

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：12103

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2022

課題番号：18K16607

研究課題名(和文) 骨髄細胞刺激が骨再生に与える影響の解析と新規治療法の開発

研究課題名(英文) The analysis of the effect of bone marrow cell stimulation on osteogenesis and the development of brand-new treatment

研究代表者

菅谷 久 (Hisaahi, Sugaya)

筑波技術大学・保健科学部・准教授

研究者番号：10752553

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：副甲状腺ホルモン(PTH)の間欠的投与による骨髄細胞への影響を検討した。有核細胞である白血球と造血前駆細胞のマーカーであるCD34+細胞、CD34+CD45-細胞はいずれも投与終了1日後に高いピークがみられた。他方、間葉系幹細胞のマーカーであるCD31-45-81+90+細胞、CFU-Fは、投与終了後4日に強いピークがみられ、投与終了後10日に弱いピークがみられた。間欠的PTH投与により骨髄細胞は刺激されるが、造血前駆細胞と間葉系幹細胞とではピークが異なり、各々刺激応答が異なる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨髄血採取前にPTHをあらかじめ投与すること(Pre-conditioning)により、より多くの骨髄細胞を採取することが可能となり、骨髄血移植後の骨新生・血管新生において有利に作用することが明らかとなれば、骨髄血採取時に少量の骨髄血しか採取できない(Dry Tap)症例や、幹細胞数が少ないとされる高齢者の細胞治療に際しても、事前にPTHを投与することで従来よりも多くの骨髄細胞の採取が可能となり、骨髄血を用いた骨新生治療が骨壊死のみならず骨粗鬆症に起因した手・腰・足の骨折など、骨新生に不利な年齢層の疾患に対しても有用な治療技術を創出できる可能性が見込まれる。

研究成果の概要(英文)：We investigated the effects of intermittent administration of parathyroid hormone (PTH) on bone marrow cells. Nucleated leukocytes and hematopoietic progenitor cell markers (CD34+ cells and CD34+CD45- cells) showed high peaks one day after the end of PTH administration. The markers of mesenchymal stem cells (CD31-45-81+90+ cells and CFU-F) showed a strong peak 4 days after the end of PTH administration and a weak peak 10 days after the end of PTH administration. Bone marrow cells were stimulated by intermittent administration of PTH, but the peaks differed between hematopoietic progenitor cells and mesenchymal stem cells, suggesting the possibility that their stimulation responses differed.

研究分野：整形外科

キーワード：副甲状腺ホルモン 骨髄細胞 間葉系幹細胞 造血前駆細胞

## 1. 研究開始当初の背景

比較的多い骨壊死の1つである特発性大腿骨頭壊死は、日本では年間2200名、米国では年間10,000名以上もの新規罹患者が発生する。発症年齢は男性で40歳代、女性で30歳代と、青壮年期に発症することが多く、この時期に機能障害が生じることは、日常生活の質を長期間にわたって低下させ、社会的にも大きな損失である。特にステロイド製剤に起因した骨壊死は、医原性に発生する側面もあり喫緊に克服すべき課題にも関わらず、壊死部位を確実に修復しうる最善の治療法は未だ確立されていない。骨壊死の標準的な治療は、骨移植、骨切り、人工関節置換の3つである。これらはいずれも手術侵襲が大きく正常組織にも損傷が及ぶことがある。また壊死部を含めた組織置換による機能回復を目指した治療であり、壊死部の組織再生を目指した治療ではない。

近年、壊死部の組織再生を目指して幹細胞を移植し骨・関節温存を図る、細胞治療が報告されるようになった。再生医療等安全性確保法が施行され、社会的関心も高く再生医療に対する期待が高まる一方で、治療技術・創薬においては発展途上であり、より安全で高い効果が期待される再生医療が模索されている。申請者のグループでは、骨壊死の治療に自家骨髄血を利用して壊死部の骨組織再生を促進させる治療研究を進めているが、壊死部の組織再生効果を高めるために、移植細胞数や生着細胞数をどうしたら多く増やすことができるのか、という問題がある。こうした問題は自家骨髄血を利用した骨再生を安定して成功させるために重要であるが、今まではヒトでは症例報告が殆どで無作為ランダム化比較試験といった信頼性の高い報告はなく、移植した骨髄血の組成や骨髄細胞の生着に関する研究もなかったため、壊死部の骨組織再生の成功率を上げる方法がわからなかった。

このため、壊死骨内への移植細胞の生着については自グループ内で研究を進め、移植した骨髄細胞が壊死骨内で生着し骨芽細胞へと分化したことを明らかにした。一方、移植細胞数や生着細胞数の増加については、副甲状腺ホルモン(PTH)が間葉系幹細胞の接着作用を増強させる効果や顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)の放出を促進させる効果が報告されている。

