

平成21年1月

# 能勢道也 学位論文審査要旨

主 査 岡 崎 俊 朗  
副主査 豊 島 良 太  
同 萩 野 浩

## 主論文

Comparison of osteoclast precursors in peripheral blood mononuclear cells from rheumatoid arthritis and osteoporosis patients

(関節リウマチと骨粗鬆症患者における末梢血単核細胞中の破骨細胞前駆細胞の比較)

(著者：能勢道也、山崎英俊、萩野浩、森尾泰夫、林眞一、豊島良太)

平成20年 Journal of Bone and Mineral Metabolism 27巻 57～65頁

# 学 位 論 文 要 旨

## Comparison of osteoclast precursors in peripheral blood mononuclear cells from rheumatoid arthritis and osteoporosis patients

### (関節リウマチと骨粗鬆症患者における末梢血単核細胞中の破骨細胞前駆細胞の比較)

骨吸収能を持つ破骨細胞は、単球やマクロファージと同様な性格を持つ血球系細胞で、その前駆細胞(osteoclast precursors, pOCs)は末梢血中に存在する。pOCsが破骨細胞に分化するために必要な因子についてはすでに知られているが、in vitroで効率的に分化させる方法は未だ確立されていない。本研究では、pOCsを破骨細胞へ効率的に分化させる方法を考案するとともに、骨粗鬆症を主な病態とする関節リウマチと原発性骨粗鬆症におけるpOCsの量的・質的差異の有無を検討した。

## 方 法

健常人5例(21~35歳)の末梢血を採取し、研究対象とした。末梢血単核細胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)のみを分離して取り出し、細胞表面マーカーであるCD14とCD16を用いてpOCsに純化して、効率良く破骨細胞を誘導する方法を検討した。純化した細胞をマウス間質細胞(ST2)と14日間共培養し、その後、酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ染色を行い、さらにRT-PCRによる破骨細胞の遺伝子発現を検索した。

次に、関節リウマチと原発性骨粗鬆症におけるpOCsについて検討した。関節リウマチ9例(平均63.4±8.8歳)と骨粗鬆症14例(平均66.4±6.3歳)の女性を対象とし、健常女性10例(平均67.6±5.6歳)を対照として、各群のpOCsの差異をflow cytometryと培養を行って調べた。

## 結 果

### 1. pOCsから破骨細胞への効率的な分化誘導の方法

PBMCsをヒト組み換えマクロファージコロニー刺激因子(M-CSF)とreceptor activator of NFκ-B ligand (RANKL)を添加した培地で、ST2と共培養した場合に最も効率的に破骨細胞に分化誘導できた。M-CSF、RANKL、ST2のいずれが欠けた場合にも、破骨細胞は分化誘導されなかった。CD14とCD16の発現の有無によってPBMCsを純化し培養した結果、pOCsはCD16を強く発現するPBMCsにはほとんど存在せず、CD14を発現するPBMCsの中に存在していた。CD14

を発現するPBMCsは、さらにCD16も発現するPBMCsとCD14のみを発現するPBMCsに分けられ、それぞれ培養した結果、pOCsはCD16を発現せず、CD14のみを発現するPBMCsに存在することが明らかとなった。したがって、CD16陰性でCD14陽性のPBMCsをM-CSFとRANKL添加培地でST2と共培養することによって最も効率的に破骨細胞に分化誘導された。

## 2. 関節リウマチ、骨粗鬆症、健常人の3群間でのpOCsの量的・質的差異

3群間でPBMCsの数に有意な差は無かった。3群でそれぞれ同数のpOCsから破骨細胞の分化誘導を行ったところ、関節リウマチで最も多くの破骨細胞が誘導され、次に健常成人で、最も少ないのは骨粗鬆症であった。関節リウマチと骨粗鬆症の間の差は有意であった。PBMCs中のpOCsは、健常人より関節リウマチと骨粗鬆症の両群で多かったが、有意な差はなかった。

## 考 察

pOCsから破骨細胞を効率的に分化させるためには、PBMCsをCD16陰性でCD14陽性の細胞に純化し、これをM-CSFとRANKLを添加した培地でST2と共培養する方法が有用であることが判明した。in vitroでは、M-CSFとRANKLの存在下でもST2が欠けた場合には破骨細胞への分化は見られず、ST2の重要性、特にST2由来の接着分子等の何らかの因子が必須であると考えられた。PBMCs中のCD14陽性細胞は2つの集団に分けられ、特にCD14のみ陽性の単核細胞にpOCsが多いことが示された。近年、感染や炎症性疾患の患者ではCD14・CD16陽性のPBMCsが増加していることが報告されているが、関節リウマチや骨粗鬆症では有意な増加は認めなかった。同数のpOCsから誘導される破骨細胞数に関節リウマチと骨粗鬆症で大きな差があったという結果は、関節リウマチと骨粗鬆症のpOCsには質的な差異があり、骨粗鬆症に比べて関節リウマチのpOCsが破骨細胞に分化する能力は高いことが示唆された。

## 結 論

PBMCsをCD16陰性でCD14陽性の細胞に純化し、この細胞をST2と共培養することによって、破骨細胞を効率的に分化誘導することができた。この方法を用いて関節リウマチと原発性骨粗鬆症のPBMCs中のpOCsの量的・質的差異を検討した結果、骨粗鬆症に比べて関節リウマチのpOCsが破骨細胞に分化する能力の高いことが示唆された。