

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

于 焜

The role of bone marrow-derived cells in ectopic bone
regeneration in the GFP mouse bone marrow
transplantation model

Yu Song

(平成 28 年 12 月 8 日受付)

緒 言

現在、頭頸部領域における外傷、腫瘍、外科的侵襲などによる骨欠損に対して骨増量や骨新生を目的に自家骨移植や人工生体材料による補填がなされている。しかし、自家骨移植では骨組織の供給源に限りがあり、また生体への侵襲や感染のリスクなどがある。近年、生体内に分布する未分化間葉系幹細胞を用いた骨欠損部の回復や再生を図る治療が注目されている。特に骨髄幹細胞は多分化能を示すため幹細胞の主な供給源と考えられ、再生医療のためのドナー細胞として注目されている。骨髄由来幹細胞は正常組織において、血球系細胞のみならず、気管上皮、腸管粘膜上皮、皮膚など様々な細胞に分化することが報告されており¹⁾、頭頸部領域においても脳神経細胞や唾液腺、嗅上皮構成細胞などに分化する報告がなされている²⁾。また、創傷治癒においても創部に接している骨髄から細胞が動員されるなどの報告があり^{3,4)}、多様な臓器の維持や修復に関与していることが明らかになりつつある。*In vitro* において骨髄細胞中の接着細胞を長期間培養して得られる幹細胞の存在が報告され⁵⁻⁷⁾、骨芽細胞や軟骨細胞、脂肪細胞などに分化することが知られている^{8,9)}。このように組織再生に

骨髄由来細胞が深く関与していることが報告され、同細胞を用いた骨組織再生の報告は多数あるものの^{10,11)}、生体内の骨髄細胞自体の関与については未だ明らかにされていない。

我々が以前行った Green Fluorescent Protein(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骨吸収に関わる破骨細胞等、多様な細胞へ分化したが、骨芽細胞や軟骨細胞への明らかな分化は確認できず、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¹²⁾。しかしながら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。GFP 骨髄移植モデルマウスは、GFP トランスジェニックマウス大腿骨から骨髄採取し、この骨髄細胞を同系野生型マウスに移植することにより作製した。そして骨前駆細胞の存在する可能性のある大腿骨周囲や筋組織に接している大腿部筋周囲、またこれらの組織が存在せず骨前駆細胞

の供給に乏しいと考えられる背部皮下にラット脱灰骨 (Insoluble Bone Matrix : IBM) を Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2) とともに GFP 骨髄移植モデルマウスに移植して、異所性骨形成における骨髄由来細胞の関与を検討した。

材料ならびに方法

1. 実験動物

実験動物には 7 週齢雌性 GFP トランスジェニックマウス [C57BL/6-Tg (CAG-EGFP)] (清水実験材料株式会社, 京都, 日本) 16 匹および 7 週齢雌性同系野生型マウス (C57BL/6J) (日本チャールズ・リバー, 横浜, 日本) 34 匹の計 50 匹を使用した。尚、本研究において使用した全ての動物は、岡山大学医歯薬学総合研究科の実験動物ガイドラインに従い飼育、使用した。本研究は岡山大学動物実験委員会の審査、承認を受けて行った。(承認番号 : OKU-2014140)

2. GFP マウス由来骨髄細胞移植マウスの作製

1) 骨髄細胞の調整

GFP マウスをジエチルエーテルの過剰吸入にて安楽死させ、大腿骨と脛骨を採取した後、骨周囲軟組織を可及的に切除し、Dulbecco's modified eagle medium (Invitrogen Co. NY, USA) を用いて骨髓細胞を洗い出した。骨髓細胞浮遊液を Cell Strainer (BD Falcon, NJ, USA) に通した後、1500 rpm で5分間遠心分離し、骨髓細胞浮遊液を 0.1 M phosphate buffer saline (PBS) HBSS で希釈し、約 1×10^7 cells/0.25 ml になるように調整した。

2) 骨髓移植

野生型マウスにエックス線照射装置 (MBR-1520R, 日立製作所, 東京, 日本) を用いて総量 10 Gy のエックス線を照射した。エックス線照射終了直後、調整した骨髓細胞浮遊液を 27 G 注射器にて 0.25 ml/匹を経尾静脈投与した。骨髓移植後 4 週間は感染予防のため酸性水 (pH 3.0) を与えて飼育した (G→W マウス)。

3) 対照実験として上記 1)、2) と同様の方法で、野生型マウスから骨髓細胞を、放射線照射した GFP マウスに経尾静脈投与した (W→G マウス)。

3. Insoluble bone matrix (IBM) の作製

10 週齢雄性 Wistar 系ラット（日本チャールズ・リバー，横浜，日本）から大腿骨と脛骨を摘出し、可及的に軟組織を取り除いた。その後両骨端を切断し軟骨部分を除去、液体窒素で凍らせ粉砕した。粉砕したものを蒸留水で水洗し、クロロフォルム：メタノール（1：1）で脱脂、メタノールで洗浄、蒸留水で水洗後、pH 2.0 の塩酸水で一晩脱灰した。吸引濾過し、蒸留水で洗浄、4 M グアニジン・50 mM Tris-HCL・pH 7.4 で蛋白質溶出させ、再び吸引濾過、蒸留水による洗浄し、凍結乾燥器で真空乾燥して作製した。

4. 異所性骨形成モデル作製

異所性骨形成モデルマウス作製方法は、塩酸ケタミン 75 mg/kg、塩酸メドミジン 1.0 mg/kg を腹腔内投与による麻酔下にて行った。大腿部筋中埋入群では両下腿皮膚をポピドンヨードにて消毒し、臀部から大腿部を剃毛後、滅菌器具を使用して腸骨陵に沿って皮膚を約 8 ミリ切開後、剥離尖刃にて直下の殿筋内を鈍的剥離し、約 5 ミリの筋肉内ポケットを作成した。rhBMP-2 (PeproTech, NJ, USA) 10 μ g を浸透させた IBM 150 mg を剥離した筋肉内ポケットに埋入後、臀筋を縫合してサンプルを完全に筋体で被覆した後、表皮を縫合した。背部皮

