

機関番号：22701

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791406

研究課題名 (和文) 人工骨における骨前駆細胞ホーミングのメカニズムと骨再生促進の研究

研究課題名 (英文) Homing of osteogenic progenitors to site of new bone formation in artificial bone substitute

研究代表者

熊谷 研 (KUMAGAI KEN)

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号：10468176

研究成果の概要 (和文)：マウス人工骨移植モデルを用いた本研究では、骨移植材料としての β -TCPに骨髄細胞を付加することで、異所性に骨形成を生じることが確認された。これまで人工材料に細胞を付加することで骨形成促進効果が報告されているが、今回の結果より、ドナーだけでなくレシピエント由来の骨前駆細胞が関与することが示唆された。これらの細胞は隣接する局所の組織由来または末梢循環由来の可能性が考えられた。

研究成果の概要 (英文)：This study demonstrated that bone formation was stimulated by the addition of bone marrow cells to subcutaneously implanted porous β -TCP blocks in mouse. The data also suggested that recipient derived osteogenic cells migrate into the ceramic pores and contribute to new bone formation. A possible source of osteogenic cells is cells adjacent to local site or circulating osteogenic cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

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：人工骨, 骨形成, 末梢血由来細胞, ホーミング

1. 研究開始当初の背景

(1) 疾患、外傷等により、修復不可能な臓器の欠損あるいは機能障害が生じた場合、治療法として臓器移植が行われることがある。運動器の一つである骨組織を例に挙げると、従来自家骨移植が行われており、また近年では同種他家骨移植が普及しつつある。前者においては採取部位の疼痛や採取量の限界などの問題があり、後者では免疫、感染などの問題がある。

(2) 自家骨移植に代わる新しい移植材料として、生体吸収性の人工骨補填材が普及しつつある。我々はこれまでに変形性膝関節症患者に対する高位脛骨骨切り術において骨開大部に β -Tricalcium Phosphate (β -TCP)の人工骨を使用し、良好な治療成績が得られている。今後の課題は、外傷や慢性骨髄炎、腫瘍による広範な骨欠損に対しても、人工骨を使用して良好な成績が得られるかどうかである。

(3) 難治性骨折と総称される遷延治癒骨折や偽関節、あるいは広範な骨欠損では、局所において膜性骨化および軟骨性骨化に関与する細胞の供給は制限されていると考えられる。人工骨が自己の骨組織に置換されるには骨形成細胞の供給が不可欠である。人工骨における骨形成細胞供給のメカニズムについては不明な点が多く残されている。

(4) 近年、人工骨に細胞を付加することで骨形成を促進することや、骨誘導を来すことが報告されている。しかしながら、人工骨に細胞を付加した場合、移植後の人工骨内にドナー由来細胞がどの程度残存するかは不明である。

2. 研究の目的

(1) 骨折治癒過程における末梢血由来細胞関与のメカニズムは我々がこれまでに示した最新の知見であるが、この点に焦点を絞り、「移植人工骨における骨形成のメカニズムの一つとして末梢血由来細胞のホーミングがある」という仮説を検証する。

(2) 骨膜や骨髄細胞の供給が乏しい環境下を考慮し、皮下という骨と離れた環境での骨形成を観察する。この場合、周囲からの細胞供給が主にホーミングの機序によると考えられ、これを検証する。

3. 研究の方法

(1) 人工骨への細胞付加：移植材料として、 β -TCP の多孔体（気孔率 75%，直径 5mm × 高さ 3mm の円盤状）を使用した。細胞付加群として、野生株マウス的大腿骨より骨髄細胞を採取し、Selective cell retention 法で陰圧下に人工骨内へ付加した。

(2) 人工骨移植：GFP マウスの背部皮下に細胞付加 β -TCP と β -TCP のみをそれぞれ 1 つずつ移植した。移植後 4 週で検体を摘出し、組織学的に評価した。

(3) 末梢循環中における GFP キメラの形成：末梢血由来の細胞を同定するため、GFP をマーカーとして用い、野生株マウスの末梢血において GFP 陽性細胞のキメラを作製した。具体的には GFP トランスジェニックマウスと野生株マウスとを体側で結合させ末梢循環を共有する parabiosis を作製した。約 3 週間で末梢血に 50 : 50 のキメラが形成され、以後安定した状態が保たれた。

