

筑波大学

博士（医学）学位論文

家兎骨壊死モデルへ移植した
自家骨髄間葉系幹細胞の長期追跡

2013

筑波大学大学院博士課程人間総合科学研究科

菅谷 久

目次

第1章 本研究の背景	5
1.1. 骨壊死とは	5
1.2. 臨床的背景	6
1.3. 骨壊死に対する従来の治療法とその課題	6
1.3.1. 保存的治療	
1.3.2. 骨穿孔術	
1.3.3. 骨切り術	
1.3.4. 人工関節置換術	
1.3.5. 自家骨移植術	
1.3.6. 自家骨髄血移植術	
1.4. 自家骨髄血移植後の骨新生に関する見解	9
1.5. 骨髄血に含有される細胞群とその作用	9
1.6. 骨髄間葉系幹細胞	10
1.7. 骨髄間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化	11
1.8. 間葉系幹細胞追跡に対する従来の細胞標識法	12
1.8.1. 蛍光色素	
1.8.2. 緑色蛍光蛋白質	
1.8.3. 鉄粒子	
1.8.4. 量子ドット	
1.9. 共同研究者による先行研究	13
1.9.1. モータリンと量子ドットを用いた細胞標識	
1.9.2. 家兎骨髄細胞への量子ドット導入と <i>in vivo</i> での追跡	

1.9.3. 家兎第4足根骨を用いた骨壊死モデルの作製

第2章 本研究の目的	16
第3章 対象と方法	17
3.1. 実験系の設定	17
3.2. 骨髄からの細胞採取	17
3.3. 骨髄間葉系幹細胞の選定と評価	18
3.4. 骨髄間葉系幹細胞への量子ドット導入	19
3.5. 自家骨髄間葉系細胞移植後の細胞追跡	20
3.5.1. 量子ドット導入	
3.5.2. 骨壊死モデルの作製	
3.5.3. 自家骨髄間葉系幹細胞移植	
3.6. 移植後組織の肉眼的評価	22
3.7. 移植後組織における量子ドットの局在	22
3.8. 移植後組織におけるアルカリフォスファターゼ陽性細胞の局在	23
3.9. 移植後組織における新生骨による石灰化の局在	23
3.10. 移植後組織の電子顕微鏡による評価	23
第4章 結果	24
4.1. 接着培養で増殖した骨髄間葉系幹細胞	24
4.2. 骨髄間葉系幹細胞の細胞表面抗原マーカー評価	24
4.3. 骨髄間葉系幹細胞への量子ドット導入	24
4.4. 量子ドット導入率の評価	25

4. 5.	骨壊死モデルの 24 週経過における組織評価	25
4. 6.	移植後組織の肉眼的評価	25
4. 7.	移植細胞の局在と骨新生	25
4. 7. 1.	移植後 4 週組織	
4. 7. 2.	移植後 8 週組織	
4. 7. 3.	移植後 12 週組織	
4. 7. 4.	移植後 24 週組織	
4. 8.	移植後組織の電子顕微鏡による評価	27
第 5 章	考察	28
5. 1.	採取した家兎骨髄間葉系幹細胞の特性	28
5. 2.	家兎骨髄間葉系幹細胞の特性に関する検証	29
5. 3.	採用した骨壊死モデルについて	30
5. 4.	移植後組織の肉眼的評価	31
5. 5.	凍結標本を用いた組織学的評価	32
5. 5. 1.	移植後 4 週組織	
5. 5. 2.	移植後 8 週組織	
5. 5. 3.	移植後 12 週組織	
5. 5. 4.	移植後 24 週組織	
5. 6.	凍結標本による組織学的評価の限界	34
5. 7.	電子顕微鏡による評価	35
5. 8.	量子ドットについて	36
5. 8. 1.	未分化骨髄細胞への量子ドット導入	
5. 8. 2.	量子ドット導入率	

5. 8. 3.	細胞分裂に伴う量子ドット希釈	
5. 8. 4.	量子ドットの有無による骨新生の違い	
5. 9.	移植細胞の生着と骨新生	38
5. 10.	臨床に即したモデルでの検証	39
5. 10. 1	濃縮自家骨髄血移植と骨髄間葉系幹細胞移植	
5. 10. 2	疾患モデルを用いた検討	
5. 10. 3	骨新生促進に関する検討	
第 6 章	結論	44
図・表		45
引用論文		67
学会発表		75
謝辞		78
参考論文		79

第 1 章 本研究の背景

1. 1. 骨壊死とは

骨や骨髄が正常に機能するためには血流の供給が不可欠である。骨への血流が途絶されると、骨は壊死に陥る。壊死に至った骨では、組織の **turn over** が停止する。繰り返しの荷重が加わり、壊死骨に変形や微小骨折が起こると、荷重が集中する部位の骨は圧潰や変形を来す。また、関節表面の陥凹により関節面の適合不良を来し、二次性に変形性関節症に至ることもある。こうした変化により、患部の疼痛や罹患関節の炎症・可動域制限などを来し、日常生活動作に支障を来すことも少なくない。

骨の血流障害の直接的原因がはっきりしているものは、二次性骨壊死と呼ばれる。骨折後に生じる骨壊死(大腿骨頸部骨折後に生じる大腿骨頭の骨壊死、距骨骨折後に生じる距骨体部の骨壊死など)や放射線照射後に生じる骨壊死、急性減圧症候群(潜函病)による骨壊死がこれにあたる。

一方、原因が明らかでない骨壊死が存在することは 1888 年 König らにより報告されており、一次性または特発性と呼ばれる。誘因として、ステロイドやアルコール多飲などが考えられているが、こうした誘因がなくても発症することがある。大腿骨頭壊死は特に頻度が高く、大腿骨内顆骨壊死や上腕骨頭壊死、月状骨骨壊死(Kienböck 病)もしばしばみられる。病理学的に病期を分類すると、4 期に分けられる。第 1 期には骨壊死のみで骨構築上の変化はみられないが、第 2 期になると壊死骨周囲に小血管が進入し付加骨による修復が始まる。このため壊死部位周囲に骨硬化がみられるようになる。第 3 期には骨構築上の変化がさらに進み関節面の陥凹がみられるようになり、関節軟骨の変性を来し変形性関節症に移行したものが第 4 期とされる[1]。

1.2. 臨床的背景

骨壊死の中でも高頻度にみられる特発性大腿骨頭壊死は、日本では年間 2200 名[2]、米国では年間 10,000 名以上[3]の新規罹患者がいるとされている。また確定診断時の年齢は男性で 40 歳代、女性で 30 歳代と、青壮年期に発症することが多い[2]。

青壮年期に機能障害が生じることは、日常生活の質を長期間にわたって低下させることになり、社会にとっても大きな損害となり得る。

したがって、早期から治療に介入し骨壊死の圧潰や変形性関節症への変化を防止することが重要であるが、壊死部位を確実に修復しうる最善の治療法はまだ確立されていないのが現状である。

1.3. 骨壊死に対する従来の治療法とその課題

現在臨床応用され、その成績が報告されている治療法の特徴と課題を記述する。

1.3.1. 保存的治療

骨壊死と診断されると、壊死部位への負荷による圧潰を防止するため安静や免荷を行うことが多い。安静・免荷により疼痛が緩和され、壊死範囲がごく小さい場合にはこの治療法だけでも効果が期待できる。しかし壊死部位に対する根治的治療ではないため、壊死範囲がごく小さい場合を除けば外科的治療と併用されて行われる[1]。

1.3.2. 骨穿孔術

骨壊死部位の周囲に形成される骨硬化部位を穿孔し、周囲正常骨髄から骨壊死部位に骨髄内の未分化間葉系細胞や成長因子を誘導して骨新生を促進させる方法である[4]。1960年代から行われている治療法で、壊死範囲が比較的小さく圧潰がみられていない場合には圧潰・変形を抑制させる効果が期待できる。しかし、壊死範囲が大きい場合には圧潰・変形へと進行することがある。

1.3.3. 骨切り術

骨を切離・回転させてアライメント(荷重のかかる軸方向)を矯正させることで壊死部位にかかる荷重負荷を軽減させる方法である[5, 6]。前方回転骨切り、後方回転骨切り、内反骨切りなどの方法があり、壊死部位の局在・大きさなどにより決定する。周囲正常骨に荷重負荷をかけるように矯正するため、壊死範囲が大きい場合には圧潰・変形へと進行することがある。また、骨切り・回転などが不十分な場合、圧潰・変形へと進行するため十分な手技の習熟が必要である。

1.3.4. 人工関節置換術

骨壊死部位を切除し、当該部位を人工関節に置換させる方法である。股関節や膝関節の場合、標準的な外科的治療法として人工関節置換術が行われることが多い。1961年に Charnley らが骨セメントを人工股関節の固定に用い、摺動面には high-density polyethylene を用いた人工股関節の開発に成功し、以後膝関節にもこの組み合わせが応用され飛躍的に発展した[7]。手術手技の工夫やインプラント機構の改良、加工技術の進歩により、近年良好な成績が報告されている。しかし、人工関節特有の合併症(人工関節の感染、弛み)や耐用年数の観点から、青壮年期での骨壊死へはその適応に慎重を要する。

1.3.5. 自家骨移植術

骨壊死部位を切除後、自家骨を移植する方法である[8, 9]。大腿骨頭壊死では骨穿孔術と合わせて腸骨から採取した自家骨を移植することがある。大腿骨内顆骨壊死では、周囲の非荷重部位から骨軟骨ごと採取し骨壊死部位に移植している。自家組織を移植できる利点がある一方で、ドナー部位の障害、壊死領域が広範囲にわたる場合にはドナー不足となり圧潰・変形へと進行する可能性がある。

1.3.6. 自家骨髄血移植術

予め腸骨から骨髄血を採取しておき、骨壊死部位に移植する方法である。骨新生のために自家骨髄血が臨床使用された報告は、1986年に Connolly らが骨折後の骨癒合不全に対して自家骨髄血を移植し治療した報告がはじめてで[10]、以後骨癒合不全、骨壊死などに対して骨新生促進効果を期待して行われるようになった。採取した骨髄血をそのまま移植する方法(狭義の骨髄血移植)と、骨髄血のうち血漿・赤血球成分を除去して得られた成分を移植する方法(濃縮骨髄血移植)があり、濃縮骨髄血移植では骨髄血を 300-400 ml 程度採取し、遠心分離後得られた濃縮自家骨髄血 30-40 ml 程度を移植に使用することが多い。

我々のグループでは、2002年に月状骨骨壊死(Kienböck 病)に対して本方法で治療し、以後大腿骨頭壊死、上腕骨頭壊死などの骨壊死や骨癒合不全に対して濃縮自家骨髄血移植で治療を行ってきた[11]。2012年までで総症例数は200を超えており、大腿骨頭壊死では圧潰進行による人工関節置換例は22% (47/214)で78% (167/214)は大腿骨頭が温存され、骨癒合不全では76% (13/17)が骨癒合に至っており、いずれも良好な成績が得られている。

1.4. 自家骨髄血移植後の骨新生に関する見解

それまで行われていた骨穿孔術での効果として、壊死部と周囲正常組織を交通させることで、正常組織から遊走した骨髄未分化間葉系細胞、成長因子により骨新生が得られると考えられていた[4]。2002年に Hernigou らは、自家骨髄血移植後の骨新生は移植された未分化間葉系細胞の量と相関があると報告し、周囲正常組織から遊走した未分化間葉系細胞や成長因子による効果に加え、移植細胞による直接的な骨新生効果により旺盛な骨新生が得られたと報告した[12]。近年、他グループの前向き研究で、骨穿孔術と比較して自家骨髄血移植後良好な骨新生が得られたと報告されており、壊死骨内に未分化間葉系細胞を移植することでの有用性が示された[13, 14]。

1.5. 骨髄血に含有される細胞群とその作用

静脈から血液を採取し、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)塩などの抗凝固剤を添加して遠心分離すると、上層に淡黄色の透明な血漿と下層に赤い赤血球層がみられ、さらに両者の境界には灰白色の薄層(buffy coat)が観察される(図 1) [15]。この buffy coat は、血液中の白血球と血小板が遠心操作により沈殿したものである。

骨髄血は、吸引された骨髄細胞と小組織片および静脈洞血(末梢血)の混合液であり、骨髄血を遠心すると骨髄細胞は白血球などの有核細胞と同じ buffy coat 内に観察される。この中には、骨新生に寄与する骨髄間葉系幹細胞、血管新生に寄与する内皮前駆細胞、血管新生を促進させる繊維芽細胞増殖因子(FGF: fibroblast growth factors)、間葉系細胞を増殖させる血小板由来増殖因子(PDGF: platelet-derived growth factors)、骨芽細胞を増殖させるトランスフォーミング増

殖因子ベータ(TGF- β : transforming growth factors - β)などの成長因子が含まれている。1.3.6.で記載された濃縮自家骨髄血移植は、この buffy coat を抽出し移植したものである。

よって骨壊死組織へ移植された濃縮自家骨髄血の中では、直接骨新生に作用する細胞として骨髄間葉系幹細胞が重要と考えられており、本研究では骨髄間葉系幹細胞に注目した。

1.6. 骨髄間葉系幹細胞

1999年に Pittenger らがヒト間葉系幹細胞に関する報告を行い、間葉系幹細胞は接着作用を持ち、そして骨・軟骨・脂肪への多分化能を持つと報告した[16]。以後間葉系幹細胞についての研究が数多く報告され、ヒト骨髄間葉系幹細胞の場合、国際細胞治療学会では上記に加え細胞表面抗原マーカーのうち CD73、CD90、CD105 に陽性で、CD45、CD34、CD14、CD11b、CD79 α 、CD19、HLA-DR に陰性であると定義されている[17]。

家兎骨髄間葉系幹細胞に関しては、接着作用、多分化能については多くの報告がなされていたが、ヒト骨髄間葉系幹細胞と異なり、家兎骨髄間葉系幹細胞と定義されるような細胞特性に関してはほとんど同定されていなかった[18, 19, 20]。これは、家兎骨髄間葉系幹細胞に関する分子生物学的情報が少なく、その細胞特性により限られたモノクローナル抗体しか使用できなかったためであり、家兎骨髄間葉系幹細胞の細胞表面抗原マーカーに関する詳細な報告はこれまでみられなかった。このため同じ方法で採取した家兎骨髄間葉系細胞に関して、過去の報告では、骨髄間葉系細胞と表記されているものと、骨髄間葉系幹細胞と表記されているものが混在していた[21, 22]。

2013年、Tan らが家兎骨髄間葉系幹細胞の細胞表面抗原マーカーに関して詳

細な報告をまとめ、家兎骨髄間葉系幹細胞では CD29、CD44、CD73、CD81、CD90 で陽性、CD34、HLA-DR で陰性であることを報告した[23]。

よって本研究では、接着作用、多分化能、そして Tan らの報告した家兎骨髄間葉系幹細胞に関する表面抗原マーカーで示された特性を持った細胞を家兎骨髄間葉系幹細胞と表現することとした。

1.7. 骨髄間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化

骨髄間葉系幹細胞は自己増殖能と間葉系組織(骨・軟骨・脂肪など)への分化能を有し、場の環境に応じて分化・増殖する[16]。骨髄間葉系幹細胞が骨組織に存在する場合には、骨芽細胞へと分化し骨新生が生じる。

骨芽細胞への分化には、特異的な転写因子である runt-related transcription factor 2 (Runx2)、osterix が作用している。また骨形成誘導蛋白質である bone morphogenetic protein (BMP)も骨芽細胞への分化を促進させる作用を持つ[24]。

骨芽細胞は骨形成を担う細胞であり、有機マトリックスである I型コラーゲンやオステオポンチンなどを合成・分泌している。骨芽細胞により分泌された有機マトリックスはマトリックスが分泌された直後に始まる(一次石灰化)が、数週間あるいはそれ以上の長期にわたって完成しない(二次石灰化)。この石灰化はアルカリフォスファターゼ活性に依存して制御を受けている[25]。

骨芽細胞の細胞形態は、有機マトリックスの合成機能を反映しており、前駆細胞ではコラーゲン線維に囲まれた繊維芽細胞の形態を示し、骨形成の活発な骨芽細胞では粗面小胞体やゴルジ装置が発達して観察される。成熟骨芽細胞を過ぎると、骨芽細胞の有機マトリックス合成・分泌能は低下し、骨細胞または骨表面を覆う lining cell となる[26]。

1. 8. 間葉系幹細胞追跡に対する従来 of 細胞標識法

移植した細胞の分化・生着を評価するためには、細胞を標識化することが必要になる。これまでに報告された骨髄間葉系幹細胞を対象とした細胞標識法の特徴と課題を記述する。

1. 8. 1. 蛍光色素

細胞表面に蛍光色素を結合させて標識する古典的方法である。骨髄間葉系細胞を蛍光色素で標識し追跡した報告では、移植後 5 - 6 週まで蛍光観察可能との報告がみられた[27, 28]。蛍光観察期間が比較的短い理由として、細胞の分裂増殖に伴う蛍光強度の減弱化や光安定性の低下などが考えられている。このため、長期間の安定した観察には不向きである。

1. 8. 2. 緑色蛍光蛋白質

オワンクラゲ (*aequorea* 属) の持つ発光タンパク質が放出する光の波長を変換するタンパク質として発見され、238 個のアミノ酸から成り、分子量約 27 kDa の蛋白質である。各種のプロテアーゼに耐性を示すなど化学的に非常に安定しており、pH 5 - 12 の間で蛍光が見られ、凍結融解したものや 70°C 程度に加熱したものでも蛍光が損なわれない特徴がある。他の蛋白質との融合蛋白質として機能を発揮することから蛋白質の細胞内局在を明らかにするのにきわめて有効とされている。骨髄間葉系幹細胞に導入したものでは 12 週の報告だった[29]が、骨髄移植時のドナー骨髄細胞に緑色蛍光蛋白質を導入したものでは 24 週まで安定して追跡できたと報告されており[30]、長期間の安定した観察も可能である。ただし遺伝子導入を要するため、技術習熟を要し、侵襲的な操作が必要となる。