下埋入群では、大腿部筋中埋入群同様に背部において消毒、剃毛を行い、約 10 ミリの切開を加えた。その後剥離尖刃にて筋膜下を鈍的に剥離し、rnBMP-2 を含浸させた IBM を埋入、表皮を縫合した。

5. 放射線学的観察

異所性骨形成モデル作製後エックス線撮影装置 (Sofron type SR0-M50, 宗研社, 東京, 日本) を用いて 7、14、28 日目のマウスのエックス線写真を撮影した (40 kv-5 mA-1 秒照射)。エックス線写真上で大腿部筋中と背部皮下での骨形成状態を観察した。

6. 組織学的観察

異所性骨形成モデルマウス作製後 7、14、28 日目のマウスをジエチルエーテル過剰吸入にて安楽死させ、移植した IBM を摘出後、4%パラホルムアルデヒド固定液で 12 時間浸漬固定した。次に、摘出材料において 10%EDTA を用いて 4 °C で 14 日間脱灰した。脱灰後、常法に従ってパラフィン包埋し、厚さ 5 μ m の連続切片を作製した。切片はヘマトキシリン・エオジン染色、免疫組織化学

的染色を行い組織学的に観察した。

1) ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色

切片をキシレンにて脱パラフィンし、100%から70%エタノールおよび精製水にて再水和後、ヘマトキシリン・エオジン染色を行った。70%から100%エタノールおよびキシレンにて脱水・透徹を行った後、Entellan (Merck KGaA, Darmstadt, Germany)にて封入し、組織学的観察を行った。

2) 免疫組織化学的染色

前述のごとく脱パラフィン後、室温で30分間0.3%過酸化水素メタノール溶液にて内因性ペルオキシダーゼをブロックし、精製水で洗浄した。抗体は、ウサギポリクロナール抗体の抗GFP抗体(MBLライフサイエンス, 名古屋, 日本)を使用した。前処理は37℃で5分間0.1%トリプシン溶液により行い、抗GFP抗体を1000倍に希釈して4℃でovernightにて反応させた。

3) 蛍光免疫二重染色

骨芽細胞のマーカーとして抗オステオカルシン(OC)抗体(タカラバイオ社, 滋賀, 日本)を使用し、抗GFP抗体としてヤギポリクロナール抗体 (Abcam, Cambridge, MA, USA) を用いて、GFP-OCの組み合わせについて行った。脱パ

ラフィン後に 37 °C で 5 分間 0.1% トリプシン溶液により前処理、Tris Buffered Saline with Tween (TBST) で洗浄後、10% ニワトリ正常血清 (IBL, 群馬, 日本) および 10% ロバ正常血清 (JIR, Philadelphia, USA) を用いて室温で 30 分間ブロッキングを行った。一次抗体として抗 GFP 抗体は 100 倍、抗 OC 抗体は 2000 倍に希釈して 4 °C で overnight にて反応させた。TBST で洗浄後、二次抗体 (eBioscience, San Diego, California, USA) を 200 倍に希釈して室温で 60 分間反応させた。標本は発色完了後、TBST で洗浄後、対比染色として DAPI 1 μ g/ml を 3 分間反応させた。TBS で洗浄後に Fluorescent Medium (DAKO, Glostrup, Denmark) で封入し、蛍光顕微鏡で観察した。

なお、HE 染色、免疫組織化学的染色における組織学的検討は、IBM 大腿部筋中移植群の大腿骨周囲、筋周囲、IBM 中央部 (図 1a)、IBM 背部皮下移植群の皮膚側、筋側 (図 1b) に分けて検討を行った。

7. GFP 陽性細胞数カウント

抗 GFP 染色した標本で、図 1 で示す大腿部筋中移植群における大腿骨周囲、大腿部筋周囲、移植 IBM 中央部、また背部皮下皮膚側移植群における皮膚側、

筋側での GFP 陽性細胞数をカウントした。HE 染色標本の最大断面を光学顕微鏡下 (OLYMPUS BX53, OLYMPUS, 東京, 日本) 200 倍で観察、5 視野で陽性細胞数をカウントした。(N = 4)

8. 形成硬組織の面積測定

形成された硬組織面積を測定するために HE 染色標本を光顕微鏡 (OLYMPUS BX53) を用いて撮影した。HE 染色標本の最大断面の 200 倍視野において図 1 で示す大腿骨周囲、筋組織周囲、IBM 中央部、背部皮下皮膚側、背部皮下筋側の 5 部位で撮影した画像を Image J (NIH, NY, USA) を用いて解析した。各部位 5 視野で面積を測定し、平均値を求めた。(N = 4)

結 果

1. 骨髄移植マウスの大腿骨骨端部の GFP 免疫染色

GFP トランスジェニックマウス骨髄細胞を移植した野生型マウス (G→W マウス) の脛骨近位骨端部を HE 染色および GFP 免疫組織学的に観察した (図 2a, c, e)。また野生型マウス骨髄細胞を移植した GFP マウス (W→G マウス) の脛骨近位骨端

部を HE 染色および免疫組織学的に観察した(図 2b, d, f)。G→W マウス、W→G マウスともに骨髄移植後に骨髄組織を構成する造血系細胞にドナー由来の骨髄細胞が多数観察された。このことから、造血系細胞はドナー由来の骨髄細胞に置換され、骨髄移植による造血系細胞再構築が起こったことが観察された。骨端軟骨板において、破骨細胞と考えられる多核巨細胞はドナーの骨髄細胞由来であった。また骨周囲に配列する骨芽細胞や血管内皮細胞、脂肪細胞と考えられる細胞はホストマウスの細胞由来であった(図 2c, d, e, f)。

