

# 論文内容の要旨

申請者氏名 川田 滋久

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により維持されている。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。マウス破骨細胞に関する詳細な研究は多く行われているものの、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。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。

そこで私は、初代マウス骨髄細胞から破骨前駆細胞株を樹立する基本技術を確立し、次いで、それをヒト骨髄由来の初代細胞に応用することにより、ヒト破骨細胞の新規分化誘導系を構築するための研究を行った。その結果、

## 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：

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い、少なくとも1年以上は培養可能であり、既に報告されている破骨前駆細胞と同様の性質を有する細胞を得ることに成功した。さらに、それらの細胞集団を限外希釈により単一コロニー由来の細胞株を複数取得し、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。以上により、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するとともに、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を実証した。

## 2) ヒト初代破骨前駆細胞の培養系構築：

マウス系での知見を応用し、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。そこで、まずヒト初代骨髄細胞を 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。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。それらの細胞群に対し、レトロウィ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を実証した。

# 論文審査結果の要旨

申請者氏名 川田 滋久

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。これまで、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。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。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、骨代謝研究ならびに応用面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。

そこで申請者は、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。

これらの成果をもとに、ヒト細胞への応用を試み、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が80倍以上に増幅可能であり、分化に要する日数の短縮も実現できた。さらに、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。

以上のように、本論文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もので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（バイオサイエンス）の学位論文として価値あるものと認めた。