

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011 ~ 2012

課題番号：23659915

研究課題名（和文）

骨延長モデルを用いた幹細胞集積因子の機能解析

研究課題名（英文）

Analysis of molecular forces for stem/progenitor cell homing in bone regeneration

研究代表者

山本 朗仁（AKIHITO YAMAMOTO）

名古屋大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：50244083

研究成果の概要（和文）：骨延長において SDF-1 は幹細胞／前駆細胞の集積に働き、新生血管網の再構成に不可欠な役割を果たす。マウス骨延長では幹細胞／前駆細胞が延長部に集積することを見いだした。骨延長での骨再生過程において、SDF-1 を機能抑制すると骨延長部での血流が低下し、膜性骨化様式から軟骨内骨化様式へと変化した。一方、SDF-1 過剰発現実験での実験結果から、細胞集積システムを応用することによって組織再生を促進する、新しい医療デバイス提供の可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：In distraction osteogenesis, SDF-1 plays an essential role in the reconstruction of the neovascular network. Blood flow in the distraction gap is reduced by SDF-1 suppression. Then, it was changed to endochondral ossification style from membranous ossification style. On the other hand, experimental results on SDF-1 over-expression experiments, possibilities to promote tissue regeneration by applying the migration cell system, a new medical device provided was suggested.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：再生医学

科研費の分科・細目：歯学、歯科医用工学・再生歯学

キーワード：SDF-1, 幹細胞、骨延長

1. 研究開始当初の背景

これまでの細胞移植治療の問題点として、細胞採取時の侵襲、培養にかかる時間と、経費、細胞品質のメンテナンスなどがあげられる。一般的にヒトの自己再生能力は極めて限られていると考えられている。しかしながら、整形外科、口腔外科領域では、骨折部位に一定の張力をかけ続けることによって「骨、神経、血管、筋組織 などを含む大型組織新生・再生を促す骨延長術」が臨床的に用いられている。ヒトも環境さえ整えば、十分な

自己組織再生能力を発揮するのである。骨延長では、骨髄や骨膜に散在する間葉系幹細胞（MSC）・血管内皮前駆細胞（EPC）・造血幹細胞（HSC）の集積が重要な役割を果たすと考えられるが、幹細胞集積の実体やその分子機構は多くが不明のままである。

骨延長は3つのステージに分けられ、各ステージで幹細胞、前駆細胞など組織再生に関与する細胞群の集積が重要とされている。

待機期間（Latency; LA）：骨切り部に炎症が生じ、さらに、MSCの集積が起こる。骨膜

細胞による、軟骨内骨化が起こる。

延長期間 (Active Distraction; AD) : EPC, 骨芽細胞の集積が起こり、骨延長部では膜性骨化が起こる。

骨硬化期間 (Consolidation; CO) : 破骨細胞によるリモデリングがおこる。

もし、生体に内在する幹細胞をターゲットとする部位に効率よく集めることができれば、先ほどの問題点を克服した新しい再生治療が提供できるのではないかと考えた。

そのため、幹細胞の集積システムの理解が必要となる。

骨延長において、SDF1 は EPC の集積に不可欠であるが、HSC や MSC の集積には不必要であった。SDF1 に着目した理由は「全ての幹細胞 (HSC, EPC, MSC) の集積に機能する」ことが報告されていたためである。研究結果に相違が生じた理由は、(1)過去の報告が *in vitro* の解析のみであったため、*in vivo* における細胞集積効果を検証していなかった、(2)実験モデルの違いなどが想定される。いずれにせよ、申請者は SDF-1 以外のケモカインの中に MSC の集積に不可欠な分子がある可能性も考えている。ケモカインファミリーは 20 種類のレセプターと 50 種類のリガンドで構成される。

2. 研究の目的

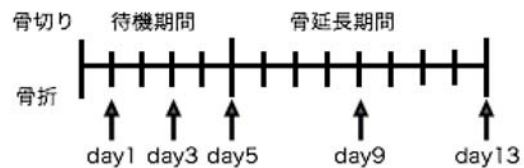
本申請研究では、下記2項目に焦点を絞って解析を進め、骨延長モデルにおいてMSCの集積に不可欠なケモカインの同定を試みる。