2. 軟エックス線による異所性骨形成の経時的変化

大腿部筋中に IBM を移植した場合、7 日目には IBM 周囲にはエックス線不透過像が観察されないが、既存大腿骨 (○) と IBM の間では僅かにエックス線不透過像を認めた(図 3a)。14 日目からは IBM 周囲に繊細なエックス線不透過像が観察され(図 3b)、28 日目においては不透過像が充進し、明瞭になった(図 3c)。

背部皮下に IBM を移植した場合では、大腿部筋中同様、7 日目で筋側に僅かな不透過像が認められ(図 3d)、14 日目から経時的に IBM 周囲にエックス線不透過像が充進し(図 3e)、28 日目ではエックス線不透過像の範囲が拡大しているの

が観察された(図 3f)。

3. 骨髄移植マウスを用いた異所性骨形成過程の組織学的検討

骨髄移植マウスを用いた異所性骨形成過程を HE 染色にて組織学および免疫組織学的に検討を行った。IBM 大腿部筋中移植群、IBM 背部皮下移植群とも図 1 で示す大腿骨周囲、筋組織周囲、IBM 中央部、また背部皮下皮膚側、筋側の 6 部位においてそれぞれ組織学的に検討した。

1) IBM を大腿部筋中に移植した場合

IBM 移植 7 日目では、既存大腿骨周囲では軟骨形成を認め、また筋組織と IBM の間においても僅かに軟骨形成が観察された(図 4a, e)。大腿骨骨周囲では既存骨に添加されるように旺盛な軟骨形成を認め、形成された軟骨周囲には紡錘形や類円形細胞の集簇を主体とした肉芽様組織が観察された(図 4a, b)。筋周囲では筋から IBM の方向に紡錘形や類円形細胞を主体とする肉芽様組織の形成を認め、一部では肉芽組織中の筋側から軟骨形成が観察された(図 4e, f)。免疫組織化学的に検索すると、大腿骨周囲では形成された軟骨周囲の肉芽様組織中の紡錘形細胞や類円形細胞において GFP 陽性であったが、大腿骨に添加するように

形成された軟骨組織では GFP 陰性であった(図 4c, d)。また筋周囲においても筋に接して形成された軟骨組織では GFP 陰性であり、肉芽様組織中の紡錘形や類円形細胞において GFP 陽性であった(図 4g, h)。移植された IBM 中央部では周囲組織からの細胞の遊走は乏しく、肉芽様組織や軟骨組織形成を認めず、GFP 陽性細胞もほとんど観察されなかった(図 4i, j, k, l)。

IBM 移植 14 日目では、大腿骨周囲に軟骨組織や骨組織の形成、また筋と IBM の間においても軟骨・骨組織形成を認めた(図 5a, e)。大腿骨周囲では、7 日目で形成されていた軟骨が骨組織に置換され、形成された硬組織周囲では紡錘形または類円形の細胞が観察された(図 5a, b)。筋周囲では筋線維間に肉芽様組織を認め、また筋に接するように骨芽細胞と考えられる細胞が表層に配列する骨組織の形成を認めた(図 5e, f)。免疫組織化学的に検索すると、大腿骨周囲および筋周囲で形成される軟骨・骨組織、そして形成された骨組織を取り囲むように配列している骨芽細胞において GFP 陰性であった。しかし、形成された硬組織周囲の肉芽様組織中の紡錘形・類円形細胞においては GFP 陽性であった(図 5c, d, g, h)。移植された IBM 中央部では僅かに類円形細胞の遊走を認め、それらの細胞は GFP 陽性であった(図 5i, j, k, l)。

IBM 移植 28 日目では、大腿骨周囲と筋周囲に形成された骨組織が連続し、移植された IBM 周囲を取り囲むように骨形成が観察された。また形成された骨組織内部には骨髓様組織形成を認めた。大腿骨周囲では既存大腿骨と連続するように骨芽細胞に囲まれた層板構造を有する骨組織の形成が観察され、その形成された骨組織周囲には血球系細胞や脂肪組織を認める骨髓様組織形成を認めた (図 6a, b)。筋周囲においても大腿骨周囲同様、IBM を囲むように骨組織形成を認め、IBM 側では血球系細胞や脂肪組織を認める骨髓様組織形成が観察された (図 6e, f)。GFP 免疫染色では、大腿骨周囲、筋周囲ともに骨髓様組織中の血球系細胞や形成された骨組織に沿って出現した破骨細胞と考えられる多核巨細胞に GFP 陽性所見が認められたが、形成された骨組織表面に配列した骨芽細胞や骨内に封入されている骨細胞は GFP 陰性を示した (図 6c, d, g, h)。移植された IBM 中央部では、IBM 周囲に添加するように骨組織形成を認め、その周囲には脂肪細胞や血球系細胞を認める骨髓様組織形成が観察された。GFP 免疫染色では他部位同様に骨組織において GFP 陰性であり、骨髓様組織では GFP 陽性を示した (図 6i, j, k, l)。

2) IBM を背部皮下に移植した場合

IBM 移植 7 日目では、皮膚側、筋側ともに IBM 全周を取り囲むように紡錘形や類円形細胞の遊走を認める肉芽様組織の形成を認めた。皮膚側、筋側ともに紡錘形や類円形細胞からなる肉芽様組織が筋側または皮膚側から形成されてきているのが観察され、筋側では肉芽様組織中に僅かに軟骨組織の形成を認めた(図 7a, c)。免疫組織化学的に検索すると、形成された肉芽様組織中の紡錘形や類円形細胞は GFP 陽性であったが、筋側で僅かに形成した軟骨組織においては GFP 陰性であった。GFP 陽性細胞は筋、または皮膚に接する部位で多く集簇しているのが観察された(図 7b, d)。

IBM 移植 14 日目では、7 日目で IBM 周囲を取り囲んでいた肉芽様組織の筋・皮膚に接する部位で軟骨や骨組織の形成を認めた。皮膚側においては旺盛な軟骨組織の形成が観察され、皮膚に接する部位では一部骨形成が観察された(図 7e)。筋側では、筋に近接する部位から表面に骨芽細胞と考えられる細胞が配列する骨組織形成を認め、IBM の方向へ軟骨組織、肉芽様組織の形成を認めた(図 7g)。GFP 免疫染色では、骨・軟骨組織間の紡錘形や類円形の細胞に GFP 陽性所見を認めたが、形成された骨組織内の骨細胞やその表面に配列する骨芽細胞で

