



破骨細胞機能の個体差異の解析に基づいた骨粗鬆症に対する新しいテーラーメイド医療の開発

大阪大学免疫学フロンティア研究センター・細胞動態学分野
大学院生

菊田 順一

(大阪大学免疫学フロンティア研究センター・細胞動態学 石井 優氏の代理発表)

【ポスター -1】

簡単にまず背景から述べさせていただきます。

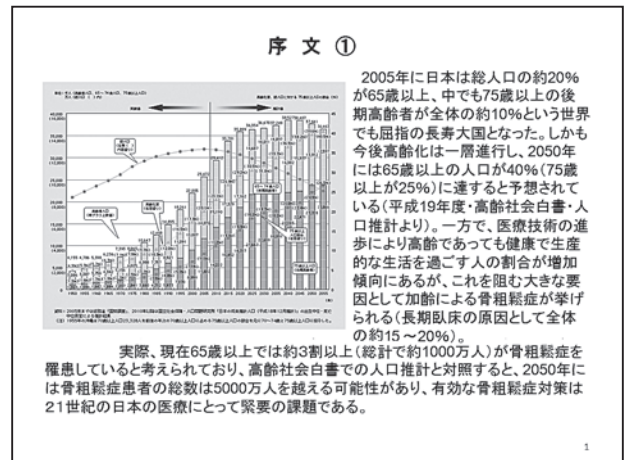
近年日本は総人口の20%以上が65歳以上、中でも75歳以上の後期高齢者が全体の約10%という、世界でも屈指の長寿大国となりました。しかも今後高齢化は一層進行し、2050年には65歳以上の人口が40%に達すると予想されています。一方で、医療技術の進歩により、高齢であっても健康で生産的な生活を過ごす人の割合が増加傾向にあります。これを阻む大きな要因として加齢による骨粗鬆症が挙げられます。

【ポスター -2】

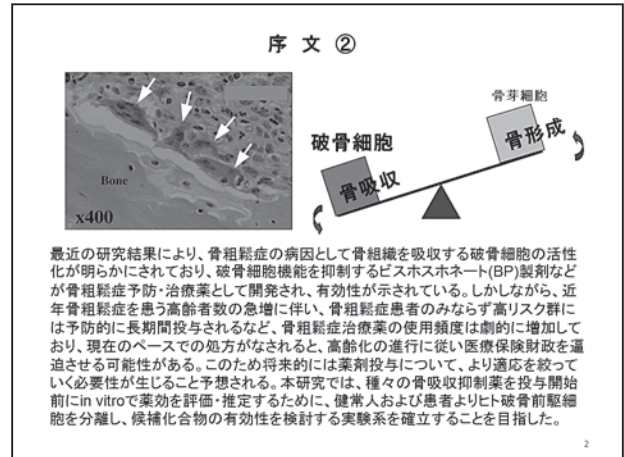
骨粗鬆症の病因として骨組織を吸収する破骨細胞の活性化が明らかにされており、破骨細胞機能を抑制するビスホスホネート製剤などが骨粗鬆症予防・治療薬として汎用されています。しかしながら、近年骨粗鬆症を患う高齢者数の急増に伴い、骨粗鬆症患者のみならず、高リスク群には骨粗鬆症薬を予防的に長期間投与されるなど、骨粗鬆症治療薬の使用頻度は劇的に増加しており、現在のペースで処方となされると、社会の高齢化の進行に伴い、医療保険財政を逼迫させる可能性があります。このため、薬剤投与について、今後、より適応を絞っていく必要性が生じることが予想されます。

本研究では、様々な骨吸収抑制薬を投与開始前に in vitro で薬効を評価・推定するために、健康人よりヒト破骨前駆細胞を分離して、薬剤の有効性を検討するための実験系を確立することを目指しました。

ポスター 1



ポスター 2



【ポスター -3】

まず方法ですが、マウスモデルで薬効を評価しても、ヒトは純系マウスと異なってきたらめて個体差が大きいので、本当にヒトの系でも同様の効果を示すかどうかは一般に不明です。ただ、骨代謝の現象は比較的马ウスとヒトの間で保存されていますので、マウスモデルでの薬効評価がヒトへの応用の際にも有効となると考えられます。

