

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 19 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870039

研究課題名(和文) 骨折部におけるDickkopf3の発現と機能解析による骨折治癒機構の解明

研究課題名(英文) Identification of a progenitor cell population destined to form fracture fibrocartilage callus in Dickkopf-related protein 3-green fluorescent protein reporter mice

研究代表者

森 優 (Mori, Yu)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：70634541

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：Dkk3、Col3.6、SMAAの3種類のGFPリポーターマウスを交配しtriple colorマウスを作製した。Dkk3は通常は骨膜上に発現していた。骨折初期では増殖したSMAA陽性細胞においてDkk3あるいはCol3.6との共発現が認められた。骨折部の軟骨形成期では幼若な線維軟骨細胞にはDkk3の発現がみられたが、成熟した軟骨細胞では発現が消失していた。免疫染色ではDkk3と血管基底膜のtype IV collagenの発現パターンは全く一致せず、血管新生阻害因子PEDFは共発現が認められた。Dkk3は血管新生を調節し、骨折部の軟骨形成、骨形成の調節に関連している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Fracture healing is a complex biological process involving the proliferation of mesenchymal progenitor cells, and chondrogenic, osteogenic and angiogenic differentiation. Here, we demonstrate Dickkopf-related protein 3 (Dkk3) expression in periosteal cells using Dkk3-green fluorescent protein (Dkk3-GFP) reporter mice. We found that proliferation of mesenchymal progenitor cells began in the periosteum, involving Dkk3-positive cell proliferation near the fracture site. In addition, Dkk3 was expressed in fibrocartilage cells with and smooth muscle alpha actin and Col3.6 in the early phase of fracture healing as a cell marker of fibrocartilage cells. Dkk3 was not expressed in mature chondrogenic cells or osteogenic cells. Transient expression of Dkk3 had disappeared in the late phase of fracture healing except in the superficial periosteal area of fracture callus. The Dkk3 expression pattern differed in newly formed type IV collagen-positive blood vessels and the related avascular tissue.

研究分野：整形外科

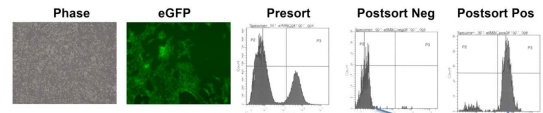
キーワード：骨折修復機構 間葉系幹細胞 Dickkopf 3 血管新生

1. 研究開始当初の背景

高齢者の大腿骨骨折に代表される骨折は、整形外科手術の主要な部分を占めている。臨床の場で高頻度にみられる外傷ではあるが、実験モデルを用いて骨折治癒のメカニズムを詳細に検討した研究は少なく、どのような機構で骨折部に仮骨が形成され新生骨が形成されるか未知な部分も多い。骨折治療において早期の確実な骨癒合を得るために骨癒合のメカニズムを理解することは必要不可欠である。

2. 研究の目的

骨折の治癒過程を詳細に検討した研究はこれまでに少ない。骨折部において軟骨、仮骨を経て新生骨がどのように形成されるかはいまだ未知な点が多い。骨折部において間葉系未分化細胞から線維軟骨細胞が形成され、軟骨組織が吸収されたのちに骨芽細胞により骨形成が行われるが、このような骨折治癒に関わる細胞群の分子マーカーなどの情報も少ない。申請者らは GFP リポーターマウスを用いた脛骨骨折実験モデルで骨折治癒のメカニズムについて間葉系未分化細胞のマーカーである SMAA、骨芽細胞の分化マーカーである Col1A1、Osteocalcin に着目し詳細な検討を行い、SMAA と Col1A1 が共発現を示す double positive の細胞は幼若な骨芽細胞に分化していくこと、さらに分化の進んだ骨芽細胞では SMAA の発現がなくなり、Col1A1 と Osteocalcin の共発現を認めることを明らかにした。間葉系未分化細胞の分化を解析するために FACS で抽出した SMAA 陽性細胞を骨芽細胞の分化条件で培養した細胞培養のマイクロアレイによる網羅的な解析では、アルカリフォスファターゼなどの骨形成マーカーの発現以前に、血管新生阻害因子である PEDF や、thrombospondin2 と Dkk3 の強い発現がみられるのが確認された。



OFFICIAL_GENE_NAME	OFFICIAL_SYMBOL	MSC Neg	MSC Pos
alkaline phosphatase, liver/bone/kidney	Alpl	445	4326
integrin binding sialoprotein	Ibsp	288	989
trans-acting transcription factor 7	Sp7	464	5447
collagen, type II, alpha 1	Col2a1	279	3063
scleraxis	Scx	259	1284
tenascin C	Tnc	683	11,510

dickkopf homolog 3	Dkk3	3,814	53,825
thrombospondin 2	Thbs2	5,474	65,185
serine peptidase inhibitor, clade F, member 1, (PEDF)	Serpinf1	7,662	66,985

本研究の目的は Dkk3 の骨折治癒に関わる生理的な役割を Dkk3GFP レポーターマウスを用いて明らかにすることである。

3. 研究の方法

骨折治癒において間葉系未分化細胞がどのように線維軟骨細胞、骨芽細胞に分化して骨新生を行うか、また Dkk3 の骨折治癒に関わる生理的機能を明らかにするために以下の実験を行った。

