

審査の結果の要旨

丁 憲 煜

生体内の骨組織には、骨芽細胞と破骨細胞が存在することにより、骨形成と骨の分解のバランスが一定に保たれることにより、その組織の恒常性が維持されていることが知られている。正常な骨組織では上述の二つの細胞の作用により古い骨は分解され、新しい骨が常につくられるリモデリングが起こっていることがわかっている。破骨細胞よりも骨芽細胞の活性が極端に高くなることによって生ずる **Osteopetrosis** を発症した状態では骨は強くなるが材料力学的には脆性破壊が起きやすい組織となり、同時多発的な骨折などが問題となっている。一方、骨芽細胞より破骨細胞の活性が高くなる **Osteoporosis** を発症した組織では骨が極端に脆くなるのが問題となっている。従って、生体内の骨においては骨芽細胞と破骨細胞がバランスよく活動することにより骨の恒常性が維持されている状態がよりよい状態であると考えられている。

生体内の骨様組織を再生する研究では、骨芽細胞にフォーカスした研究が行われてきたが、破骨細胞にフォーカスした研究は少ない。本研究では将来的な再生医療への応用を目指して、骨芽細胞と破骨細胞のトポロジカルな微細構造の与える効果について、生体内および生体外における検討を行うことを目的とした。特に生体内の解析においては、ラットを実験モデルとして用い、幼若ラット、成熟ラット、卵巣切除ラット、加齢ラットの4種類のラットの骨から細胞のみを脱細胞するモデルを構築し、骨と細胞との界面の微細構造を定量的に解析する試みを行った。生体外における解析では、ライン状のトポロジカル界面を作製し、破骨細胞と骨芽細胞の活性に及ぼす効果を調べた。

実験動物を用いた電子顕微鏡解析から、幼若ラットの骨様基質と細胞との界面にはナノからマイクロ単位の微細なファイバー状のマトリクスが多数存在することがわかった。一方、卵巣切除モデルや加齢モデルではマトリクス表面の構造は平滑で、小さい孔が数多く存在することがわかった。骨表面の表面粗さの半定量的な解析からも、同様の傾向が存在することがわかった。

次に、生体外における造血幹細胞からの破骨細胞への分化に及ぼすトポロジカルな界面の効果を検証する実験を行った。生体内の骨様基質表面にはライン状のナノマイクロ構造が存在することから、本研究においてもライン状の凹凸構造の造血幹細胞から破骨細胞への分化に及ぼす効果を調べた。溝の幅を 1, 5, 10 μm に変えて実験した結果、1 μm の幅を有するパターンが最も破骨細胞への分化を促進することがわかった。さらに破骨細胞の骨吸収に深く関与していると考えられている podosome の形成（ベルト状、リング状、クラスター様）においても、1 μm のパターンが最も破骨細胞の活性をあげることがわかった。これらの現象は、細胞内のテンションを阻害剤で抑制すると、5, 10 μm のパターンによる破骨細胞への分化抑制が阻害されることから、細胞内の力学場との関係が強く示唆される結果であった。さらに、pososome のトポロジカル界面内での存在部位を定量的に解析した結果、1 μm の幅を有するパターンでは、podosome がパターンのエッジ上部に存在することによって細胞内のテンションが加わらないように細胞内骨格が配置される形態を細胞がとると推察された。同様のパターンを用いて骨芽細胞でも培養を行った結果、数日間の短期培養では破骨細胞と骨芽細胞では真逆の細胞活性を有する結果を示すことがわかった。一方、骨芽細胞を長期培養すると、短期的にその活性が低下した 1 μm の幅を有するパターンが最も高い骨芽細胞様活性を示すこともわかった。

以上の結果から、本研究では、幼若ラット、成熟ラット、卵巣切除ラット、加齢ラットの 4 種類のラットの骨から細胞のみを脱細胞するモデルを構築して、細胞と骨様マトリクスとの界面を電子顕微鏡で可視化し、微細構造を定量的に解析したところ、成長期に値する時期には微細構造が存在するが、高齢期にはその微細構造に変化が現れることがわかった。生体外における培養実験でライン状のマイクロ構造の破骨細胞と骨芽細胞の分化に与える効果を検証したところ、これらの細胞の分化にトポロジカルな構造が影響を与えることがわかった。従って、骨内のリモデリング現象を活発化させる再生骨モデルを今後考えるにあたり、本研究は有用な基盤となりうると考えられた。

よって本論文は博士（工学）の学位請求論文として合格と認められる。