1.8.3. 鉄粒子

ナノメートルサイズの鉄粒子を移植細胞に取り込ませ、核磁気共鳴画像(MRI)によるライブイメージングにより移植細胞を追跡する方法である[31, 32]。鉄粒子は周囲組織の磁性との違いから MRI 法の T2 強調画像で低信号領域として描出される。対象を生きた状態のまま、すでに汎用化されている MRI で評価できるという利点がある。ただし、鉄粒子の細胞毒性の可能性や、偽陽性(標識されていない細胞の移植操作だけでも信号変化を来してしまう)出現などの課題がある。

1.8.4. 量子ドット

量子ドット(QD: quantum dot)は、セレン化カドミウムなどの半導体の 2 - 20 nm 程度の粒子で、強い蛍光強度、長期の光安定性に加え、発光スペクトルがシャープで幅が狭く、QD のサイズに特異的な波長で蛍光するため、スペクトル同士の重なりが避けられ、二重、三重と同時に多くの色を標識マーカーとして使えるなどの利点を持つ[33, 34]。

1.9. 共同研究者による先行研究

1.9.1. モータリンと量子ドットを用いた細胞標識

Wadhwa らはマウスの癌細胞株からストレスシャペロンや細胞内輸送機能を有し、細胞増殖に関連する蛋白であるモータリンをクローニングし[35]、モータリンが正常細胞と不死化細胞で細胞内の局在が異なり、正常細胞では細胞質に主に分布するが、不死化細胞では細胞質には検出できず、細胞表面に発現していることを明らかにした(図 2 A) [36]。Kaul らは、モータリンに対する抗体(抗モ

ノクローナルモーターリン抗体)と量子ドットとの複合体を細胞培養液に溶解しヒト骨肉腫細胞株と共培養することで、細胞表面のモーターリンにこの化合物が抗原抗体反応で結合し、エンドサイトーシスにより細胞内に量子ドットが導入されることを報告した[37]。この方法の特徴は、能動的に細胞内へ取り込まれる性質を持つ抗モーターリン抗体を量子ドットと結合させることにより、侵襲的な操作を行わずともモーターリン蛋白質を発現する細胞への自発的な細胞内取り込みが可能となったことにある(図 2 B, C)。また、量子ドットの細胞内導入率は約 80 %程度であり、5 回の細胞分裂後も量子ドットが細胞内に観察可能だったと報告した[38]。

1.9.2. 家兎骨髓細胞への量子ドット導入と in vivo での追跡

Ohyabu らは、抗モーターリンモノクローナル抗体を使用して家兎未分化骨髓細胞内に量子ドットを導入したと報告し、導入の有無に関わらず、骨髓細胞は骨、軟骨、脂肪への分化能を有していたことを報告した[39]。また、Yoshioka らは家兎骨髓間葉系幹細胞由来三次元軟骨様組織を関節軟骨全層欠損に同種移植したモデルで、移植細胞に量子ドットを導入し修復組織における量子ドットの局在を観察した。移植後 8 週に加え、26 週でも蛍光が観察され、長期間の細胞追跡が可能であることを報告した[40]。

1.9.3. 家兎第 4 足根骨を用いた骨壊死モデルの作製

Ogawa らは、家兎第 4 足根骨を用い、液体窒素に浸して壊死させた後、同ウサギの背部皮下に移植するモデルを開発した[41]。このモデルは、家兎第 4 足根骨を摘出し液体窒素に 5 分間浸すことで壊死させた後、常温の生理食塩水内で解凍し、3 面ある皮質骨面に 1 箇所ずつ、計 3 箇所に直径 2 mm のドリリングを

行った後、体幹背部皮下に移植する(図 3 A)。家兎第 4 足根骨を壊死させた後、力学的負荷がかかりにくく血管の誘導が期待できる皮下に移植した場合、引き続き骨壊死が持続されるのか、12 週齢日本白色家兎を用いて組織学的検討を行った。

HE 染色では、2 週では骨細胞の核は一部残存していたが、4 週で完全に **empty lacunae** となり、脂肪髄も消失した。8, 12, 20 週いずれも添加骨形成や脂肪髄の出現は認めず、**empty lacunae** の存在も持続していた(図 3 B)。また骨形態計測では、骨石灰化面では 4 週で、骨芽細胞面では 8 週でいずれもわずかな増加を認めるも、以降 20 週にかけて増加することはなかった(図 3 C)。

よって、この骨壊死モデルは皮下移植後 4, 8, 12, 20 週のいずれも組織学的に骨壊死の状態が維持されており、移植後 20 週まで長期に安定して再現性のある骨壊死が得られていることが示された。

第2章 本研究の目的

我々のグループで行ってきた自家骨髄血移植による臨床成績、共同研究者による細胞追跡に関する先行研究を踏まえ、本研究の仮説は「家兎骨壊死組織に移植した自家骨髄間葉系幹細胞が骨芽細胞へと分化し、骨新生に直接作用している」とした。

本研究の目的は以下の2つである。

1. 家兎骨髄間葉系幹細胞に量子ドットを導入した後骨壊死組織へ移植し、移植細胞を追跡し、その分化過程を評価する。
2. 骨芽細胞内に量子ドットが含まれていることを示し、移植細胞から直接分化していることを示す。

第3章 対象と方法

本研究は筑波大学動物実験取扱い規定に従い、動物実験委員会の承認を得て行った。

3.1. 実験系の設定

本研究は、以下の実験系から構成される。

1. 12 週齢家兔から骨髓血を採取し骨髓間葉系幹細胞を単離培養した後、量子ドットを骨髓間葉系幹細胞に導入した実験系。骨髓間葉系幹細胞の選定及び骨髓間葉系幹細胞への量子ドット導入について、*in vitro* による評価を行った。
2. 1. の実験系を使用して骨髓間葉系幹細胞に量子ドットを導入した後、同一個体の家兔第 4 足根骨を壊死させ背面皮下に留置後、壊死骨内に量子ドットを導入した骨髓間葉系幹細胞を自家移植した実験系。移植した骨髓間葉系幹細胞が骨芽細胞へ分化し骨新生に寄与していることを組織学的に評価した。

3.2. 骨髓からの細胞採取

12 週齢日本白色家兔(東京実験動物、東京)雌の両側後方腸骨稜から骨髓内に 18 ゲージ針を刺入し、ACD 液 2 ml を加えた 20 ml シリンジで骨髓血を吸引採取した。採取した骨髓血はナイロンメッシュ(100 μm cell strainer; BD Falcon, Bedford, MA, USA)で濾過し、50 ml 用チューブ(50 ml conical tube; BD Falcon)に回収した。骨髓血を 20 ml 回収後、2 個の 75 cm^2 フラスコ(BD Falcon)に播種し、37 °C、5 %二酸化炭素の環境下で培養した。培養液は Dulbecco's Modified Eagle's Medium (以下 DMEM; Sigma, St. Louis, MO, USA)、10 %牛胎児血清

(Fetal Bovine Serum, 以下 FBS; Sigma)、1 %抗生物質(Antibiotic-antimitotic; GIBCO, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)で構成され、各フラスコを 15 ml の培養液で満たし、24 時間後に初回培地交換を行った。以後、2 - 3 日に 1 回の頻度で培地交換を行い、培養開始 14 日後に初回継代を行った。フラスコ底面に接着した紡錘形の細胞を 0.25 % Trypsin 1 mM EDTA (Sigma)を用いてフラスコ底面より剥離し、Phosphate-Buffered Saline (以下 PBS)で 2 回洗浄した後、別の 75 cm² フラスコに播種し、継代した。初回継代後、2-3 日に 1 回の頻度で培地交換を行い、フラスコ底面の 80 %以上に培養細胞が増生していること(80 % - confluent)を確認し、以後の実験に使用した。

3. 3. 骨髄間葉系幹細胞の選定と評価

家兎骨髄細胞に対して、接着作用、多分化能、細胞表面抗原マーカーについて、以下の通り検討を行った。

接着作用については、3.2. の培養で播種から初回培養まで 24 時間の間にフラスコ底面に接着した細胞を選定していること、また多分化能については、先行研究で Ohyabu らおよび Yoshioka らが、採取した家兎骨髄間葉系細胞に関して骨分化能及び脂肪分化能を有することを示しており [39, 40]、いずれもすでに明らかであるものとした。

細胞表面抗原マーカーについては、Tan らの報告では家兎骨髄間葉系幹細胞での陽性マーカーは 5 種類(CD29、CD44、CD73、CD81、CD90)、陰性マーカーは 2 種類(CD34、HLA-DR)を挙げていた。本研究では、Tan らの報告を参考に、現時点で入手可能な陽性マーカーとして CD81 (#561956, FITC Mouse Anti-Human CD81, BD Biosciences, San Jose, CA, USA)を評価することとした。陰性マーカーは CD34 を候補に考えていたが、種が家兎由来のマーカー

(bs-0646R-FITC, Rabbit Anti-CD-34 Polyclonal Antibody, Bioss, Woburn, MA, USA)しか入手できなかったため、合わせて HLA-DR (#555560, FITC Mouse Anti-Human HLA-DR, BD Biosciences)についても評価することとした。なお、対応する IgG として、CD81 は IgG₁ (#555748, FITC Mouse IgG₁ κ Isotype Control, BD Biosciences) を、CD34 は anti-rabbit IgG (sc-53805, mouse anti-rabbit IgG-FITC, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) を、HLA-DR は IgG_{2b} (#555742, FITC Mouse IgG_{2b} κ Isotype Control, BD Biosciences) をそれぞれ使用して測定した。

3. 2. により 80 % - confluent となった培養細胞を 0.25 % Trypsin 1 mM EDTA を用いてフラスコ底面より剥離し、 1×10^7 /ml の濃度となるように細胞懸濁液を作成した。Non-stain 用、IgG 用、細胞表面抗原マーカー用の 3 種類のチューブを用意し、この懸濁液を 100 μl ずつ分注した。分注後、それぞれ内容量に応じた試薬を投与し、4 °C 下で、30 分間反応させた。その後 PBS で 2 度洗浄し、フローサイトメトリーによる分析を行った。測定機器は Smart Sampler MoFlo™ XDP (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) を、解析は Summit Software v4.3 (Beckman Coulter) を使用した。

3. 4. 骨髄間葉系幹細胞への量子ドット導入

骨髄間葉系幹細胞へ量子ドットが導入されているかを *in vitro* で評価するため、3. 2. の初回継代の際にあらかじめカバーガラスを底面に敷いたシャーレを準備し、このシャーレ内に継代した細胞を播種した。以後の培養条件は 3. 2. と同一として 80 % - confluent となるまで培養した。量子ドット(Qdot® 655 ナノクリスタル; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)と抗体との複合体作製キット(Qdot® 655 antibody conjugation kit; Invitrogen)を用いて量子ドットとモータリンモノ

クローナル抗体の複合体を作製した。この複合体を 0.2 mg/ml の濃度で溶解した培養液で 24 時間、接着細胞と培養し量子ドットを細胞内に導入した。導入後、カバーガラスを取り出してグリセリンで封入しプレパラートを作製した。このプレパラートを蛍光顕微鏡で観察し、骨髄間葉系幹細胞へ量子ドットが導入されているか評価した。観察には 655 nm の波長に対する特異フィルター(XF305-1, Excitation 425DF45, Dichroic 475DCLP, Emission 655DF20; Omega Optical, Brattleboro, VT, USA) を取り付けた蛍光顕微鏡 (Biorevo Imaging System BZ-9000; Keyence, Osaka, Japan) を使用した。

3. 5. 自家骨髄間葉系細胞移植後の細胞追跡

骨髄間葉系幹細胞に量子ドットを導入し、移植後 4, 8, 12, 24 週での組織内における細胞の局在、分化を追跡した(図 4)。移植細胞の局在は量子ドットの局在を観察することで、骨芽細胞の局在は骨芽細胞がアルカリフォスファターゼ (ALP: alkaline phosphatase) 染色で陽染されることを利用し ALP 陽性細胞の局在を観察することで評価した。また組織回収前にカルセインを投与し、新生骨による石灰化の局在を評価した。各評価のため 5 μ m 厚の 3 連続非脱灰凍結切片を作製し、観察を行った。

また、先行研究で Ogawa らは 20 週まで骨壊死が持続していることを報告していたが、本研究では移植後 24 週とさらに長期での組織評価を行うため、別に準備した 12 週齢日本白色家兎雌 5 羽に対して、骨壊死モデル作製後、細胞を移植せずそのまま体幹背部皮下に留置し、移植 24 週後に骨壊死が持続しているかを評価した。

3. 5. 1. 量子ドット導入

12週齢日本白色家兔(東京実験動物、東京)雌 24羽から、それぞれ 3. 2. と同様にして骨髓血採取後、1羽につき 75 cm² フラスコ 2個を準備し培養を行い、一方を量子ドット導入群、もう一方はネガティブコントロールとして非導入群とした。初回継代後 80% - confluent となるまで培養し、量子ドット導入群には 3. 4. と同様に量子ドットとモータリンモノクローナル抗体の複合体が溶解された培養液で 24時間培養し、量子ドットを細胞内に導入した。このうち、電子顕微鏡の評価に用いた 4羽を除いた 20羽について、全細胞に占める量子ドット導入細胞の比率を 100倍視野で算出し、量子ドットの導入率を算出した。

3. 5. 2. 骨壊死モデルの作製(図 5)

3. 5. 1. で準備した 12週齢日本白色家兔雌 24羽に対して、先行研究の Ogawa らの方法と同様に、両側の第 4足根骨を採取し、液体窒素に 5分間浸して第 4足根骨を壊死させた。常温の生理食塩水内で解凍後、壊死骨内部に移植細胞を到達させるため、第 4足根骨に 3面ある皮質骨面に 1箇所ずつ 3箇所に直径 2 mm のドリリングを行った。移植の際にはこのドリル孔から細胞を移植することとし、あらかじめ 1つのドリル孔に 18ゲージ針を刺入した状態で体幹背部皮下にそれぞれ留置した。この際、一方は背部前方左側に留置し量子ドット導入群の細胞を移植し、もう一方は背部後方右側に留置し非導入群の細胞を移植することとした。

3. 5. 3. 自家骨髓間葉系幹細胞移植

3. 5. 1. で準備した細胞を、0.25% Trypsin 1 mM EDTA を用いてフラスコ底面より剥離し、 $3 - 5 \times 10^5$ 個/ml の濃度となるように、量子ドット導入群、非導入群それぞれ細胞懸濁液を作成した。3. 5. 2. であらかじめ留置した 18ゲージ

針から壊死骨内へ細胞懸濁液をゆっくりと 1 ml 注入した。壊死骨外に溢れた分は皮下に pouch 状に貯留した状態とし、注入後 18 ゲージ針を静かに抜去した。

移植後 4, 8, 12, 24 週でそれぞれ 5 羽(合計 20 羽)を組織評価に使用した。新生骨による石灰化評価のため、組織回収 2 週前と 2 日前にそれぞれカルセインを皮下投与した。残り 4 羽は電子顕微鏡評価として移植後 4 週で組織を採取した後、評価に使用した。

3. 6. 移植後組織の肉眼的評価

屍殺はペントバルビタールソジウムの致死量を静脈注射することで行った。その後、背面皮下から移植後組織を取り出し、表面性状、色調、周囲組織との関連性に関して肉眼的評価を行った。

3. 7. 移植後組織における量子ドットの局在

量子ドットの観察が凍結標本のみで可能であるため、凍結ブロック標本を作成した。組織回収後、4 %パラホルムアルデヒドを用いて 4 日間固定した。その後、10, 20, 30 %スクロースで各 1 時間、4 °C でリンスし 4 %カルボキシメチルセルロースに包埋後、ただちに液体窒素で急速冷凍した。-70 °C 環境下に 5 µm 厚で非脱灰凍結薄切標本を作製した(Leica CM3050S; Leica Microsystems, Wetzlar, Germany)。量子ドット導入群については、3 連続切片を作成し、それぞれ量子ドットの局在評価用、ALP 陽性細胞評価用、石灰化評価用として使用した。量子ドット非導入群については、凍結切片を作成し、量子ドットの局在がないことを確認するために使用した。量子ドットの観察には 655 nm の波長に対する特異フィルター(XF305-1, Excitation 425DF45, Dichroic 475DCLP, Emission 655DF20; Omega Optical)を取り付けた蛍光顕微鏡(Biorevo Imaging

System BZ-9000; Keyence)を使用した。

3. 8. 移植後組織におけるアルカリフォスファターゼ陽性細胞の局在

3. 7. で作成した 5 μm 厚の非脱灰凍結薄切標本に対して ALP 染色を行い、光学顕微鏡で ALP 陽性細胞の局在を観察した。

3. 9. 移植後組織における新生骨による石灰化の局在

3. 7. で作成した 5 μm 厚の非脱灰凍結薄切標本に対して、トルイジン青(TB: toluidine blue)染色を行い、光学顕微鏡暗視野にてカルセイン標識された部分を観察した。

