

氏名	于 湊
授与した学位	博士
専攻分野の名称	歯学
学位授与番号	博甲第5483号
学位授与の日付	平成29年3月24日
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科病態制御科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文の題目	GFP 骨髄移植マウスを用いた異所性骨形成における骨髄由来細胞の役割の解明
論文審査委員	飯田 征二 教授 池亀 美華 准教授 長塚 仁 教授

学位論文内容の要旨

【目的】

再生医療研究の発展に伴い骨髄由来細胞の多分化能が明らかとなり、様々な組織の修復や維持への関与が報告されている。しかし、骨形成における骨髄由来細胞の関与については未だ明らかではない。

我々が以前行った GFP 骨髄移植モデルマウスを用いた骨折の治癒機転における同所性骨形成モデルでは、骨髄由来細胞はマクロファージや破骨細胞等へ分化したが、骨芽細胞や軟骨細胞への分化は確認できず、骨芽細胞は局所に存在する組織幹細胞に由来すると考えられた。しかし、このような同所性骨形成モデルでは、すでに骨形成のための環境が局所に存在するため、骨髄由来細胞の役割を明確にすることは困難である。

そこで、本研究では骨髄由来細胞の骨形成における役割を明らかにするため、GFP 骨髄移植マウスを用いて異所性骨形成モデルを作製し、骨髄由来細胞の動態や局在を経時的に検討した。

【材料および方法】

実験には7週齢雌性 C57BL/6 野生型マウス 34 匹および同系 7 週齢 GFP トランスジェニックマウス (GFP マウス) 16 匹を用いた。野生型マウスに 10Gy の放射線照射後、GFP マウス大腿骨と脛骨から採取した骨髄細胞を尾静脈から 1 個体当たり 1×10^7 cells 移植した。骨髄細胞移植 1 ヶ月後に移植細胞の生着を確認し、異所性骨形成モデルとして大腿部筋中と背部皮下に rhBMP-2 10 μ g を含浸させたラット脱灰骨 (Insoluble bone matrix : IBM) 150mg を埋入した。

IBM 移植後 7、14、28 日目に移植した IBM/rhBMP-2 を摘出し、軟エックス線写真撮影を行って硬組織形成状態を観察した。摘出した全ての試料は 4% パラフォルムアルデヒド固定液で 12 時間浸漬固定し、10% EDTA 溶液にて 2 週間脱灰した。脱灰後、常法に従ってパラフィン包埋、厚さ 5 μ m の連続切片を作製し、HE 染色、GFP、Osteocalcin (OC) に対する免疫組織化学的染色を施した。大腿部筋中に IBM/rhBMP-2 を移植したものは、大腿骨周囲、筋周囲、IBM 中央部の 3 部位、背部皮下に IBM を移植したものは皮膚側、筋側の 2 部位、計 5 部位において組織学的に検討を行った。またこの 5 部位において抗 GFP 染色した標本で GFP 陽性細胞数をカウントし、HE 染色標本において形成された硬組織面積を計測することにより骨髄由来細胞と異所性骨形成の相関について検討した。

【結果】

GFP 骨髄移植マウスの骨端部骨髄では血球系細胞がドナー由来骨髄細胞に置換されており、骨髄移植による造血系再構築が起こったことが確認された。骨端軟骨板では肥大軟骨細胞層直下の多核巨細胞や単核の破軟骨細胞、破骨細胞が GFP 陽性を示したが、増殖軟骨細胞、肥大軟骨細胞、また骨周囲に配列する骨芽細胞は GFP 陰性を示した。

軟エックス線写真において、IBM/rhBMP-2 移植後の骨形成過程を観察したところ、7 日目では IBM 周囲に僅かに不透過像が観察され始め、14 日目では徐々にエックス線不透過像が鮮明になり、28 日目には IBM 周囲を囲むように連続した不透過像を認め、IBM 周囲における経時的な骨形成が確認された。

組織学的観察において、IBM/rhBMP-2 移植後 7 日目では、大腿骨周囲に軟骨形成を認め、その他の部位では GFP 陽性の類円形や紡錘形の細胞からなる肉芽様組織の形成を認めた。14 日目では、大腿部筋周囲や背部皮下においても GFP 陽性の類円形や紡錘形細胞からなる肉芽組織中から軟骨や骨組織形成を認めた。形成された骨組織中の骨芽細胞は GFP-OC 蛍光免疫二重染色において骨髄由来でないことを確認した。28 日目では、IBM 周囲に形成された新生骨組織は吸収され、形成された骨組織内部に GFP 陽性の血球系細胞を含む骨髄腔が形成され、残存した骨組織周囲に GFP 陽性の破骨細胞を認めた。