は GFP 陰性であった(図 7f, h)。

IBM 移植 28 日目では、IBM 周囲全周が骨組織で囲まれているのが観察された。皮膚側では、骨細胞の封入を認める骨組織の旺盛な形成が観察され、IBM 間では類円形細胞の僅かな浸潤を認めた(図 7i)。筋側では、筋に近接して旺盛な骨組織形成が観察され、IBM と形成された骨組織の間では、血球系細胞や脂肪組織を認める正常な骨組織に類似した骨髓様組織の形成を認めた(図 7k)。免疫組織化学的に検索すると、皮膚側、筋側ともに形成された骨組織では GFP 陰性であるが、形成された骨髓様組織の血球系細胞や脂肪組織で GFP 陽性であった(図 7j, l)。

4. GFP-Osteocalcin 蛍光免疫二重染色

異所性骨形成において骨髓由来細胞は GFP 免疫染色で骨芽細胞へ分化していないことが示唆された。そこでより詳細に骨髓由来細胞の骨芽細胞への分化を検討するため、最も骨形成が盛んであった IBM 移植 14 日目において osteocalcin (OC) と GFP の蛍光二重染色を行った。G→W マウスでは、大腿部筋中、背部皮下ともに OC 陽性所見は新生骨基質の一部と新生骨に沿って一層配列した骨芽細胞と思われる細胞に認められた。しかし、ほぼすべての OC 陽性を示す骨芽細胞

は GFP 陰性であった。新生骨組織周囲の結合組織では GFP 陽性で OC 陰性の紡錘形や類円形の細胞が多数観察された(図 8a, b)。一方、W→G マウスでは大腿部筋中、背部皮下ともに骨芽細胞と新生骨基質の一部で OC 陽性であり、かつこれらの細胞は GFP 陽性を示した(図 8c, d)。よって異所性骨形成過程で出現する骨芽細胞はレシピエント由来であることが示された。

5. GFP 陽性細胞数と硬組織形成面積の経時的変化

GFP-OC 蛍光二重免疫染色により骨髄由来細胞が骨芽細胞に分化していないことが示唆された。そこで異所性骨形成における骨髄由来細胞の関与を検討するため、GFP 陽性細胞数と形成された硬組織の面積の相関について解析した。IBM 移植後 7、14、28 日目での既存大腿骨周囲、大腿部筋中、IBM 中央部、背部皮下皮膚側、背部皮下筋側における GFP 陽性細胞数をカウントした。また、形成された軟骨・骨組織を含めた硬組織について面積を求めた。

GFP 陽性細胞数は大腿骨周囲、筋周囲および背部皮下筋側において IBM 移植 7 日目が最も多く、経時的に減少傾向であった。一方、背部皮下皮膚側と IBM 中央部では GFP 陽性細胞数は経時的に増加していった(図 9a)。

形成された硬組織の面積は、IBM 移植 7 日目では既存骨周囲ですでに多くの硬組織が形成されているが、他部位では大腿部筋中と背部皮下筋側で僅かに軟骨組織形成を認めた。14 日目では背部皮下皮膚側で軟骨形成が認められ始め、大腿部筋中や背部皮下筋側で骨組織形成を認めるが、既存骨周囲を除いて形成量は僅かであった。28 日目までで、既存骨周囲で形成された硬組織面積が他部位よりも大きく、既存骨周囲において IBM 埋入後初期の段階ですでに他部位と比べ多くの硬組織形成が認められた。どの部位も経時的に硬組織形成は増加していくが、既存骨周囲、筋中、背部皮下筋側、背部皮下皮膚側の順で硬組織形成が開始され、28 日目までの硬組織形成量は既存骨周囲が最も大きく、大腿部筋中、背部皮下筋側、そして背部皮下皮膚側の順であった(図 9b)。

考 察

1. 骨形成に関与する細胞の由来について

骨髄移植後に骨髄組織を構成する造血系細胞に GFP 陽性細胞が多数観察された。このことから、造血系細胞はドナー由来の骨髄細胞に置換され、骨髄移植による造血系細胞再構築が起こったことが観察された。また血球系細胞や破骨

細胞は GFP 陽性であり、骨芽細胞や軟骨細胞は GFP 陰性であることから、血球系細胞や破骨細胞は骨髄由来であり、骨芽細胞、軟骨細胞は骨髄以外の組織由来であることが示された(図 2)。

本研究 GFP-OC 蛍光免疫二重染色の結果から骨髄移植後、骨髄由来細胞の骨芽細胞への明らかな分化は確認できなかった(図 8)。骨髄移植により造血系再構築が起こっていることから、ドナー造血幹細胞はレシピエントへ生着したと考えられる。しかし GFP 陽性の骨芽細胞・骨細胞は観察できなかったため、生着したドナー造血幹細胞が骨芽細胞に分化しなかった可能性が示唆された。この結果は移植された骨髄細胞が骨芽細胞へ分化するという Dominici らの報告とは異なる結果が得られた¹³⁾。しかし、造血幹細胞が分化したのではなく、宿主組織の細胞に融合した細胞融合の可能性が指摘されており^{14, 15)}、骨髄細胞中の幹細胞の可塑性について否定的な結果も報告されている。また骨髄には造血幹細胞と間葉系幹細胞、さらには体性多能性前駆細胞が含まれるが、間葉系幹細胞は骨髄中の 0.001~0.01%しか存在せず、本実験による骨髄移植では間葉系幹細胞が生着しなかった可能性が考えられる。