3. 10. 移植後組織の電子顕微鏡による評価

組織回収後半切して、一方を電子顕微鏡用に、もう一方を凍結標本用に使用した。凍結標本用の組織は、3. 7. と同様にして薄切切片を作製し、量子ドットの導入を確認するために使用した。電子顕微鏡用の組織は、電動糸鋸器で 2 mm 厚に薄切し、2.5 %グルタルアルデヒド溶液による固定(前固定)後、4.1 % EDTA 液で脱灰した。脱灰後、1 %四酸化オスミウムで固定(後固定)した後、洗浄してエタノールにて脱水し、酸化プロピレンに置換後エポキシ樹脂で重合包埋した。得られた樹脂ブロックからウルトラマイクロトーム(ULTRACUT E; Reichert-Jung, Munich, Germany)で超薄切切片を採取し、ウラン・鉛の二重染色を行った後、透過型電子顕微鏡(JEM-1400; 日本電子株式会社、東京、日本)で観察した。

第 4 章 結果

4. 1. 接着培養で増殖した骨髄間葉系幹細胞

フラスコへの播種 24 時間後には接着細胞が観察された。培地交換を経るごとに浮遊細胞が減少し、紡錘形の細胞が観察され、コロニーを形成するようになった。2 週間の培養でコロニーはいくつかみられるようになったが、フラスコ底面の 30 %程度の占有にとどまったため、継代を行った。初回継代後 5 - 7 日後にはフラスコ底面の 80 %を占めるようになった(図 6)。

4. 2. 骨髄間葉系幹細胞の細胞表面抗原マーカー評価

フローサイトメトリーによる細胞表面抗原マーカー評価の結果は、CD81 では IgG 標識細胞と CD81 標識細胞とで明らかにピークに違いがみられた(図 7)。CD34 では IgG 標識細胞と CD34 標識細胞とでピークはほとんど差がみられず(図 8)、HLA-DR でも IgG 標識細胞と HLA-DR 標識細胞とでピークに差がみられなかった(図 9)。陽性細胞の割合は、細胞表面抗原マーカーで標識された細胞から IgG で標識された細胞を差分することで算出され、CD81 陽性細胞が 90 %、CD34 陽性細胞が 5.6 %、HLA-DR 陽性細胞が 1 %未満だった。

4. 3. 骨髄間葉系幹細胞への量子ドット導入

In vitro での観察で、赤色に蛍光される量子ドットが紡錘形の細胞内に観察された(図 10)。量子ドットは細胞質に存在しており、single-dot として存在しているものや、いくつかの量子ドットが集まった cluster として存在しているのがみられた。

4. 4. 量子ドット導入率の評価

移植に使用した細胞の量子ドット導入率は、 $93.3 \pm 2.0\%$ ($n=20$, 90.0 - 97.0)であった(図 11)。

4. 5. 骨壊死モデルの 24 週経過における組織評価

肉眼的には、軟骨面は保たれているものの菲薄化しており、血管侵入がわずかに認められた。HE 染色による組織学的評価では、骨梁内は核が空胞化(empty lacunae)しており、骨壊死の状態が持続していた(図 12)。

4. 6. 移植後組織の肉眼的評価

家兎骨髄間葉系幹細胞を壊死骨内に移植し 4 週を経過した組織では、壊死骨の原型は保たれており、周囲組織からの血管増生がみられた。8 週後の組織では軟骨面の部分的な不整がみられ、原型がわずかに崩れていた。12 週後の組織では、軟骨面は不整で全体的に軟化し、軽度扁平化していた。24 週後の組織では、移植骨周囲の血管増生は少なくなり、扁平化は 12 週と同様だったが、12 週と比較し硬度が強くなっていた(図 13)。

4. 7. 移植細胞の局在と骨新生

非導入群(量子ドットを導入していない骨髄間葉系幹細胞を移植した群)については、4, 8, 12, 24 週いずれも量子ドットの蛍光がみられなかった(図 14)。

4. 7. 1. 移植後 4 週組織 (図 15)

骨梁表面に沿って赤色で蛍光される領域が多くみられ、量子ドットを含んだ

移植細胞の局在が観察された(図 15 D)。また、量子ドットの局在と一致して、ALP 染色で青紫色に染色される領域が観察されたが、その細胞形態は不明瞭だった(図 15 E)。TB 染色(暗視野)では、骨梁表面に沿って緑色に蛍光される部位がみられ、新生骨による石灰化が観察された(図 15 F)。

4.7.2. 移植後 8 週組織 (図 16)

移植後 4 週と同様に、骨梁表面に沿って赤色で蛍光される領域が多くみられ、量子ドットを含んだ移植細胞の局在が観察された(図 16 D)。また、量子ドットの局在と一致して、ALP 染色で青紫色に染色される領域が観察された。細胞形態は移植後 4 週と比較すると比較的明瞭だったが、やや薄く染色されていた(図 16 E)。TB 染色(暗視野)では、骨梁表面に沿って緑色に蛍光される部位がみられ、新生骨による石灰化が観察された(図 16 F)。

4.7.3. 移植後 12 週組織 (図 17)

移植後 4・8 週と同様に、骨梁表面に沿って赤色で蛍光される領域がみられ、量子ドットを含んだ移植細胞の局在が観察された(図 17 D)。量子ドットの局在と一致して、ALP 染色で青紫色に染色される領域が観察されたが、4 週と比較するとやや薄く、細胞形態も移植後 8 週と比較すると不明瞭だった(図 17 E)。TB 染色(暗視野)では、骨梁表面に沿って緑色に蛍光される部位がみられ、新生骨による石灰化が観察された(図 17 F)。量子ドットの局在と ALP 染色、TB 染色(暗視野)の局在が一致している領域(黄矢印)と、量子ドットの局在と TB 染色(暗視野)の局在は一致しているが ALP 染色で染色されない領域(青矢印)とが混在していた。

4.7.4. 移植後 24 週組織 (図 18)

移植後 4, 8, 12 週と同様に、骨梁表面に沿って赤色で蛍光される領域がみられ、量子ドットを含んだ移植細胞の局在が観察された(図 18 D)。ALP 染色では、明瞭に青紫色に染色される領域はほとんど観察できなかつた(図 18 E)。TB 染色(暗視野)では、骨梁表面に沿って緑色に蛍光される部位がみられ、新生骨による石灰化が観察され (図 18 F)、量子ドットの局在と TB 染色(暗視野)の局在は一致しているが ALP 染色で染色されない領域が観察された。

4.8. 移植後組織の電子顕微鏡による評価 (図 19)

半切した凍結用標本では、全例で移植後組織に赤色に蛍光される領域が観察され、量子ドットの局在を確認した。

弱拡大では、20 - 40 μm の大きさの紡錘形の細胞が多くみられた(図 19 A)。この細胞を拡大して観察すると、細胞によって核が明瞭に同定できるものと同定が困難なものがみられた(図 19 B, D)。どの細胞も細胞質は粗面小胞体が豊富で、ミトコンドリアも明瞭に認められ、活性化状態の骨芽細胞の細胞質の特徴に矛盾のない所見だった(図 19 C, E, F)。強拡大でみると、細胞質内に量子ドットを確認できた。大きさは 50 - 100 nm 程度の円形で、その大きさからいくつかの量子ドットを含んだ cluster 状に存在しているものと思われた(図 19 G)。

第5章 考察

本研究では家兎を使用して骨壊死組織内に自家骨髄間葉系幹細胞を移植し、移植細胞の局在、分化について検討した。

骨髄間葉系幹細胞に量子ドットを導入後、*in vitro* にて明瞭に量子ドットを観察することができた。また、量子ドットを導入した骨髄間葉系幹細胞を壊死骨内に移植した場合でも、24 週経過しても蛍光が減弱することなく量子ドットを観察することができた。よって、量子ドットは骨髄間葉系幹細胞の追跡マーカーとして有用であると考えられた。

凍結標本での移植細胞の局在、分化については、移植細胞の局在を示す量子ドットの局在と、ALP 染色陽性細胞の局在、新生骨の局在が一致する部位が観察できた。しかし、凍結標本を ALP 染色にも使用したことで ALP 陽性細胞は標本によって細胞形態が不明瞭なものや染色が薄いものがみられ、細胞と評価することが難しいものも中にはみられた。

このため、細胞内に量子ドットが存在することを直接示す方法として、電子顕微鏡による観察を行った。この結果、移植後組織で骨芽細胞と思われる細胞内に量子ドットを観察することができた。こうした結果から、移植した骨髄間葉系幹細胞が骨芽細胞に直接分化し、骨新生に寄与していることを示すことができたと考えている。

5.1. 採取した家兎骨髄間葉系幹細胞の特性

本研究では、12 週齢日本白色家兎雌の両側後方腸骨稜から骨髄血を吸引し、骨髄細胞を採取した。

家兎は、ラットやマウスよりも大きく、イヌや羊よりも入手しやすく飼育しやすいという利点を持っており、本研究の先行研究にも使用されていた。しかし、ヒトやマウス、ラットといった骨髄間葉系幹細胞と異なり、家兎骨髄間葉系幹細胞と定義されるような細胞特性に関してはほとんど報告がみられなかった[18, 19, 20]。近年、技術改良により家兎細胞表面抗原マーカーの報告がみられるようになり、本研究では、Tan らの報告を参考に、現時点で入手可能な陽性マーカーとして CD81 を、陰性マーカーとして HLA-DR および同種由来のマーカーしか入手できなかった CD34 を、それぞれフローサイトメトリーにより評価した。この結果、陽性マーカーである CD81 は 90 % と高い陽性率を示し、陰性マーカーである CD34 は 5.6 %、HLA-DR は 1 % 未満と低い陽性率だった。Tan らの報告では、CD81 は 96.9 %、CD34 は 7.1 %、HLA-DR は 4.3 % と示されており、CD34 の評価が同種由来のマーカーを用いた結果であることに留意する必要があるが、彼らと同様の結果が得られた。この結果は、彼らが示す家兎骨髄間葉系幹細胞の持つ特性に矛盾のない結果であり、我々が採取・培養しその後の研究に使用した骨髄間葉系細胞は、骨髄間葉系幹細胞とみなされると考えられた。

5. 2. 家兎骨髄間葉系幹細胞の特性に関する検証

5. 1. で述べたように、ヒトやマウス、ラットといった骨髄間葉系幹細胞と異なり、これまで家兎骨髄間葉系幹細胞と定義されるような細胞特性に関してはほとんど報告がみられなかった。このため本研究では、Tan らの報告を基に入手可能な細胞表面抗原マーカーで評価を行った。このため、ヒトやマウス、ラットと比較して家兎間葉系幹細胞の純度については、以下の点に関して検討が必要と考えている。

一つは、入手できた細胞表面抗原マーカーの蛍光色素がいずれも **fluorescein isothiocyanate (FITC)**であったため、移植細胞と細胞表面抗原マーカーが1対1の対応となっていることである。このため、**CD81** 単独、**CD34** 単独、**HLA-DR** 単独での検討は行ったが、**CD81** 陽性かつ **CD34** 陰性かつ **HLA-DR** 陰性である細胞に関しての評価は行うことができなかった。この評価を可能にするには、家兎に対して使用可能な細胞表面抗原マーカーで、**FITC** と重複しない蛍光色素 [例 : **phycoerythrin(PE)**, **allophycocyanin(APC)**] や **biotin** 標識などを使用したマーカーが必要であり、今後入手可能となった際には、多重標識による検証が必要と考えられる。

もう一つは、より多くの細胞表面抗原マーカーによる評価である。ヒトやマウス、ラットでは、陰性マーカーとして **CD31** かつ **CD45** が、陽性マーカーとして **CD10**, **13**, **73**, **105**, **166** が同定されているが、より高純度で高品質な間葉系幹細胞の細胞表面抗原マーカーとして、**CD271**, **140b**, **340**, **349** が報告されている[42]。しかし家兎由来の細胞表面抗原マーカーにおいては、先に挙げた細胞表面抗原マーカーのほとんどが単独標識でも報告がなく、今後家兎間葉系幹細胞に関してより詳細な分子生物学的情報が明らかとなり、細胞特性に応じた様々なモノクローナル抗体が使用可能となることが期待される。

5.3. 採用した骨壊死モデルについて

背面皮下に留置後 24 週経過した骨壊死組織は、組織学的に **ALP** 染色で骨芽細胞はみられず、**TB** 染色で石灰化もみられなかった。また骨梁には核の空胞化 (**empty lacunae**)がみられ、先行研究である **Ogawa** らの 20 週での骨壊死モデルの評価と同様のものだった。こうした結果から、液体窒素により壊死させた第 4 足根骨は、背面皮下に留置後 24 週経過後も引き続き骨壊死の状態が持続してい

た。これは、先行研究で **Ogawa** らが述べているように、壊死部分に骨前駆細胞が供給されない状態では、血管の進入を認めても、骨形成や骨吸収は生じないという報告に矛盾しない結果だった。よって、壊死骨を皮下に留置しただけでは骨新生は得られず、骨新生をもたらすには細胞移植など何らかの介入が必要であることが改めて示された。またこの骨壊死モデルの利点は、壊死骨を皮下に移植することで力学的負荷がかかりにくく、血管の誘導が期待できること、そしてモデルとして骨壊死の再現性が極めて高いことである。先行研究の **Ogawa** らの報告、そして本研究でも全例で骨壊死が得られており、本研究で採用した骨壊死モデルは、その再現性および安定性に優れたモデルと考えている。

5. 4. 移植後組織の肉眼的評価

移植後 4, 8 週と比較し、12 週では骨が扁平化し軟化が出現していた。先行研究で **Ogawa** らは自家骨髄血を直接移植し、本研究では培養した自家骨髄間葉系幹細胞を移植したが、結果としては **Ogawa** らと同様の結果であった。**Ogawa** らは 12 週で軟化が生じる原因について、遊離皮質骨移植時に見られるような初期の再生過程で起こる骨吸収に偏った **high turn over** を挙げていた。イヌの部分腓骨移植実験において、6 週から 6 ヶ月までは移植骨の強度が低下し、約 1 年で正常レベルに回復したという報告もあり [43]、本研究でも **high turn over** が原因と考えられる結果であった。また、移植後 24 週では壊死骨の変形が進行することなく、ある程度扁平化した状態で形態を維持していた。骨強度の回復に関する検討は本研究では行っていないため、骨強度の回復していく期間については今後の課題であるが、本研究に用いた第 4 足根骨は凹凸のある 1cm 程度の立方体で、その大きさから力学的強度の計測は現実的に困難であり、このモデルでの研究の限界と考えられた。

5.5. 凍結標本を用いた組織学的評価

5.5.1. 移植後4週組織

移植後4週での移植細胞の局在、分化については、移植細胞の局在を示す量子ドットの局在と、ALP陽性細胞の局在、そして新生骨による石灰化の局在が一致する部位が観察できた。この結果については、ALP染色で陽染された部位は、何らかの細胞から産生されたALPが陽染したものを観察しているが、この実験モデルでは壊死骨、自家間葉系幹細胞、周囲からの血管新生程度しか存在しないため、ALP陽性細胞は骨芽細胞と考えられ、骨芽細胞からのALPに反応して染色されたものと思われた。また骨新生がみられた部位については、骨芽細胞から有機マトリックスが分泌された直後から、このマトリックスの石灰化が始まっており(一次石灰化)、この作用を反映してTB染色で緑色に蛍光した部位を観察しているものと思われた。

この結果から、移植後4週の組織において移植細胞が生着後骨芽細胞に分化し、直接骨新生に寄与していることを示す結果が得られた。

5.5.2. 移植後8週組織

移植後8週での移植細胞の局在、分化については、4週と同様に量子ドットの局在、ALP陽性細胞の局在、新生骨による石灰化の局在が一致する部位が観察できた。移植後4週での考察と同様に、ALP陽性細胞は骨芽細胞と考えられ、骨芽細胞から分泌されたALPに反応して染色されたものと思われた。骨新生部位についても、一次石灰化による作用を反映した結果をみているものと思われた。

また ALP 評価に用いた凍結標本は、やや染色が薄かったが細胞形態が比較的明瞭に観察できたこともあり、多くの部位で量子ドットの局在、ALP 陽性細胞の局在、新生骨による石灰化の局在が一致する部位が観察できた。

この結果から、移植後 8 週の組織においても、移植細胞が生着後骨芽細胞に分化し、直接骨新生に寄与していることを示す結果が得られた。

5.5.3. 移植後 12 週組織

移植後 12 週での移植細胞の局在、分化については、4, 8 週と同様に量子ドットの局在、ALP 陽性細胞の局在、新生骨による石灰化の局在が一致する部位が観察できたが、4, 8 週と比較すると少なくなっていた。また、量子ドットの局在、骨新生による石灰化の局在は一致しているが ALP 陽性細胞がみられない部位が観察された。

こうした結果となった要因として、移植後 4 週と比較すると染色がやや薄く、8 週と比較すると細胞形態が不明瞭であるため、ALP 染色で陽染されるはずの領域が十分染まっていない可能性が考えられた。また、移植後 12 週が経過していることを考えると、移植された細胞が骨芽細胞からさらに成熟し ALP 分泌が低下し、骨細胞または骨表面を覆う lining cell へと分化した結果を反映している可能性が考えられた。

5.5.4. 移植後 24 週組織

移植後 24 週での移植細胞の局在、分化については、12 週での評価と同様に量子ドットの局在、新生骨による石灰化の局在は一致しているが ALP 陽性細胞がみられない部位が多く観察された。これは 12 週での考察と同様、移植された細胞が骨芽細胞から骨細胞あるいは骨表面を覆う lining cell へと分化した結果を

反映しているものと考えられた。

5.6. 凍結標本による組織学的評価の限界

本研究では連続薄切標本での比較評価を計画し、凍結標本以外の組織標本で量子ドットを蛍光観察することができなかつたため、凍結標本を **ALP** 染色にも使用した。この結果、**ALP** 陽性細胞は標本によって染色がやや薄いものや細胞形態が不明瞭であるもの、細胞と評価することが難しいものがみられた。

