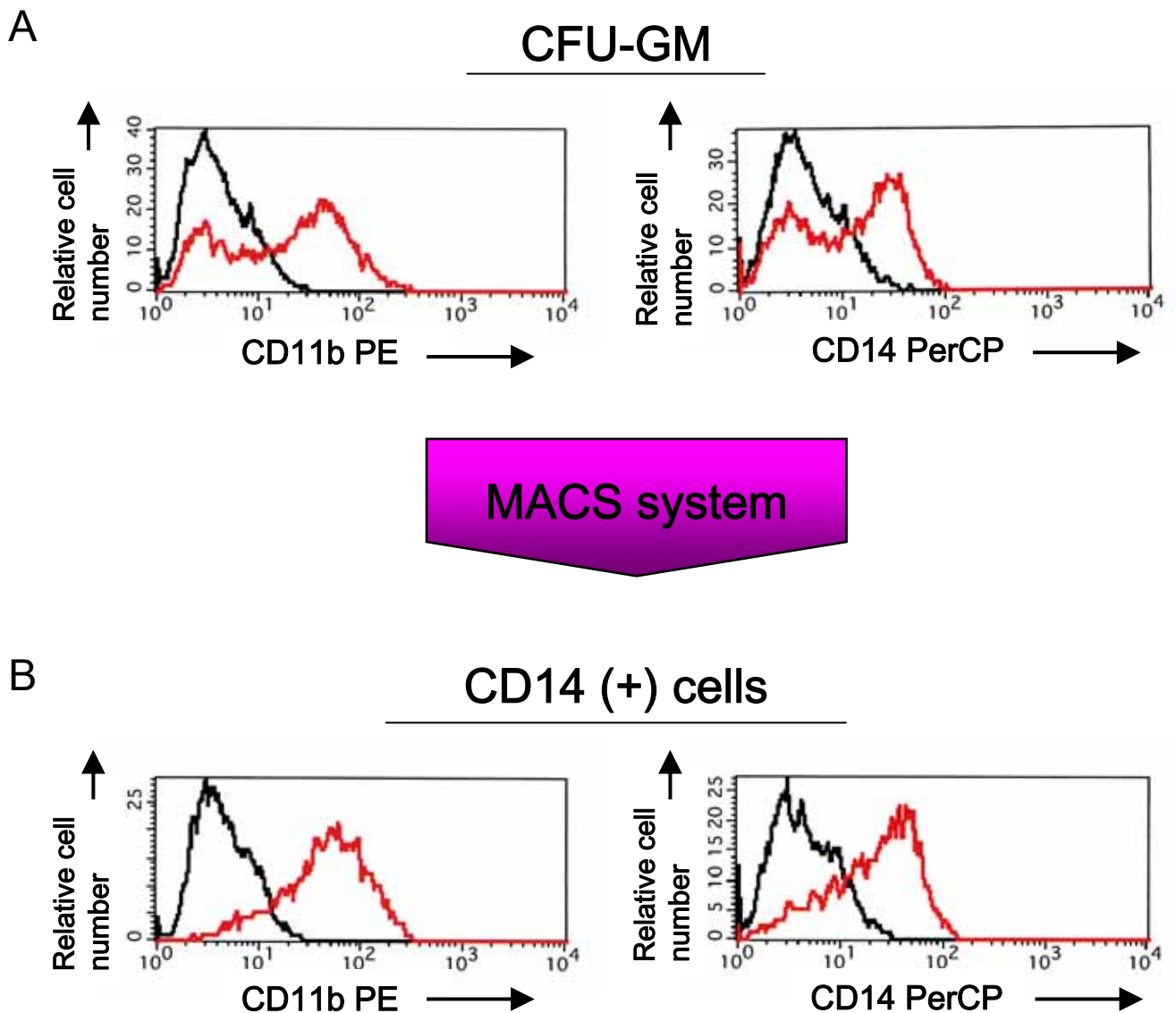
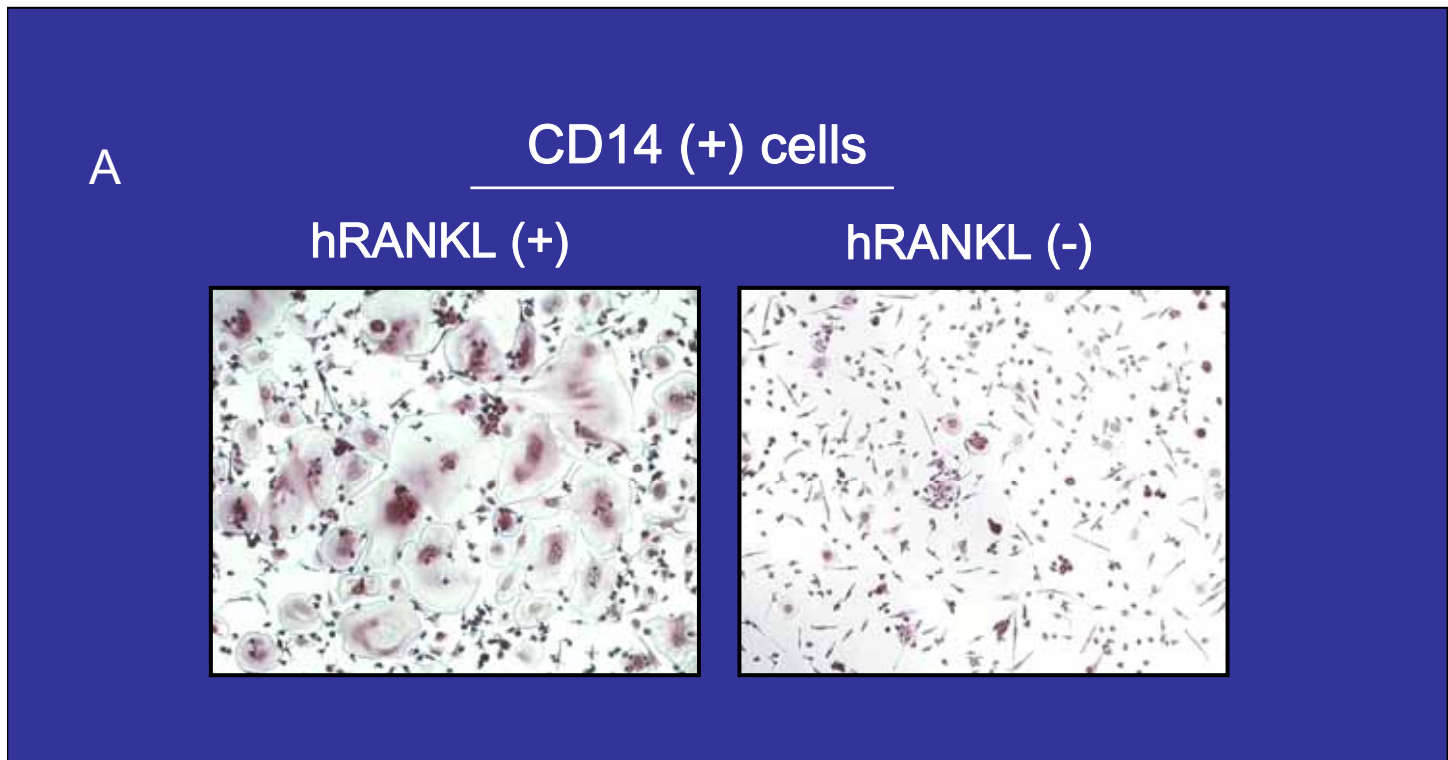