骨芽細胞に分化し得る幹細胞は筋肉や皮下結合組織中にも存在すると考えら

れている。Patricia らは皮下脂肪組織から採取した細胞を培養すると脂肪細胞、骨芽細胞、軟骨細胞、筋肉に分化することを報告しており¹⁶⁾、Arai らは骨膜に存在する activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM)陽性細胞が骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞に分化すると報告している¹⁷⁾。また筋肉組織中の間葉系幹細胞が骨折の治癒や異所性骨形成へ関与することが示唆されており¹⁸⁻²⁰⁾、骨折などの非生理的環境での炎症性サイトカインが間葉系幹細胞を遊走させ、骨芽細胞に分化しているとの報告がある^{21,22)}。以上のように骨髄以外の組織、臓器に存在する間葉系幹細胞が動員されて骨芽細胞に分化するとの報告があり、本研究においても骨髄由来細胞が骨芽細胞に直接分化することなく、大腿骨周囲や筋周囲の幹細胞が骨芽細胞に分化したと考えられる。

2. 骨形成時に動員される骨髄由来細胞の動態、役割について

移植された IBM 周囲の GFP 陽性細胞の局在を検討し、さらに GFP 陽性細胞数を経時的にカウントした。その結果、形成された硬組織中には GFP 陽性細胞は存在せず、形成硬組織周囲の肉芽様組織中の紡錘形細胞や類円形細胞に GFP 陽性細胞が観察された。その肉芽様組織は硬組織形成開始前に顕著に認められ、

IBM 側ではなく、筋側や皮膚側から形成された。GFP 陽性細胞数は、大腿骨周囲や筋周囲、背部皮下筋側において経時的に減少した。一方、背部皮下皮膚側や IBM 中央部では経時的に増加傾向であった。形成された硬組織の面積は、どの部位に関しても経時的に増加傾向であるが、大腿骨周囲や筋周囲など GFP 陽性細胞数の多い部位では、IBM 移植後早期である 7 日目には硬組織形成が観察された (図 8)。すなわち、骨髄由来 GFP 陽性細胞は大腿骨、筋周囲、皮膚側から遊走し、硬組織形成前の肉芽様組織中において、GFP 陽性細胞数がピークに達し、軟骨、骨組織が形成されるとその周囲の GFP 陽性細胞は減少した。

このように骨髄由来細胞数の経時的変化は形成された硬組織と相関関係が認められることから、骨髄由来細胞は異所性骨形成に関係している可能性が示唆された。そして前述のように GFP 陽性細胞は骨芽細胞に分化しないことから、骨髄由来細胞は硬組織形成における微小環境形成に寄与している可能性が考えられた。つまり骨髄由来細胞が直接骨芽細胞に分化し異所性骨形成に寄与するのではなく、周囲組織中の幹細胞の遊走を促進し異所性骨形成の微小環境を形成していることが考えられる。組織損傷により集まってくる炎症性細胞浸潤が放出する因子により骨髄由来細胞が動員される^{23,24)}など、組織修復期に骨髄由

来細胞が集まることは報告されている²⁾。これらの研究は本研究の結果と同様の結論であり、異所性骨形成においても骨髄由来細胞がホスト幹細胞集積に関与していることが示唆された。

3. GFP 陽性細胞数と硬組織形成量の部位特異性

大腿骨周囲や大腿部筋周囲、背部皮下筋側は IBM 移植初期から骨髄由来細胞である GFP 陽性細胞の集簇数が多く、一方で背部皮下皮膚側や IBM 中央部においては GFP 陽性細胞の集簇は少なかった。また 28 日目の形成硬組織面積を比較すると、大腿骨周囲における硬組織形成面積が最も大きく、背部皮下筋側、大腿部筋中の順であり、背部皮下皮膚側や IBM 中央部では形成量は小さかった。つまり、大腿骨周囲、筋周囲が背部皮下皮膚側と比較して GFP 陽性細胞の集積が早期でかつ集積数が多い、また形成される硬組織面積が多い結果となった (図 9)。

組織幹細胞が筋組織中に多く分布していること²⁵⁾また間葉系幹細胞が末梢血中を循環している^{26,27)}などの報告がある。本研究の大腿骨は骨髄、また骨芽細胞に分化し得る細胞を含有する骨膜に近接し、筋周囲は組織幹細胞が豊富に存

在することから骨髄由来細胞の遊走が早期にかつ多いと考えられた。一方皮膚側は血管の分布に乏しく、その周囲に存在する組織幹細胞が少ないため骨髄由来細胞の集積が遅く少ないと考えられた。このように骨髄由来細胞は骨形成のための微小環境形成に寄与しているが、骨髄由来細胞の局在や数が骨形成における微小環境形成の律速条件となっている可能性が示唆された。

結 論

骨髄由来細胞は様々な細胞に分化し、組織再生への関与が報告されている。本研究における異所性骨形成において、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ていた。しかし、骨芽細胞や軟骨細胞への明らかな分化は確認できなかった。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、組織幹細胞が骨芽細胞に分化し、骨形成するといった骨形成微小環境に働きかける役割をしている可能性が示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、懇篤なる御指導、御校閲を賜りました岡山大学大学院

医歯薬学総合研究科口腔病理学分野，長塚仁教授に謹んで感謝の意を表します。

さらに，懇切なる御指導を賜りました岡山理科大学臨床生命科学科組織病態学，辻極秀次教授ならびに，岡山大学大学院医歯薬学総合研究科口腔病理学分野，高島清文助教に心より感謝いたします。最後に本研究を行うにあたり，貴重な御援助と御助言を頂きました岡山大学大学院医歯薬学総合研究科口腔病理学分野の諸先生方に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Krause, DS., Theise, ND., Collector, MI., Henegariu, O., Hwang, S., Gardner, R., Neutzel, S., and Sharkis, SJ.: Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell*. **105**, 369-77, 2001.
- 2) Tsujigiwa, H., Nishizaki, K., Teshima, T., Takeda, Y., Yoshinobu, J., Takeuchi, A., Orita, Y., Sugata, Y., Nagatsuka, H., and Nagai, N.: The engraftment of transplanted bone marrow-derived cells into the olfactory epithelium. *Brain Res.* **1052**, 10-15, 2005.
- 3) Einhorn, TA.: The cell and molecular biology of fracture healing. *Clin Orthop Relat Res.* **355**, 7-21, 1998.