一般に骨芽細胞に関する組織学的評価で通常使用される標本は、メタクリル酸メチル (**methyl-methacrylate: MMA**) 樹脂やメタクリル酸グリコール (**glycol-methacrylate: GMA**) 樹脂で作製されている。この方法では、元々骨組織への固定液の浸透があまりよくない欠点を克服するため、樹脂を使用して安定した細胞の固定状態を保持するように工夫されている。樹脂標本では細胞や核の形態が明瞭に観察できるため、**GMA** 樹脂で作製した組織切片で量子ドットを確認できないか予備実験で評価を行ったが、樹脂標本では蛍光観察で量子ドットを確認できなかった。

一方、凍結標本では固定及び染色時の環境(温度変化、作業時間)による影響を受けやすいため、標本によって細胞が潰れているように観察され、染色濃度に差が生じてしまったと考えられた。特に **ALP** 染色では大きな影響を受けてしまい、骨形態計測などの定量評価は困難であった。他方、量子ドットや新生骨の局在評価では蛍光領域の観察評価であったため、あまり影響を受けることはなかった。

凍結標本以外で、蛍光評価による量子ドットの局在評価は不可能であるため、蛍光評価以外の方法で量子ドットが細胞内に含まれていることを直接示すことができれば、凍結標本での結果を補完し、より確証の高い結果を得られると考

え、電子顕微鏡での評価を行った。

5.7. 電子顕微鏡による評価

5.5より、移植細胞内に量子ドットが存在することを直接示す方法として、電子顕微鏡による観察を行った。その結果、量子ドットを含んだ細胞を観察することができ、その細胞質は粗面小胞体が豊富で、ミトコンドリアも明瞭に認められ、活性化状態である骨芽細胞の細胞質の特徴に矛盾のない細胞形態であった。また量子ドットは細胞質にみられ、大きさは50 - 100 nm程度で、複数の量子ドットから構成された **cluster** として存在していると考えられた。

In vitro での蛍光顕微鏡結果では、いくつもの量子ドットを観察できたが、よくみると蛍光体の大きさは均一でなく、小さいものと大きいものが混在していた。この結果からも、量子ドットは **single-dot** のものだけでなく、**cluster** として存在するものもあることを支持する結果だった。これは、本研究で使用した量子ドットの導入方法によるものと考えられる。本研究では、細胞表面のモーターリンと結合させるため、量子ドットとモーターリンモノクローナル抗体の複合体を作製するが、**single-dot** とモノクローナル抗体が一对一の対応で複合体するとは限らず、複数の量子ドットがまとまって一つのモノクローナル抗体と複合することもある。本研究で使用した導入方法は異なるが、透過型電子顕微鏡で量子ドットを観察した他の報告では、30 - 80 nm程度の **cluster** として量子ドットが観察されたと報告していた[44]。よって、本研究で使用した量子ドットは **single-dot** だけでなく **cluster** としても存在しており、電子顕微鏡では **cluster** での量子ドットを観察できたと考えている。

In vitro では細胞内にいくつもの量子ドットが確認されたが、電子顕微鏡では *in vitro* でみられたほど多くは観察できず、1つの細胞に1 - 2個の **cluster** 形

状をした量子ドットが観察できたこれは、細胞内に取り込まれた量子ドットが **single-dot** で存在していた場合、その大きさ・形状から細胞内構造物、特にリボソームと類似して観察されてしまい、その区別が非常に困難だったことがあげられる。形状としては、量子ドットはリボソームよりも球形に近く滑らかであることが推測されるが、電子顕微鏡での強拡大でも **10 - 20 nm** 程度の大きさを明瞭に観察することは困難であったため、比較的大きい **cluster** 形状のものが明瞭に同定しやすかったということがあった。また電子顕微鏡での切片の厚さが **70 nm** 程度と非常に薄いため、細胞内に立体的に分布していた量子ドットが切片作製時に標本の厚さの中には部分的にしか入らず、**in vitro** ほど多く同定できなかったと考えられた。

5. 8. 量子ドットについて

5. 8. 1. 未分化骨髄細胞への量子ドット導入

先行研究では、癌細胞におけるモータリンの局在が正常細胞と異なり細胞表面に局在すること、そしてこの特性を利用して抗モータリンモノクローナル抗体と量子ドットの複合体を作製し、癌細胞内に導入可能だったことを報告した [35, 36, 37]。しかし未分化骨髄細胞、骨髄間葉系幹細胞については、先行研究で抗モータリンモノクローナル抗体を使用して細胞内に量子ドットを導入可能だったと報告されているが [39, 40]、細胞内におけるモータリンの発現・局在に関してはまだ明らかとなっていない点が多い。また本研究で使用した間葉系幹細胞について、モータリンの発現・局在に関する検討・評価は行っていない。モータリンの発現・局在は量子ドット導入に関与する部分であり、間葉系幹細胞の純度や世代(継代)の違いによりモータリンの発現・局在に差がみられるのか、

今後検討が必要と考えられる。

5.8.2. 量子ドット導入率

量子ドットで蛍光された部位の多くは移植した間葉系幹細胞由来の細胞の存在を示していると考えられるが、完全な一致を示すためにはいくつかの点を検証する必要がある。

先行研究では量子ドットの細胞内導入率については80%程度と報告されていたが[38]、本研究では $93.3 \pm 2.0\%$ と向上していた(図12)。これは先行研究が報告された2007年以降、量子ドットの導入率を高めるために抗モーターリンモノクローナル抗体が改良され、モノクローナル抗体と量子ドットとが結合されやすくなったことが一因と考えられる。よって、本研究で使用した量子ドットは、先行研究と比較しても90%以上と高い導入効率で安定して導入されており、骨髄間葉系幹細胞の追跡マーカーの1つとして有用であると考えられた。それでも、量子ドットが導入されないまま移植された骨髄間葉系幹細胞が含まれている可能性がわずかながら存在している。100%の導入効率を目指すため、抗モーターリンモノクローナル抗体のさらなる改良が必要と考えられる。

5.8.3. 細胞分裂に伴う量子ドット希釈

量子ドットは、細胞質に存在しており、理論上は細胞が2分裂する際には半減するため、分裂を繰り返すことで量子ドットが希釈され、観察できなかった可能性がある。先行研究でKaulらは5回の細胞分裂後も量子ドットが細胞内に観察可能と報告していたが、分裂後の量子ドット希釈に関しては論じられていない[38]。他方、Yoshiokaらは量子ドットを導入した家兎骨髄間葉系幹細胞を基にして作製した三次元軟骨様組織を関節軟骨全層欠損に同種移植し、修復組

織における量子ドットの局在を観察したところ、移植後 8 週と比較し、26 週では蛍光が減弱していたと報告しており、その理由の一つに分裂後の量子ドット希釈を挙げている[40]。今後、細胞分裂と量子ドットの蛍光強度に関して、*in vitro* で細胞継代後 80 % - confluent となったところで蛍光顕微鏡による観察を行い、継代毎に細胞数当たりの蛍光面積を算出することで、細胞分裂(細胞継代)と量子ドットの希釈に関して評価が可能になると考えている。

5. 8. 4. 量子ドットの有無による骨新生の違い

先行研究では、家兔未分化骨髄細胞内に量子ドットを導入し、導入の有無に関わらず、骨髄細胞は骨、軟骨、脂肪への分化能を有していたことを報告した[39]。本研究では、量子ドット非導入群についても ALP 染色および TB 染色による評価を試みたが、凍結標本での評価だったため、特に ALP 染色では染色が薄いものや細胞形態が不明瞭だったものがみられ、陽染細胞かどうかの評価が困難なものが多く、量子ドットの有無による骨新生について定量的に比較評価することが困難であった。この比較を可能とするためには、採取した組織検体を半切り、一方を凍結標本作成用、もう一方を樹脂標本作成用として、細胞の固定保持に優れた樹脂標本から作製した ALP 染色・TB 染色により骨形態計測を行い、定量的に比較評価することが必要であると考えられる。

5. 9. 移植細胞の生着と骨新生

標識化した細胞が *in vivo* で細胞死を起こした場合、量子ドットがどのように組織内で処理されるのかはこれまで報告がない。貪食された後に組織から wash out されることが予想されるが、細胞が貪食された際に何らかの原因で量子ドットが細胞外に流出し、そのまま組織内に滞留し蛍光している可能性も考えられ

る。細胞外に流失した量子ドットについては、細胞死の同定に使用する TUNEL 染色と組み合わせ評価することで評価可能と思われる。よって、量子ドットの蛍光領域のうち、TUNEL 染色で陽染された部位(=細胞死となっている部位)を除いた領域が真の移植細胞の生着領域といえる。

この真の移植細胞の生着領域を同定することで、移植細胞の生着率や移植細胞由来の骨新生率といった定量評価が可能になると考えている。よって、1.9.3 での骨石灰化面の算出方法を参考にして、真の移植細胞の生着領域の長さを計測し、骨梁表面の長さで除して算出することで、骨梁表面での移植細胞の生着率が算出可能となると思われる。また、移植細胞由来の新生骨の割合は、真の移植細胞の生着領域と石灰化領域の重複部分の長さを計測し、石灰化領域の長さで除することで算出できると考えられる。

5. 10. 臨床に即したモデルでの検証

本研究では、同種移植ではなく自家移植により骨髄間葉系幹細胞を移植した。ヒトへの治療を念頭に置くと、幹細胞を同種移植することは、免疫学的にも倫理的にも障壁が大きい。また我々のグループで濃縮自家骨髄血移植を行っており、本研究は臨床治療に対する基礎的研究の一つとして進めてきた。自家移植によって骨髄間葉系幹細胞の分化・成熟を追跡し、移植した細胞が生着し直接骨新生に寄与していることを明らかにでき、有用な結果が得られたと考えている。

本研究では骨髄血から骨髄間葉系幹細胞を選別し培養した後に自家移植を行ったが、臨床では骨髄血から **buffy coat** を抽出し一期的に移植を行っている。また、骨壊死モデルとして先行研究の **Ogawa** らのモデルを使用した。臨床では濃縮自家骨髄血移植を行った症例の 8 割は大腿骨頭壊死であり、本研究で使用

した骨壊死モデルで完全に疾患を再現できているわけではない。よって臨床治療を考えた場合、より臨床に即した研究を進める必要がある。

5. 10. 1 濃縮自家骨髄血移植と骨髄間葉系幹細胞移植

本研究では培養した骨髄間葉系幹細胞を移植したが、臨床では骨髄細胞や血小板、成長因子を含んだ **buffy coat** を移植している。

臨床の観点から濃縮自家骨髄血移植と骨髄間葉系幹細胞移植を比較した場合、骨髄間葉系幹細胞移植は生体外での増殖培養が必要という点で障壁が大きい。間葉系幹細胞を生体外で培養した場合、細胞感染の可能性は骨髄血移植と比較して高くなることが想定される。また、間葉系幹細胞を増殖培養して移植した場合、細胞数は多く移植できるものの、**buffy coat** の投与で輸注される内皮前駆細胞などの細胞成分や、**FGF** をはじめとする血管新生に必要なサイトカイン等は全く輸注されないため、骨形成に必要な血管新生に対しては不利に作用する可能性があり、骨新生に有利に作用するかどうかは不明である。

よって、濃縮自家骨髄血移植と骨髄間葉系幹細胞移植とで、どちらがより骨新生に有効に作用するのか、検証する必要がある。研究デザインとして、骨壊死モデルは本研究と同様として、Jin らの報告[45]を参考にして家兎骨髄血から **buffy coat** を作製し、この **buffy coat** を 24 時間培養し底面に接着した骨髄間葉系幹細胞のみを移植した(=MSC)群、**buffy coat** を 24 時間培養した後の上清を移植した(=Buffy Coat without MSC)群、そして作製した **buffy coat** をそのまま移植した(=Buffy Coat)群、この 3 群について自家移植後の骨新生を評価することで、検証可能であると考えている。

また、骨髄間葉系幹細胞に加えて血管新生作用に寄与する内皮前駆細胞を合わせて移植した方が骨新生、血管新生とも有利に作用することが想定され、内

皮前駆細胞についての評価も必要であると考えている。過去にラットを使用して同一骨髓血から骨髓間葉系幹細胞と内皮前駆細胞を単離した報告があり[46, 47]、本研究でも予備実験としてこの報告をもとに家兎骨髓血から間葉系幹細胞と内皮前駆細胞を単離しようとしたが、内皮前駆細胞を単離培養することが困難だった。この原因として使用した培地や添加した成長因子などの適合不良が考えられた。その後、本研究とほぼ同じ週齢の家兎を使用して腸骨から採取した骨髓血から内皮前駆細胞を単離した報告があり[48]、培養条件などを参考にし、内皮前駆細胞が安定して単離できるか検証し、骨髓間葉系幹細胞のみを移植した群、内皮前駆細胞のみを移植した群、そして両者を同時に移植した群とで骨新生・血管新生を評価することを考えている。骨髓間葉系幹細胞および内皮前駆細胞の細胞追跡については、2種類の波長の異なる量子ドットでそれぞれ標識化することで同一標本での評価が可能であり、それぞれの細胞の局在と骨新生・血管新生の局在との関連性を明らかにできると考えている。

5. 10. 2 疾患モデルを用いた検討

疾患モデルを用いた基礎研究の一つとして、家兎ステロイド性大腿骨頭壊死症を使用した研究を考えている。家兎ステロイド性大腿骨頭壊死症についてのこれまでの報告として、Nishida ら、Mikami らの報告がある[49, 50]。Nishida らは 28-32 週の家兎に対してメチルプレドニゾロン(20 mg/kg)を筋肉内注射で単回投与し 2 週間後には 70 % (21/30)で大腿骨頭壊死が得られたと報告した[49]。Mikami らは、3.5 kg の家兎に対してメチルプレドニゾロン(40 mg/kg)を筋肉内注射で単回投与し 2 週間後に 93 % (14/15)で大腿骨頭壊死が得られたと報告した[50]。

これらの報告をもとに、ステロイド性大腿骨頭壊死に関しての予備実験を以

下の通り行った。設定週数を本研究と同一の 12 週として、メチルプレドニゾロン(40 mg/kg)を単回投与し 2 週後に大腿骨頭壊死の有無につき左右それぞれで組織学的評価を行った。20 羽中 10 羽が 2 週未満で死亡し[平均 9.0 (6 - 13)日]、生存した 10 羽 20 個のうち骨壊死が得られたものは 40 % (8/20)であった。また死亡した 10 羽 20 個の大腿骨頭組織も観察したが、このうち大腿骨頭壊死を発症していたものは 15 % (3/20)であった。2 週未満で死亡した 10 羽に関して、筋注した部位には腫脹・排膿などの感染徴候はみられなかった。

ステロイド投与後早期の死亡率が高かった原因として、手技は筋注によるステロイド投与のみで創部感染は否定的であったが、ステロイド投与による副作用(ショック、血圧異常、易感染性など)が考えられた。また生存しても大腿骨頭壊死の発症率が他の報告と比較して低く、疾患モデルとして安定した結果が得られなかった。Nishida らおよび Mikami らの報告での設定モデルが 28 - 32 週、あるいは 3.5 kg 相当と成熟した家兎を使用していたが[49, 50]、予備実験では本研究で用いた骨壊死モデルと同様に 12 週、2.5 kg 程度と幼若な家兎を使用することが影響したと考えられた。

ただし、先行研究で Yoshioka らは、成熟家兎から骨髄穿刺針によって採取した骨髄細胞は幼若家兎と比較して増殖能・分化能が低かったと報告しており[40]、ヒトでの報告でも年齢、ステロイドの使用により骨髄前駆細胞の増殖能、分化能が低下するとの報告がある[51]。よって、設定を本研究での 12 週から Nishida らと同じ 28 - 32 週に変更することを考えた場合、高週齢の家兎での骨髄間葉系幹細胞の増殖能、分化能などの特性に関する検証が必要と考えられた。また、実際の臨床ではステロイド投与後骨壊死を発症した後、治療のために骨髄細胞を採取しており、骨髄間葉系幹細胞の特性がステロイド投与によりどう影響を受けるのか、合わせて検証することが必要と思われた。

5. 10. 3 骨新生促進に関する検討

より早期から骨新生を促進させるために、骨粗しょう症の治療薬として使用されているテリパラチド(Teriparatide)に注目している。テリパラチドはヒト副甲状腺ホルモン活性部分であるN端側34個のアミノ酸で構成された遺伝子組換えペプチド(PTH[1-34])である。PTH[1-34]は、過去にラットでの長期投与(2年間)で骨肉腫が発生したと報告されたことがあったが[52]、その後の検証で投与期間と量に依存することが報告され[53]、その有効性と安全性が確認されたため、日本では2010年7月より臨床使用が開始されている。主な作用として、骨髄前駆細胞からの骨芽細胞への分化促進作用と骨芽細胞のアポトーシス抑制作用があり、骨梁ならびに皮質骨の内膜及び外膜面において、骨芽細胞の機能を活性化し骨新生を促進するといわれている。Nakajimaらはラットを使った研究でPTH[1-34]の間欠投与により仮骨の骨密度や力学強度を有意に増加させ骨折治癒を促進したことを報告しており[54]、臨床でもPTH[1-34]の間欠投与により高齢女性での恥骨骨折後の骨折治癒を有意に促進したとの報告がみられた[55]。こうした結果を踏まえ、自家骨髄血移植後PTH[1-34]を投与することで、移植後分化した骨芽細胞にPTH[1-34]が作用し、より早期から十分な骨新生効果が得られるのではないかと考えられた。今後、本研究で用いた家兎骨壊死モデルを使用して骨髄血移植後PTH[1-34]製剤を間欠投与し、壊死骨内の骨新生を評価する研究を計画しており、その有効性や安全性を確認できれば、より骨新生効果の高い治療として臨床への応用が早期より期待できる。

