

氏名	平田 泰久
学位	博士
専門分野の名称	歯学
学位授与番号	博甲第4531号
学位授与の日付	平成24年3月23日
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科機能再生・再建科学専攻 (学位規則(文部省令)第4条第1項該当)
学位論文題目	GFP 骨髄移植マウスの骨治癒過程における骨髄由来細胞の役割について
学位論文審査委員	教授 山城 隆      教授 長塚 仁 教授 山本 敏男

## 学位論文内容の要旨

### 【目的】

骨治癒過程では、多様な細胞が複雑に関与すると考えられている。骨治癒過程は一般的に炎症期、修復期、リモデリング期の3期に分けられ、組織の損傷に伴う炎症性細胞の浸潤、未分化間葉系幹細胞および血流を介した幹細胞の動員、細胞の増殖ならびに分化による組織の修復により治癒が完了する。これら骨治癒過程に関わる細胞の由来については、明らかではない。

一方、再生医療研究の発展に伴い骨髄由来細胞の多分化能が明らかとなり、様々な組織の修復や維持への関与が報告されている。しかし、骨治癒過程における骨髄由来細胞の関与について詳細は不明である。

そこで本研究ではGFP トランスジェニックマウス骨髄細胞移植マウスを用いて骨欠損モデルを作製し、治癒過程における骨髄由来細胞の関与について検討した。

### 【材料および方法】

実験には8週齢雌性C57BL/6野生型マウス34匹および同系8週齢GFPトランスジェニックマウス(GFPマウス)16匹を用いた。野生型マウスに10Gyの放射線照射後、GFPマウス大腿骨と脛骨から採取した骨髄細胞を尾静脈から1個体当たり $1 \times 10^7$  cells移植した。骨髄細胞移植1ヶ月後に移植細胞の生着を確認し、骨欠損モデルとして脛骨近位骨端から約5mm遠位の骨幹中央部にラウンドバーにて生理食塩水注水下に直径1mmの骨欠損を作製した。

骨欠損作製後、3、7、14、28日目に脛骨を摘出し、エックス線写真撮影を行って骨欠損部の硬組織形成状態を観察した。摘出した全ての試料は4%パラホルムアルデヒド固定液で12時間浸漬固定し、10%EDTA溶液にて2週間脱灰した。脱灰後、常法に従ってパラフィン包埋、厚さ5 $\mu$ mの連続切片を作製し、HE染色、TRAP染色およびGFP、F4/80、CD34、Osteocalcin (OC)に対する免疫組織化学的染色を施した。対照部位として脛骨骨端軟骨板を同様の方法で染色し、組織学的に観察した。

## 【結果】

対照組織である骨端部の骨髄では血球系細胞がドナー由来骨髄細胞に置換されており、骨髄移植による造血系再構築が起こったことが確認された。骨端軟骨板では肥大軟骨細胞層直下の多核巨細胞や単核の破軟骨細胞、骨化帯に存在する破骨細胞が GFP 陽性を示したが、増殖軟骨細胞、肥大軟骨細胞は GFP 陰性を示した。また骨周囲に配列する骨芽細胞や血管内皮細胞、脂肪細胞と考えられる細胞は GFP 陰性を示した。

エックス線写真において、骨欠損作製後の骨形成過程を観察したところ、3 日目では骨欠損部の周囲および窩底部から不透過性が亢進し、7、14 日目では徐々に骨欠損範囲が小さく浅くなり、28 日目には皮質骨の連続性が回復していた。

骨欠損部の組織学的観察において、骨欠損作製後 3 日目では、骨欠損部炎症巣において好中球を主体とした炎症性細胞と F4/80 陽性の類円形、樹枝状のマクロファージに GFP 陽性が認められた。7 日目では、骨欠損部に肉芽組織の増生が認められ、肉芽組織中の CD34 陽性血管内皮細胞の一部に GFP 陽性が認められた。14 日目では、骨欠損内の大部分が骨組織に置換されており、新生骨周囲で OC 陽性、GFP 陰性の骨芽細胞が認められた。骨組織中の血管内皮細胞は GFP 陰性を示したが、血管周囲には多数の GFP 陽性細胞が認められた。28 日目では、欠損部の新生骨組織の吸収により骨髓腔が形成され、残存した骨組織周囲に TRAP 染色陽性 GFP 陽性の破骨細胞を認めた。

## 【考察】

骨髄移植後の骨端軟骨板では、血球系細胞や破骨細胞は GFP 陽性であったことから、移植した骨髄由来であることが示され、本モデルは骨髄由来細胞を組織学的に明らかにする上で有用なモデルであることが確認された。本研究の骨欠損モデルでは、一般的な骨折治癒と同様に炎症期、修復期、リモデリング期の段階を経て治癒していたことが組織学的に確認された。また本モデルは、各観察期間における組織像に個体差が少なく、再現性が高いモデルと考えられた。

