

論文内容の要旨

申請者氏名 市田 勝紀

間葉系の未分化な細胞の骨形成のメカニズムを解明することは、骨折治療などの医療への応用に繋がり重要である。未分化な細胞が骨形成に寄与するためには骨芽細胞へ分化すること、そして骨形成部位への移動することの両方が重要であるが、これまで分化と運動について包括的な研究はなされてこなかった。

申請者は未分化な細胞は骨分化の段階により細胞形態、接着能、運動能が変わることを未分化間葉系細胞株 ST2 細胞と骨髄より得られた初代培養細胞を用いて明らかにし、分化と運動の関係について新たな知見を示した。

まず、最初に骨分化を誘導することができるマウスの4つの細胞株を用いて運動能を調べた。すると、4つの細胞株間において運動能が違うことが分かった。これらの細胞株は分化段階が異なる細胞株であり、分化段階において運動能が変化するのではないかと示唆された。そこで、未分化な細胞株 ST2 細胞を用いて骨分化を段階的に誘導することができる分化実験系を構築し、分化と運動能について解析を進めた。段階的に骨分化を誘導し、分化段階の違いによる細胞形態、運動、接着の変化を観察した。すると、骨分化に伴い細胞形態がダイナミックに変化することが明らかになった。骨分化初期においては細胞運動が亢進しており、その時期にはアクチン細胞骨格の制御に重要である Rho ファミリー低分子量 G タンパク質である Cdc42 と Rac1 の活性が高くなっていることがわかった。また、骨分化後期では細胞接着能が亢進しており、運動能が低下することがわかった。さらに細胞運動のタイムラプスビデオの撮影を行い、未分化な細胞が mesenchymal mode によって速く移動することを明らかとした。

次に、mesenchymal mode による細胞運動が低分子量 G タンパク質の RhoA の下流で働く ROCK (Rho-associated kinase) の阻害剤である Y-27632 を処理することによって促進されることを ST2 細胞、及びマウスの骨髄より調製した間葉系細胞を用いて明らかにした。Y-27632 による運動促進の作用は、マウスの *in vivo* 異所性骨形成モデルにおいても有効であった。Y-27632 を供給することによってマウスの骨形成部位への細胞の動員が顕著に促進され、その後、骨形成が進むとコントロールと比べ大きな骨が形成されることが明らかとなった。これらのことから、*in vivo* での運動促進が骨形成を増強することを明らかとした。

本研究から、申請者は骨分化段階によって細胞運動に変化があることが明らかとし、骨分化と細胞運動の関係に新たな知見を示した。また、細胞運動を促進することにより骨形成が増強されることを示し、間葉系幹細胞の性質の解明に貢献した。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 市田 勝紀

骨形成における間葉系の未分化な細胞を解析することは、骨形成のメカニズムの解明、さらには骨折治療や再生医療などの医療への応用に繋がり重要である。申請者は、骨分化段階によって細胞運動能に変化があると予想した。実際、分化段階が異なるマウスの細胞株を用いて細胞運動能に違いがあることを明らかとした。

また、未分化な細胞株 ST2 細胞を用いて骨分化を段階的に誘導することができる分化実験系を構築し、分化と運動能について解析を行なった。分化段階の違いによる細胞形態、運動、接着の変化を観察したところ、細胞形態が骨分化に伴いダイナミックに変化することがわかった。未分化な時期ではアクチンストレスファイバーの形成、接着班の形成が強固になっているが分化初期段階に消失し、紡錘状に細胞形態が変化することがわかった。細胞運動は形態変化が大きく見られた分化初期段階に優位に亢進し、分化段階後期には運動速度は初期の細胞と同程度まで減少することを明らかとした。さらに細胞運動の促進が見られた分化初期段階にアクチン細胞骨格の制御に重要である Rho ファミリー低分子量 G タンパク質の Cdc42、Rac1 の活性が高くなっていることが明らかとなった。さらに細胞運動をタイムラプスビデオにより観察を行う事によってその運動様式が mesenchymal mode であることがわかった。分化後期の時期では細胞の接着能が促進されることが明らかとなり、細胞接着が細胞運動に関与していることが示唆された。

次に、ST2 細胞とマウスの骨髄より初代培養を行なった間葉系細胞を用いて ROCK 阻害剤である Y-27632 を処理することにより mesenchymal mode による細胞運動の促進が引き起こされる事を明らかとした。Y-27632 処理による運動促進作用は骨分化した ST2 細胞や骨芽細胞株 MC3T3-E1 細胞では見られなかった。このことから Y-27632 処理は未分化な細胞特異的に細胞運動を促進することが明らかとなった。Y-27632 による未分化な細胞の運動促進はマウスの異所性骨形成モデルによる実験において in vivo でも引き起こされることがわかった。Y-27632 をマウスに供給することによって骨形成部位への未分化な細胞の移動が促進され、コントロールに比べて大きな骨ができた。このことから未分化な細胞の細胞運動を促進することによる骨形成の促進が明らかとなった。

以上のように、本論文は分化と細胞運動の関係について新たな知見を明らかにしたもので、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。