Fig.18 CFU-GMからのCD14陽性細胞の分取

MACS (Magnetic Cell Sorting) 法により、CFU-GMから分取したCD14陽性細胞の表面抗原マーカーをFACSCanを用いて調べた。グラフはヒストグラム図で示し、赤線は抗表面抗原抗体を反応させた細胞の分析結果、黒線は抗表面抗原抗体の反応なし(ネガティブコントロール)の結果を示した。

A) CFU-GMの表面抗原マーカーを調べた。縦軸は細胞数、横軸は、右側がCD14 PerCPの蛍光強度、左側がCD11b PEの蛍光強度を示している。

B) CD14陽性細胞の表面抗原マーカーを調べた。縦軸は細胞数、横軸は、右側がCD14 PerCPの蛍光強度、左側がCD11b PEの蛍光強度を示している。



B

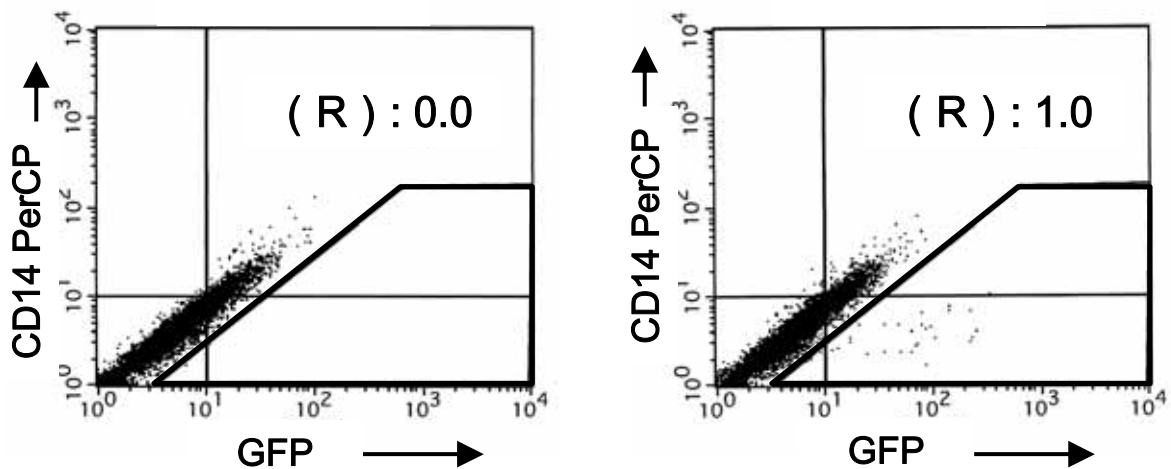


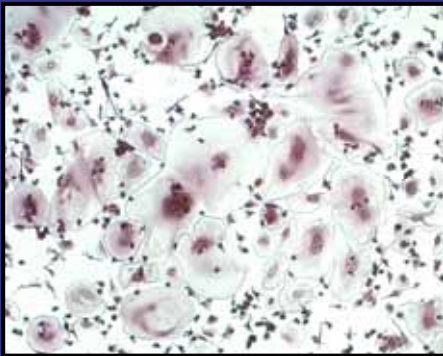
Fig.19 CD14陽性細胞の破骨細胞分化誘導と遺伝子導入

A) 分化誘導したCD14陽性細胞のTRAP染色結果の顕微鏡写真を示した。左はhRANKL添加、右はhRANKL添加なしの培地で培養した。

B) レトロウィルスベクターによるCD14陽性細胞へのGFP遺伝子導入について調べた。遺伝子導入効率、FACSCanを用いて測定した。右はレトロウィルス感染なし、左はレトロウィルス感染ありを示している。縦軸はCD14 PerCPの蛍光強度、横軸はGFPの蛍光強度を示している。(R)は、黒枠内の細胞分布(%)を示している。

CD14 (+) cells

hRANKL (+)