(1) マウス骨延長モデルにおけるMSC集積に機能するケモカインの同定と発現解析を行う。

(2) 細胞集積因子の機能抑制や過剰発現による細胞動態・組織再生効率の変化を検証する。

3. 研究の方法

8週齢の雌性ICRマウスを実験動物とし、片側性の骨延長モデルを作製した。骨延長の速度は 0.2mm/12時間とする。サンプル採取のスケジュールは図に示す。



詳細は、ペントバルビタール 40mg/kg をマウス腹腔内に投与し、右下肢を剃毛、消毒後、正中に約 15 mm の切開を加えた。そして、腓骨を明示し周囲組織の損傷を最小限にして、腓骨のみを骨折させた。次に、脛骨近位端に 25G 針を、遠位端に 27G 針をそれぞれ 2 本ずつ貫通させ、即時重合レジン (ユニファスト II、GC 社) にて延長装置と固定した。延長装置はエキスパンジョンスクリュー (オーソデントラム社) と、即時重合レジンで作成した外径 20 mm、内径 10 mm、厚さ 5 mm の固定装置を連結させたものを使用した。レジン硬化後、脛骨骨幹中央部を横骨折させ、4-0 ナイロンにて皮膚を縫合し閉創した。



Control-distraction osteogenesis model (C-D0) : 手術後3日間の待機期間 (Latency; LA) の後、術後3日目から11日目まで0.2mm/12h (0.4mm/day) で延長し (Active Distraction; AD)、8日間で脛骨を32mm延長させた。4日間の骨硬化期間 (Consolidation; CO) の後、手術後15日目に屠殺し、4%パラホルムアルデヒドにて灌流し固定した。そして、脛骨と周囲組織を含め採取し、凍結非脱灰標本を作製した。凍結マイクロトームにて5μmの薄切切片を作成し、H-E染色を行った。

(1) マウス骨延長モデルにおける MSC 集積に機能するケモカインの同定と発現解析。

他のケモカインファミリーの発現を検索した。3つの時期(延長前の待機期間終了時 day5、延長中期 day9、延長完了後 day13)から RNA を抽出。定量的リアルタイム RCR にてレセプター の発現変化を解析した。遺伝子発現上昇を確認したケモカインレセプターに対するリガンド の発現変化を同様に解析した。

(2) 先で得られた結果より、細胞集積因子の機能抑制や過剰発現による細胞動態・組織再生効率の変化を検証。

解析候補の機能抑制化合物や中和抗体による分子機能抑制実験。さらには集積因子蛋白を直接延長部に注入し治療効果を判定した。

Hematoxin-Eosin染色、アリザリンレッドS染色、アルシアンブルー染色、骨髄幹細胞マーカーによる組織学的解析

集積細胞の変化や骨延長期間の変化を組織学的に評価するために MSCs、骨芽細胞、血管内皮前駆細胞の細胞表面抗原に対する抗体を用いて免疫染色を行った。さらに、組織学的に骨組織の再生を観察した。

骨髄移植と細胞移動の計測

シンプルな免疫組織化学的に得られた結果を、in vivo imaging にて検証した。同系マウスの骨髄単核球分画を、採取直後に遠赤外領域色素 XenoLight DiR (励起波長/蛍光波長：748/780nm) にて標識し、培養せずに骨端部より注入。live 細胞移動を IVIS200 in vivo imager による DiR 検出によって計測、解析した。

細胞集積因子の過剰発現による骨延長促進実験

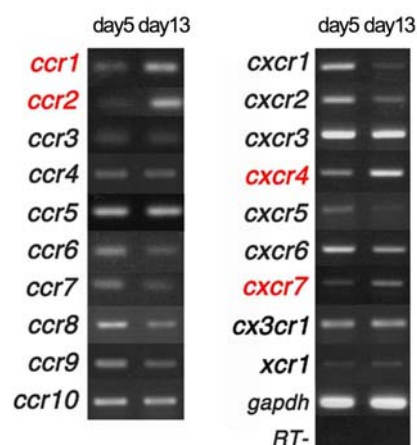
マウス大腿骨を骨切り後、独自に開発した創外固定装置を用いて固定して、5日間の待機期間を経た後、延長操作を開始した。通常、仮