本研究では本当にヒトの系でも有効かどうか、個体差の評価も含めて、種々の骨吸収抑制薬の臨床薬理評価系として、ヒト末梢血より破骨前駆細胞を分離し成熟破骨細胞を *in vitro* にて分化させ、これをヒトの骨吸収抑制薬の薬効評価に用いる系を確立しました。

具体的には、健康人ボランティアより末梢血を 20ml 採取し、これを、①Sephadex G10 カラム、②CD14⁺ MACS beads、③CD11b⁺ MACS beads の 3つの方法により、ヒト末梢血に存在する単球系細胞を分離して、M-CSF と RANKL の刺激下で破骨細胞分化を誘導し、どのフラクションが最も破骨細胞前駆細胞を含むかどうかを評価しました。さらに、破骨細胞前駆細胞に近いフラクションを用いて、*in vitro* 実験系において、現在頻用されている骨吸収抑制薬の効果を検討しました。

【ポスター -4, 5】

まず結果①ですが、健康人ボランティア 3名より、1回 20ml の採血を 3回に渡って行い、それぞれ、①Sephadex G10 カラム、②CD14⁺ MACS beads、③CD11b⁺ MACS beads の 3つの方法を用いて、ヒト末梢血単球細胞を分離しました。これに M-CSF と RANKL を添加して 4~6 日間培養し、TRAP 染色を行い、多核化した成熟破骨細胞の数を定量しま

ポスター 3

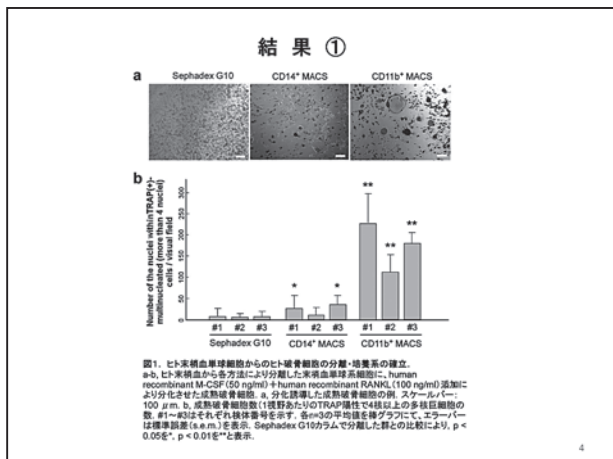
方法

◎ヒト破骨前駆細胞を用いた薬効評価系の確立

マウスモデルで薬効を評価しても、それが必ずしもヒトでも同様の効果を示すかどうかは一般に不明である。骨代謝の現象は比較的马ウスとヒト間で保存されているため、マウスモデルでの薬効評価がヒトへの応用の際にも有用となると考えられるが、本研究では新規骨吸収抑制薬の臨床薬理評価系として、ヒト末梢血より破骨前駆細胞を分離し(および成熟破骨細胞を *in vitro* にて分化させ)、これをヒトの骨吸収抑制薬の薬効評価に用いる系を確立する。具体的には健康人ボランティアより末梢血を 20 ml 採取し、これを ①Sephadex G10 カラム (GE Bioscience より購入) ②CD14⁺ MACS beads (Miltenyl Biotech より購入) ③CD11b⁺ MACS beads (Miltenyl Biotech より購入) によりヒト末梢血単球系細胞を分離し、human recombinant M-CSF (50 ng/ml: Peprotech より購入) + human recombinant RANKL (100 ng/ml: Peprotech より購入) を添加し、破骨細胞分化を誘導し、どのフラクションが最も破骨細胞前駆細胞を含むかどうかを評価した。さらには、最も破骨細胞前駆細胞に近いフラクションを用いて、*in vitro* 実験系において、現在頻用されているビスフォスホネート製剤 (アレンドロネート、リセドロネート) や、本研究者が新規骨吸収抑制剤として注目している S1P 作動物質 (S1PR1 アゴニストおよび S1PR2 アンタゴニスト) の効果を検討した。