(1) SMAA, Dkk3, Col1A1 のトリプル GFP リポーターマウスを用いた骨折部における Dkk3 の発現解析と間葉系未分化細胞の骨、軟骨細胞分化の解析: Dkk3-eGFP, Col3.6GFPcyan, SMAA-RFPchry の 3 種類の GFP リポーターマウスを交配し triple color マウスを作製した。マウス脛骨骨折モデルは吸入麻酔下に手術操作を行った。はじめにマウスの膝関節周囲剃毛後に経皮的に、脛骨関節面から直径 0.3mm、長さ 18mm 程度のステンレス製ピンを髓内釘として挿入した。その後 Einhorn らの報告にある閉鎖骨折を作製する骨折デバイスで、再現性のある横骨折をマウス脛骨骨幹部中央に作成した。骨折から第 3 日、5 日、7 日、14 日、21 日にマウスを安楽死させて、マウス脛骨凍結組織切片を作製し観察を行った。実験の工夫として、共焦点顕微鏡での観察時に蛍光漏れが生じないように、蛍光蛋白を波長の異なる組み合わせで選択した。SMAA は GFPCherry、Dkk3 は eGFP、Col1A1 は GFPcyan で標識することにより、顕微鏡で観察する際に、蛍光漏れがなく 3 つの分子の発現を同時に解析することが可能となり、線維軟骨前駆細胞や

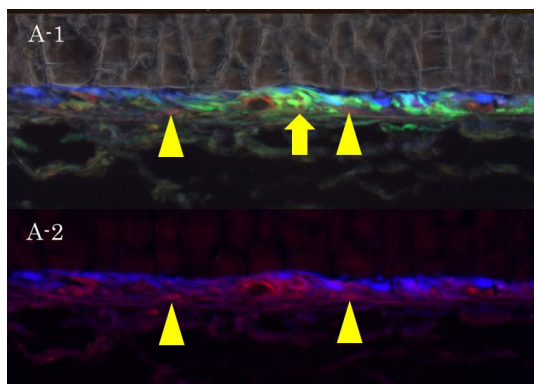
骨芽前駆細胞における SMAA、Dkk3、Col1A1 の共発現の検討が可能であった。Dkk3 と SMAA、あるいは Dkk3 と SMAA と Col1A1 の共発現の検討により Dkk3 の生理的意義を検討した。

(2) 骨折部における血管新生と血管新生調節因子の発現解析と Dkk3 発現の関連の分析：先行して行った SMAA 陽性細胞培養のマイクロアレイの結果で Dkk3 と同時期に発現をみる血管新生阻害因子である PEDF、thrombospondin2 が Dkk3 陽性細胞に発現して、骨折部の血管新生の調節に関わっているかを新生血管基底膜に発現する type IV collagen の免疫染色と併せて行うことにより検討して、Dkk3 の血管新生調節機構に関する生理的機能を解析した。

Dkk3GFP リポーターマウスを用いた脛骨骨折モデルで骨折から 3 日、5 日、7 日、14 日、21 日後にマウスを安楽死させて、各タイムポイントで脛骨の凍結切片を作製して PEDF、type IV collagen の各抗体を用いて免疫染色を行った。二次抗体は Invitrogen 社の Alexa Fluor594 を選択した。Dkk3 が血管新生を調節する可能性について、Dkk3 と PEDF 共局在の可能性を検討した。

4. 研究成果

Dkk3-eGFP, Col3.6-GFPcyan, SMAA-RFP chry の 3 種類の GFP リポーターマウスを交配し triple color マウスを作製した。平常状態では Dkk3 はマウスの骨膜上、あるいは靭帯付着部などに発現がみられた。骨折後の初期反応では増殖した SMAA 陽性細胞において Dkk3 あるいは Col3.6 の共発現が認められた。図に示すように Dkk3 細胞 (矢印) は骨折部近傍で増殖し、増殖した SMAA 細胞 (矢頭) との共発現が確認された (A-1, A-2)。



骨折部の軟骨形成期では幼若な線維軟骨細胞に Dkk3 の発現がみられたが、成熟した軟骨細胞には発現が消失していた。Dkk3 は間葉系未分化細胞に発現しており、線維軟骨細胞の細胞マーカーであることが示唆された。Dkk3 は骨折修復反応の後期では仮骨の表層の骨膜にのみ発現がみられた。骨折部における Dkk3 の発現は骨折修復過程の軟骨性仮骨内の線維軟骨にみとめたが、成熟軟骨、あるいは骨芽細胞には認めなかった。Dkk3 と血管新生の関連を確認するために、血管基底膜に発現する type IV collagen の免疫染色を行った。Dkk3 と type IV collagen の発現パターンは全く一致を認めなかった。一方で、血管新生阻害因子 PEDF の免疫染色では、Dkk3 と共発現が認められた。以上の結果から Dkk3 は骨膜上に発現しており、骨折修復過程では Dkk3 は線維軟骨細胞に発現が認められた。Dkk3 は単に線維軟骨細胞のマーカーとしてだけでなく、PEDF との共発現を認めたことから、骨折部における血管新生の調節に寄与しており、骨折部の軟骨形成・骨形成の調節に関連している可能性が示唆された。本研究により Dkk3 陽性細胞が骨折修復過程において、軟骨性仮骨を形成する線維軟骨細胞に分化することがあきらかになった。骨折部において早期に仮骨が形成可能となれば、骨折治癒までの治療期間の短縮、あるいは難治性骨折の治療に有用である。また骨折部における血管新生の調節機構の深い理解は骨折癒合遅延の治療に貢献することが期待できる。今後は Dkk3 と他の間葉系未

分化細胞発現分子と共発現、あるいは血管新生調節因子との関連を検討し Dkk3 の生理的機能のさらなる解明を行う予定である。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計 1 件)

1. 森 優, A Dkk3 reporter identifies progenitors of the fibrocartilage and periosteum of the fracture callus, 8th Combined Meeting of Orthopaedic Research Society, 2013年10月13日, Venice (Italy)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

森 優 (MORI, Yu)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：70634541