第6章 結論

家兎骨壊死組織に移植した自家骨髄間葉系幹細胞は、移植後生着し、直接骨芽細胞へ分化し骨新生に作用していることを、量子ドットを細胞追跡マーカーとして使用した実験系で明らかにした。また量子ドットは24週経過しても蛍光が減弱することなく観察可能で、骨髄間葉系幹細胞の追跡マーカーの1つとして有用であった。今後、より臨床疾患に即した動物モデル、臨床治療に近い移植方法、他の治療との併用など様々な角度から検討を行い、臨床で行ってきた骨壊死に対する濃縮自家骨髄血移植の有用性を明らかにするとともに、さらに骨新生効果が期待される治療を基礎的研究で検証し、臨床治療につなげていく必要がある。

図・表

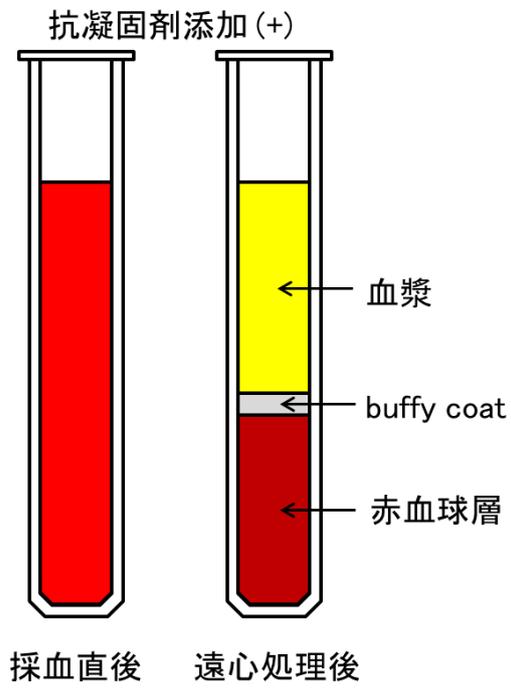
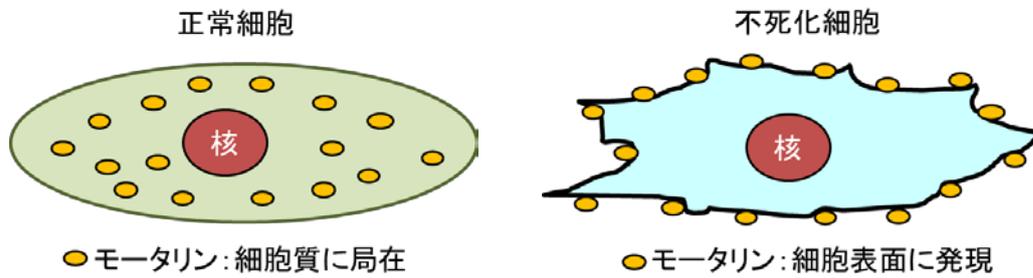
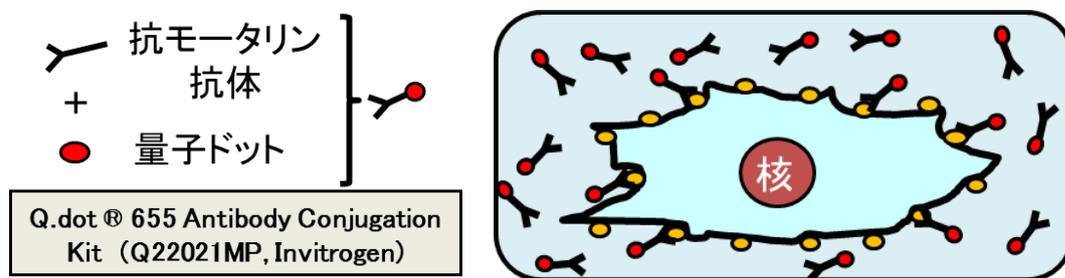


図 1 Buffy coat : 血漿と赤血球の間の灰白色の薄層 (文献 15 より)

A



B



C

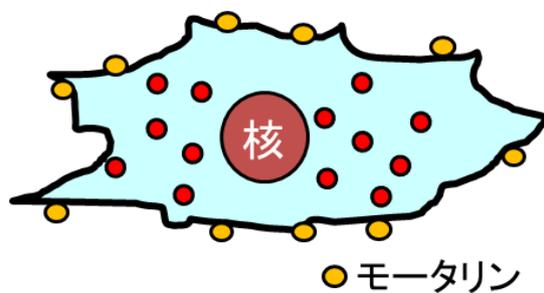


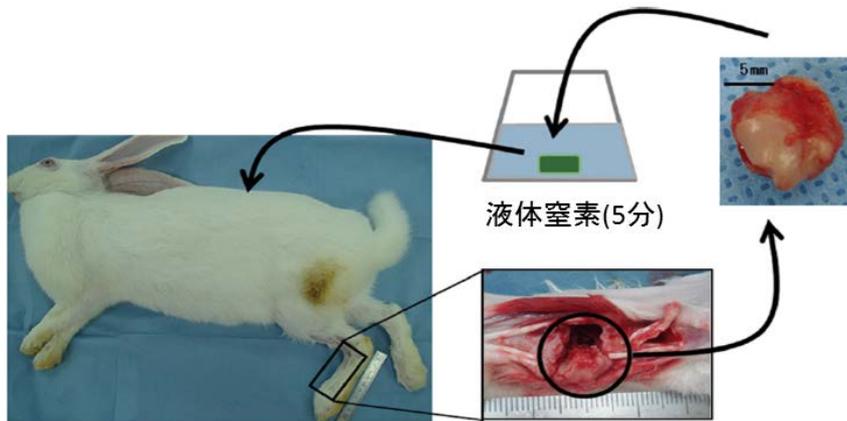
図2 量子ドットの導入

A : 正常細胞と不死化細胞とで細胞内におけるモーターリンの局在が異なる

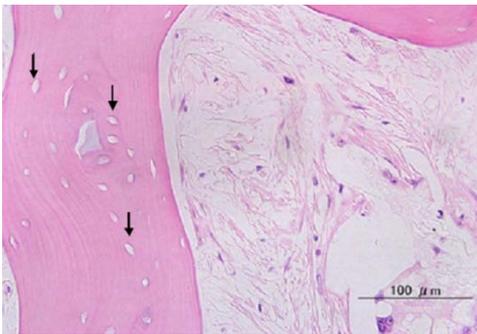
B : 量子ドットを結合させた抗モーターリンモノクローナル抗体と、細胞膜に発現したモーターリンが、抗原抗体反応により結合

C : エンドサイトーシスにより量子ドットは細胞内へ取り込まれる

A



B



C

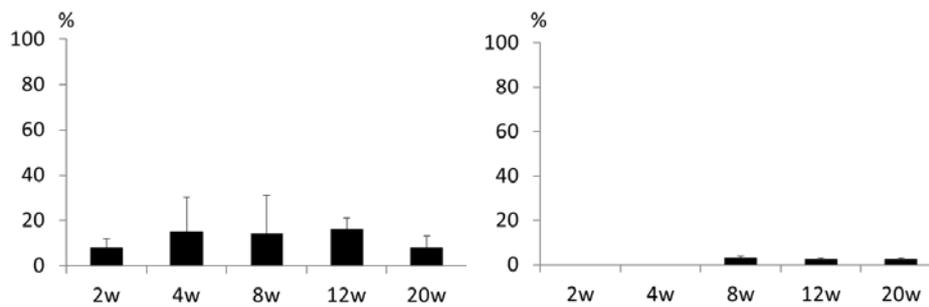


図3 家兎第4足根骨を用いた骨壊死モデル *参考文献 39 より(一部改編)

A: 概要. B: 脱灰組織標本(HE 染色, 移植後 20 週). 骨細胞は empty lacunae(矢印)で骨髓腔には線維性組織が存在. C: 骨石灰化面(左), 骨芽細胞面(右).

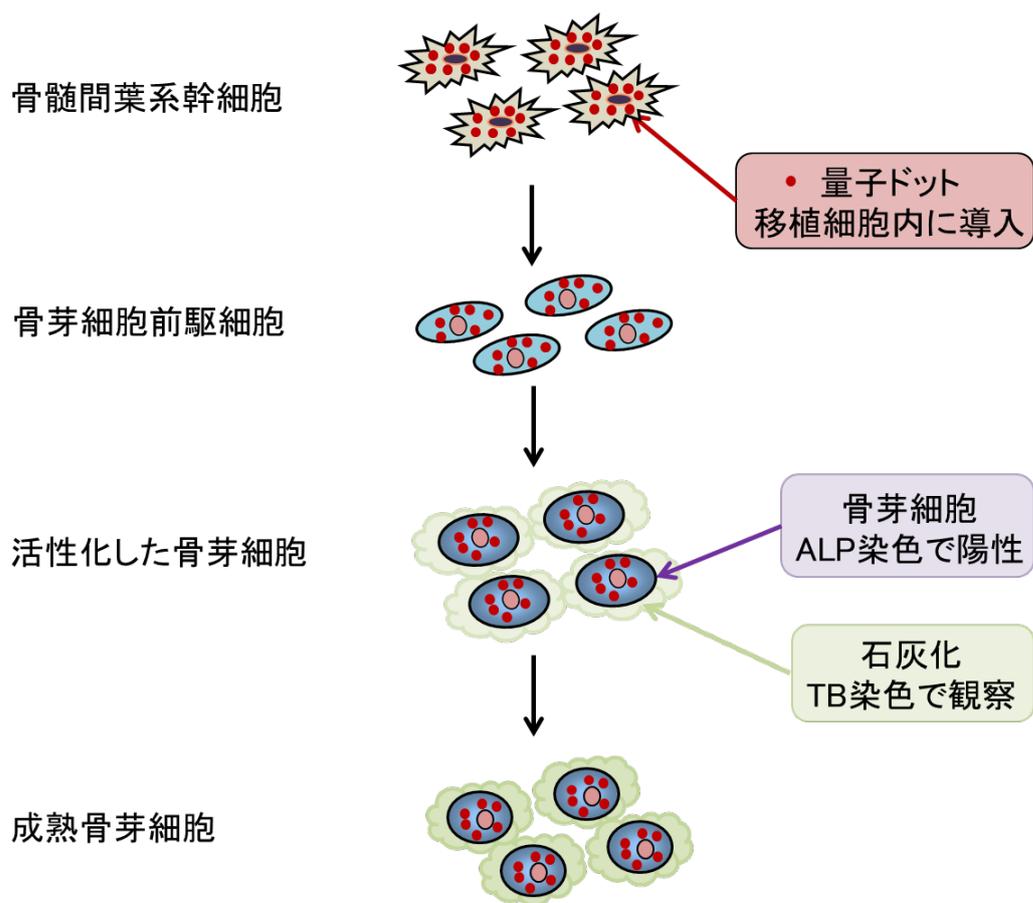


図 4 自家骨髄間葉系細胞移植後の細胞追跡

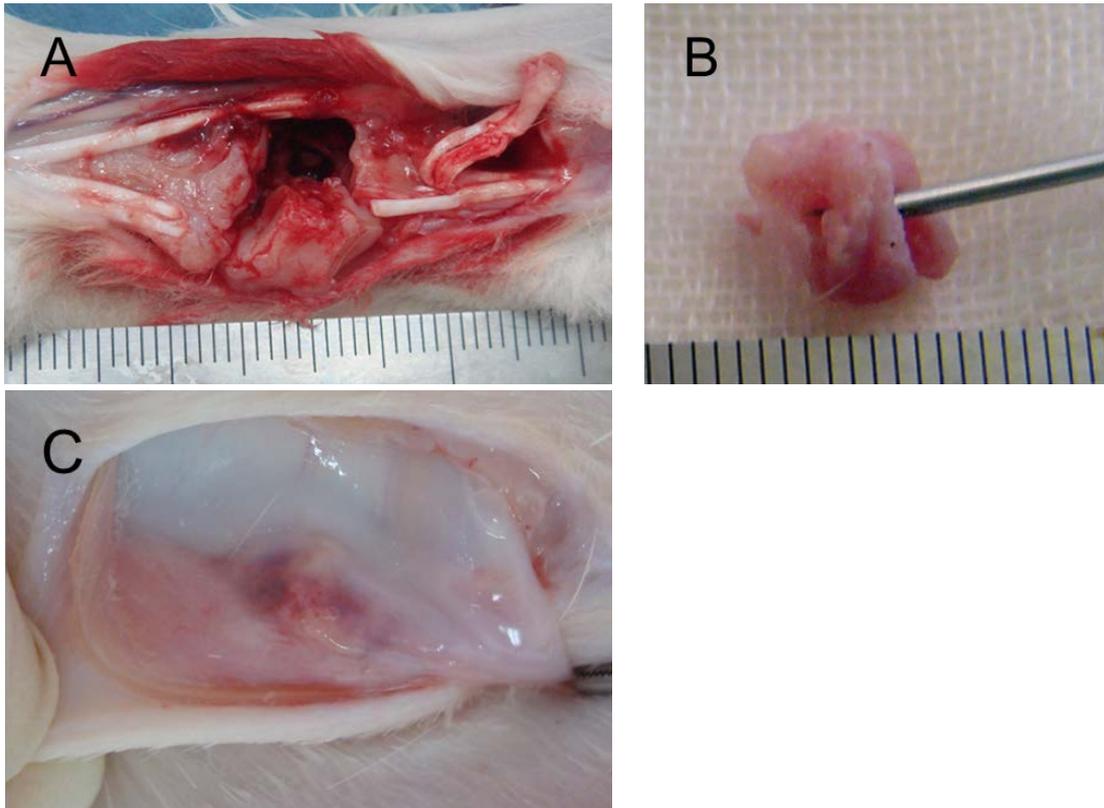


図5 骨壊死モデルの作製

A：足部外側にある第4足根骨を採取後、液体窒素に5分間浸漬

B：皮質骨3面に骨孔を開け、移植細胞注入ガイドとして骨孔に18ゲージ針を
刺入し、背面皮下に留置(18G針は移植細胞注入後に抜去)

C：背面皮下に留置した壊死骨(組織採取直前)

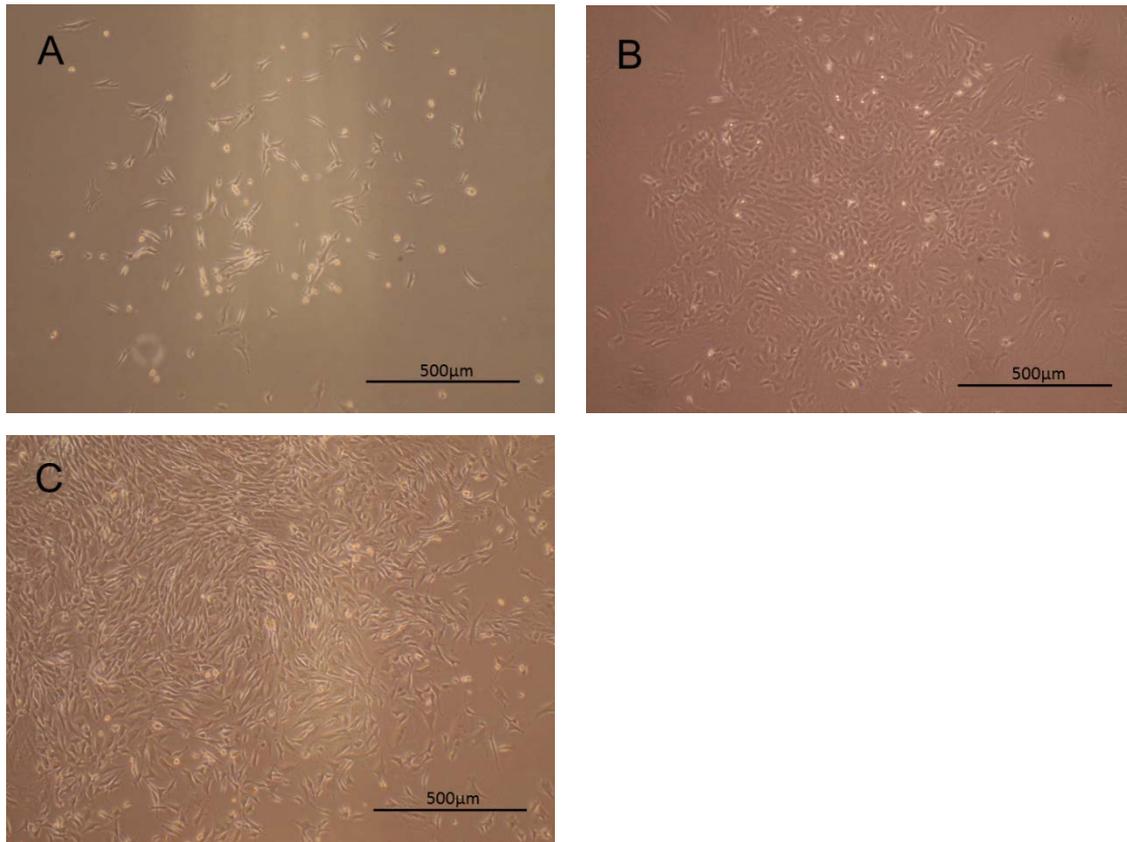


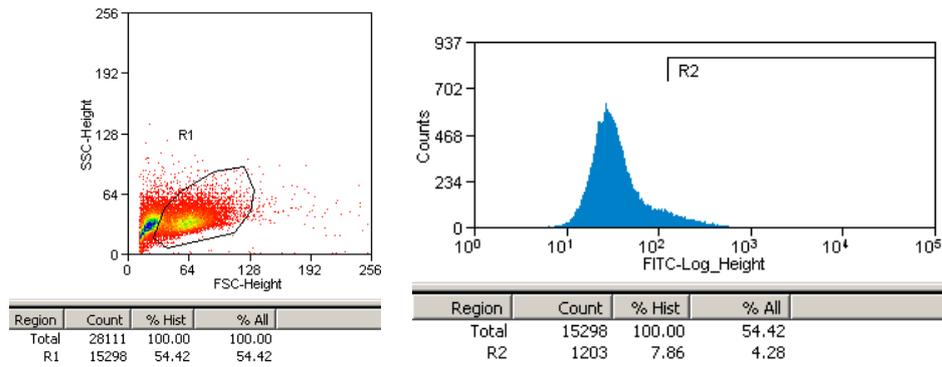
図6 家兎骨髄間葉系幹細胞の培養

A：初回培養開始 24 時間後 接着細胞を確認

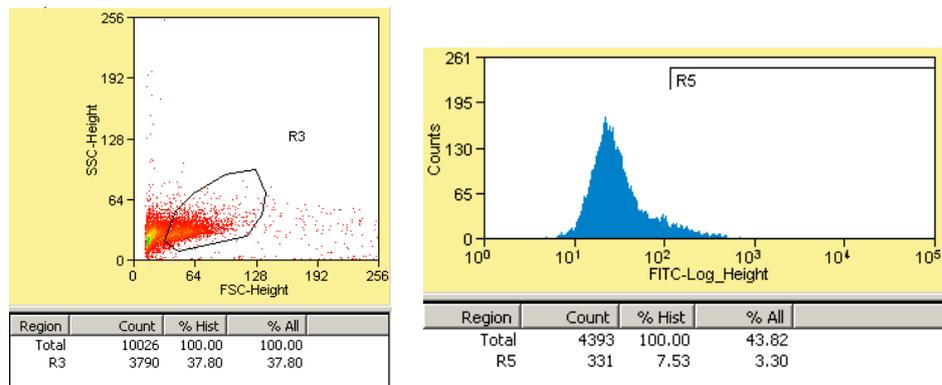
B：初回培養から 12 日後 コロニーを形成

C：初回継代 5 日後 細胞がフラスコ底面の 80%を占めた状態(80 %-confluent)