炎症期である骨欠損作製後 3 日目、7 日目に骨髄由来である GFP 陽性マクロファージが出現し、7 日目では血管内皮細胞の一部に GFP 陽性所見が認められた。このことから、創傷治癒初期のような修復反応が活発で特殊な環境下においては骨髄由来細胞が動員され、一部の血管内皮細胞に分化する可能性が示唆された。修復期～リモデリング期に出現した OC 陽性の骨芽細胞は GFP 陰性であることから、骨髄細胞由来ではなく、血管周囲に存在するとされるレシピエント由来の間葉系幹細胞が分化したものである可能性が考えられた。骨治癒組織に出現する破骨細胞は GFP 陽性を示しており、造血幹細胞を由来とする前駆細胞が破骨細胞に分化したと考えられた。

本研究における骨治癒過程では、骨髄由来細胞は炎症性細胞、肉芽組織中のマクロファージ、血管内皮細胞の一部、血管周囲の細胞および骨吸収に関わる破骨細胞等、多様な細胞に分化していたが、軟骨細胞、骨芽細胞や骨細胞への明らかな分化は確認できなかった。以上のことから、骨髄由来細胞は、骨治癒過程の早期より出現して創傷治癒を促進し、血管形成制御や骨組織のリモデリング等に関わって、新生骨形成のための微小環境形成に重要な役割を担っていることが示唆された。

## 学位論文審査結果の要旨

骨折治癒過程は、組織の損傷に伴う炎症、未分化間葉系幹細胞および血流を介した幹細胞の動員、細胞の増殖ならびに分化による組織の修復等、多様な細胞が複雑に関与すると考えられている。近年、骨髄由来幹細胞の多分化能が明らかとなり、様々な組織の修復や維持への関与が報告されている。しかし、骨治癒過程における骨髄由来幹細胞の関与についての詳細は不明である。

本論文は GFP トランスジェニックマウス骨髄移植マウスを用いて骨欠損モデルを作製し、骨治癒過程における骨髄由来細胞の関与について検討したものである。

本研究は、岡山大学動物実験委員会の審査、承認を受けて行った。8 週齢雌性 C57BL/6 野生型マウスに 10Gy の放射線照射後、同系 GFP トランスジェニックマウスから採取した骨髄細胞を尾静脈から移植した。骨髄細胞移植 1 ヶ月後に骨欠損モデルとして脛骨に直径 1mm の骨欠損を形成し、3、7、14、28 日後に摘出した。全ての試料は常法にてパラフィン切片を作製し、HE 染色、TRAP 染色および GFP、F4/80、CD34、Osteocalcin (OC) に対する免疫組織化学的染色を施し、組織学的に観察した。

対照組織である骨端部の骨髄では血球系細胞がドナー由来骨髄細胞に置換されていた。骨端軟骨板周囲の多核巨細胞や単核の破骨細胞、破骨細胞は GFP 陽性を示したが、増殖軟骨細胞、肥大軟骨細胞、骨芽細胞、血管内皮細胞や脂肪細胞と考えられる細胞は GFP 陰性を示した。

骨欠損モデルは骨折治癒過程と同様に、炎症期、修復期、リモデリング期の段階を経て治癒していた。骨欠損作製後 3 日目では、創傷部において好中球を主体とした炎症性細胞と F4/80 陽性の類円形、樹枝状のマクロファージに GFP 陽性が認められた。7 日目では、肉芽組織の増生が認められ、肉芽組織中では CD34 陽性血管内皮細胞の一部に GFP 陽性が認められた。14 日目では、骨欠損内の大部分が骨組織に置換されており、新生骨周囲で OC 陽性、GFP 陰性の骨芽細胞が認められ、血管内皮細胞は GFP 陰性を示した。28 日目では、創傷部の骨組織の多くが吸収しており、残存した骨組織周囲に TRAP 染色陽性、GFP 陽性の破骨細胞を認めた。

以上の結果より、本研究における骨治癒過程において、骨髄由来細胞は炎症性細胞、肉芽組織中のマクロファージ、血管内皮細胞の一部、血管周囲の細胞および骨吸収に関わる破骨細胞等、多様な細胞に分化していたが、軟骨細胞、骨芽細胞や骨細胞への明らかな分化は確認できなかった。骨髄由来細胞は、骨治癒過程の早期より出現して創傷治癒を促進し、血管形成制御、骨組織のリモデリング等に関わって、新生骨形成のための微小環境形成に重要な役割を担っていることが示唆された。

これらの知見は、骨欠損の治癒過程における骨髄由来細胞の役割を明らかにしたものであり、骨組織の治癒機転解明の一端を担う基礎研究として価値のある研究業績である。

よって、審査委員会は本論文に博士（歯学）の学位論文としての価値を認める。