PTHについては、動物実験では骨髄間葉系幹細胞の接着能増強(J Davies et al. 2004)、幹細胞動員増強・G-CSF放出促進(Brunner et al. 2008)、造血幹細胞数増加(Jacome-Galarza et al. 2011)などの報告がある。骨髄血採取前にPTHをあらかじめ投与すること(Pre-conditioning)により、より多くの骨髄細胞を採取することが可能となり、骨髄血移植後の骨新生・血管新生において有利に作用することが明らかとなれば、骨壊死に対する治療だけでなく、今後患者数の増加が見込まれるにもかかわらず治療に難渋することが多い骨粗鬆症を伴う骨折に対して、骨新生促進の一役を担う治療技術となることが期待できる。

また骨髄血採取時に少量の骨髄血しか採取できない(Dry Tap)症例や、幹細胞数が少ないとされる高齢者の細胞治療に際しても、PTHを投与することで従来よりも多くの骨髄細胞の採取が可能となることが明らかになれば、骨髄血を用いた骨新生治療が、骨壊死のみならず骨粗鬆症に起因した手・腰・足の骨折(橈骨遠位端骨折・椎体骨折・大腿骨頸部骨折)など、今後患者数の増加が見込まれるにもかかわらず骨新生に不利な年齢層の疾患に対しても有用な治療技術を創出できる可能性が見込まれる。

## 2. 研究の目的

本研究では、PTH投与による骨髄血中の細胞成分・液性成分の組成変化を解析し、新たな骨形成治療の実施可能性について家兎を使用した動物実験で明らかにする。

## 3. 研究の方法

実験動物は12週齢日本白色家兎(東京実験動物、東京)雌を使用した。PTH投与群と対照群(生理食塩水投与群)の2群を設定した。PTH投与群は40 $\mu$ g/kg/mlに調整したPTH調整液を3ml作成し5日間連日投与した。対照群は生理食塩水3mlを5日間連日投与した。投与前(Day 1)、投与終了1日後(Day 7)、4日後(Day 10)、7日後(Day 13)、10日後(Day 16)にそれぞれ骨髄血を採取し、解析を行った。また骨髄血採取時に体重を測定し、薬剤投与による影響を検討した。

骨髄血採取は、先行研究と同様の方法で採取した。家兎の両側後方腸骨稜から骨髄内に18ゲージ針を刺入し、ACD液2mlを加えた20mlシリンジで骨髄血を8ml吸引採取した。採取した骨髄血はナイロンメッシュ(100 $\mu$ m cell strainer; BD Falcon, Bedford, MA, USA)で濾過し、

50 ml 用チューブ(50 ml conical tube; BD Falcon)に回収した。

回収した骨髓血に対して、分化能と骨髓血内の有核細胞・幹細胞数を検討した。

分化能については、採取した骨髓血を Phosphate-Buffered Saline (以下 PBS)で 2 回洗浄した後、75 cm<sup>2</sup> フラスコに播種し、37 °C、5 %二酸化炭素の環境下で培養した。培養液は Alpha-Minimum Essential Medium (以下  $\alpha$ -MEM; Sigma, St. Louis, MO, USA)、10 %牛胎児血清(Fetal Bovine Serum, 以下 FBS; Sigma)、1 %抗生物質(Antibiotic-antimitotic; GIBCO, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)で構成され、各フラスコを 15 ml の培養液で満たし、24 時間後に初回培地交換を行った。以後、2-3 日に 1 回の頻度で培地交換を行い、フラスコ底面の 80 %以上に培養細胞が増生していること(80 % - confluent)を確認した後に、フラスコ底面に接着した紡錘形の細胞を 0.25 % Trypsin 1 mM EDTA (Sigma)を用いてフラスコ底面より剥離し、PBS で 2 回洗浄した後、分化能評価に使用した。評価は、骨分化用(Rabbit Osteoblast Differentiation Medium, Cell Applications, Inc., San Diego, CA, USA) および脂肪分化用(Rabbit Adipocyte Differentiation Medium, Cell Applications, Inc., San Diego, CA, USA) のメディアウムを使用して、各々評価した。

骨髓血内の有核細胞については、全自動血球計測器(日本光電、東京)を使用して、骨髓血中の白血球数を測定した。

幹細胞数については、間葉系幹細胞と造血前駆細胞の 2 種類について計測を行った。間葉系幹細胞(Mesenchymal stem cells: MSCs)については、陽性マーカーとして 2 種類(CD81、CD90)、陰性マーカーとして 2 種類(CD31、CD45)を選択し、CD31-CD45-CD81+CD90+細胞数を計測した。合わせて colony forming unit - fibroblast (CFU-F) 数を計測した。造血前駆細胞(Hematopoietic stem cells: HSCs)として、CD34 陽性細胞数、CD34+CD45-細胞数を測定した。細胞表面抗原マーカーの測定は、フローサイトメトリー(FACS)による分析を行った。フローサイトメトリーで使用した測定機器は Smart Sampler MoFlo™ XDP (Beckman Coulter, Brea, CA, USA)、解析は Summit Software v4.3 (Beckman Coulter) を使用した。