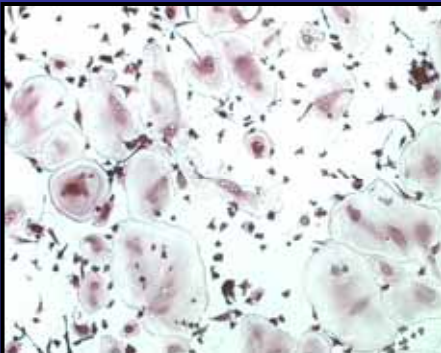


hRANKL (-)



hRANKL (+)

+ CsA 100ng/ml



hRANKL (+)

+ CsA 1μg/ml



hRANKL (+)

+ CsA 3μg/ml



Fig.20 CD14陽性細胞のシクロスポリンAによる破骨細胞分化阻害

CD14陽性細胞を用いた破骨細胞分化誘導系に対する破骨細胞分化阻害剤（シクロスポリンA：CsA）の効果を調べた。分化培地にCsAを添加し、分化誘導結果のTRAP染色結果の顕微鏡写真を示した。CsA濃度は下段左（100ng/ml）、下段中（1μg/ml）、下段右（3μg/ml）で、上段左はhRANKL添加のみ、上段右はhRANKL添加なしの培地で培養した。

考察

1) マウス初代骨髄細胞からの破骨前駆細胞株の樹立

株化細胞を用いた、破骨細胞の *in vitro* 分化誘導系としては、マウス単球・マクロファージ系細胞株である RAW264.7 を用いて可溶性 RANKL により破骨細胞に分化誘導する系が報告されている (Hsu et al., 1999)。現在、多くの研究室がこの系を用いており、当研究室でも RAW264 細胞を用いた分化誘導系が構築されている (Ishida et al., 2002)。また、tsT トランスジェニックマウスを用いて破骨前駆細胞株を樹立した例も報告もされている (Takeshita et al., 2000)。

今回、構築した方法は、tsLT 抗原を用いて不死化を行っているため Large T 抗原のみ発現し、Small T 抗原の影響を受けない。また、レトロウィルスを用いて細胞外より tsLT 抗原を導入する方法は、将来的なヒト細胞株樹立への応用が考えられた。

tsLT 抗原は温度感受性の T 抗原であり、不死化した MDBMT においても 33.5 の温度条件では細胞が増殖し、39.0 の温度条件では細胞増殖が停止した。このことから、培養温度条件依存的に増殖を制御できることも示された (Fig.3 A)。また、免疫プロット結果から、33.5 での細胞増殖時には恒常的に LT 抗原が発現し、増殖が停止している 39.0 の状態では、LT 抗原の発現レベルが、系時的に減少することがわかった (Fig.3 B)。これら二点の実験結果から、MDBMT の増殖あるいは生存に、Large T 抗原の発現が強く関与していることが示唆された。

細胞周期の分析では、33.5 の温度条件で 24 時間あるいは 72 時間培養した MDBMT において、G0/G1 期状態の細胞分布が 49.5%、55.4% と高く (Fig.4 A) 細胞増殖時に、G0/G1 期状態の細胞が多く存在していることが示唆された。また、S 期状態と考えられる細胞分布は、24 時間で 30.3%、72 時間で 26.6% (Fig.4 A) であり、細胞増殖時には全体の約 1/4 が DNA 合成を行っている可能性が示唆された。一方、39.0 の温度条件で、24 時間、72 時間培養した MDBMT では、S 期状態の細胞分布が 7.6%、7.0% (Fig.4 A) と低下しており、DNA 合成の視点からも細胞の増殖停止が示された。また、DNA 合成が停止した細胞は G0/G1 期に同調せず、G2/M 期状態に細胞分布の上昇が見られることから、LT 抗原が消失することで何らかの分子が G2/M 期停止を起こしている可能性が考えられる。また、Sub G1 とと思われる細胞が、若干増加傾向 (33.5 : 0.1% 39.0 : 0.9%、33.5 : 0.1% 39.0 : 1.8%) であり (Fig.4 A) 細胞数の増加実験 (Fig.3 A) においても、細胞数が減

少傾向にあることから、39.0 の温度条件においてアポトーシスが起っており、結果として細胞が減少している可能性も示唆された。一方、39.0 の温度条件において、細胞数が0になっていないことから、生存している細胞の存在が示唆された (Fig.3 A)。そこで、細胞老化の指標の一つである SA-β-galactosidase (SA-β-gal) 活性を調べたところ、94.7%の細胞が陽性反応を示した (Fig.4 B)。以上のことから、39.0 の温度条件では細胞周期が停止し、細胞老化を経てアポトーシスが起っている可能性が考えられた。

2) MDBMT の破骨細胞分化

これまでに報告されている破骨細胞の分化誘導系 (Hsu et al., 1999; Ishida et al., 2002; Takeshita et al., 2000) を参考に、MDBMT の破骨細胞への分化誘導を行ったところ、33.5 での定温培養において、播種 (-24 時間)、一回目の RANKL 刺激 (0 時間) 二回目の RANKL 刺激 (96 時間) TRAP 染色 (120 時間) の条件 (Fig.6 A) で、多核の TRAP 陽性破骨細胞が観察された (Fig.6 B)。培養温度条件依存的に、増殖の制御が可能な tsLT 抗原の性質を利用し、細胞周期を同調させて分化誘導を行った (Fig.6 A)。結果、RANKL 刺激と同時に 39.0 培養を行った細胞において、破骨細胞への分化が観察されなかった (Fig.6 B)。一般的に、細胞の分化は G0/G1 期で起こると考えられている。細胞周期分析では 39.0 培養において G2/M 期停止を起こしている可能性が考えられる (Fig.4 A)。また 39.0 培養において細胞老化が観察された (Fig.4 B) ことから、39.0 培養を行った細胞は、G2/M 期停止を経て細胞老化を起こした細胞群が分化できなかった可能性が示唆された。39.0 培養では T 抗原が消失し、p53、pRb が活性化していると考えられる。p53 は多くの標的遺伝子を持ち (Prives and Hall, 1999)、その中でも p21 は細胞周期を G1 で停止させる (el Deiry et al., 1993)。また、pRb は E2F と結合することで細胞周期を G1 で停止させる (Nevins, 1992)。今回の結果では S 期の細胞は G2/M で停止した可能性が高く、これ以外の p53 あるいは pRb 経路が働いている可能性が示唆された。しかし、いずれの経路であっても p53、pRb の活性化が、強く細胞周期を停止させている可能性が高く、結果として分化の経路が阻害されている可能性が示唆された。