A



B



C

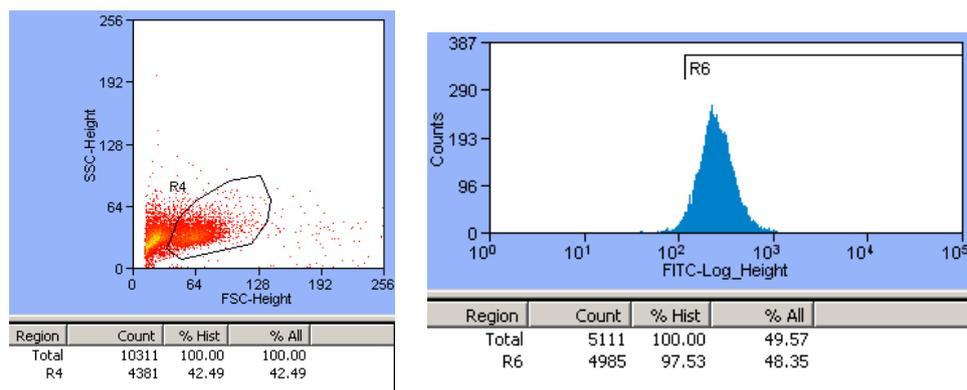
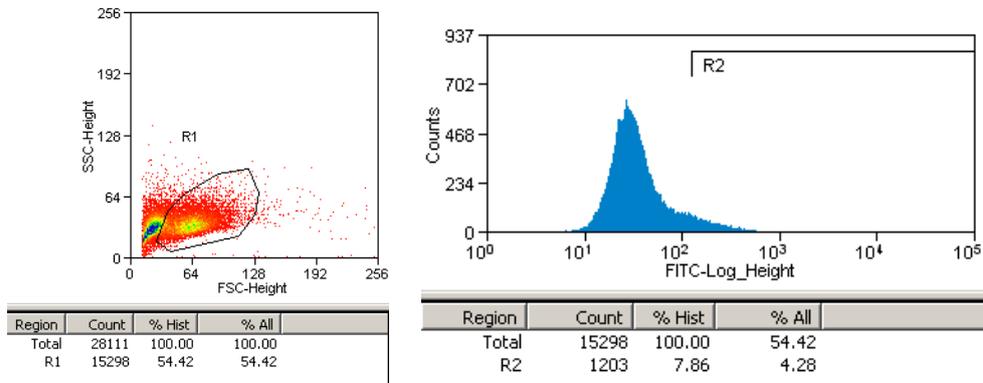


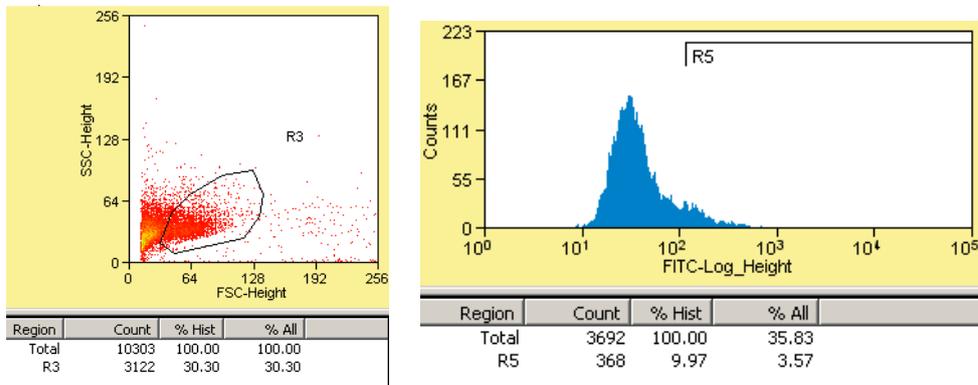
図7 骨髄間葉系幹細胞の表面抗原マーカー評価：CD81

A : Non-stain. B : IgG. C : CD81.

A



B



C

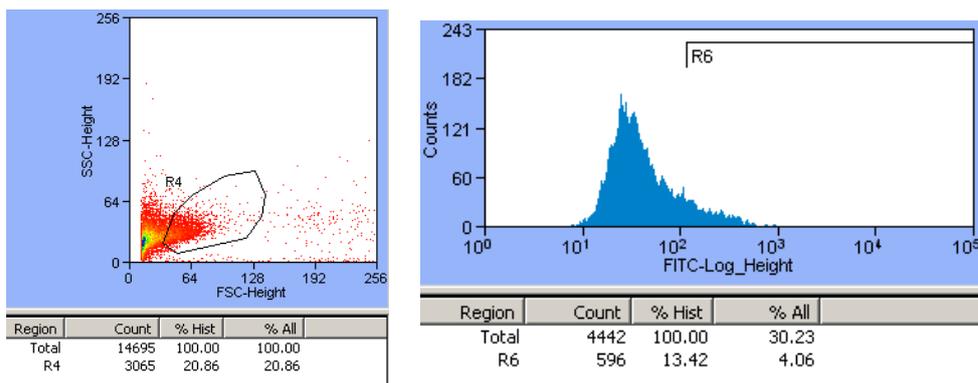
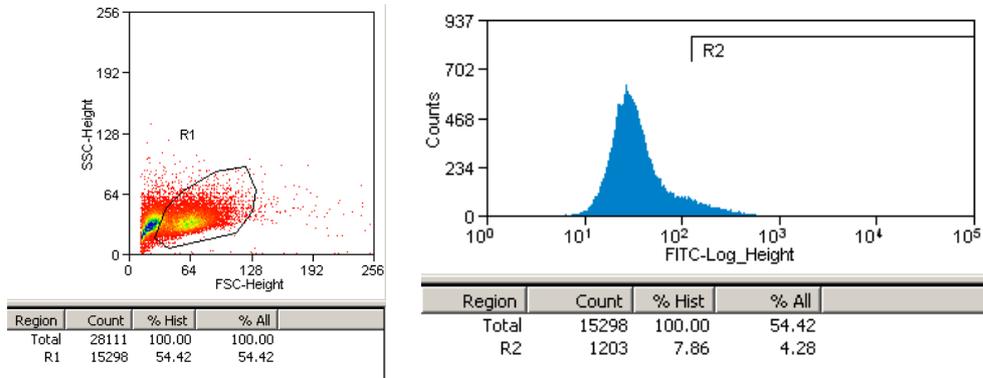


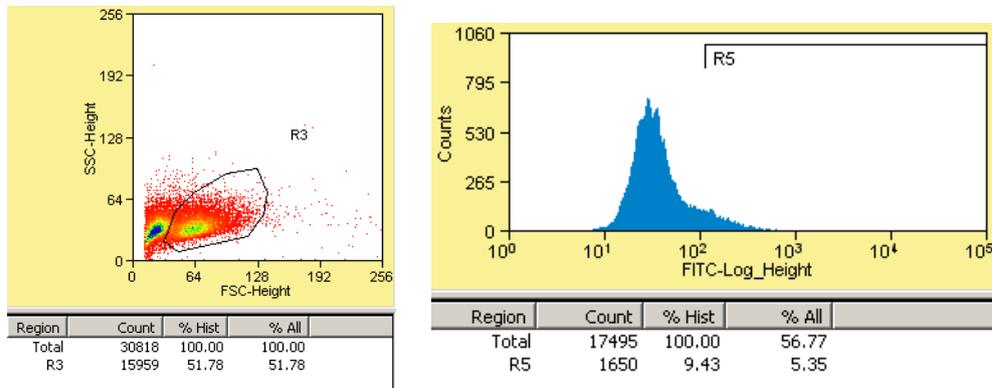
図 8 骨髄間葉系幹細胞の表面抗原マーカー評価：CD34

A : Non-stain. B : IgG. C : CD34.

A



B



C

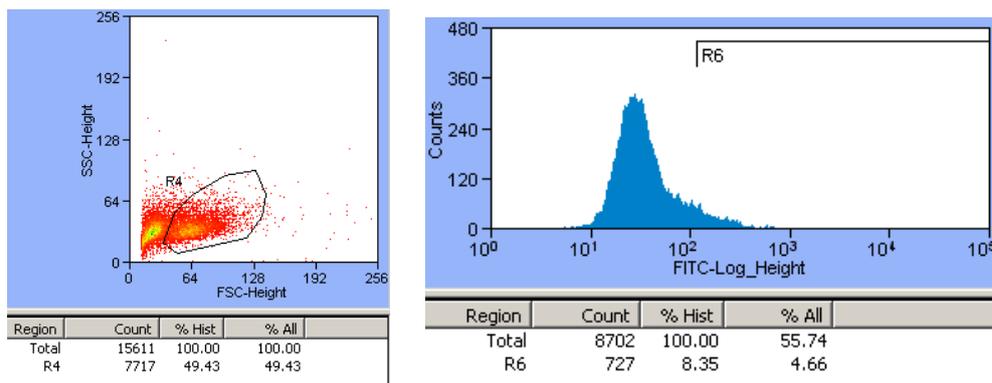


図9 骨髄間葉系幹細胞の表面抗原マーカー評価：HLA-DR

A : Non-stain. B : IgG. C : HLA-DR.

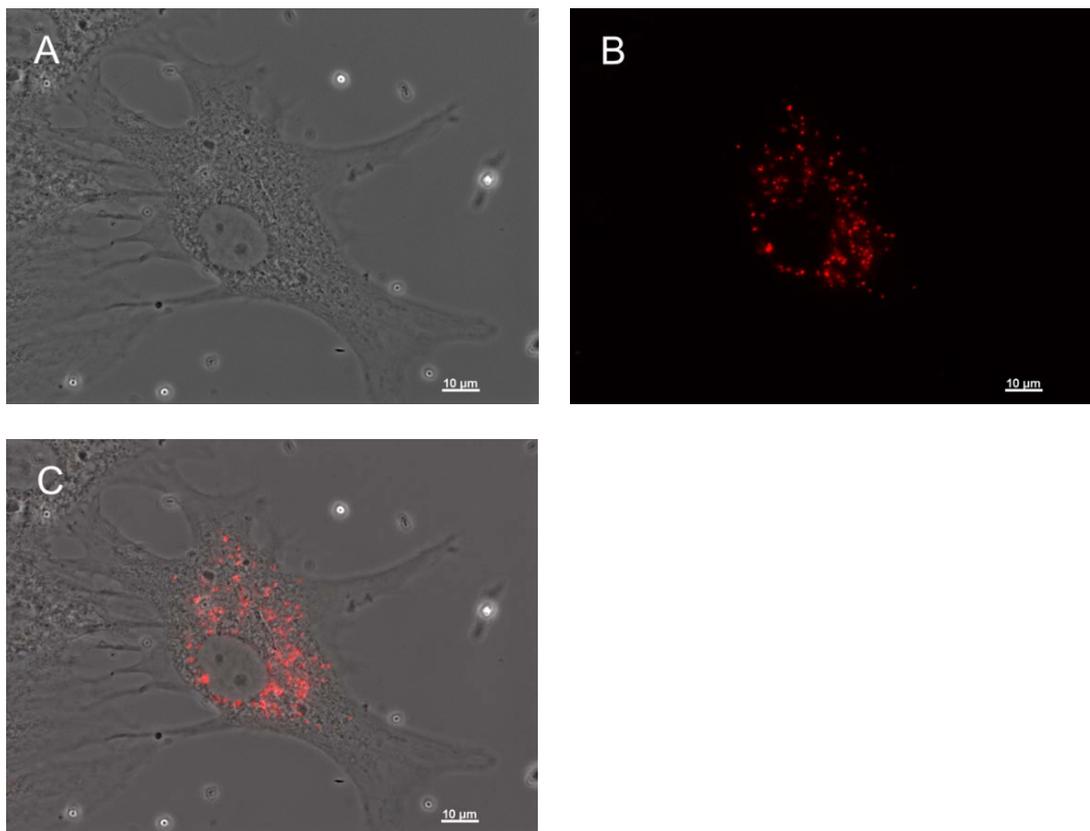


図 10 量子ドットを導入した骨髄間葉系幹細胞

A : Bright. B : QD655. C : Merged.

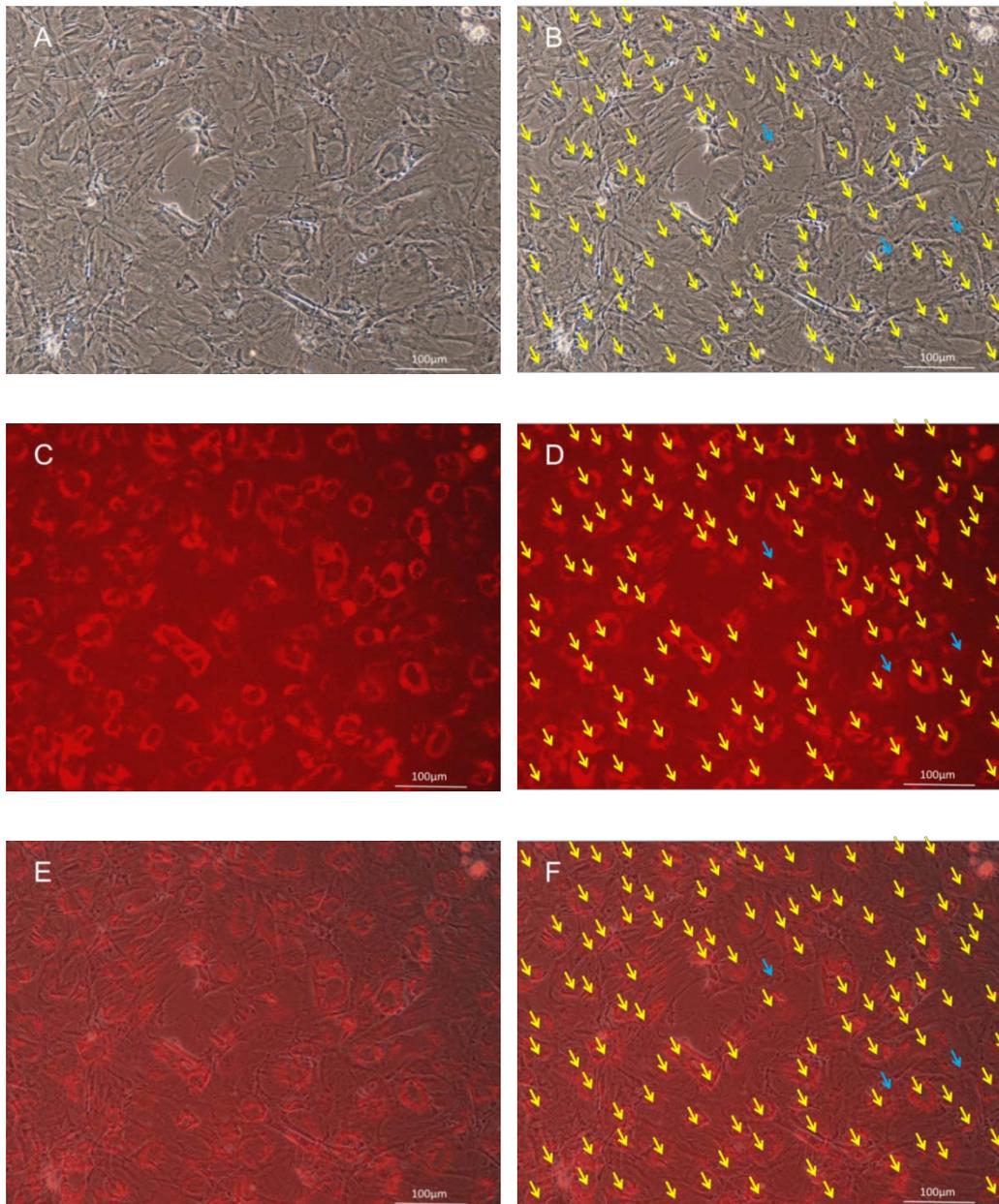


図 11 量子ドット導入率の評価

A・B : Bright. C・D : QD655. E・F : Merged.

