

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 7日現在

機関番号：34517

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：平成21年度～平成23年度

課題番号：21591953

研究課題名（和文） パラバイオシスラットを利用した骨軟骨欠損修復細胞由来の解明と組織修復への応用

研究課題名（英文） Research the origin of cells that contribute to the repair of osteochondral defect and application this for the acceleration of the tissue repair.

研究代表者：脇谷 滋之（Wakitani, Shigeyuki） 武庫川女子大学

研究者番号：70243243

研究成果の概要（和文）：

軟骨欠損修復部に動員され修復に関与する細胞の由来、性質を、GFPラットと野生型ラットのパラバイオシスラットを使って経時的に解析した。その結果、骨軟骨欠損修復過程初期において、末梢血からの細胞が欠損部に集積することを明らかにした。

さらにこの結果に基づき、骨髄を刺激するgranulocyte colony stimulating factor（G-CSF）を150 μ g/kgで5日連続、ラットに投与すると、末梢血中の有核細胞数が3日目から6日目まで増加すること、その時点でラット膝関節に直径1.5mm、深さ1mmの骨軟骨欠損を作成すると、骨軟骨欠損修復が促進は軽度であることを明らかにした。

さらに良い修復を得るために、我々は、G-CSFの投与方法を変え、150 μ g/kgを2週間投与すると、末梢血中の有核細胞数を3日目から14日目までさらに大きく増加させる効果があることを明らかにした。その時点でラット膝関節に直径2mm、深さ2mmの骨軟骨欠損を作成し、2週間後に観察した。その結果、最初のG-CSF投与方法（150 μ g/kgを5日連続投与）における修復組織と比較して、Wakitani scoreによる修復組織の定量評価、画像解析による組織修復率の定量評価、軟骨率の定量評価、軟骨下骨の定量評価とも、有意な改善は得られなかった。

研究成果の概要（英文）：

We examined the possibility that cells circulating in peripheral blood participated in a natural repair process of the joint bone and cartilage injury by using green fluorescent protein transgenic transgenic (GFP) rat. In this study, we used the parabiosis model of GFP rat and wild one. Two weeks after parabiosis operation, vascular communication was confirmed by flow cytometry analysis. 1.5 mm diameter and 1.0 mm depth osteochondral defect was made in patella groove of femoral bone. Histological examination was done at 1, 2, 4, 24 weeks after surgery. In the early phase after the surgery, there were both GFP negative and positive cells in the defects of both rats of parabiosis. GFP positive chondrocytes was confirmed partly in the repair tissue of the wild rat of parabiosis. In the late phase after the surgery, the repaired defect was occupied by cells originated from the adjacent tissue not from the peripheral blood. The rate of cells originated from the peripheral blood was about 30-40% in the repair tissue at 1 week after surgery. While

at 24 weeks after surgery that was about 0-7%. From these results, it is confirmed that cells circulating in peripheral blood contributed to repair of osteochondral defects in joint especially in early phase not only supplying the factors needed for repair but also supplying the repair cells.

When injected granulocyte colony stimulating factor (G-CSF; 150 μ g/kg pre day for 5 days) to rats, the nucleated cells in blood increased. After the cells increase, we made 1.5 mm diameter and 1.0 mm depth osteochondral defect and observed up to 24 weeks. The repair of subchondral bone was accelerated although that of cartilage did not. To obtain better repair, we increased the nucleated cell more by injecting G-CSF for 14 days. After the cells increased more, we made defects and observed for 2 weeks. When we compared the repair of the preceding method with the new one, there were no significant differences between them.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
21年度	1,500,000	450,000	1,950,000
22年度	1,300,000	390,000	1,690,000
23年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：再生医療、細胞・組織、骨軟骨再生

1. 研究開始当初の背景

骨軟骨欠損の修復過程において、修復に関与する細胞は主として損傷部位の骨髄から、さらには関節腔や末梢血中からも供給されるが、その詳細は不明である。また骨軟骨欠損の修復過程は関節軟骨発生を踏襲し、細胞の動員・増殖・分化が重要であるが、その詳細な機構も不明である。

2. 研究の目的

骨軟骨欠損修復過程において、末梢血からの細胞がどの時期にどの程度が関与するかを明らかにする。

また、末梢血中の有核細胞を増加させる作用のある G-CSF を投与し、末梢血有核細胞数を増加させた状態での骨軟骨欠損修復に与える影響を明らかにする。

3. 研究の方法

GFP ラットと野生型ラットの側腹部皮膚を縫合するパラバイオシスラットを作成する。

2週間経過すると血行路が形成され、お互いの血流が交通する状態となる。したがって、野生型ラットの血流中に GFP 陽性の細胞が存在することになる。

このパラバイオシスラットの膝関節に直径 2mm、深さ 2mm の骨軟骨欠損を作成し、その自然経過を観察する。その経過中、修復組織内の GFP 陽性細胞の比率を経時的に観察する。

ラットに G-CSF を投与し、末梢血中の有核細胞を増やした状態で骨軟骨欠損を作成し、組織学的観察を行い、修復への影響を明らかにする。

4. 研究成果

関節骨軟骨欠損修復細胞の由来の解析

関節軟骨損傷の自然修復過程に血流中の細胞が関与する可能性について、GFP transgenic Lewis rat と wild type Lewis rat の parabiosis という血流交換モデルを使って研