表面抗原の解析において、MDBMT の細胞の多くが、破骨前駆細胞で報告のある Mac-1 陽性、F4/80 陽性 (Takeshita et al., 2000) であった (Fig.5 D)。また、ポジティブコントロールである RAW264 細胞の表面抗原も Mac-1 陽性、F4/80 陽性 (Fig.5 A) であった。MDBMT を破骨細胞に分化誘導した結果、全ての細胞が TRAP 陽性の破骨細胞に分化したが、RAW264 細胞に比べて多核の破骨細胞の形成効率が悪かった (Fig.6 B)。以上の結果から、MDBMT は破

骨前駆細胞群であり、多核の破骨細胞の形成効率が良い細胞と悪い細胞のミックスポピュレーションである可能性が示唆された。

マウス初代骨髄単核細胞(mBMMNCs)を用いた分化誘導実験において、M-CSF 依存的に増殖する細胞群が破骨細胞に分化している(data not shown)。また、MDBMT も M-CSF 依存的に生存・増殖する(data not shown)。さらに、MDBMT(Fig.5 D)とmBMMNCsをM-CSFで72時間刺激した細胞の表面抗原(Fig.5 C)は、表面抗原マーカーにおいて同じ傾向であることから、MDBMTはM-CSF 依存的に増殖する細胞のポピュレーションが不死化されていることが考えられた。

破骨細胞に分化が進むと、破骨前駆細胞の表面抗原マーカーが、Mac-1 陽性、F4/80 陽性から Mac-1 陰性、F4/80 陰性にシフトすることが報告されている(Takeshita et al., 2000)。MDBMTにおいて、RANKL 刺激72時間後の表面抗原マーカーの状態を分析した。結果から、33.5 °Cの温度条件(Fig.6 A)ではMac-1 陰性、F4/80 陰性へシフトする傾向が見られたが、F4/80の傾向強度においてピークが二つとなり、分化が遅いポピュレーションと早いポピュレーションの存在が示唆された(Fig.7)。また、TRAP 陰性であった条件(Fig.6 A)ではMac-1 陰性、F4/80 陰性へシフトする細胞がほとんど無く、分化していない傾向が観察された(Fig.7)。

これらのことから、MDBMTはある程度均一な破骨前駆細胞であるが、中には多核の破骨細胞の形成効率が良い細胞と悪い細胞が存在する可能性が示唆された。

3) マウス破骨前駆細胞株(MBC-1, MBC-2)の解析

不死化した破骨前駆細胞群であるMDBMTをさらに詳しく解析するために、不死化細胞集団から限外希釈により、単一コロニー由来の細胞株を7株取得した。各細胞株は顕微鏡観察から、丸い形で増殖するタイプ(3クローン)と細長い形で増殖するタイプ(4クローン)に大別し、丸い形で増殖するタイプをMBC-1、細長い形で増殖するタイプをMBC-2とした(Fig.8)。細胞株であるMBC-1、MBC-2においても、33.5 °Cの温度条件では細胞が増殖し、39.0 °Cの温度条件では細胞増殖が停止した(Fig.9 A)。このことからMDBMTと同様、tsLT抗原の発現制御により、培養温度条件依存的に増殖を制御できることが示された。また、MBC-1、MBC-2はM-CSF依存的に生存・増殖することも示された(Fig.9 B)。これら二点の実験結果から、MBC-1、MBC-2は、MDBMTと同じく増殖あるいは生存に、Large T抗原の発現が強く関与していることが示唆された。

MDBMTの条件を参考に、MBC-1、MBC-2について破骨細胞への分化誘導を行

った。各細胞株の分化段階の差を明確にするために、一回目の RANKL 刺激 (0 時間) から 196 時間後に TRAP 染色を行った。結果、MBC-1、MBC-2 共に TRAP 陽性細胞への分化が確認されたが (Fig.10 A ,)、多核細胞に分化したのは MBC-2 (Fig.10 A) のみであった。表面抗原においても確認するために、RANKL 刺激 168 時間後の表面抗原の状態を分析したところ、MBC-2 において Mac-1 陰性、F4/80 陰性へシフトする傾向が見られたが (Fig.10 B 右)、MBC-1 においては Mac-1 陰性、F4/80 陰性へシフトする細胞がほとんど無く、分化していない傾向が観察された (Fig.10 B 左)。これら二点の実験結果からも、マウス初代骨髄単核細胞 (mBMMNCs) 中の M-CSF 依存的に生存・増殖する細胞集団は均一ではなく、破骨細胞分化において各細胞間の細胞融合能には差異があることが示唆された。一方、破骨細胞分化における必須の転写因子である NFAT2 (NFATc1) の発現レベル (Fig.11 A)、M-CSF に対する細胞遊走能力 (Fig.11 B) に差異が見られなかったことから、多核化に差異が認められた MBC-1、MBC-2 において他の因子の存在が示唆された。

以上の結果から、これら二つのクローン (MBC-1、MBC-2) を比較することで、破骨細胞の融合における因子のスクリーニング系として利用できる可能性が考えられた。一方、MDBMT からのクローニングにより、TRAP 陽性多核細胞に分化可能な破骨前駆細胞株である MBC-2 の取得に成功したことから、効率よく成熟破骨細胞を得る分化誘導系としての利用も考えられた。

