

平成20年度 研究戦略プロジェクト事業 研究成果報告書

平成21年6月30日

公立大学法人横浜市立大学
理事長 様

平成20年度 研究戦略プロジェクト事業 (W20010) で行った研究成果等は下記のとおりです。

記

1 研究者情報	研究代表者氏名 (所属・職位)	熊谷 研 (医学部整形外科・助教)			
2 事業情報	新規・継続の分け				
	研究費の区分	若手人材育成推進費 (自然科学)			
	研究課題名	人工骨移植での骨形成における末梢血由来幹細胞関与の研究			
	研究実施期間	平成20年7月1日 ~ 平成21年3月31日			
	研究ユニットの構成 ※研究代表者も含む ※研究計画書と相違のないようにご注意ください。	所属名・企業名等 整形外科	役職名 助教	氏名 熊谷 研	役割 研究代表者
3 研究概要					
<p>自家骨移植に代わる新しい移植材料として、生体吸収性の人工骨補填材が普及しつつある。人工骨が自己の骨組織に置換されるには骨形成細胞の供給が不可欠である。広範な骨欠損部位では残存する組織からの骨膜や骨髄細胞の供給が著しく制限される。現在世界的には人工骨に骨髄由来間葉系幹細胞または培養骨芽細胞を播種し、骨形成を促進する方法がいくつか報告されている。しかしながら、手技の煩雑さや感染などのリスク、あるいはコストの問題などがあり、臨床応用の実現までには解決すべき点が多い。一方、近年、末梢血中において骨前駆細胞が存在することが報告され、その生理学的な作用について注目されている。したがって新しい細胞供給のメカニズムとして末梢血由来骨前駆細胞のホーミングに着目し、この機序による骨形成を検証する。人工骨における末梢血由来幹細胞の同定は、すでに我々が確立している GFP parabiosis マウスのモデルを使用することで可能となる。また、難治性骨折治療で厚生労働省の先進医療に認定されている低出力超音波骨折治療器を移植人工骨にも応用し、末梢血由来幹細胞のホーミングおよび骨形成促進を目指す。本研究により、幹細胞を利用した骨再生医療への発展が期待される。</p>					

4 研究成果

※研究成果については、2,000 字程度で記入して下さい。(絵、図入りも可)

※地域貢献促進費の方は課題提案者に提出する報告書(必須)をご提出頂きますので、この欄は記載しないで結構です。その他の方は別紙を用意せず、この枠の中に記入するようにして下さい。(枚数は問いません)

難治性骨折と総称される遷延治癒骨折や偽関節、あるいは広範な骨欠損では、局所において膜性骨化および軟骨性骨化に関与する細胞の供給は制限されていると考えられる。このような場合、従来自家骨移植が行われており、また近年では同種他家骨移植が普及しつつある。前者においては採取部位の疼痛や採取量の限界などの問題があり、後者では免疫、感染などの問題がある。これ以外にも細胞工学的手法による研究が行われているが、実際の臨床の場では未だ普及していないのが現状である。近年、前駆細胞も含めた骨芽細胞系の細胞が骨組織や骨髄内のみならず、末梢血中にも存在することが示唆され、生理的な役割について注目を集めている。

本研究では骨形成における新しい細胞供給のメカニズムとして、末梢血由来骨前駆細胞の関与について検討することが第一の目的である。これについては末梢血由来の細胞をトラッキングして骨形成との関係を観察した。また、細胞供給の乏しい環境での骨形成について、人工骨移植と末梢血由来骨前駆細胞の関与について検討することが第二の目的である。これについては皮下人工骨移植モデルを用いて観察した。以下が平成 20 年度の研究成果についての概要である。