3

ポスター 4



ポスター 5

結果 ①

健康人ボランティア 3名より、1回 20 ml の採血を 3回に渡って行い、それぞれを①Sephadex G10カラム ②CD14⁺ MACS beads ③CD11b⁺ MACS beads を用いて、ヒト末梢血単球細胞を分離した。これに human recombinant M-CSF (50 ng/ml) + human recombinant RANKL (100 ng/ml) を添加して 4~6 日間培養し、TRAP 染色を行い、多核化した成熟破骨細胞の数を定量した。その結果、①②ではほとんど破骨細胞分化が見られなかったが、③では少ないながらも TRAP 陽性細胞を観察することができた(図1)。上記より、ヒト末梢血細胞中では CD11b⁺ 分画に、破骨細胞前駆細胞が最も多く含まれていることが明らかになった。

した。

結果ですが、前者2つ (①、②) ではほとんど破骨細胞分化が見られませんでした。後者 (③) では少ないながらも TRAP 陽性細胞を観察することができました。このことにより、ヒト末梢血細胞中では CD11b⁺ 分画に破骨細胞前駆細胞が最も多く含まれていることが明らかになりました。

【ポスター -6, 7】

次に結果②に移ります。

結果①で得られた破骨前駆細胞を多く含む集団を用いて、ビスフォスホネート製剤 (アレンドロネートとリセドロネート)、そして S1P 作動物質 (S1P 受容体のアゴニストである FTY720 と S1PR2 のアンタゴニストである JTE013) の効果を検討しました。

まず、ビスフォスホネート 2 剤については、in vitro 系においてヒト破骨細胞の機能を抑制し、この抑制効果については、3名の健常者の間で大きな個体差はみられませんでした。

一方で、ヒト破骨細胞前駆細胞を骨表面から遠ざけて骨吸収を抑制する S1P 作動物質については、in vitro の細胞遊走実験系を用いて、個体間差異を評価しました。その結果、FTY720 や JTE013 では、ヒト末梢血から分離した CD11b 陽性単球細胞に対して遊走能を調節する効果が見られましたが、その程度については 3名の個体間で若干の差異がみられました。

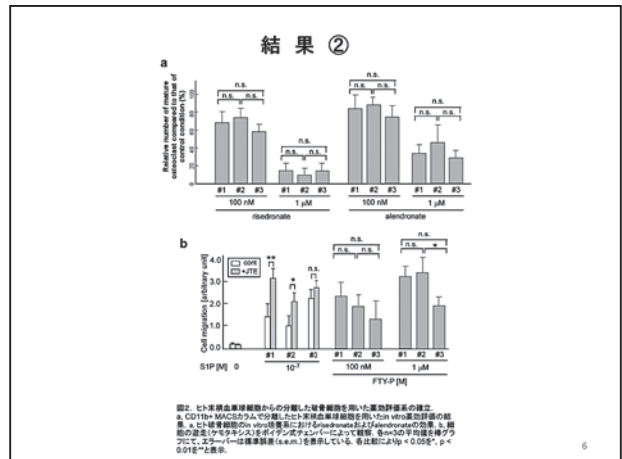
これらの効果はいずれも健常人より採取したヒト破骨細胞および破骨前駆細胞に対するものであるため、骨粗鬆症患者など骨代謝に障害がある状態では個体間差がさらに顕在する可能性があります。そのため、これらの薬剤を選択する際には、個体差を評価しながら、その有効性について投与前に充分検討することが大切であると考えられました。

