

## 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 5 月 31 日現在

機関番号：37104

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23792066

 研究課題名（和文） 骨髄間葉系幹細胞移植による異所性骨形成モデルを用いた  
骨形成関連細胞の系譜解析

 研究課題名（英文） Lineage analysis of cells involved in bone formation using the ectopic  
bone model in which prepared bone marrow stromal cells were transplanted in rats.

研究代表者

田上 隆一郎 (TANOUE RYUICHIRO)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：40597457

研究成果の概要（和文）：本研究ではリポーター分子として緑色蛍光タンパク（EGFP）を発現した骨髄由来細胞（骨髄間質細胞）を用いて、異所性骨をラットの背側皮下に作製し、同骨の構成細胞の動態を観察するとともに、それら細胞の起源について検証した。その結果、異所性骨を構成するドナー細胞とレシピエント細胞の数は、一定の割合を示すことが明らかとなった。また、レシピエント細胞の一部は線維芽細胞に由来していることを確認できた。

研究成果の概要（英文）：In our research, we employed bone marrow stromal cells that expressed Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP) as a reporter molecule to observe the formation and organization of subcutaneous ectopic bone tissues in rats' backs and to verify the origin of those cells. The results showed an even proportion of donor cells and recipient cells in the organization of ectopic bone tissues. It was also confirmed that some of the recipient cells were originated from fibroblasts.

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	2,000,000	600,000	2,600,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・形成外科学

キーワード：細胞培養・移植学・間葉系幹細胞・再生医学・形態

## 1. 研究開始当初の背景

骨欠損部位の回復や骨増量を目的とした治療法は自家骨移植や人工材料による補填が主流である。しかし、自家骨移植の供給源には限りがあり、治療を受ける患者側には疼痛や感染のリスク等の負担を伴う。近年、患者自身の体に分布する未分化間葉系幹細胞を用いた欠損部の回復や再生を図る治療が様々な領域で注目されている。その間葉系幹細胞は *in vitro* において骨芽細胞や軟骨細胞、脂肪細胞といった間葉細胞に分化するこ

とが知られており、同細胞を用いた臨床応用の報告もあるものの、細胞自体の関与については未だ明らかにされていない。また、骨芽細胞は骨組織周囲の間葉系細胞や筋組織、血管周囲細胞、さらに最近では末梢血に循環している骨髄由来の未分化細胞などから分化すると報告されているが、その由来も明確には証明されていない。

## 2. 研究の目的

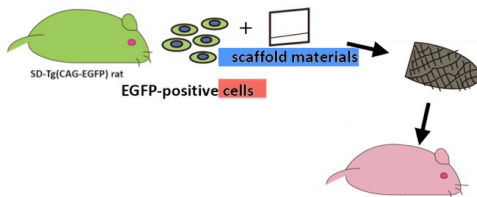
ラット異所性骨形成モデルを用いて、骨形成

に關与する細胞種を、GFP をリポーター分子として利用することで蛍光顕微鏡・共焦点レーザー顕微鏡下に組織化学的に同定し、形態形成や再生過程における骨周辺の細胞の動態および細胞間相互作用を解明することを目的とした。それら細胞の分布状態と動態の解明をきっかけに *in vivo* での細胞間の分化誘導やその活性制御などのコントロールが可能となれば、供給源に限りのある骨髄移植や人工材料に代わる新しい骨再生療法となることが期待される。

### 3. 研究の方法

(1) 恒常的に緑色蛍光を発現するグリーンラットの骨髄より採取した間葉系幹細胞を含む間質細胞を培養後、コラーゲン製剤に播種した。これをシリンダー状に加工したチタンメッシュケージに填入後、別のラットの背側皮下に移植し、異所性骨形成モデルを作製した(図1)。

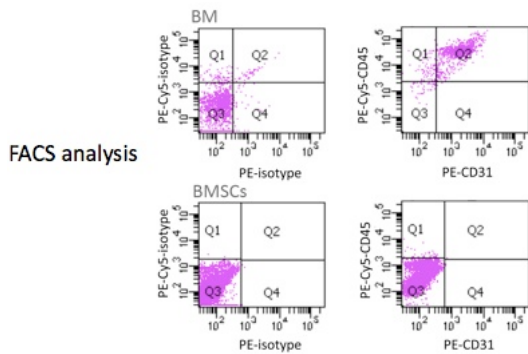
皮下異所性骨形成モデル



(図1 皮下異所性骨形成モデル)