究した。Parabiosis とは体の側面の皮膚を切開し、筋、皮下、皮膚を相手と縫い合わせるモデルであり、術後約2週で半分ずつの血流を共有した状態になる。27ペア作成したが3ペア死亡し24ペアで解析した。ペア作成4週後フローサイトメトリーで血流が共有されていることを確認した後、膝関節軟骨に径1.5mm 深さ1mmの骨軟骨欠損を作成した。術後1, 2, 4, 24週(各群6ペアずつ)の免疫組織標本を作成し、欠損内の細胞の由来(GFPおよびwild rat別々に)を解析した。

欠損作成後1週では欠損部は線維性組織と少数の未分化な細胞で覆われていた。wild ratの欠損部に存在する未分化細胞の約30%にGFP陽性の細胞が認められ、GFP ratの欠損部にも約40%にGFP陰性の細胞が認められ、欠損部に血液由来細胞が存在することが明らかになった。欠損作成後2週では、欠損部を埋めていた線維性の組織が減り、分化した細胞成分が増加し、4週では欠損部が一部軟骨細胞で修復されていた。Wild ratではGFP陽性細胞は数%に、GFP ratではGFP陰性細胞は約30%に減少した。Wild ratの新生軟骨細胞はほとんどGFP陰性であったが一部GFP陽性細胞も存在し、血液由来細胞が軟骨修復に寄与している可能性が示唆された。24週では、欠損部の多くは軟骨組織で覆われるが、新生軟骨細胞はほぼ、wild ratはGFP陰性、GFP ratではGFP陽性の細胞であった。このことから、関節軟骨欠損自然修復の初期には、血流由来の可能性もある細胞が欠損部に動員されてくるが、修復された組織はほぼ自己由来の細胞で占められるということが明らかになった。

Stem Cell Mobilization (骨髄幹細胞動員) 誘導

ラット(12週齢の雄Lewisラット)に顆粒球増殖因子(granulocyte-colony stimulating factor:以下、G-CSFと略す)を投与し、血中の有核細胞の増加を確認した。150 μ g/kgを投与が効率的であること、1回投与では投与翌日にピークに達し、5日連続で投与すると有核細胞が高く保たれることを確認した。その結果から、G-CSF群はday 0-4にPBS 500 μ lに溶かしたG-CSF 150 μ g/kgを、Control群ではday 0-4にPBS 500 μ lのみを腹腔内投与(5日連続投与)することとした。
大腿骨顆間部骨軟骨欠損作成手術

G-CSF群、コントロール群ともG-CSFあるいはPBS腹腔内投与4日目(5回目投与のその日、投与後)にケタラールおよびセラクターを筋肉内注射し、全身麻酔を施行した。両膝周辺を剃毛し、消毒した。皮膚を正中切開し、内側傍膝蓋骨正中切開で関節を展開した。大腿骨遠位部、膝関節大腿骨顆間部に直径1.5mm、深さ1mmの骨軟骨欠損を作成し、膝関節、創部を閉創した。手術後、それぞれ2週(2匹)・4週(2匹)・8週(2匹)・12週(5匹)・24週(2匹)でsacrificeした。

大腿骨の骨軟骨欠損部を肉眼的に評価した。大腿骨をホルマリン固定後、脱灰し、骨軟骨欠損部の中央部と通る矢状面で組織切片を作成した。トルイジンブルーおよびヘマトキシリンエオジンで染色し、評価した。軟骨修復よりも軟骨下骨の修復が良好であることが明らかになった。

さらに良い修復を得るための方法が必要である。

さらに良好な修復を得るための骨髄細胞動員の改良

そこで今年度、我々は、G-CSFの投与方法を変え、150 μ g/kgを2週間投与すると、末梢血中の有核細胞数を3日目から14日目までさらに大きく増加させる効果があることを明らかにした。その時点でラット膝関節に直径1.5mm、深さ1mmの骨軟骨欠損を作成し、2週間後に観察した。

その結果、最初のG-CSF投与方法(150 μ g/kgを5日連続投与)における修復組織と比較して、Wakitani scoreによる修復組織の定量評価、画像解析による組織修復率の定量評価、軟骨率の定量評価、軟骨下骨の定量評価とも、有意な改善は得られなかった。

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)

[雑誌論文](計1件)

Okano T, Wakitani S, Okabe T, Takahashi M, Koike T, Nakamura H. Nucleated cells circulating in the peripheral blood contribute to the repair of osteochondral defects only in the early phase of healing.

〔学会発表〕(計1件)

岡野匡志、脇谷滋之、安田宏之、渭川徹秀、
山田賢太郎、岡部高弘、川口杏夢、中村博亮。
Stem cell mobilizationによる骨軟骨欠損修
復. 第26回日本整形外科学会基礎学術集会、
平成23年10月20-21日、前橋(日整会誌
85(8):S1162, 2011)

〔図書〕(計0
件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

脇谷 滋之 (WAKITANI SHIGEYUKI)
武庫川女子大学・健康・スポーツ科学部・
教授
研究者番号：70243243

(2) 研究分担者

星 学 (HOSHI MANABU)

大阪市立大学・大学院医学研究科・病院講
師

研究者番号：50445037

(3) 連携研究者

()

研究者番号：