黄矢印 : 導入細胞、青矢印 : 非導入細胞

上図 : 総細胞数 : 101, 導入細胞 : 98, 量子ドット導入率 : 97.0% (98/101)

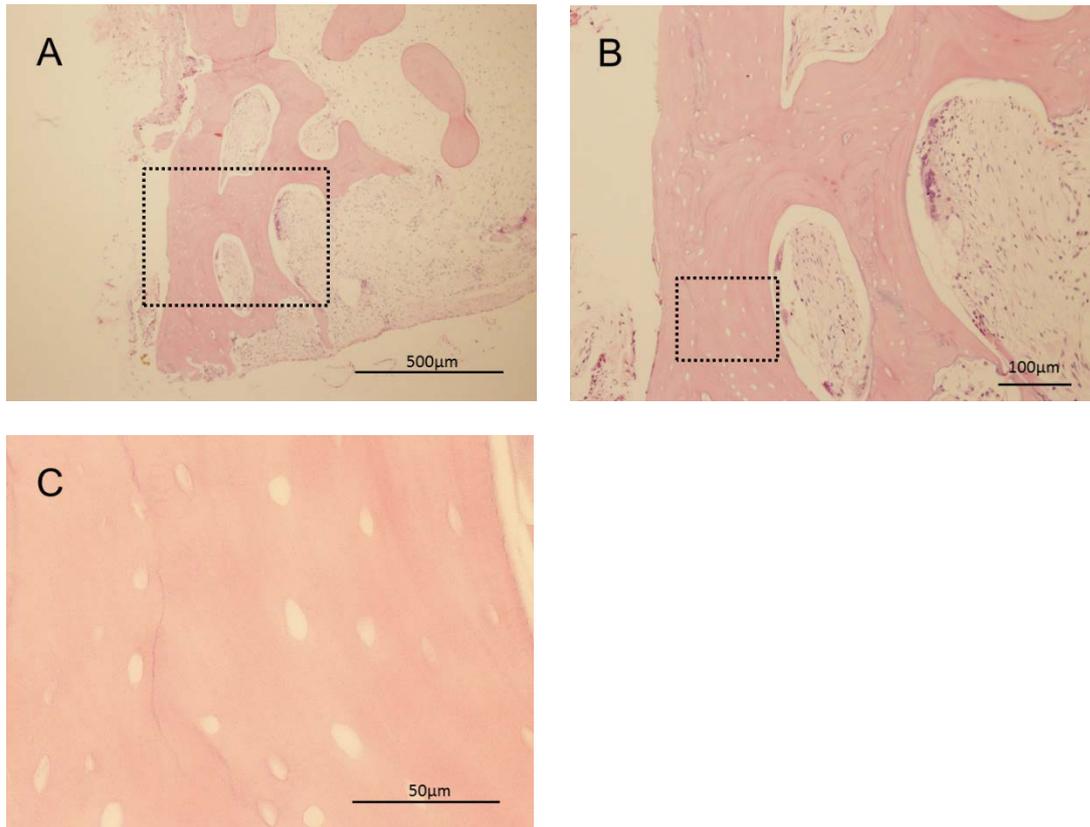


図 12 骨壊死モデルの 24 週経過における組織

A : 弱拡大

B : 中拡大(図 A の点線で囲まれた範囲)

C : 強拡大(図 B の点線で囲まれた範囲)

核は空胞化(empty lacunae)しており、骨壊死の状態を維持

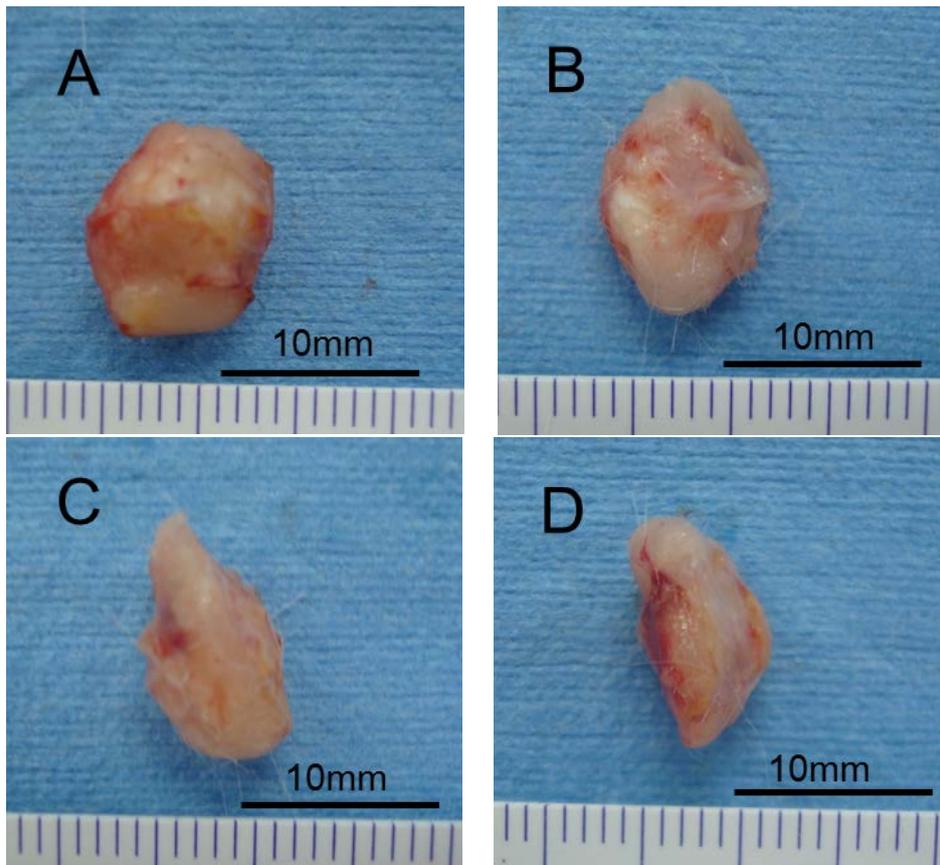


図 13 肉眼評価

A : 移植後 4 週

B : 移植後 8 週

C : 移植後 12 週

D : 移植後 24 週

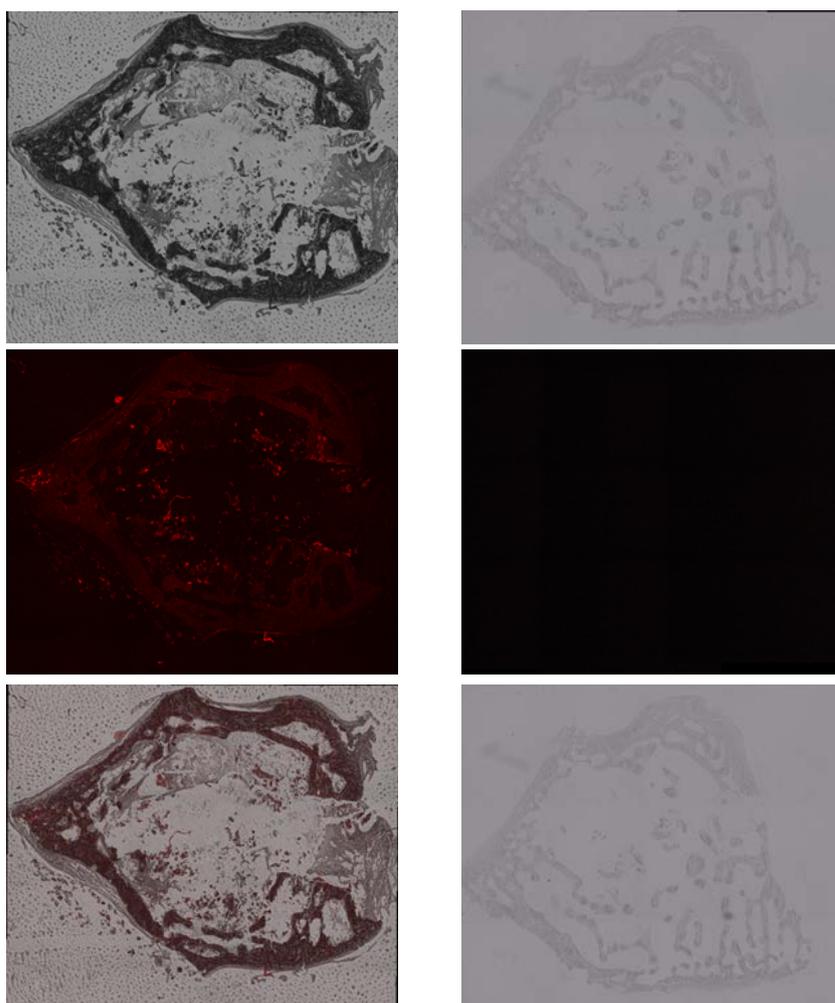


図 14 蛍光顕微鏡による量子ドットの観察

左：量子ドット導入群

右：量子ドット非導入群

左右いずれも、上：Bright. 中：QD655. 下：Merged.

非導入群は 4, 8, 12, 24 週とも量子ドットの蛍光がないことを確認

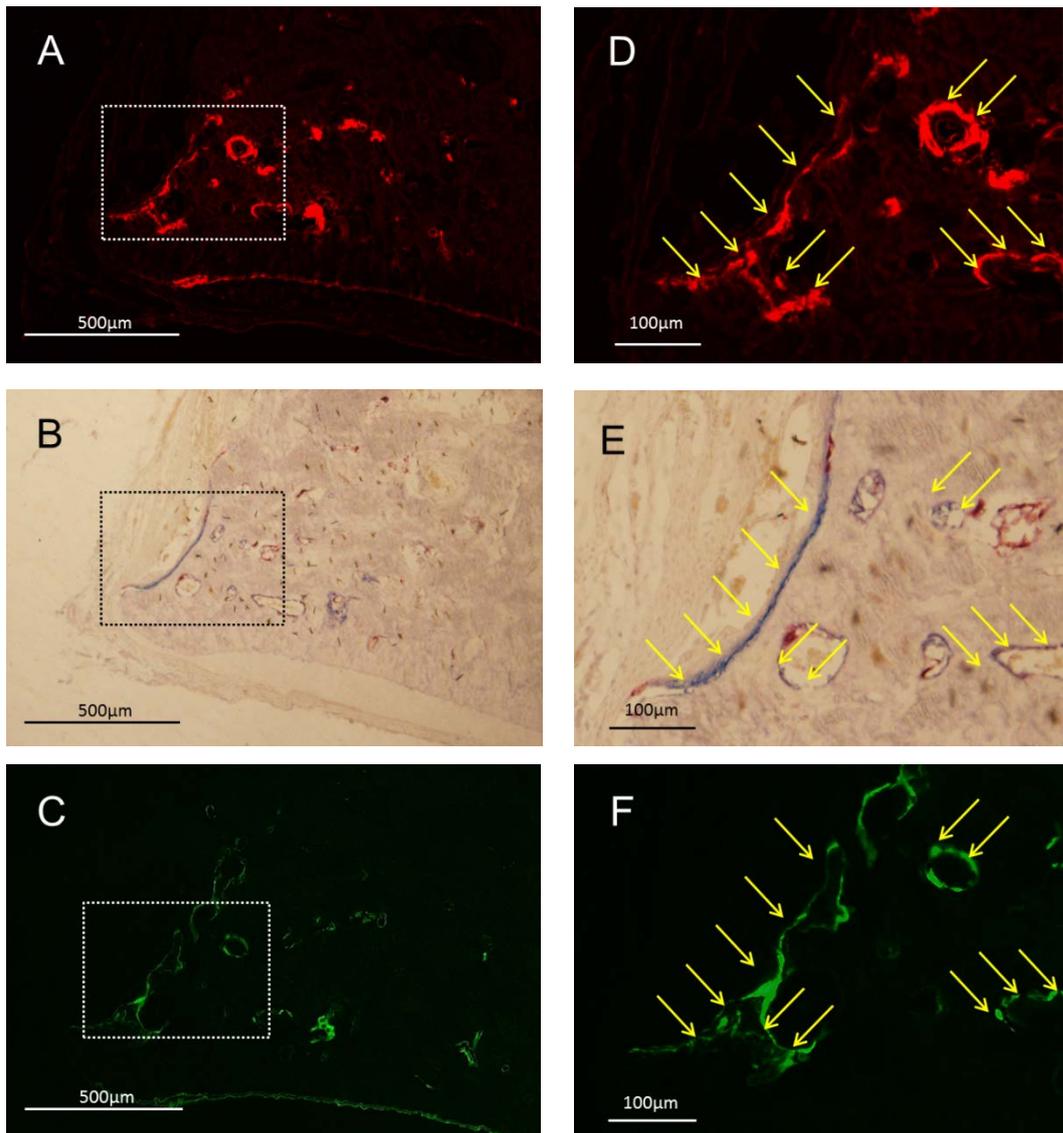


図 15 移植後 4 週 組織評価

A : 量子ドット(QD655). B : ALP 染色. C : TB 染色(暗視野).

D : 図 A の点線で囲まれた範囲. E : 図 B の点線で囲まれた範囲. F : 図 C の点線で囲まれた範囲.

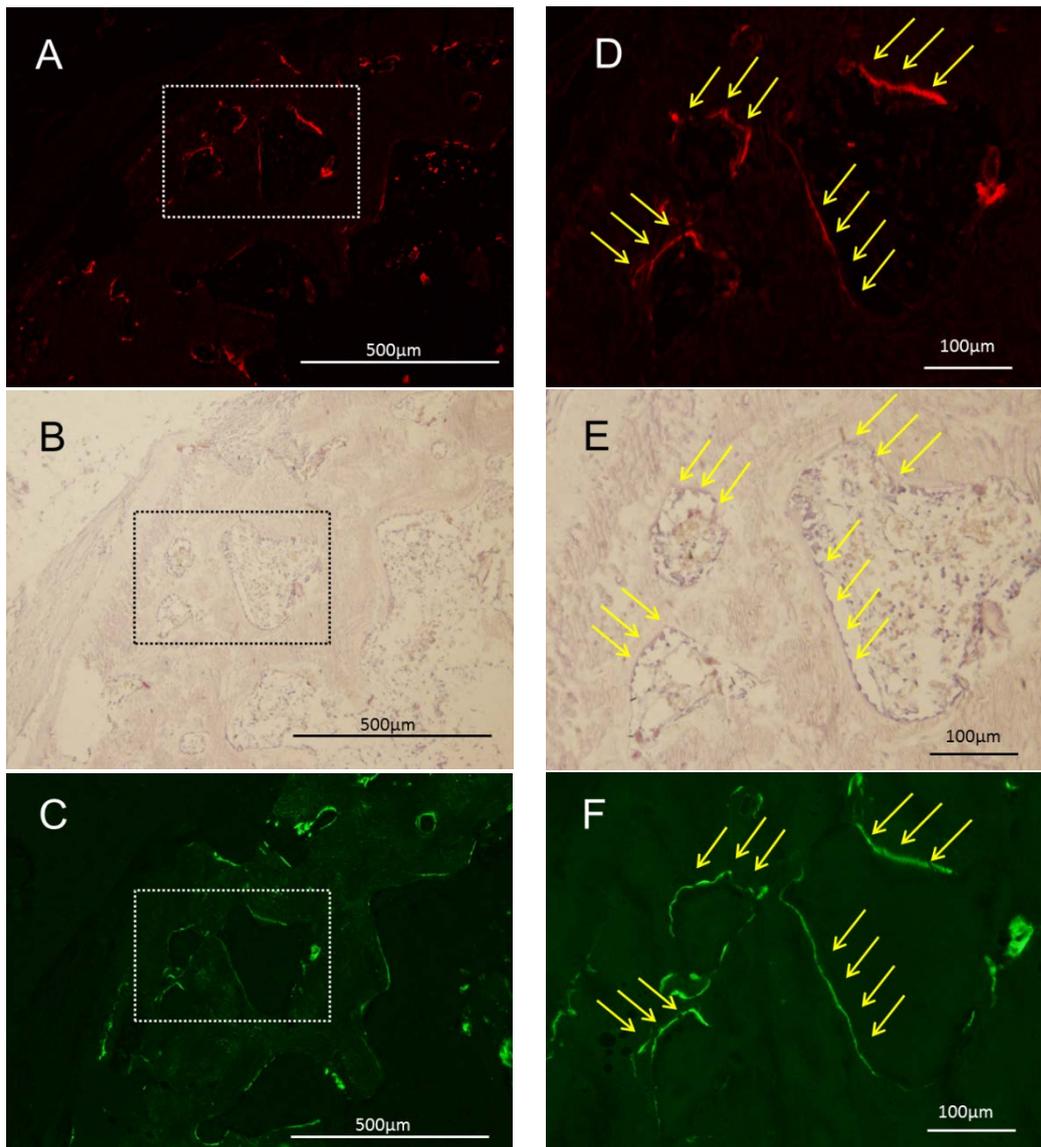


図 16 移植後 8 週 組織評価

A : 量子ドット(QD655). B : ALP 染色. C : TB 染色(暗視野).

D : 図 A の点線で囲まれた範囲. E : 図 B の点線で囲まれた範囲. F : 図 C の点線で囲まれた範囲.