(4) parabiosis マウスへの人工骨移植：末梢血において GFP 陽性細胞のキメラを形成した parabiosis ペアの野生株マウスの皮下に人工骨を移植した。人工骨内への細胞付加は

(1) と同様に行った。移植後 4 週で検体を摘出し、組織学的に評価した。

4. 研究成果

(1) 人工骨への細胞付加：骨髄細胞浮遊液中の単核細胞 $41.8 \pm 11.6 \times 10^6$ 個を陰圧下で人工骨内を通過させた結果、 $18.4 \pm 8.9 \times 10^6$ 個が人工骨に付加された。骨前駆細胞は人工骨内を通過した 261 ± 99.3 個に対し、 67.3 ± 37.1 個が付加された。

(2) 人工骨内での骨形成：移植後 4 週の検体における組織観察では、 β -TCP は残存し、細胞付加群では人工骨内に骨形成が確認されたが、細胞なし群では骨形成は全くみられなかった。（図 1）

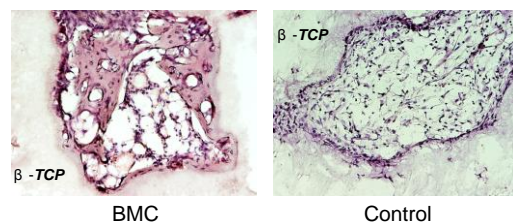


図 1 人工骨内の組織像. BMC: 細胞付加群. Control: 細胞なし群.

(3) 人工骨内におけるレシピエント由来細胞の同定：細胞付加群および細胞なし群の両群において、人工骨内にレシピエント由来 GFP 細胞を確認した。人工骨内におけるアルカリフォスファターゼ活性を示す領域は、細胞付加群で平均 6.5%、細胞なし群で平均 0.2% であり、細胞付加群で有意に高かった。細胞付加群におけるアルカリフォスファターゼ活性は人工骨の底面側に観察される傾向があった。（図 2）

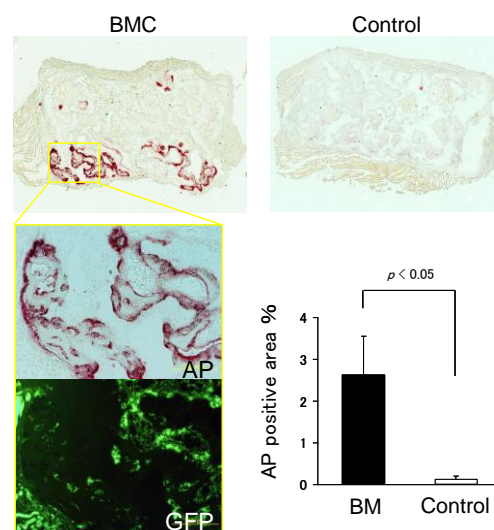


図 2 人工骨内の GFP 陽性細胞およびアルカリフォスファターゼ活性. BMC: 細胞付加群.

Control: 細胞なし群. 上段は人工骨縦断面を示す.

(4) レシピエント由来骨前駆細胞の同定: 細胞付加群の骨形成部において、骨組織内にレシピエント由来 GFP 陽性骨細胞が観察された。(図 3)

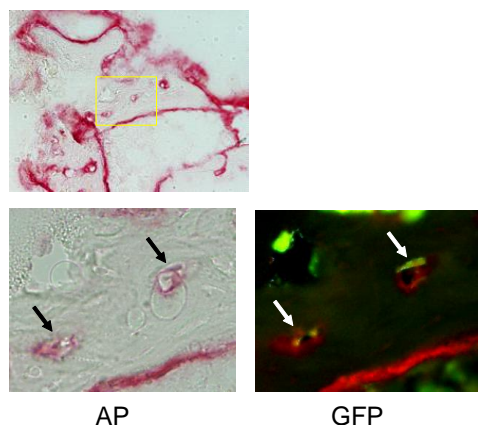


図 3 新生骨形成と GFP 陽性骨細胞

(5) parabiosis マウスへの移植人工骨内における末梢循環由来 GFP 陽性細胞の同定と SDF-1 の発現: 細胞付加群および細胞なし群の両群において、parabiosis マウスへの移植人工骨内にレシピエント由来 GFP 細胞を確認した。また、ホーミング因子であるケモカイン SDF-1 の発現は細胞付加群において観察された。(図 4)