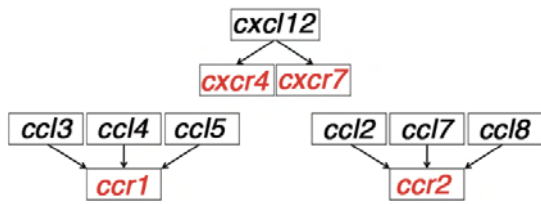
骨が形成されないハイスピードで延長を行った。過去の実験経験によるとハイスピード延長では、仮骨形成は完全に抑制され、大量の軟骨が形成されることがわかっている。ハイスピード延長期間に集積因子をコラーゲンタイプIと混和して延長部に2日間隔で投与する。組織学的解析を行い、骨再生の効果について比較検討を行った。

Hi speed-distraction osteogenesis model (H-D0)：骨の延長速度を2倍にした。手術後5日間の待機期間の後、術後5日目から9日目まで0.4mm/12h(0.8mm/day)で延長し、4日間で脛骨を32mm延長させる。4日間の治癒期間の後、手術後13日目に屠殺し、組織を採取、凍結非脱灰標本を作製、薄切切片を作成し、染色を行った。

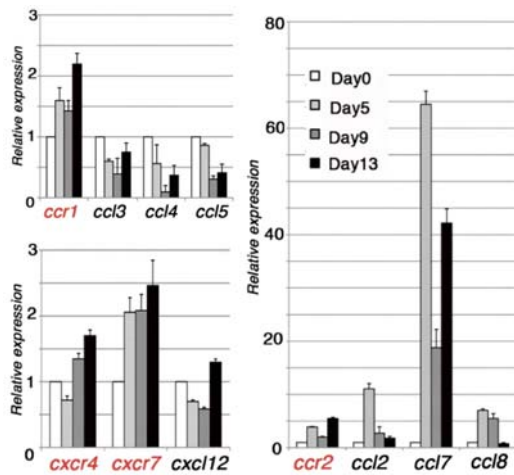
4. 研究成果

骨延長操作の前後で、骨延長部の組織を採取し、ケモカインレセプターの mRNA についての遺伝子発現を解析した。発現が上昇したレセプター/リガンドのグループを、これまでの報告をもとに3つに分け、定量的リアルタイム RCR にて定量化、CXCR12(SDF-1)の機能の検証をした。