皮下組織に異所性骨を作製することは、既存骨からの影響を排除できるという点から、骨形成における研究の中でも位置づけは高い。

用いた間質細胞の purity についてはフローサイトメトリーにて造血系由来と血管内皮由来の double positive 細胞が骨髄と比べて排除できていることを確認している(図2)。

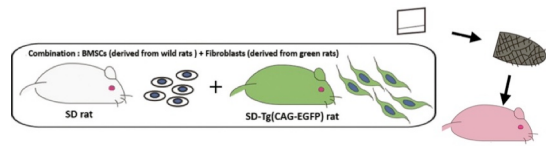


(図2 骨髄間質細胞のフローサイトメトリー) (Tanoue, R., et al. 2012 より引用)

さらに同間質細胞に骨芽細胞への分化誘導処理を行った結果、ALP 陽性を示したことから、間葉系幹細胞を含んでいることを証明している。

移植後形成される骨の構成細胞の動態を蛍光顕微鏡・共焦点レーザー顕微鏡下に観察した。

(2) 異所性骨の起源について、移植予定部位の線維芽細胞を採取し、緑色蛍光を示す線維芽細胞と野生型ラット由来の骨髄間質細胞を共移植し、形成される骨組織に緑色線維芽細胞由来の骨細胞が存在するか検証した(図3)。



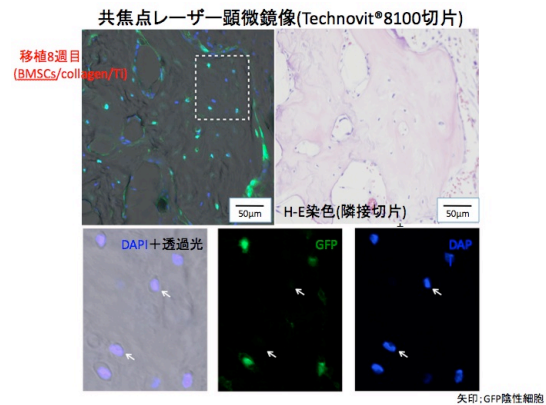
(図3 EGFP 線維芽細胞および骨髄間質細胞共移植モデル) (Tanoue, R., et al. 2013 より引用)

用いた線維芽細胞は移植予定部位の皮下組織から採取した。骨髄間質細胞同様、フローサイトメトリーにて造血系由来と血管内皮由来の double positive 細胞が骨髄と比べて排除できていることを確認している。

また、エックス線  $\mu$ CT を用いて骨密度、透過型電子顕微鏡および FIB/SEM を用いて異所性骨の骨細胞間ネットワークを観察した。

### 4. 研究成果

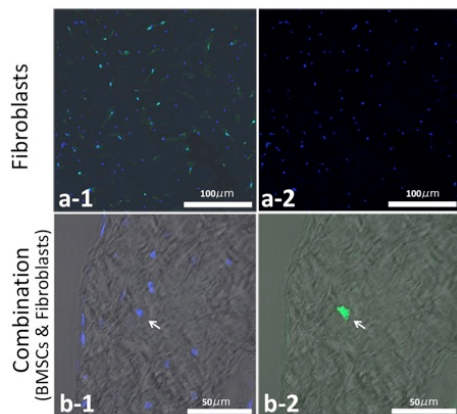
(1) 異所性骨は GFP 陽性 (ドナー由来) の細胞と GFP 陰性 (レシピエント由来) の細胞で構成されていた。その割合はドナー由来細胞が約 8 割に対し、レシピエント由来細胞は約 2 割であった (図4)。



(図4 共焦点顕微鏡像; 形成骨には GFP 陽性の骨細胞に加え、GFP 陰性の骨細胞も観察で

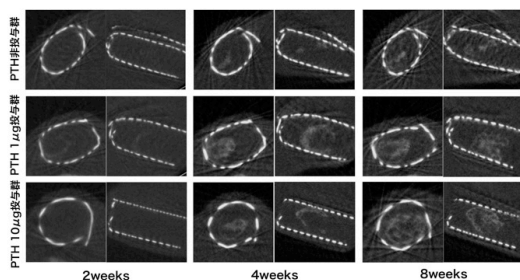
きた。) (Tanoue, R., et al. 2012 より引用)