【ポスター -8】

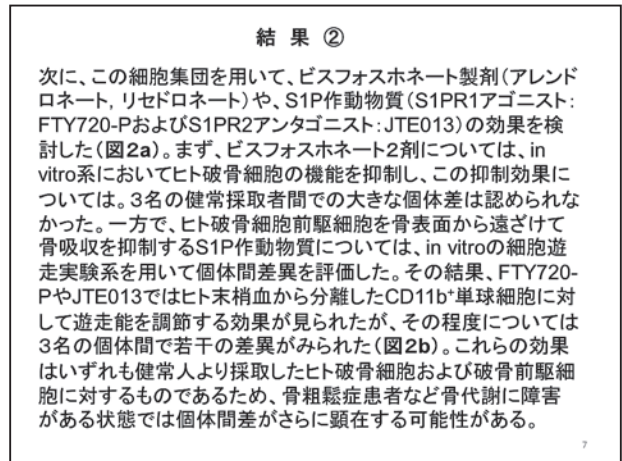
今回のまとめです。

本研究では、ヒト末梢血より破骨細胞を分離し、薬剤の効果を評価するシステムを立ち

ポスター 6



ポスター 7



上げました。これまで破骨前駆細胞の明確な定義がされていなかったため、これらの破骨前駆細胞の集団の同定分離にはたくさんの困難を伴いましたが、我々は複数の単球系分画を評価することによって、破骨前駆細胞を高い比率で含む分離法を同定し、これを用いてヒト破骨細胞を分離・培養して薬剤の効果を検討する新しい実験系を確立しました。

今回は健常者3名より分離・培養した破骨前駆細胞を用いて薬効評価を行い、基本的には有意な個体差というものは見られませんでしたけれども、骨粗鬆症など骨吸収性疾患を患う状態では個体差が顕著になる可能性があるため、どの薬剤が有効であるかということ投与前に評価することが大変重要であるということが示唆されました。

ポスター 8

まとめ

1. 健常人ボランティアより、1回20mlの採血を行い、CD11b+ MACS beadsにより分離したヒト末梢血単球細胞にhuman recombinant M-CSF (50 ng/ml) + human recombinant RANKL (100 ng/ml)を添加することで、TRAP陽性ヒト成熟破骨細胞を得る方法論を確立することができた。これにより、ヒト末梢細胞中ではCD11b+分画に、破骨細胞前駆細胞が最も多く含まれていることが明らかになった。
2. 上記の細胞集団を用いて、現在頻用されているビスフォスホネート製剤(アレンドロネート、リセドロネート)や、本研究者が新規骨吸収抑制剤として注目しているS1P作動物質(S1PR1アゴニストおよびS1PR2アンタゴニスト)の効果をin vitroで検討する系を確立した。
3. 本研究成果は、患者検体からヒト破骨細胞を分離し、投与前に効果を検討する新しいテラーメイド医療システムの開発につながると期待される。

質疑応答

長谷川： 私の方から聞かせて下さい。まず、健常人ボランティア3名から採った末梢血でやっているわけですね。それと、その後で出てきた薬効の個体差の部分等ということですが、このボランティアの方のプロフィールとして、すでに薬を飲んでいたりとか、そういう差異みたいな情報はあるのでしょうか？ 研究の中身としてあまり関係ないかもしれませんが、ちょっとそこが興味があります。

それからもう一つは、菊田先生が出してくださった序文①のポスターが、今後の日本の社会問題として非常に大きいということを示しているのですが、アプローチとして、先ほどの森脇先生のようにマスの社会集団からリスクを見ていく形と、それから、個別性に入って行って選り分けていく形と、2つあると思うのです。後者でいく場合の実際のコストとか手間はかなりまだあって、高い敷居となっていると思うのですが、何かそれを乗り越えていく、菊田先生が考えておられる課題みたいなものがあれば、紹介してほしいと思います。

菊田： 今回は健康な女性の方を対象にして行っているのですが、骨粗鬆症があるというわけではありません。今後は骨粗鬆症のある患者さんで行いたいとは思っています。ビスフォスホネート製剤も含めて、現時点では薬剤というのは、ほとんど何も検討されずにそのまま投与されて、効かなければ他の薬に変えるという状態です。それで費用もかかってしまうので、理想的にはその患者さんに合った薬を最初から使うことが望ましいと思います。ただ、その評価系に関してはなかなか難

しいところもあって、時間もお金もかかる。これが簡単にできるようになればいいと思います。

長谷川： 奇しくも1題目、2題目で、骨粗鬆症という、これから日本が直面する問題へのアプローチの大きな方向性がここで見えているような気がして、大変印象深かったです。どうも有り難うございました。