- 4) Gerstenfeld, LC., Cullinane, DM., Barnes, GL., Graves, DT., and Einhorn, TA.: Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. *J Cell Biochem.* **88**, 873-84, 2003.
- 5) Friedenstein, AJ., Gorskaja, JF., and Kulagina, NN.: Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol.* **4**, 267-274, 1976
- 6) Jiang, Y., Jahagirdar, BN., Reinhardt, RL., Schwartz, RE., Keene, CD., Ortiz-Gonzalez, XR., Reyes, M., Lenvik, T., Lund, T., Blackstad, M., Du, J., Aldrich, S., Lisberg, A., Low, WC., Largaespada, DA., and Verfaillie, CM.: Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature.* **447**, 879-880, 2002
- 7) Ohgushi, H., and Caplan, AI.: Stem cell technology and bioceramics: from cell to gene engineering. *J. Biomed. Mater. Res.* **48**, 913-927, 1999.
- 8) Pittenger, MF., Mackay, AM., Beck, SC., Jaiswal, RK., Douglas, R., Mosca, JD., Moorman, MA., Simonetti, DW., Craig, S., and Marshak, DR.: Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* **284**, 143-147, 1999.
- 9) Caplan, AI.: Mesenchymal stem cells. *J. Orthop. Res.* **9**, 641-650, 1991.

- 10) Ohgushi, H., Dohi, Y., Katuda, T., Tamai, S., Tabata, S., and Suwa, Y.: In vitro bone formation by rat marrow cell culture. *J Biomed Mater Res.* **32**, 333-40, 1996.
- 11) Kihara, T., Oshima, A., Hirose, M., and Ohgushi, H.: Threedimensional visualization analysis of in vitro cultured bone fabricated by rat marrow mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* **316**, 943-8, 2004.
- 12) Tsujigiwa, H., Hirata, Y., Katase, N., Buery, RR., Tamamura, R., Ito, S., Takagi, S., Iida, S., and Nagatsuka H.: The Role of Bone Marrow-Derived Cells During the Bone Healing Process in the GFP Mouse Bone Marrow Transplantation Model. *Calcif Tissue Int.* **92**, 296-306, 2013.
- 13) Dominici, M., Marino, R., Rasini, V., Spano, C., Paolucci, P., Conte, P., Hofmann, TJ., and Horwitz, EM.: Donor cell-derived osteopoiesis originates from a self-renewing stem cell with a limited regenerative contribution after transplantation. *Blood.* **111**, 4386-4391, 2008.
- 14) Terada, N., Hamazaki, T., Oka, M., Hoki, M., Mastalerz, DM., Nakano, Y., Meyer, EM., Morel, L., Petersen, BE., and Scott, EW.: Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature.* **416**, 542-545, 2002.

- 15) Ying, QL., Nichols, J., Evans, EP., and Smith, AG.: Changing potency by spontaneous fusion. *Nature*. **416**, 545-548, 2002.
- 16) Patricia, AZ.: The Adipose-derived Stem Cells: Looking Back and Looking Ahead. *Tissue Engineer*. **7**, 211-228, 2002
- 17) Arai, F., Ohneda, O., Miyamoto, T., Zhang, XQ., and Suda, T.: Mesenchymal stem cells in perichondrium express activated leukocyte cell adhesion molecule and participate in bone marrow formation. *J Exp. Med.* **195**, 1549-63, 2002.
- 18) Asakura, A., Komaki, M., and Rudnicki, M.: Muscle satellite cells are multipotential stem cells that exhibit myogenic, osteogenic, and adipogenic differentiation. *Differentiation*. **68**, 245-253, 2001.
- 19) Deasy, BM., Li, Y., and Huard, J.: Tissue engineering with muscle-derived stem cells. *Curr Opin Biotechnol*. **15**, 419-423, 2004.
- 20) Jankowski, RJ., and Huard, J.: Myogenic cellular transplantation and regeneration: sorting through progenitor heterogeneity. *Panminerva Med*. **46**, 81-91, 2004.
- 21) Lemos, DR., Eisner, C., Hopkins, CI., and Rossi, FM.: Skeletal muscle-resident MSCs and bone formation. *Bone*. **80**, 19-23, 2015.

- 22) Ono, T., Okamoto, K., Nakashima, T., Nitta, T., Hori, S., Iwakura, Y., and Takayanagi, H.: IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells enhance bone regeneration. *Nat Commun.* **11**;7:10928, 2016.
- 23) Altschul, SF., Madden, TL., Schäffer, AA., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, DJ.: Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**, 3389-3402, 1997.
- 24) Altschul, SF., and Gish, W.: Local alignment statistics. *Methods Enzymol.* **266**, 460-480, 1996.
- 25) Troy, A., Cadwallader, AB., Fedorov, Y., Tyner, K., Tanaka, KK., and Olwin, BB.: Coordination of satellite cell activation and self-renewal by Par-complex-dependent asymmetric activation of p38 α / β MAPK. *Cell Stem Cell.* **11**, 541-553, 2012.
- 26) Ferrari, G., Cusella, AG., Coletta, M., Paolucci, E., Stornaiuolo, A., Cossu, G., and Mavilio, F.: Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science.* **279**, 1528-1530, 1998.
- 27) Kuznetsov, SA., Mankani, MH., Gronthos, S., Satomura, K., Bianco, P., and Robey,

PG.: Circulating skeletal stem cells. *J Cell Biol.* **153**, 1133-1140, 2001.

