

氏 名	きた　むら　かず　ゆき 北　村　和　之
学位(専攻分野)	博　士　(学　術)
学 位 記 番 号	博 甲 第 69 号
学位授与の日付	平成 6 年 11 月 28 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研 究 科・専 攻	工学科学研究科機能科学専攻
学 位 論 文 題 目	Studies on In Vitro Bone Resorption Assay and Establishment of Monoclonal Antibodies against Mouse Osteoclasts (マウス破骨細胞による骨吸収窩形成法の検討及びマウス破骨細胞に対するモノクローナル抗体の作製)
審 査 委 員	(主査) 教 授 松 原 藤 好 教 授 松 本 継 男 教 授 古 沢 寿 治 教 授 遠 藤 泰 久

論 文 内 容 の 要 旨

近年、骨代謝に関する研究が盛んになっている。骨は、一見変動の乏しい組織に見えるが、絶えず骨吸収、骨形成が行なわれている。骨吸収を司る細胞が破骨細胞であり、骨形成を司る細胞が骨芽細胞である。破骨細胞の研究は、数年前まで、もっぱら *in vivo* と器官培養系を用いて行なわれてきた。最近になって、*in vivo* で骨吸収現象がより解析的に検討され、その結果、細胞レベルでの実験系、骨髓細胞培養系や単離した破骨細胞を用いた骨吸収系が相次いで開発されるようになった。

本研究ではとくに破骨細胞に焦点をあて、まず第 1 章では既往の研究について解説し、本研究の目的を述べている。

第 2 章では、骨吸収を評価する *in vivo* 骨吸収形成アッセイ法の検討について述べている。骨吸収を評価するアッセイ系として現在までにラジオアイソトープを用いた器官培養法、マウス又はラット全骨細胞中の破骨細胞を用いた吸収窩アッセイ法などが確立されている。しかしながら、これらの方法は、ラジオアイソトープを使用することによる操作の煩雑さ、また再現性、定量性に欠けるなど改善すべき問題点がいくつか上げられる。さらに、未だ有用な破骨細胞株が存在しない現在、大量のサンプルを短時間に処理したり、常に一定の結果を得たりすることは困難な場合が多い。そこでこれら問題を解決するために、まず、マウス全骨細胞を副甲状腺ホルモンで前培養することにより、破骨細胞様細胞が多く形成されることを見だし、これら細胞を象牙片上で培養し吸収窩を形成させることにより再現性のある定量的アッセイ法を確立した。さらにこの前培養細胞は、吸収窩形成能を失うことなく長期凍結保存が可能であることを確認した。これらの結果より、このアッセイ系は、簡便な骨吸収の定量的解析を可能とし、さらに、細胞を凍結保存できることにより、破骨細胞株に代わりうる準細胞株として有用であると考えられる。

第 3 章では、第 2 章で確立したアッセイ系を用いて、抗炎症剤及び免疫抑制剤として開発された leflunomide を評価し、その作用機序についての検討結果を述べている。近年、leflunomide と同様の作用を持つサイクロスポリン A が強く骨吸収を抑制することが報告された。そこで、leflunomide を、第 2 章で確立したアッセイ系で検討したところ、この薬物は濃度依存的に吸収窩の形成を抑制し、その作用機序は骨吸収の強い促進物質である PGE₂ の産生抑制によることを確かめた。このような作用機序に関する研究は、新しい骨吸収抑制剤の開発などにヒントを与えるものである。

第 4 章では、破骨細胞の性状の解析を目的とした、破骨細胞膜表面抗原を特異的に認識するモノクロー

ナル抗体の作製について述べている。破骨細胞の役割、機能を詳細に研究する1つの手段として、現在までにヒトあるいは、ニワトリの破骨細胞膜表面上のマーカー、機能分子に対するモノクローナル抗体が作製され解析に用いられている。しかし、マウス破骨細胞に対するモノクローナル抗体は未だ確立されていない。そこで、第2章で述べた、培養により増やした破骨細胞を免疫することにより、マウス破骨細胞に特異的に反応するモノクローナル抗体の作製を試み、それに成功した。この結果は、マウスが研究材料としてもっともよく使われていることを考えると非常に意義深い。マウス破骨細胞のマーカーとしてのみならず、分化過程を研究する手段として、さらには破骨細胞の骨吸収の作用機序を解析する手段としても有用であると考えられる。

論文審査の結果の要旨

本論文は、骨代謝に関与する破骨細胞に焦点を当て、マウス全骨細胞を用いることにより簡便かつ定量的骨吸収窩形成アッセイ法を確立し、また全骨細胞の凍結保存により細胞株に代わりうる準細胞株として有用であることを明らかにしている。また、本アッセイ法を利用し、薬物の解析へと検討を広げ、抗炎症剤の骨吸収抑制作用に対する作用機序を明らかにしている。さらに、マウス破骨細胞に対するモノクローナル抗体を作製し、細胞のマーカーとしてのみならず、破骨細胞の解析の手段としての有用性を与えている。

本論文は以下の点で独創性が認められた。

(1) マウスの骨細胞を用いて、簡便な定量的骨吸収窩形成アッセイ法を確立し、また、骨細胞を凍結保存し、準細胞株として利用できることを示したのは本論文が最初である。

(2) リフルノマイドが骨吸収抑制作用を持つことを示し、さらにその作用機序が骨吸収の促進因子である PGE_2 の産生抑制であることを示したのは本論文が最初である。

(3) マウス破骨細胞に対するモノクローナル抗体を確立したのは本論文が最初である。

以上のように、本論文は、破骨細胞による骨吸収の研究に関して学術上新規性に富み、独創的なものであると評価できるので、博士(学術)を授与するに値することを認める。なお、本論文の記載内容は、国際的に評価の高い査読制度のある学術雑誌3編にまとめられ、すべて筆頭著者である。さらに内容に関連する2つの報文が国際学術雑誌に受理されている。その内容は骨代謝の研究に着実な寄与をしているものと判断した。