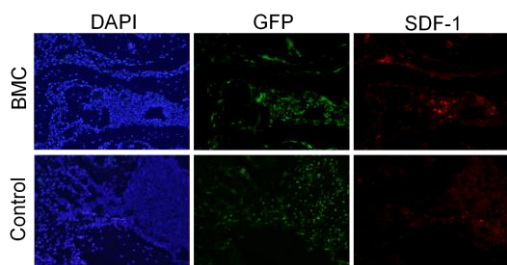


図 4 人工骨内の GFP 陽性細胞および SDF-1 の発現. BMC: 細胞付加群. Control: 細胞なし群.

(6) まとめ: 以上の結果より、人工骨内の骨形成にレシピエント由来の骨前駆細胞が関与することが示唆された。これらの細胞は隣接する局所の組織由来または末梢循環由来の可能性が考えられる。

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)

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① 熊谷研, 齋藤知行. 最新学際情報 骨折治療における circulating osteogenic cell の関与. 関節外科. 2010; 29(6): 749-751.
- ② Muschler GF, Raut VP, Patterson TE, Wenke JC, Hollinger JO. The design and use of animal models for translational research in bone tissue engineering and regenerative medicine. Tissue Eng Part B Rev. 2010;16(1):123-45.
- ③ Bito H, Takeuchi R, Kumagai K, Aratake M, Saito I, Hayashi R, Sasaki Y, Saito T. Opening wedge high tibial osteotomy affects both the lateral patellar tilt and patellar height. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc. 2010;18(7): 955-60.

[学会発表] (計 5 件)

- ① Kumagai K, Takeuchi R, Ishikawa H, Yamaguchi Y, Fujisawa T, Kuniya T, Takagawa S, Saito T. Bone formation and homing of circulating connective tissue progenitors at fracture site were enhanced by low-intensity pulsed ultrasound. 7th Combined Meeting of the Orthopaedic Research Societies, Kyoto, October 16-20, 2010
- ② Kumagai K, Takeuchi R, Ishikawa H, Saito I, Yamaguchi Y, Chiba N, Takagawa S, Saito T. Recruitment of recipient derived osteogenic connective tissue progenitors to β -tricalcium phosphate scaffold combined with bone marrow cells. 56th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society, New Orleans, March 6-9, 2010
- ③ 熊谷研, 竹内良平, 荒武正人, 齋藤泉, 尾藤晴彦, 林陸, 佐々木洋平, 齋藤知行. 骨膜除去骨折モデルへの低出力超音波刺激による骨形成促進と末梢血由来骨前駆細胞の関与. 第 24 回日本整形外科学会基礎学術集会, 横浜, 2009 年 11 月 5-6 日.
- ④ Kumagai K, Takeuchi R, Ishikawa H, Saito I, Yamaguchi Y, Chiba N, Takagawa S, Saito T. Effects of Low-Intensity Pulsed Ultrasound on Intramedullary Bone Formation and Homing of Circulating Connective Tissue Progenitors in Fracture with Periosteal Stripping. 31st Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, Denver, CO, September 11-15, 2009
- ⑤ Kumagai K, Takeuchi R, Aratake M,

Saito I, Bito H, Sasaki Y, Saito T.
Low-intensity pulsed ultrasound
stimulates iIntramedullary bone
formation and homing of circulating
connective tissue progenitors at
fracture site with periosteal
stripping in mice. 55th Annual Meeting
of the Orthopaedic Research Society,
Las Vegas, NV, February 22-26, 2009

[図書] (計1件)

- ① 熊谷研, 齋藤知行: 内側型変形性膝関節症に対する高位脛骨骨切り術-内側楔状開大型骨切り術-. OS Now Instruction 16 膝・足関節および足趾の骨切り術, メジカルビュー社, 41-50, 2010

6. 研究組織

(1) 研究代表者

熊谷 研 (KUMAGAI KEN)
横浜市立大学・医学部・助教
研究者番号: 10468176

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

(4) 研究協力者

George F Muschler
Cleveland Clinic, Orthopaedic Research
Center, Director (USA)