#### 4. 研究成果

分化能については、骨髓血から単離した未分化細胞が骨・脂肪いずれにも分化することを確認し、研究に使用する細胞が多分化能を有していることを確認した。

投与前後での体重(kg)は、2.79±0.03 (Day 1) vs. 2.74±0.09 (Day 7) vs. 2.77±0.11 (Day 10) vs. 2.79±0.10 (Day 13) vs. 2.78±0.15 (Day 16)で PTH 投与による有意な体重増加・減少といった有害事象はみられなかった。

白血球数(/ $\mu$ l)は、13.9±6.0 × 10<sup>3</sup> (Day 1) vs. 20.5±4.1 × 10<sup>3</sup> (Day 7) vs. 4.7±2.1 × 10<sup>3</sup> (Day 10) vs. 7.2±5.3 × 10<sup>3</sup> (Day 13) vs. 4.8±2.8 × 10<sup>3</sup> (Day 16)で投与終了 1 日後にピークがみられた。

CD31-45-81+90+細胞(%)は 3.67±2.34 × 10<sup>-2</sup> (Day 1) vs. 2.25±0.80 × 10<sup>-2</sup> (Day 7) vs. 16.1 ± 15.3 × 10<sup>-2</sup> (Day 10) vs. 3.67±4.08 × 10<sup>-2</sup> (Day 13) vs. 10.6±11.2 × 10<sup>-2</sup> (Day 16) で投与終了後 4 日に強いピークがみられ、投与終了後 10 日に弱いピークがみられた。

白血球 10<sup>6</sup> 個あたりの CFU-F 数(個)は、3.54±2.57 (Day 1) vs. 8.23±4.26 (Day 7) vs. 22.7 ± 22.0 (Day 10) vs. 7.56±9.55 (Day 13) vs. 10.9±5.69 (Day 16) で、CD31-45-81+90+細胞と同様に、投与終了後 4 日に強いピークがみられ、投与終了後 10 日に弱いピークがみられた。

CD34+細胞(%)は 4.11±2.82 × 10<sup>-1</sup> (Day 1) vs. 7.63±2.27 × 10<sup>-1</sup> (Day 7) vs. 4.50±2.59 × 10<sup>-1</sup> (Day 10) vs. 1.47±1.29 × 10<sup>-1</sup> (Day 13) vs. 2.89±2.28 × 10<sup>-1</sup> (Day 16)で投与終了 1 日後にピークがみられた。