GFP 陽性細胞は大腿骨周囲と筋周囲、背部皮下筋側では 7 日目が最も多く、経時的に減少傾向を示した。一方、背部皮下皮膚側と IBM 中央部では経時的に GFP 陽性細胞の増加を認めた。形成された硬組織面積は大腿骨周囲が最も大きく、背部皮下筋側、筋周囲の順であった。

【考察】

本研究における異所性骨形成において骨髄由来細胞は、肉芽組織様の類円形や紡錘形細胞、骨吸収に関わる破骨細胞等、多様な細胞に分化したが、骨芽細胞や軟骨細胞への分化は確認できなかった。また GFP 陽性骨髄由来細胞は硬組織形成前に動員され、硬組織形成後には GFP 陽性細胞数は経時的に減少した。大腿骨周囲、筋周囲が背部皮下皮膚側と比較して GFP 陽性細胞の集積は早期でかつ集積数が多く、また形成される硬組織面積が多かった。つまり、GFP 陽性細胞の動員時期や数には部位により違いがあった。以上のことから、異所性骨形成における骨髄由来細胞の主な役割は、骨芽細胞への分化による直接的な骨再生ではなく、組織幹細胞に働きかけ、それらを骨芽細胞に分化させるとともに、骨形成のための微小環境形成に寄与している可能性が示唆された。

論文審査結果の要旨

骨髄由来細胞は多分化能を有し、多様な臓器の修復や維持に関与していると考えられているが、骨形成における役割については不明な点が多い。Green Fluorescent Protein (GFP) トランスジェニック骨髄移植マウスを用いた骨折の治癒機転における同所性骨形成モデルでは、骨芽細胞は局所に存在する組織幹細胞に由来するとの報告がある。しかし、この様な同所性骨形成モデルでは、すでに骨形成のための環境が局所に存在するため、骨髄由来細胞の役割を明確にすることは困難である。

本論文は骨髄由来細胞の骨形成における役割を明らかにするため、GFP トランスジェニックマウス骨髄移植マウスを用いて異所性骨形成モデルを作製し、異所性骨形成における骨髄由来細胞の関与について検討したものである。

本研究は、7週齢雌性 C57BL/6 野生型マウスに 10Gy の放射線照射後、同系 GFP トランスジェニックマウスから採取した骨髄細胞を尾静脈から移植した。移植 1ヶ月後にラット脱灰骨(Insoluble Bone Matrix : IBM)を recombinant human Bone Morphogenetic Protein-2(rh-BMP-2)とともに大腿部筋中、背部皮下に埋入し、埋入後 7、14、28 日目に摘出した。全ての試料は通法にてパラフィン切片を作製、HE 染色および GFP、Osteocalcin (OC)に対する免疫組織化学的染色を施し、組織学的に観察した。

IBM 大腿部埋入群、背部皮下埋入群とも経時的に形成される硬組織周囲に局在する肉芽様組織中の類円形や紡錘形の細胞に GFP 陽性を認めた。しかし、形成された軟骨組織や骨組織、骨芽細胞において GFP は陰性を示した。大腿骨周囲や大腿部筋中、背部皮下筋側において 7 日目では既に硬組織形成を認め、これらの部位では集簇する GFP 陽性細胞数は経時的に減少した。一方、背部皮下皮膚側や IBM 中央部では経時的に GFP 陽性細胞数が増加し、その後硬組織形成を認めた。

以上の結果より、本研究では、GFP 陽性を示す骨髄由来細胞は硬組織形成以前から動員が開始され、硬組織形成とともに減少していくことが示された。また骨髄由来細胞の動員開始時期や数、形成される硬組織の面積は部位により違いが認められた。骨芽細胞に分化する能力を有する組織幹細胞が多く存在する部位では、骨髄由来細胞の影響で、硬組織形成がより早期に開始された。骨髄由来細胞の主な役割は骨形成のための微小環境形成に寄与し、組織幹細胞に働きかけ、それらを骨芽細胞に分化させる可能性が示唆された。

これらの知見は、骨形成における骨髄由来細胞の役割を明らかにしたものであり、骨組織の再生や骨形成疾患の病態解明の一端を担う基礎研究として価値のある研究業績である。

よって、審査委員会は本論文に博士（歯学）の学位論文としての価値を認める。