1. 末梢循環中に存在する細胞のトラッキング

末梢血由来の細胞を同定するため、Green Fluorescence Protein(GFP)をマーカーとして用い、野生株マウスの末梢血において GFP 陽性細胞のキメラを作製した。具体的には GFP トランスジェニックマウスと野生株マウスとを体側で結合させ末梢循環を共有する parabiosis を作製した。parabiosis 直後より末梢循環の共有を開始し、2-3 週間でパートナー間の末梢血 GFP 陽性細胞率はほぼ同等に達した。つまりは野生株マウスの末梢血中に GFP マウス由来の血液細胞と自己の血液細胞がほぼ 50:50 で存在する状態となった。その後も安定した状態で末梢血のキメラは維持された。また、このモデルにおいては免疫学的な反応などの問題がなく、術前の放射線照射などの処置も不要であった。

2. 骨形成における末梢血由来細胞の関与

末梢血において GFP 陽性細胞のキメラを形成した parabiosis ペアの野生株マウスにて、腓骨骨幹部を骨切りして骨形成を経時的に観察した。1 週後に軟性仮骨を形成し、GFP 陽性細胞はわずかに観察されるのみであった。2 週後に石灰化が始まり、GFP 陽性細胞の数も有意に増加した。また、アルカリフォスファターゼ活性陽性率も有意に増加した。3 週後も GFP 陽性細胞数は維持されたが、アルカリフォスファターゼ活性陽性率は低下した。4 週後では GFP 陽性細胞数、アルカリフォスファターゼ活性陽性率ともに低下した。したがって、末梢血由来骨前駆細胞が早期の骨形成に関与している可能性が示唆された。

次に前述の parabiosis ペアの野生株マウスにて、大腿骨を骨幹部で骨切りし、骨切り部より両端の関節包までそれぞれ骨膜を取り除き髄内固定したモデルを作製し、骨形成を観察した。仮骨形成はいずれの週においても不良であった。GFP 陽性細胞は観察されたが、アルカリフォスファターゼ活性を示すものはわずかであった。さらには同モデルに連日で麻酔下に骨切部へ 1 日 20 分間の低出力超音波照射を行い、4 週まで骨形成を観察した。骨切り部周囲の仮骨形成は不良であったが、髄内で骨形成が観察された。GFP 陽性細胞が多数観察されたが、これらは同時にアルカリフォスファターゼ活性も示した。このことより、骨膜除去によって仮骨形成は抑制されるが、低出力超音波照射によって細胞の残存する部位での骨形成と末梢血由来細胞のホーミングを促進することが示唆された。

3. 人工骨移植での骨形成とホーミング

広範な骨欠損部では骨膜や骨髄細胞の供給が乏しいが、このような環境下での骨形成を考慮し、皮下という骨と離れた環境に人工骨を移植し、骨形成を観察した。人工骨には直径 5mm、厚さ 3mm、気孔率 75%の β -TCP 多孔体ブロック(オスフェリオン、オリンパステルモバイオマテリアル株式会社)を使用した。マウス皮下に人工骨のみ単独で移植した場合、内部での骨形成は観察されなかった。バックグラウンドが同じ野生株マウスか

ら骨髄細胞を採取し、陰圧下で人工骨に付加したものを GFP マウス皮下に移植した場合、人工骨内部での骨形成が観察された。GFP 陽性細胞が確認されたことより、人工骨周囲からも細胞が内部へ進入し、骨形成に関与した可能性が考えられた。今後は末梢血由来骨前駆細胞のホーミングについて、低出力超音波照射との関連も含め、さらに詳細な検討を行っていく予定である。

5 研究成果の活用（予定）

例) 平成 22 年度 科学研究費補助金（基盤 S）に申請予定

例) 第〇会 〇〇学会に論文発表予定

例) 研究成果が横浜市〇〇事業に活用され、当該事業の PR イベントが開催された際に広報チラシ等に「横浜市立大学 研究戦略プロジェクト事業」との関連を記載した。

本研究を発展させた内容で平成 21 年度 科学研究費補助金（若手研究 B）に申請し、採択された。

第 31 回米国骨代謝学会議（ASBMR2009）、第 24 回日本整形外科学会基礎学術集会に発表予定である。

※ページ数は増えても構いません。

以上