

Title	マウス骨細胞様細胞株ML0-Y4の樹立とその生物学的特性の解析
Author(s)	加藤, 洋一
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/42686">https://hdl.handle.net/11094/42686</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	加藤 洋一
博士の専攻分野の名称	博士(学術)
学位記番号	第 15857 号
学位授与年月日	平成13年1月31日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文名	マウス骨細胞様細胞株 MLO-Y4の樹立とその生物学的特性の解析
論文審査委員	(主査) 教授 米田 俊之
	(副査) 教授 前田 芳信    助教授 村上 伸也    講師 岩本 容泰

### 論文内容の要旨

#### [研究目的]

生体の発達、成長の基盤をなす骨格を構成する骨は、多様の細胞集団から構成されている。骨芽細胞は骨形成、破骨細胞は骨吸収において中心的役割を果たし、これらの細胞は相互に緊密な関係を保ちながら骨の生理、あるいは代謝の調節に関わっている。一方、骨細胞は骨組織中で最も数多く存在する細胞であるにもかかわらず、その生理的役割はほとんど知られていない。その大きな理由として、骨細胞は石灰化硬組織中に埋もれているために組織学的解析が困難であること、また代謝、増殖活性が極端に低いために培養が困難であること、さらに骨芽細胞や破骨細胞のような明確な生物学的マーカーも確立されていないため *in vivo*、および *in vitro* での研究が大きく制限されることがあげられる。したがって、骨細胞の研究を進展させる一つ的手段として、細胞株の樹立が強く望まれる。しかしながら、現在までに骨細胞様形質を保持する細胞株は樹立されていない。本研究においては、このような状況をふまえ骨細胞様形質を有する細胞株を樹立し、その生物学的特性を解析することにより骨の生理、代謝における骨細胞の役割を明らかにすること、さらには骨細胞のマーカータンパクを検索同定することを目的とした。

#### [研究方法]

オステオカルシン (OC) は分化した骨芽細胞と骨細胞にのみ発現が認められている。そこで、OCプロモーター制御下に細胞を不死化させる SV40T 抗原を発現するトランスジェニックマウスを用い、骨細胞の分離を試みた。生後14日齢のトランスジェニックマウスより四肢の長管骨を採取し、骨端部および骨髄を除去後、細かく破碎して得られた骨片をコラゲナーゼにより段階的に消化し、消化後期の細胞画分を得た。この画分を、コラーゲン上において仔牛血清を含む培地で培養し、樹状の突起を持つ星状の小さな骨細胞様細胞集団を得た。その細胞集団から最終的に骨細胞の形態的特徴を最も良く示すクローン MLO-Y4を分離した。MLO-Y4の生物学的特性はアルカリフォスファターゼ (ALP) 活性、OC産生 (RLA)、I型コラーゲン、およびペリオスチン (RT-PCR) 発現、そしてコネキシン43発現 (western) により検討した。また、同時にそれらの指標を骨芽細胞、および同時に得た他のクローン株、MLO-A5および MLO-D1株と比較検討を行った。また MLO-Y4細胞をラットに直接免疫して抗血清を作成し、MLO-Y4、および各種細胞株、ならびに骨組織における骨細胞特異的タンパク発現の有無をウェスタンブロッティングにより検討した。

### [結果]

MLO-Y4細胞は、小さな星状の形態を示す細胞で、培養経過と共に樹状の突起を伸ばす特異な形態的特徴を示した。また、骨芽細胞に比較し、OC産生が高く、骨芽細胞の特徴であるALP活性、ならびにI型コラーゲンの発現は著しく低下していた。また最近骨芽細胞の新しい指標として提唱されているペリオスチンは、MLO-Y4には発現されていなかった。またMLO-Y4では、細胞と細胞との連絡に関与するギャップジャンクション蛋白の一つであるコネキシン43の非常に強い発現が認められた。これらの形質は20代以上継代後も維持され、T抗原の発現も保持されていた。一方、MLO-A5、D1は、高いOC産生、ALP活性を示した。MLO-Y4細胞の特性を別の角度から検討する目的で、この細胞を認識する抗体を作成した。MLO-Y4細胞の免疫により得られた抗血清は、MLO-Y4株の数種のタンパクを認識したが、その中で、約40KdのタンパクはMLO-Y4株と骨細胞に富む骨基質内部組織にのみ検出され、同じトランスジェニックマウスから分離された骨芽細胞様細胞株、OCT-1には見いだされなかった。つまりMLO-Y4細胞はin vivoでの骨細胞が特異的に発現するのと同じタンパクを発現していることが示された。以上の結果より、MLO-Y4は骨芽細胞とは異なる生物学的特性を示し、骨細胞に類似の形質を有する骨細胞由来細胞株であることが示唆された。

### [考察]

MLO-Y4は小さく星状で樹状の突起をのばす形態的特徴や、高いOCの発現と非常に低いALP活性、およびI型コラーゲンの発現など、成熟骨細胞の特徴として知られているさまざまな特性を保持していることが明らかとなった。MLO-Y4細胞を用いて作成した抗血清が骨細胞を多く含む骨基質内部組織のみに見られる約40Kdの抗原を認識することから、MLO-Y4が骨細胞由来の細胞株であることが示唆された。さらにこの約40Kdの抗原は骨細胞に特異的な生物学的マーカーとして有用であると期待される。一方、MLO-A5、MLO-D1は非常に高いALP活性とOC産生を示し、特にMLO-A5は高い石灰化能をも有することから、未分化な骨細胞の性質を有する細胞株である可能性が示唆された。

### [結論]

in vitroにおいて旺盛に増殖し、骨細胞としての生化学的及び、生物学的特性を有する細胞株MLO-Y4を樹立した。MLO-Y4株は骨細胞の機能を解析していく上で極めて有用性の高い細胞であり、今後、骨の生理、代謝研究の発展に大きく貢献し得る実験モデルを提供すると考えられる。

## 論文審査の結果の要旨

本研究は、オステオカルシンプロモーターによってコントロールされるSV-40T抗原を強く発現するトランスジェニックマウスより、世界に先駆けて骨細胞株を樹立し、その分子細胞生物学的特性を明らかにしたものである。本研究の成果は骨の生理、代謝研究の発展、並びに骨代謝性疾患の病態解明に大きく貢献するものであり、よって本論文は博士（学術）に値するものと認める。