この方法を用いることで、破骨細胞の研究上有用なツールとなりうる破骨前駆細胞株が樹立可能であることが実証された。また、ガン遺伝子導入による不死化法が分化能を有する破骨前駆細胞株の樹立に有効であることも実証された。

4) ヒト破骨細胞分化誘導系の確立

ヒト破骨細胞の *in vitro* 分化誘導系としては、現在までに抹消血の単球 - マクロファージ系細胞を用いた、初代細胞の分化誘導系が主に用いられている (Shalhoub et al., 1999)。近年、MACS (Magnetic Cell Sorting) を用いて抹消血中の CD14 細胞を純化し、10-14 日前後で分化誘導を行うアッセイ系も用いられている (Shinoda et al., 2003)。また、6 日ほどで成熟破骨細胞へ分化するヒト破骨前駆細胞 (Osteoclast Precursor Cells : OPCs) も販売されているが (TaKaRa)、分化効率は 20-30% であり、非常に高価である。これらの系は、遺伝子導入に関しても困難である。そこで私は、マウスでの系の応用も考え、抹消血細胞より増殖能力の高い骨髄細胞を用いて、破骨細胞の分化誘導系を構築した。

マウスの系で成功していたことから、マウスでの方法と同様に、ヒト初代

骨髄単核細胞 (hBMMNCs) に対してヒト M-CSF を添加し、ヒト RANKL 刺激を行うことで成熟破骨細胞への分化誘導を試みた。しかし、マウスの系とは違い、hBMMNCs は成熟破骨細胞への分化が観察されなかった (Fig.12 A)。そこで、培地、播種の方法、RANKL 刺激のタイミング等の条件検討を行ったが、主に増殖するのは繊維芽細胞様の細胞であった (data not shown)。TRAP 染色を行い、繊維芽細胞様の細胞と周辺に存在する単球 - マクロファージ系細胞を観察したところ、繊維芽細胞様の細胞と、周辺に存在する単球 - マクロファージ系細胞は、TRAP 染色に対して陽性反応が見られた (Fig.12 B 矢印部分)。抹消血細胞を用いたヒト破骨細胞研究において、破骨前駆細胞の表面抗原マーカーとして CD14 が用いられている (Purton et al., 1996; Nicholson et al., 2000)。そこで、ヒト初代骨髄単核細胞 (hBMMNCs) について、CD14 の発現を調べたところ、陽性細胞の分布が低い傾向が観察された (Fig.15)。

これらのことから、ヒト初代骨髄単核細胞 (hBMMNCs) は、マウス初代単核骨髄細胞 (mBMMNCs) (Fig.5 B) に比べて、単球 - マクロファージ系細胞の分布が少ないため、hBMMNCs から効率良く破骨細胞は得られない事が考えられた。また、hBMMNCs の表面抗原解析 (Fig.15, Fig.16) より、hBMMNCs には多くのポピュレーションの細胞が存在するため、効率良く破骨細胞が得られない可能性も示唆された。

これらの実験結果から、ヒト初代骨髄単核細胞 (hBMMNCs) より、骨芽細胞様の細胞を分離する必要があった。さらに、ある程度分化の進んだ前駆細胞を濃縮することで破骨前駆細胞群を濃縮したいと考えた。そこで、造血細胞から特定の骨前駆細胞を増殖させる *in vitro* コロニー法 (参考図.2) を用いた培養を選択した。*in vitro* コロニー法 (Methocult 培養) を用いた培養を行うことで、hBMMNCs より顆粒球・マクロファージ系列の前駆細胞である CFU-GM (Colony Forming Unit Granulocyte Macrophage) を得ることが可能である。CFU-GM は、これまでに効率良く破骨細胞に分化できることが報告されている (Mena et al., 2000, Shead et al., 2006)。得られた細胞である CFU-GM は、ヒト単球-マクロファージ系細胞に発現する抗 CD4 抗体、抗 CD11b 抗体、抗 CD14 抗体について、陽性細胞数が増加していた (Fig.15)。CD14 陽性細胞の分布が増幅していたことから、効率的な破骨細胞分化が期待できた。また、増幅された CFU-GM は、Methocult 培養前の細胞数に比べて、80 倍以上の細胞数に増幅させることができた。得られた細胞群 (CFU-GM) は、M-CSF 存在下で、RANKL 刺激により、TRAP 陽性の多核成熟破骨細胞へ分化する細胞を確認できた (Fig.13)。さらに、CFU-GM を用いたヒト破骨細胞分化誘導系において、破骨細胞分化阻害剤であるシクロスポリン A 存在下での分

化阻害を確認した。結果、1 ug/mL の濃度において多核化を完全に阻害することが確認できた (Fig.14)。これらのことから、少量のヒト初代骨髄単核細胞 (hBMMNCs) より、Methocult 培養を実施することで、破骨細胞分化能を持つ細胞群 (CFU-GM) を大量に調製できることが示された。

5) ヒト破骨前駆細胞への遺伝子導入

ヒト破骨細胞分化誘導系として、遺伝子導入が容易に行えるかを調べるために、Methocult 培養により得られた細胞群 (CFU-GM) に対し、遺伝子組み換えレトロウイルスによる GFP 遺伝子の導入を実施した。ベクターには、ヒト細胞においても、レトロウイルスの感染が可能なアンフォトロピックレトロウイルスを用いた。結果、細胞外から GFP 遺伝子を導入することができた (Fig.17 B)。しかし、導入効率は 1.5% 程度であり、遺伝子解析実験に用いるには、遺伝子導入効率を向上させる必要があると考えられた。GFP 遺伝子を導入した CFU-GM に対し、抗 CD14 抗体で染色したところ、GFP 陽性細胞の CD14 陽性へのシフト (Fig17 C,D) が観察された。このことから、レトロウイルスによって遺伝子導入される細胞は CD14 陽性細胞である可能性が示唆された。また、レトロウイルスによる遺伝子導入が確認されたことから、CD14 陽性細胞群の中に増殖能を持つ細胞が存在することが考えられた。