(2) EGFP 線維芽細胞および骨髄間質細胞共移植モデルにおける形成骨の中には少量の GFP 陽性骨細胞が観察された。これは線維芽細胞が骨細胞に分化したことを示す。異所性骨を形成するレシピエント細胞の一部はレシピエント動物の間葉系細胞(線維芽細胞)に由来するというを蛍光的に証明できた(図5)。

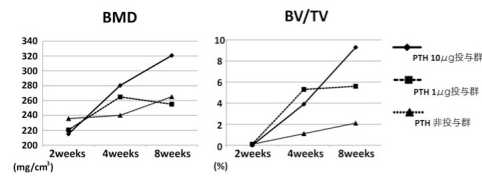


(図5 共焦点顕微鏡像; GFP 陽性の骨細胞が観察された。) (Tanoue, R., et al. 2013 より引用)

骨組織は間葉系由来の細胞によって構成されるという過去の報告を蛍光プローブを用いて直接的に証明できたことは意義深い。また、エックス線  $\mu$ CT を用いて骨密度、透過型電子顕微鏡および FIB/SEM を用いて骨細胞間のネットワークを観察したところ、同異所性骨が正常骨同様の組織であることも証明できた。その上で、同骨組織に PTH を加えると造骨を期待できる結果に至った(図6、7)。



(図6 エックス線  $\mu$ CT 像; PTH の投与量に比例して、不透過像の範囲は増加した。) (田上隆一郎、他. 2013 より引用)



(図7 骨密度および骨体積の比較; 一定量以上の PTH 投与で骨密度および骨体積は上昇した。) (田上隆一郎、他. 2013 より引用)

これらの論文報告は移植を含めた骨再生医療においても重要な知見になり得ると考えられる。

## 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) 田上隆一郎、平嶋伸悟、金澤知之進、吉富宗健、太田啓介、中村桂一郎、楠川仁悟、副甲状腺ホルモンの間歇的投与がラット皮下異所性骨モデルに与える影響、久留米医学会雑誌、査読有、76、2013、pp34-41.

(2) Tanoue R, Ohta K, Ogasawara S, Yano H, Kusukawa J, Nakamura K. Bone marrow stromal cells can cause subcutaneous fibroblasts to differentiate into osteocytes in a physically stable spatial microenvironment in rats. Acta Histochemica, 査読有, 115, 2013, pp512-518. DOI:pil:S0065-1281(12)00171-7. 10.1016/j.acthis.2012.11.007.

(3) Tanoue R, Ohta K, Kusukawa J, Nakamura K. The effect of the microenvironment created by a titanium mesh cage on subcutaneous experimental bone formation and inhibition of absorption. Cells Tissues Organs, 査読有, 196, 2012, pp 221-230. DOI:10.1159/000334409.

[学会発表] (計3件)

- (1) 田上隆一郎、太田啓介、蔵田耕作、都合重記暢、東龍平、金澤知之進、中村桂一郎、FIB/SEM トモグラフィーを用いた脱灰骨および未脱灰骨の微細構造の比較、第 68 回日本顕微鏡学会・学術講演会、2012 年 5 月 15 日(筑波).
- (2) 田上隆一郎、太田啓介、都合重記暢、東龍平、楠川仁悟、中村桂一郎、ラット皮下異所性新生骨の FIB/SEM トモグラフィーによる微細構造解析、第 117 回日本解剖学会・全国学術集会、2012 年 3 月 26 日(山梨).
- (3) R. Tanoue, K. Ohta, S. Ogasawara, H. Yano, J. Kusukawa, K. Nakamura. Lineage analysis of cells involving in bone formation using the subcutaneous ectopic bone formation model. 10th Asia-Pacific Microscopy Conference. February 8 2012 (Perth, Western Australia).

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.kurume-u.ac.jp/med/anat2/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

田上 隆一郎 (TANOUE RYUICHIRO)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：40597457