図表の説明

図 1. IBM 移植後の大腿部筋中移植群と背部皮下移植群の HE 染色全体像

a : IBM 大腿部筋中移植群の HE 染色全体像を示す。実線で囲まれた部位を大腿骨周囲、点線で囲まれた部位を筋周囲、二重線で囲まれた部位を IBM 中央部とした。(○) は既存大腿骨。

b : IBM 背部皮下移植群の HE 染色全体像を示す。実線で囲まれた部位を皮膚側、点線で囲まれた部位を筋側とした。

(スケールバー : 500 μ m)

図 2. 大腿骨、脛骨骨端部の組織学的所見

a, b : 骨髄移植後の大腿骨と脛骨骨端部の HE 染色全体像を示す。骨端部軟骨板では骨・軟骨組織が観察された。(×40)

c, d : 骨髄移植後の大腿骨と脛骨骨端部の HE 染色の高倍像を示す。骨端部軟骨板では骨・軟骨組織が観察され、骨髄組織では血球系細胞が認められた。(×400)

e : G→W マウスにおける GFP 抗体による免疫組織化学的染色像を示す。骨髄中

の血球系組織および破骨細胞 (▲) に GFP 陽性所見を認めた。骨芽細胞 (↑) や

軟骨細胞は GFP 陰性を示した。(×400)

f : W→G マウスにおける GFP 抗体による免疫組織化学的染色像を示す。骨芽細胞

(↑) や軟骨細胞は GFP 陽性であり、骨髄中の血球系組織では GFP 陰性所見を

認めた。(×400)

図 3. 大腿部筋中 (a, b, c) あるいは背部皮下 (d, e, f) に IBM 移植後の軟エッ

クス線写真による経時的变化

a : 移植後 7 日目、既存大腿骨 (○) 周囲に僅かな不透過像亢進を認めた。

b : 移植後 14 日目、IBM 周囲に繊細な不透過像が認められた。

c : 移植後 28 日目、IBM 周囲の不透過像が明瞭になった。

d : 移植後 7 日目、筋側に不透過像亢進を認めた。

e : 移植後 14 日目、皮膚側と筋側両方ともに不透過像が認められた。

f : 移植後 28 日目、IBM 周囲の不透過像が明瞭になった。

図 4. 大腿部筋中 IBM 移植後 7 日目の組織学的所見

a : 大腿骨周囲の HE 染色像を示す。既存大腿骨 (○) 周囲に軟骨組織形成と肉芽組織形成を認めた。

b : 図 a 実線部の拡大像を示す。形成された軟骨組織周囲の肉芽組織は紡錘形細胞や類円形細胞を主体とした。

c : 図 a の相当部位の GFP 抗体による免疫組織化学的染色像を示す。GFP 陽性細胞は新生軟骨組織周囲に集簇を認めた。(実線は既存骨の境界)

d : 図 b の相当部位の GFP 抗体による免疫組織化学的染色像を示す。新生軟骨周囲の類円形や紡錘形細胞に GFP 陽性を示したが、形成された軟骨細胞では GFP 陰性を示した。(実線は既存骨の境界)

e : 筋周囲の HE 染色像を示す。筋組織に接するように肉芽様組織形成を認め、肉芽様組織内に僅かに軟骨形成を認めた。

f : 図 e 実線部の拡大像を示す。新生軟骨組織周囲の肉芽組織は紡錘形細胞や類円形細胞を主体とした。

g : 図 e の相当部位の GFP 抗体による免疫組織化学的染色像を示す。形成された軟骨組織周囲の肉芽組織の中には GFP 陽性細胞を認めた。

h : 図 f の相当部位の GFP 抗体による免疫組織化学的染色像を示す。形成され

た肉芽様組織中の類円形や紡錘形細胞が GFP 陽性を示した。

i, j, k, l : IBM 中央部の HE 染色像と GFP 抗体による免疫組織化学的染色像を示す。移植された IBM 周囲に細胞の遊走を認めず、GFP 陽性所見も観察されなかった。

(スケールバー : 100 倍像は 100 μ m、400 倍像は 20 μ m)

図 5. 大腿部筋中 IBM 移植後 14 日目の組織学的所見

a: 大腿骨周囲の HE 染色像を示す。既存大腿骨 (○) 周囲に旺盛な骨・軟骨組織形成を認め、その周囲に肉芽組織を認めた。

b : 図 a 実線部の拡大像を示す。既存大腿骨 (○) 周囲に形成された骨、軟骨組織近傍の肉芽組織中には紡錘形細胞や類円形細胞を認めた。(実線は既存骨との境界)

c : 図 a の相当部位の GFP 抗体による免疫組織化学的染色像を示す。GFP 陽性細胞は形成された骨、軟骨組織周囲に少数認められた。

d : 図 b の相当部位の GFP 抗体による免疫組織化学的染色像を示す。僅かに認められる新生骨、軟骨周囲の類円形や紡錘形細胞に GFP 陽性を示したが、形成

された骨・軟骨細胞では GFP 陰性を示した。(実線は既存骨との境界)

e : 筋周囲の HE 染色像を示す。筋組織に接するように旺盛な骨組織形成を認めた。

f : 図 e 実線部の拡大像を示す。形成された骨組織の近傍に配列している骨芽細胞と考えられる細胞 (↑) を認めた。

g : 図 e の相当部位の GFP 抗体による免疫組織化学的染色像を示す。新生骨周囲に GFP 陽性細胞の集簇を認めた。

h : 図 f の相当部位の GFP 抗体による免疫組織化学的染色像を示す。形成された骨組織内の骨細胞と骨芽細胞 (↑) は GFP 陰性を示した。一方形成された骨組織間の類円形や紡錘形細胞は GFP 陽性を示した。

i, j, k, l : IBM 中央部の HE 染色像と GFP 抗体による免疫組織化学的染色像を示す。移植された IBM 周囲に紡錘形細胞や類円形細胞を主体とする肉芽組織を認め、肉芽組織中には GFP 陽性を示した紡錘形や類円形の細胞の遊走を認めた。

(スケールバー : 100 倍像は 100 μ m、400 倍像は 20 μ m)