GFP 遺伝子を導入した CFU-GM に対し、継代培養を行ったところ、単球-マクロファージ系列の細胞群は増殖が確認されず、骨芽細胞様(繊維芽細胞様)の細胞のみが増殖した (data not shown)。このことから、Methocult 培養により得られた細胞群 (CFU-GM) の中には、破骨細胞分化能を持つ細胞群以外に、骨芽細胞様(繊維芽細胞様)の細胞も混入している可能性が示唆された。そこで私は、MACS (Magnetic Cell Sorting) 法により、破骨前駆細胞群 (CFU-GM) から CD14 陽性細胞を分取した (Fig.18 A,B)。CD14 陽性の細胞は、CD11b も陽性であり (Fig.18 B)、分離した CD14 陽性細胞は、単球-マクロファージ系列細胞の純度が高いと考えられた。CD14 陽性細胞は、CFU-GM と同条件で、TRAP 陽性の多核成熟破骨細胞に分化した (Fig.19 A)。また、破骨細胞分化阻害剤であるシクロスポリン A を 1 ug/mL 添加した条件において多核化が完全に阻害された (Fig.20)。以上の結果から、CFU-GM より CD14 陽性細胞を分取することで、破骨細胞分化能を持つ細胞群を純化できることが示された。さらに、レトロウイルスベクターによって、遺伝子導入が可能であった (Fig.19 B) ことから、CD14 陽性細胞に、レトロウイルスによる遺伝子導入が可能であることが確認された。しかし、導入効率は 1.0% 程度であり、レトロウイルスを用いた遺伝子導入を行う場合、遺伝子導入効率を向上させる必要があると考えられた。

GFP 遺伝子を導入した CD14 陽性細胞に対し、CFU-GM と同様に継代培養を行ったところ、単球-マクロファージ系列の細胞群の増殖は確認されなかったが、骨芽細胞様（繊維芽細胞様）の細胞の増殖も見られなかった（data not shown）以上の結果から、Methocult 培養と MACS 法により、破骨前駆細胞群（CFU-GM）から CD14 陽性細胞を分取することで、さらに純度の高いヒト破骨前駆細胞群を得ることができると考えられた。また、ヒト細胞においても、レトロウイルスによる破骨前駆細胞群への遺伝子導入の可能性が示された。

まだ解決すべき点は多いが、この方法を用い、細胞外からガン遺伝子を導入することで、ヒト破骨前駆細胞を不死化できれば、破骨細胞の研究上有用なツールとなりうる、ヒト破骨前駆細胞株樹立の可能性が示されたと考える。

6) まとめ

本研究では、初代骨髄細胞から効率的に成熟破骨細胞を得る分化誘導系の構築を行った。マウス細胞においては、細胞外からガン遺伝子を導入することで細胞を不死化し、破骨前駆細胞株を得る手法を開発した。この方法により、特定の増殖因子を培地に加えることで、破骨細胞に分化することができる前駆細胞を株化できることを示した。また、株化したマウス破骨前駆細胞には、破骨細胞分化において多核化に違いのあるポピュレーションが含まれることを見出した。ヒト細胞においては、初代ヒト骨髄細胞からの効率的な成熟破骨細胞への分化誘導系を構築した。この系を用いることで初代骨髄細胞に比べ破骨細胞分化能を持つ細胞を 80 倍以上に増幅可能であり、分化日数の短縮も実現できた。また、得られた細胞にレトロウイルスによる遺伝子導入が可能であることを示した。近年、これまでに行われてきたマウス細胞を用いた破骨細胞研究が、ヒト細胞を用いる研究にシフトしてきており、今回の成果はヒト破骨細胞研究を行う上での有用な手段として期待される。また、ヒト破骨細胞を標的とした治療法開発における前臨床試験の代替手段としても期待できると考える。

謝辞

本研究を行うにあたり、終始懇切なる御指導と御鞭撻を賜りました当研究室の竹家達夫教授、宍戸知行准教授、北川教弘助教、小川拓哉助教に心から深く感謝の意を表します。

数々の貴重な御助言、御支援を頂きました与語圭一郎博士、諸先輩方に心から感謝の意を表します。また、お互いに激励し合った研究室の同期、後輩に深く感謝します。

また、五年間共に切磋琢磨し、お互いに激励し合った花金メンバーに心から深く感謝します。

五年間、大学院生の私を遠くから見守り、サポートしてくれた川田三千雄、ますみ、幸久、敦子に深く感謝致します。

最後になりましたが、そばで支えてくれた川田昭奈、暖乃、そして私を支えてくれた全ての人々に深く感謝致します。

参考文献

Akagi, T., Shishido, T., Murata, K., and Hanafusa, H. (2000). v-Crk activates the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway in transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *97*, 7290-7295.

Barclay, N.A., Brown, M.H., Birkeland, M.L., et al, ed. (1997). *The Leukocyte Antigen FactsBook*. (San Diego, CA: Academic Press), (Biology)

Berns, K., Hijmans, E.M., Mullenders, J., Brummelkamp, T.R., Velds, A., Heimerikx, M., Kerkhoven, R.M., Madiredjo, M., Nijkamp, W., Weigelt, B., Agami, R., Ge, W., Cavet, G., Linsley, P.S., Beijersbergen, R.L., and Bernards, R. (2004). A large-scale RNAi screen in human cells identifies new components of the p53 pathway. *Nature* *428*, 431-437.

Boyle, W.J., Simonet, W.S., and Lacey, D.L. (2003). Osteoclast differentiation and activation. *Nature* *423*, 337-342.