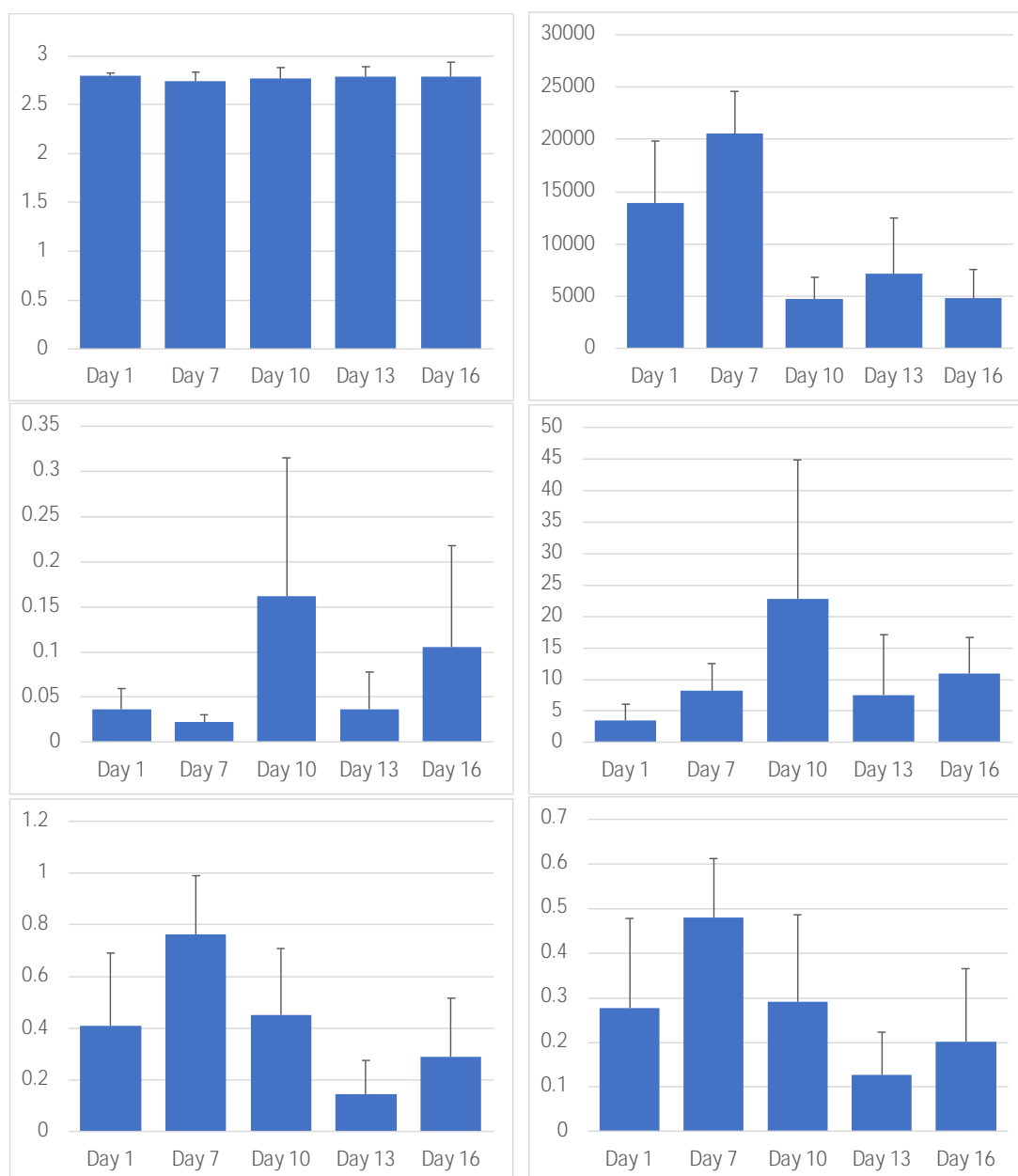
CD34+CD45-細胞(%)は 2.77±2.01 × 10<sup>-1</sup> (Day 1) vs. 4.79±1.33 × 10<sup>-1</sup> (Day 7) vs. 2.92 ± 1.94 × 10<sup>-1</sup> (Day 10) vs. 1.27±0.97 × 10<sup>-1</sup> (Day 13) vs. 2.01±1.64 × 10<sup>-1</sup> (Day 16)で、CD34+細胞と同様に投与終了 1 日後にピークがみられた。

以上から、有核細胞である白血球と造血前駆細胞のマーカーである CD34+細胞、CD34+CD45-細胞はいずれも投与終了 1 日後に高いピークがみられた。この要因として、PTH については、動物実験では幹細胞動員増強・G-CSF 放出促進(Brunner et al. 2008)、造血幹細胞数増加(Jacome-Galarza et al. 2011)などの報告があり、比較的短期的で即効性の高い効果であることが判明した。

他方、間葉系幹細胞のマーカである CD31-45-81+90+細胞、CFU-F は、投与終了後 4 日に強いピークがみられ、投与終了後 10 日に弱いピークがみられた。間葉系幹細胞に対する PTH の効果については骨髄間葉系幹細胞の接着能増強(J Davies et al. 2004)、また骨芽細胞に対する PTH の効果については転写因子の c-fos の発現・増殖促進や interleukin-11(IL-11)の発現促進効果 (Takeuchi Y et al. 2002) がいわれているが、PTH が間葉系幹細胞に対して細胞増殖を促進する効果があり、造血前駆細胞よりも 3 日程度の時間差で細胞増殖促進効果であることが判明した。

間欠的 PTH 投与により骨髄細胞は刺激されるが、造血前駆細胞と間葉系幹細胞とではピークに時間差があり、各々刺激応答が異なる可能性が示唆された。ただし、間葉系幹細胞のマーカである CD31-45-81+90+細胞、CFU-F は、投与終了後 4 日に強いピークがみられた他に、投与終了後 10 日にも弱いピークがみられており、PTH 投与による細胞増殖効果が投与終了 10 日後以降にも影響を及ぼすのか、さらに長期の経過を検証することが望ましいと考えられる。他方、今回採用した PTH 投与期間についてさらに改善の余地があると考えられ、PTH 投与期間をより長期間とした場合の骨髄細胞への影響についても検討が望ましいと考えられる。より多くの骨髄細胞を効果的に採取するために適切な PTH 投与期間を検証することを検討している。対照群との比較解析を進めており、結果をまとめた後論文誌上に公表することを計画している。

図 左上：体重(kg)、右上：白血球数(/ $\mu$ l)、左中：CD31-45-81+90+細胞(%）、右中：白血球  $10^6$  個あたりの CFU-F 数(個)、左下：CD34+細胞(%）、右下 CD34+CD45-細胞(%)



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------