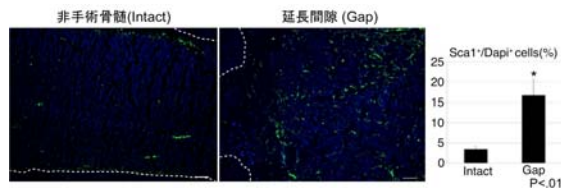




骨延長部において、CXCR4/7-SDF-1 と CCR2-
 CCL2/7/8 が集積因子として機能しているこ
 とが示唆された。



骨延長部に集積する細胞を、幹細胞共通抗
 原(Sca-1)で観察したところ、骨延長部では
 非手術の骨髄に比べ幹細胞が約4倍増加し
 ていた。



幹細胞の分画を調べるため、血管内皮細胞
 のマーカー(CD31)、血球系のマーカー
 (CD45)を用いて、以下のように区別した。

HSC: Sca1+, CD45+

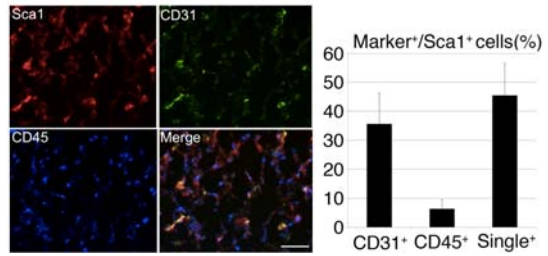
EPC: Sca1+, CD31+

MSC: Sca1+, CD45-, CD31-

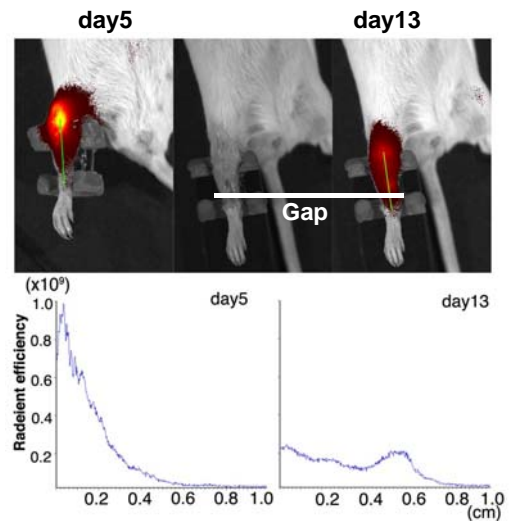
骨延長部の幹細胞の分画はEPC、MSCが多い
 ことが示された。

Gapに集積した骨髄幹細胞の種類

EPCs CD31+/Sca1+
 HSCs CD45+/Sca1+
 MSCs CD31-/CD45-/Sca1+

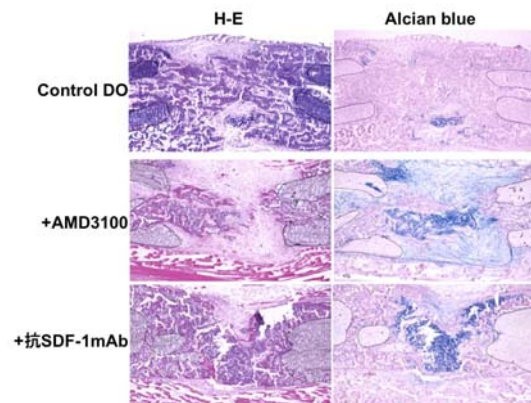


in vivo imagingにて骨延長前後で骨髄細胞
 の移動を観察したところ、延長操作により
 骨延長部へ細胞が移動することが明らかと
 なった。



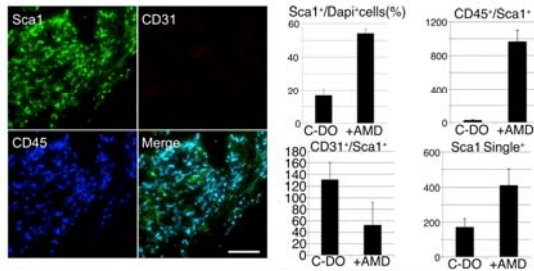
SDF-1/CXCR4-axisの骨延長での機能を解
 析するため、SDF-1の機能抑制を行った。
 SDF-1の機能抑制は骨延長部位における仮骨
 形成を抑制し、骨延長の治癒過程にはほとん
 ど観察されない軟骨組織の形成を促進した。

SDF-1機能抑制による仮骨形成阻害



CXCR4 のアンタゴニスト、AMD3100 投与群では、骨髄中の幹細胞が血中に動員されることが知られている。AMD3100 投与群では、MSC の分画細胞が増加し、EPC の分画の集積が抑制された。

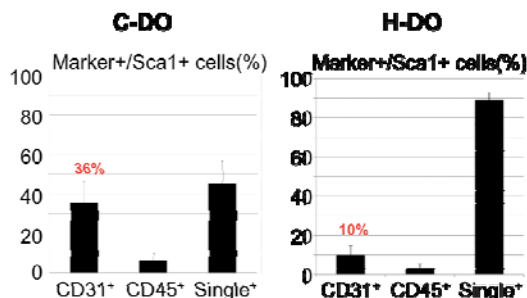
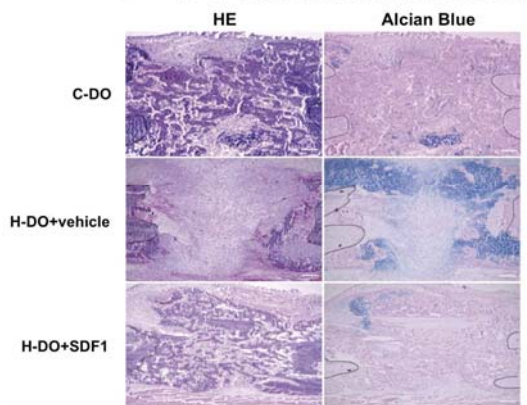
SDF1機能抑制による幹細胞集積への影響