DeCaprio, J.A., Ludlow, J.W., Figge, J., Shew, J.Y., Huang, C.M., Lee, W.H., Marsilio, E., Paucha, E., and Livingston, D.M. (1988). SV40 large tumor antigen forms a specific complex with the product of the retinoblastoma susceptibility gene. *Cell* *54*, 275-283.

el Deiry, W.S., Tokino, T., Velculescu, V.E., Levy, D.B., Parsons, R., Trent, J.M., Lin, D., Mercer, W.E., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1993). WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* *75*, 817-825.

Goyert, S.M., and Ferrero, E. (1987). Biochemical analysis of myeloid antigens and cDNA expression of gp55 (CD14). In: McMichael, A.J., ed. *Leucocyte Typing III: White Cell Differentiation Antigens*. (New York: Oxford University Press), pp. 613-619.

Hahn, W.C., Dessain, S.K., Brooks, M.W., King, J.E., Elenbaas, B., Sabatini, D.M., DeCaprio, J.A., and Weinberg, R.A. (2002). Enumeration of the simian virus 40 early region elements necessary for human cell transformation. *Mol. Cell Biol.* *22*, 2111-2123.

Hardy, K., Mansfield, L., Mackay, A., Benvenuti, S., Ismail, S., O'hare, M.J., and Jat, P.S. (2004). Transcriptional Networks and Cellular Senescence in Human Mammary Fibroblasts. *Mol. Biol. Cell* ..

Hsu, H., Lacey, D.L., Dunstan, C.R., Solovyev, I., Colombero, A., Timms, E., Tan, H.L., Elliott, G., Kelley, M.J., Sarosi, I., Wang, L., Xia, X.Z., Elliott, R., Chiu, L., Black, T., Scully, S., Capparelli, C., Morony, S., Shimamoto, G., Bass, M.B., and Boyle, W.J. (1999). Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *96*, 3540-3545.

Ishida, N., Hayashi, K., Hoshijima, M., Ogawa, T., Koga, S., Miyatake, Y., Kumegawa, M., Kimura, T., and Takeya, T. (2002). Large scale gene expression analysis of osteoclastogenesis in vitro and elucidation of NFAT2 as a key regulator. *J. Biol. Chem.* *277*, 41147-41156.

Jat, P.S., Noble, M.D., Ataliotis, P., Tanaka, Y., Yannoutsos, N., Larsen, L., and Kioussis, D. (1991). Direct derivation of conditionally immortal cell lines from an H-2Kb-tsA58 transgenic mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *88*, 5096-5100.

Jat, P.S. and Sharp, P.A. (1986). Large T antigens of simian virus 40 and polyomavirus efficiently establish primary fibroblasts. *J. Virol.* *59*, 746-750.

Jat, P.S. and Sharp, P.A. (1989). Cell lines established by a temperature-sensitive simian virus 40 large-T-antigen gene are growth restricted at the nonpermissive temperature. *Mol. Cell Biol.* *9*, 1672-1681.

Jayaram, Y., and Hogg, N. (1989). Surface expression of CD14 molecules on human neutrophils. In: Knapp W., Dörken B., Gilks W.R., et al, eds. *Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens.* (New York: Oxford University Press), pp. 796-797.

Karpov, M., Laczka, M., Leboy, P.S., and Osyczka, A.M. (2007). Sol-gel bioactive glasses support both osteoblast and osteoclast formation from human bone marrow cells. *J Biomed Mater Res A.* *84A*, 718-726.

- Karsenty, G. (2003). The complexities of skeletal biology. *Nature* 423, 316-318.
- Knapp, W., Dörken, B., Rieber, E.P., et al, ed. (1989). *Leucocyte Typing IV. (New York: Oxford University Press), (Clone-specific)*
- Lane, D.P. and Crawford, L.V. (1979). T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* 278, 261-263.
- Lansdorp, P.M., Dougherty, G.J., and Humphries, R.K. (1989). CD34 epitopes. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, et al, eds. *Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens. (New York: Oxford University Press), pp. 826-827.*
- Lidington, E.A., Rao, R.M., Marelli-Berg, F.M., Jat, P.S., Haskard, D.O., and Mason, J.C. (2002). Conditional immortalization of growth factor-responsive cardiac endothelial cells from H-2K(b)-tsA58 mice. *Am. J. Physiol Cell Physiol* 282, C67-C74.
- Matsuzaki, K., Udagawa, N., Takahashi, N., Yamaguchi, K., Yasuda, H., Shima, N., Morinaga, T., Toyama, Y., Yabe, Y., Higashio, K., and Suda, T. (1998). Osteoclast differentiation factor (ODF) induces osteoclast-like cell formation in human peripheral blood mononuclear cell cultures. *Biochem Biophys Res Commun.* 246, 199-204.
- Meiyanto, E., Hoshijima, M., Ogawa, T., Ishida, N., and Takeya, T. (2001). Osteoclast differentiation factor modulates cell cycle machinery and causes a delay in s phase progression in RAW264 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 282, 278-283.
- Menea, C., Kurihara, N., and Roodman, G.D. (2000). CFU-GM-derived cells form osteoclasts at a very high efficiency. *Biochem Biophys Res Commun.* 267, 943-946.
- Morita, S., Kojima, T., and Kitamura, T. (2000). Plat-E: an efficient and stable system for transient packaging of retroviruses. *Gene Ther.* 7, 1063-1066.

Morrison, S.J., Shah, N.M., Anderson, D.J. (1997). Regulatory mechanisms in stem cell biology. *Cell*. *88*, 287-298

Nadler, L.M., Anderson, K.C., Marti, G., Bates, M., Park, E., Daley, J.F., and Schlossman, S.F. (1983). B4, a human B lymphocyte-associated antigen expressed on normal, mitogen-activated, and malignant B lymphocytes. *J Immunol*. *131*, 244-250.

