

[別紙2]

審査の結果の要旨

氏名 岩井しのぶ

本研究はヒトにおける破骨細胞形成過程において重要な働きを演じているODFとM-CSFの役割と骨髄微小環境におけるNotch系による新たな破骨細胞形成制御機構を明らかにするため、ヒトの造血前駆細胞とヒト骨組織由来の培養細胞を用いて破骨細胞の分化制御機構の解明を試みたものであり、下記の結果を得ている。

- 1) ヒトの末梢血中に含まれる破骨細胞前駆細胞を同定するため、破骨細胞前駆細胞を含む細胞を末梢血中から単離することを試みたところ、重要な表面マーカーはCD11b, CD18, CD40, c-Fmsがともに陽性で、CD11cが陰性であることが判った。
- 2) 未分化で幼若な造血前駆細胞から分化誘導させ、破骨細胞を形成することができる細胞群はどのような性質のものであるかを調べるため、臍帯血CD34陽性造血前駆細胞からの分化誘導を行った。培養条件は2段階で、最初にSCF, IL-3, IL-6, GM-CSF, M-CSFを添加して骨髄球系細胞を増幅し、次にM-CSF, ODFを添加した分化培地で破骨細胞を誘導した。この二段階培養法で効率的に破骨細胞を分化誘導できる事が明らかになった。
- 3) 破骨細胞前駆細胞がどの分化系統のコロニーから生じるかを調べる目的でシングルセルソートを行った。臍帯血CD34陽性細胞を精製し、2週間の培養を行ったところ、破骨細胞はマクロファージもしくはGMコロニーからのみ分化したが、マクロファージもしくはGMコロニーであると形態学的に判定されたコロニーの細胞の総てが破骨細胞に分化できるのではなく、そのなかの一部30%から60%が破骨細胞になりうる前駆細胞を含んでいることが明らかになった。
- 4) M-CSFとODF存在下でFlt-1強陽性CD11b強陽性細胞群はFlt-1弱陽性CD11b弱陽性細胞群よりも増殖能力が低かったが、前者から分化する破骨細胞には単核の破骨細胞が

相対的に多かった。後者は増殖活性を示し、多核破骨細胞の割合が高かった。

- 5) 破骨細胞形成が骨髄中の微細環境でODFとM-CSF以外による正の制御だけでなく、細胞接着を介した何らかの負の制御を受けると仮定した場合、破骨細胞形成に影響を与える可能性がある細胞として、骨芽細胞、増殖軟骨細胞、肥大化軟骨細胞が考えられる。これらを用いた共存培養で比較すると、培養液中に十分量添加したODFとM-CSFの存在にもかかわらず、増殖軟骨細胞上では破骨細胞の形成が明らかに阻害された。肥大化軟骨細胞上では、破骨細胞前駆細胞を含むGMコロニー由来細胞が、所々で大きなコロニーを形成し、コロニー形成細胞が軟骨細胞層を剥がして浸潤し、その下で大量の破骨細胞を形成した。骨芽細胞上では破骨細胞形成に抑制的な働きは認められなかった。
- 6) 可溶性Notchリガンドのもたらす分化抑制効果が破骨細胞形成システムに影響を与える可能性を確認するため、可溶性Notchリガンドを破骨細胞前駆細胞培養に添加し、その効果を調べた。破骨細胞形成は明らかに抑制を受けたが、この抑制は可逆的で、可溶性Notchリガンドを培養液の中から除去して引き続き培養すると、破骨細胞の形成が進行した。
- 7) ODF刺激による破骨細胞の形成にはNF κ B活性化とJNK活性化が不可欠であるが、可溶性Notchリガンド刺激によってNF κ B活性化とJNK活性化の阻害が認められた。
- 8) 増殖軟骨細胞と肥大化軟骨細胞ではJagged1が強く発現していたが、骨芽細胞でJagged1の発現はほとんど認められなかった。破骨細胞前駆細胞はNotch2を発現し、Jagged1を破骨細胞形成培養中に添加すると明らかに破骨細胞形成を阻害したことから、軟骨細胞が破骨細胞分化を抑制的に制御しているシステムには、Jagged1を介したNotchシグナルが関与する可能性があると考えられた。

以上、本論文はヒト破骨細胞形成培養系においてM-CSFとODFの果たす役割と、骨組織における部位特異的な破骨細胞形成が細胞接着を介したNotchシグナリングの働きで制御を受けることを明らかにした。本研究はこれまで未知であった詳細なヒト破骨細胞形成における新たな制御機構の存在の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。