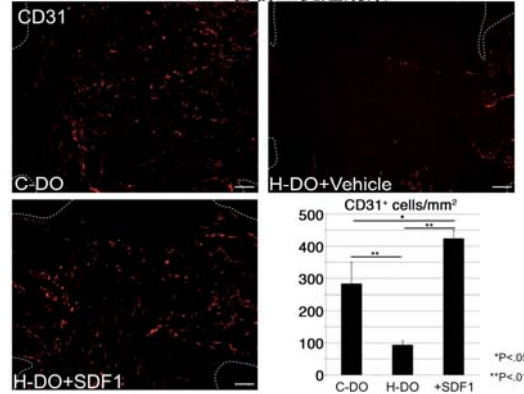
急速な延長操作は SDF-1 機能抑制と同様に仮骨の形成を抑制し軟骨の形成を促進した。急速な延長操作により延長間隙では EPC の割合が減少し、血管新生も抑制された。

そして、SDF-1 の局所投与は、EPC の集積を促進することにより血管新生を促進し、骨延長部に大量の仮骨を形成した。

SDF1による骨延長の治癒促進効果



SDF1の血管新生促進効果



骨延長部位において、SDF-1 は新生血管網の再構成に不可欠な役割を果たす。SDF-1 機能抑制により骨延長部での血流が低下し、膜性骨化様式から軟骨内骨化様式へと変化したものと考えられる。一方、SDF-1 過剰発現実験での実験結果から、細胞集積システムを応用することによって組織再生を促進する、新しい医療デバイス提供の可能性が示唆された。

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 9 件、すべて査読有り)

(1) M. Fujio, A. Yamamoto, Y. Ando, R. Shohara, K. Kinoshita, T. Kaneko, H. Hibi, and M. Ueda. “Stromal Cell-Derived Factor-1 Enhances Distraction Osteogenesis-Mediated Skeletal Tissue Regeneration Through the Recruitment of Endothelial Precursors” *Bone*, 49(4), 693-700, 2012. 査読有り doi: 10.1016/j.bone.2011.06.024.

(2) H. Hibi and M. Ueda, “Interfaces of titanium implants and a vascularized osteocutaneous scapular graft revised with distraction osteogenesis”, *Journal of Craniofacial Surgery*, Vol.23, No.5, (2012), pp.1549-1550. 査読有り doi: 10.1097/SCS.0b013e3182587db2.

〔学会発表〕(計 17 件)

(1) 安藤友二, 山本朗仁, 藤尾正人, 日比英晴, 上田 実; 培養上清による骨延長部の骨形成促進効果の検討; 第 33 回日本炎症・再生医学会, ポスター発表; P4-7; 福岡; 2012 年 7 月 5-6 日

(2) 安藤友二, 山本朗仁, 藤尾正人, 日比英晴, 上田 実; 培養上清による組織再生/骨延長部の骨形成促進効果の検討; 第 57 回(社)日本口腔外科学会総会・学術大会, ポスター発表; 1-P7.3-4; 横浜; 2012 年 10 月 19-21 日

(3) Yuji Ando, Akihito Yamamoto, Hideharu Hibi, Minoru Ueda; Conditioned media from mesenchymal stem cells enhanced distraction osteogenesis; 23rd 2012 International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science (From Micro & Nano Scale Systems to Robotics & Mechatronics Systems) (MHS2012 & Micro-Nano Global COE), Poster presentation; P1-23; Nagoya, Japan; November. 4-7 2012

(4) Yuji Ando, Akihito Yamamoto, Hideharu Hibi, Minoru Ueda; Conditioned media from mesenchymal stem cells enhanced distraction osteogenesis; International Symposium on Micro-Nano Systems for the Interaction of Young Researchers - MHS 2012 Satellite Session -, Poster presentation; P5; Nagoya, Japan; November. 8 2012

(5) Yuji Ando, Akihito Yamamoto, Hideharu Hibi, Minoru Ueda; Paracrine Factors of

Mesenchymal Stem Cells Recruit Stem / progenitor Cells and Enhance Distraction Osteogenesis; The 5th Symposium of Young Researchers -Biomimetic Materials and Actuators-, Oral presentation; B-4; Nagoya, Japan; January. 15 2013

〔図書〕(計 1 件)

再生医療叢書8 歯学系, 上田実/山本朗仁, 朝倉書店, 2012年

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本朗仁 (YAMAMOTO AKIHITO)

名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号: 50244083

(2) 研究分担者

日比英晴 (HIBI HIDEHARU)

名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号: 90345885

(3) 連携研究者なし