Nelson, B.J., Belosevic, M., Green, S.J., Turpin, J., and Nacy, C.A. (1992). Interleukin-2 and the regulation of activated macrophage cytotoxic activities. *Adv. Exp. Med. Biol.* *319*, 77-88.

Nevins, J.R. (1992). E2F: a link between the Rb tumor suppressor protein and viral oncoproteins. *Science* *258*, 424-429.

Nicholson, G.C., Malakellis, M., Collier, F.M., Cameron, P.U., Holloway, W.R., Gough, T.J., Gregorio-King, C., Kirkland, M.A., and Myers, D.E. (2000). Induction of osteoclasts from CD14-positive human peripheral blood mononuclear cells by receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL). *Clin Sci (Lond)*. *99*, 133-140.

Niwa, H., Yamamura, K., and Miyazaki, J. (1991). Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene* *108*, 193-199.

Noble, P.B., and Cutts, J.H. (1967). Separation of blood leukocytes by Ficoll gradient. *Can. Vet. J.* *8*, 110-111.

Obinata, M. (2001). Possible applications of conditionally immortalized tissue cell lines with differentiation functions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *286*, 667-672.

Ogawa, M. (1993). Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. *Blood* *81*, 2844-2853.

Pallas, D.C., Shahrik, L.K., Martin, B.L., Jaspers, S., Miller, T.B., Brautigan, D.L., and Roberts, T.M. (1990). Polyoma small and middle T antigens and SV40 small t antigen form stable complexes with protein phosphatase 2A. *Cell* *60*, 167-176.

Prives, C. and Hall, P.A. (1999). The p53 pathway. *J. Pathol.* *187*, 112-126.

Purton, L.E., Lee, M.Y., and Torok-Storb, B. (1996). Normal human peripheral blood mononuclear cells mobilized with granulocyte colony-stimulating factor have increased osteoclastogenic potential compared to nonmobilized blood. *Blood.* *87*, 1802-1808.

Raschke, W.C., Baird, S., Ralph, P., and Nakoinz, I. (1978). Functional macrophage cell lines transformed by Abelson leukemia virus. *Cell* *15*, 261-267.

Rundell, K. and Parakati, R. (2001). The role of the SV40 ST antigen in cell growth promotion and transformation. *Semin. Cancer Biol.* *11*, 5-13.

Ryan, D., Kossover, S., Mitchell, S., Frantz, C., Hennessy, L, Cohen, H. (1986). Subpopulations of common acute lymphoblastic leukemia antigen-positive lymphoid cells in normal bone marrow identified by hematopoietic differentiation antigens. *Blood* *68*, 417-425.

Schlossman, S.F., Boumsell, L., Gilks, W., et al, ed. (1995). *Leukocyte Typing V: White Cell Differentiation Antigens.* (New York: Oxford University Press), (Clone-specific)

Shalhoub, V., Faust, J., Boyle, W.J., Dunstan, C.R., Kelley, M., Kaufman, S., Scully, S., Van, G., and Lacey, D.L. (1999). Osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand effects on osteoclast formation from human peripheral blood mononuclear cell precursors. *J Cell Biochem.* *72*, 251-261.

Shed, E.F., Haworth, C.S., Gunn, E., Bilton, D., Scott, M.A., and Compston, J.E. (2006). Osteoclastogenesis during infective exacerbations in patients with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* *174*, 306-311.

Shinoda, K., Sugiyama, E., Taki, H., Harada, S., Mino, T., Maruyama, M., and Kobayashi, M. (2003). Resting T cells negatively regulate osteoclast generation from peripheral blood monocytes. *Bone.* *33*, 711-720.

Sullivan, C.S. and Pipas, J.M. (2002). T antigens of simian virus 40: molecular chaperones for viral replication and tumorigenesis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *66*, 179-202.

Suzuki, J., Fukuda, M., Kawata, S., Maruoka, M., Kubo, Y., Takeya, T., and Shishido, T. (2006). A rapid protein expression and purification system using Chinese hamster ovary cells expressing retrovirus receptor. *J Biotechnol.* *126*, 463-474.

Suzuki, J., Sukezane, T., Akagi, T., Georgescu, M.M., Ohtani, M., Inoue, H., Jat, P.S., Goff, S.P., Hanafusa, H., and Shishido, T. (2004). Loss of c-abl facilitates anchorage-independent growth of p53- and RB- deficient primary mouse embryonic fibroblasts. *Oncogene* *23*, 8527-8534.

Spangrude, GJ, Heimfeld, S, Weissman, I.L. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science.* 1988 Jul 1;241(4861):58-62.

Takahashi, N., Udagawa, N., Akatsu, T., Tanaka, H., Shionome, M., and Suda, T. (1991). Role of colony-stimulating factors in osteoclast development. *J. Bone Miner. Res.* *6*, 977-985.

Takayanagi, H., Kim, S., Koga, T., Nishina, H., Isshiki, M., Yoshida, H., Saiura, A., Isobe, M., Yokochi, T., Inoue, J., Wagner, E.F., Mak, T.W., Kodama, T., and Taniguchi, T. (2002). Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts. *Dev Cell.* *3*, 889-901.

Takeshita, S., Kaji, K., and Kudo, A. (2000). Identification and characterization of the new osteoclast progenitor with macrophage phenotypes being able to differentiate into mature osteoclasts. *J. Bone Miner. Res.* *15*, 1477-1488.

Tegtmeyer, P. (1972). Simian virus 40 deoxyribonucleic acid synthesis: the viral replicon. *J. Virol.* *10*, 591-598.

Tegtmeyer, P. and Ozer, H.L. (1971). Temperature-sensitive mutants of simian virus 40: infection of permissive cells. *J. Virol.* *8*, 516-524.