図 6. 大腿部筋中 IBM 移植後 28 日目の組織学的所見

a : 大腿骨周囲の HE 染色像を示す。既存大腿骨 (○) から連続するように骨組織形成を認め、骨髓様組織形成 (*) も認めた。

b : 図 a 実線部の拡大像を示す。形成された骨髓組織中に血球系細胞と脂肪細胞を認め、新生骨近傍に破骨細胞と考えられる多核巨細胞 (▲) を認めた。

c : 図 a の相当部位の GFP 抗体による免疫組織化学的染色像を示す。新生骨周囲と形成された骨髓組織 (*) の中に GFP 陽性細胞を多数認めた。

d : 図 b の相当部位の GFP 抗体による免疫組織化学的染色像を示す。新生骨組織周囲の破骨細胞と考えられる多核巨細胞 (▲) と形成された骨髓様組織の血球系細胞に GFP 陽性を示した。

e : 筋周囲の HE 染色像を示す。筋組織に接するように旺盛な骨組織形成を認め、IBM 側では骨髓様組織形成 (*) を認めた。

f : 図 e 実線部の拡大像を示す。形成された骨髓組織中に血球系細胞と脂肪細胞を認めた。

g : 図 e の相当部位の GFP 抗体による免疫組織化学的染色像を示す。新生骨周囲と形成された骨髓組織 (*) の中に GFP 陽性細胞を多数認めた。

h : 図 f の GFP 抗体による免疫組織化学的染色像を示す。形成された骨髓様組

織の血球系細胞と脂肪細胞に GFP 陽性を示したが、新生骨組織内の骨細胞は GFP 陰性を示した。

i, j, k, l : IBM 中央部の HE 染色像と GFP 抗体による免疫組織化学的染色像を示す。移植された IBM に添加するように新生骨形成を認めた（点線で囲まれた部位）。また新生骨間に脂肪細胞や血球系細胞を認めた。骨組織周囲の紡錘形細胞や脂肪細胞、血球系細胞に GFP 陽性所見を認めた。

（スケールバー：100 倍像は 100 μ m、400 倍像は 20 μ m）

図 7. 背部皮下 IBM 移植後 7、14、28 日目の組織学的所見

a : 7 日目の皮膚側の HE 染色像を示す。皮膚と IBM の間に紡錘形細胞の集簇を主体とする肉芽様組織形成を認めた。

b : 図 a の相当部位の GFP 抗体による免疫組織化学的染色像を示す。形成された肉芽様組織中の紡錘形細胞が GFP 陽性を示した。

c : 7 日目の筋側の HE 染色像を示す。筋組織に接するように肉芽様組織形成を認め、肉芽様組織内に僅かに軟骨形成を認める。

d : 図 c の相当部位の GFP 抗体による免疫組織化学的染色像を示す。形成され

た肉芽様組織中の類円形や紡錘形細胞が GFP 陽性を示し、筋組織に接する部位に GFP 陽性細胞の集簇を認めた。

e : 14 日目の皮膚側の HE 染色像を示す。皮膚側から IBM の方向に新生軟骨組織形成を認めた。

f : 図 e の相当部位の GFP 抗体による免疫組織化学的染色像を示す。形成された軟骨組織において GFP 陰性であった。

g : 14 日目の筋側の HE 染色像を示す。筋組織に接するように骨・軟骨組織形成を認めその周囲には紡錘形細胞からなる肉芽様組織を認めた。

h : 図 g の相当部位の GFP 抗体による免疫組織化学的染色像を示す。新生骨・軟骨細胞は GFP 陰性を示した。形成された骨組織周囲形成周囲の肉芽様組織中の紡錘形細胞は GFP 陽性を示した。

i : 28 日目の皮膚側の HE 染色像を示す。皮膚側から IBM の方向に新生骨組織形成を認めた。

j : 図 i の相当部位の GFP 抗体による免疫組織化学的染色像を示す。骨細胞は GFP 陰性であった。

k : 28 日目の筋側の HE 染色像を示す。筋組織に接するように骨組織形成を認め、

IBM 側には骨髓様組織の形成を認めた。(点線で囲まれた部位は新生骨)

l : 図 k の相当部位の GFP 抗体による免疫組織化学的染色像を示す。新生骨細胞は GFP 陰性を示した。形成された骨髓様組織中の血球系細胞や脂肪細胞の一部は GFP 陽性を示した。(点線で囲まれた部位は新生骨)

(スケールバー : 50 μ m)

図 8. 蛍光免疫二重染色像

a, b: G→W マウス大腿部筋中と背部皮下に IBM 移植後 14 日目の OC 抗体および GFP 抗体による蛍光免疫二重染色像を示す。OC は緑、GFP は赤に染めており、両部位とも OC 陽性の骨組織周囲の配列した骨芽細胞は GFP 陰性であった。GFP 陽性で OC 陰性の紡錘形や類円形細胞が多数観察された。

c, d: W→G マウス大腿部筋中と背部皮下に IBM 移植後 14 日目の OC 抗体および GFP 抗体による蛍光免疫二重染色像を示す。両部位ともに骨芽細胞と新生骨基質の一部で OC と GFP に陽性を示した。

図 9. GFP 陽性細胞数と形成硬組織面積

a : IBM 移植後 7、14、28 日目での大腿骨周囲、大腿部筋周囲、IBM 中央部、背部皮下皮膚側、背部皮下筋側における GFP 陽性細胞数をカウントした結果を示す。大腿骨周囲、筋周囲および背部皮下筋側において IBM 移植 7 日目が最も多く、経時的に減少傾向であった。一方、背部皮下皮膚側と IBM 中央部では GFP 陽性細胞数は経時的に増加していった。(N = 4)

b : 形成された軟骨・骨組織そして形成された骨髄様組織を含めた硬組織について面積の結果を示す。どの部位も経時的に硬組織形成は増加し、大腿骨周囲、筋周囲、背部皮下筋側、背部皮下皮膚側の順で硬組織形成が開始された。28 日目までの硬組織形成量は大腿骨周囲が最も大きく、筋周囲、背部皮下筋側、そして背部皮下皮膚側の順であった。(N = 4)

表題脚注

岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科

病態制御科学専攻

口腔病理学分野

(指導 : 長塚 仁 教授)