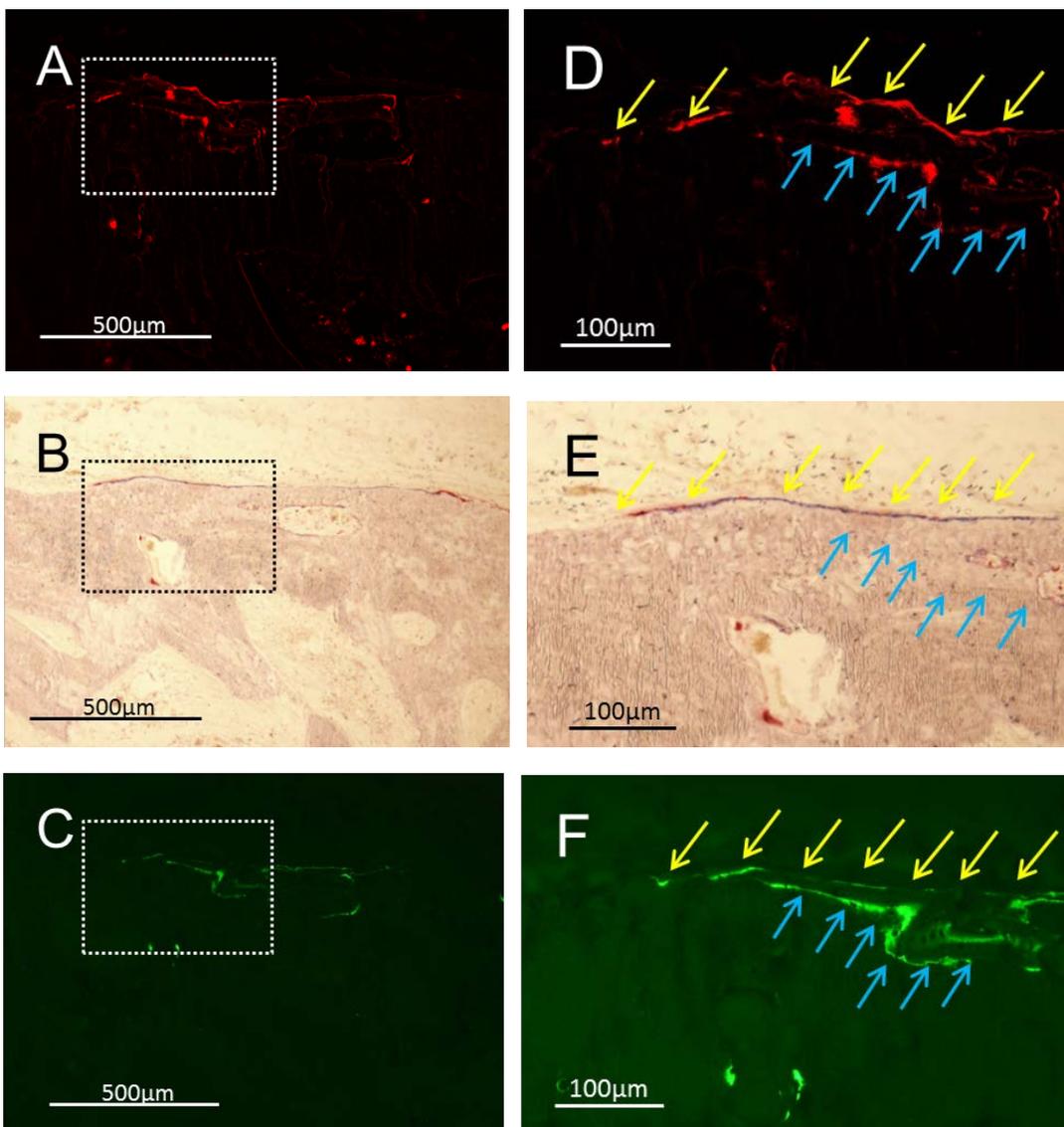


図 17 移植後 12 週 組織評価

A : 量子ドット(QD655). B : ALP 染色. C : TB 染色(暗視野).

D : 図 A の点線で囲まれた範囲. E : 図 B の点線で囲まれた範囲. F : 図 C の点線で囲まれた範囲.

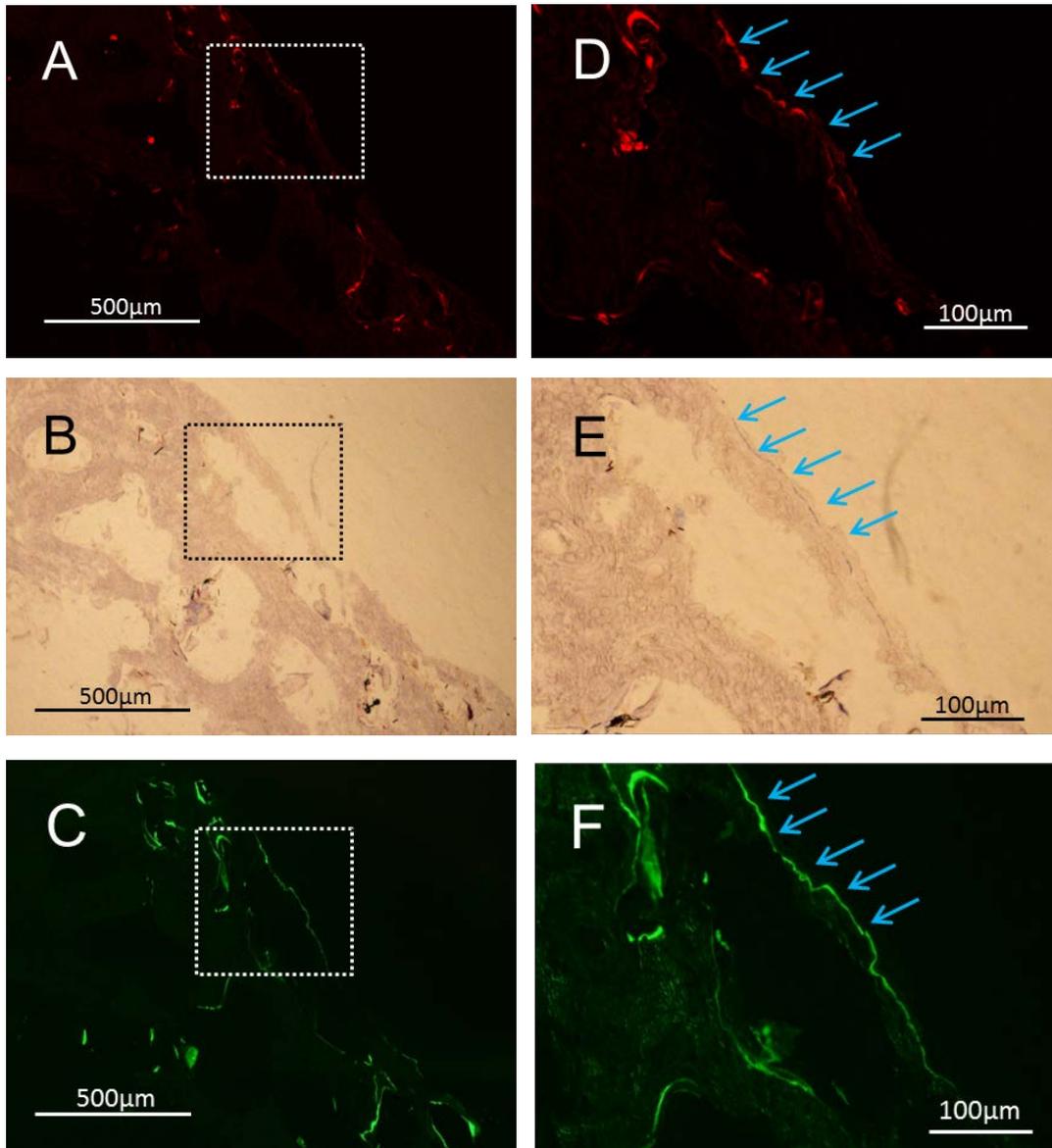


図 18 移植後 24 週 組織評価

A : 量子ドット(QD655). B : ALP 染色. C : TB 染色(暗視野).

D : 図 A の点線で囲まれた範囲. E : 図 B の点線で囲まれた範囲. F : 図 C の点線で囲まれた範囲.

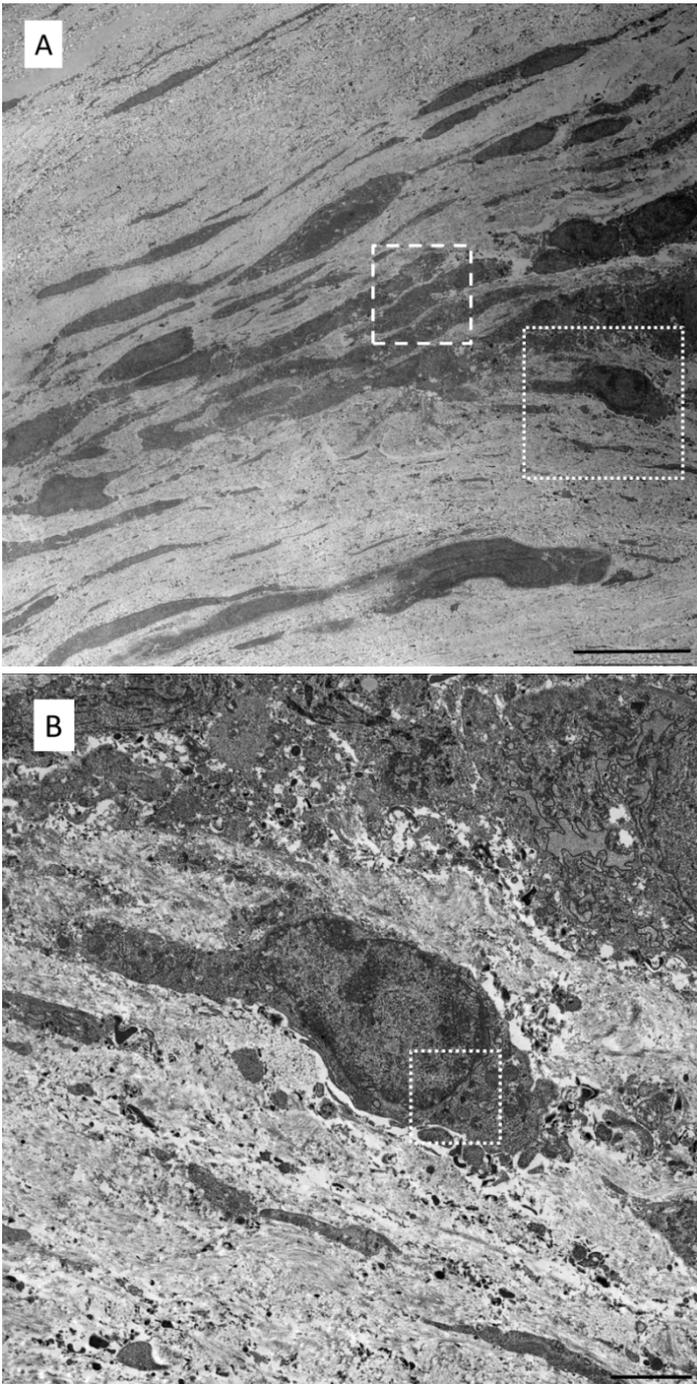


図 19 電子顕微鏡による評価

A : 弱拡大像 (Scale bar)= 10 μm

B : A の点線で囲まれた範囲を拡大 (Scale bar)= 1 μm

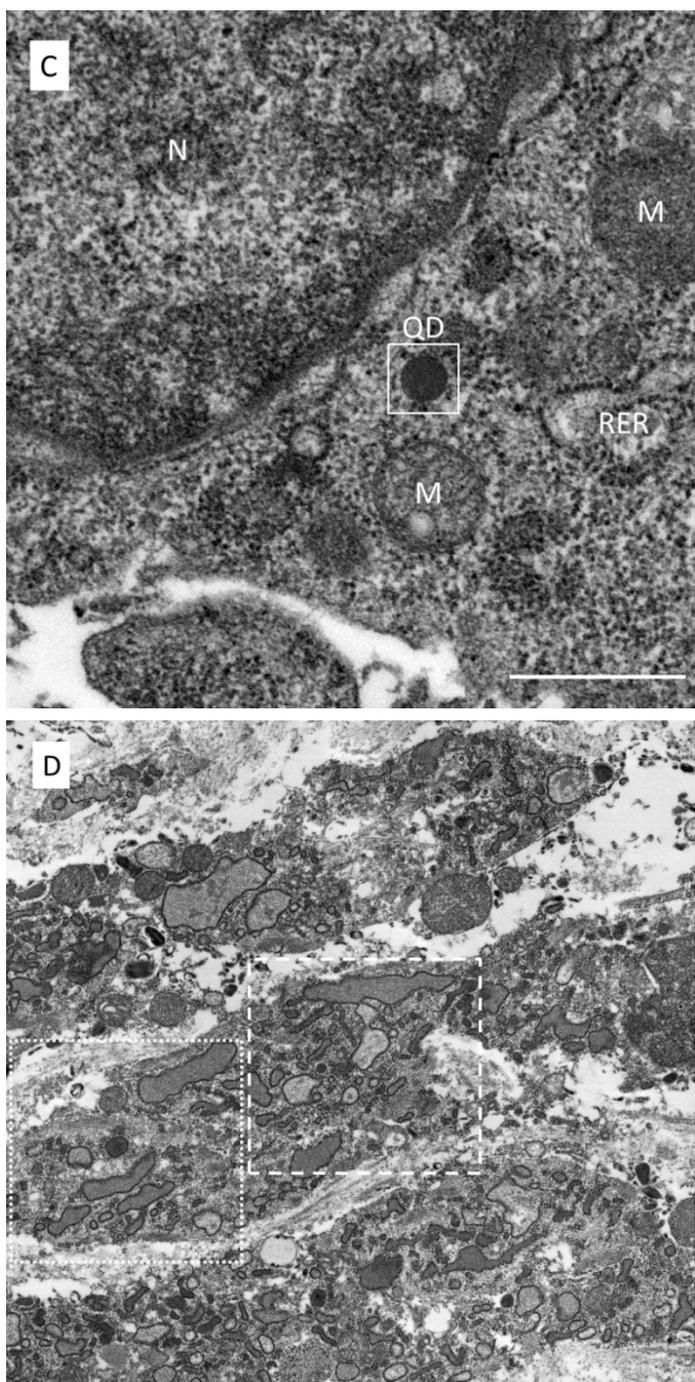


図 19 電子顕微鏡による評価

C : B の点線で囲まれた範囲を拡大 (Scale bar)= 500 nm

D : A の破線で囲まれた範囲を拡大 (Scale bar)= 1 μ m

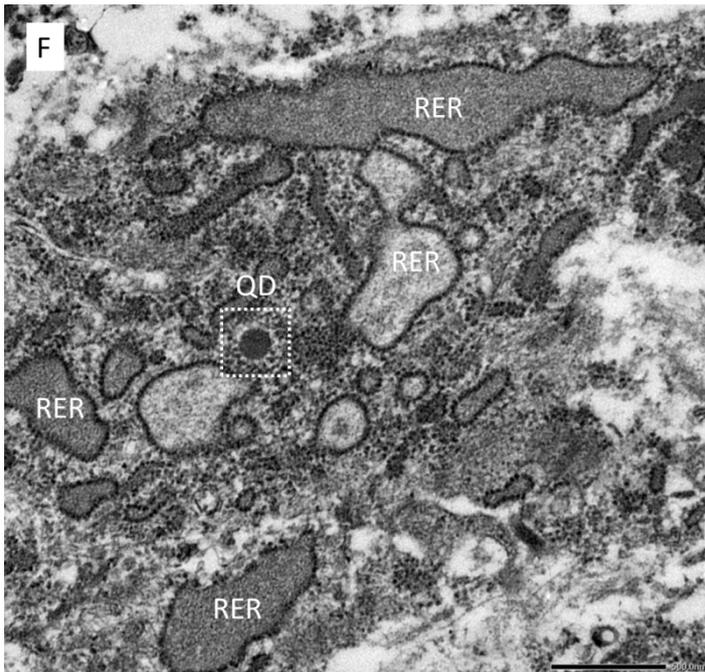
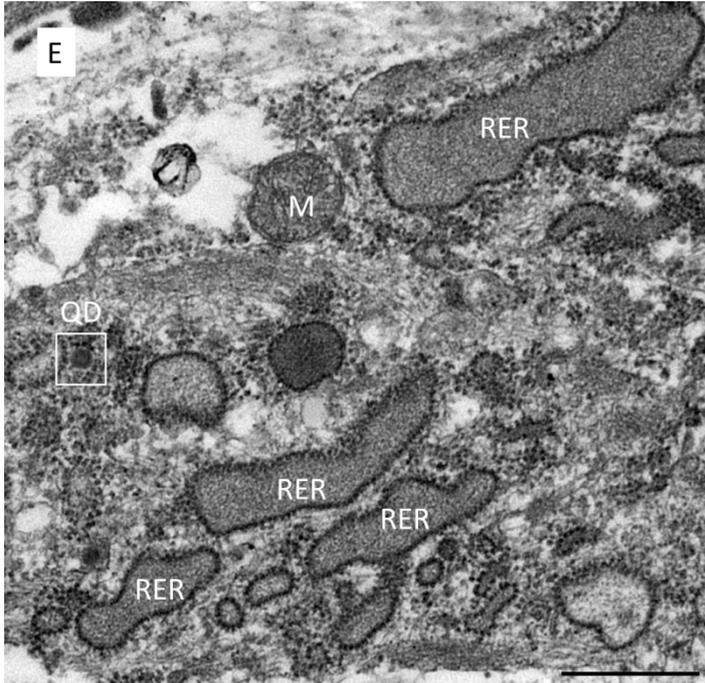


図 19 電子顕微鏡による評価

E : D の点線で囲まれた範囲を拡大 (Scale bar)= 500 nm

F : D の破線で囲まれた範囲を拡大 (Scale bar)= 500 nm

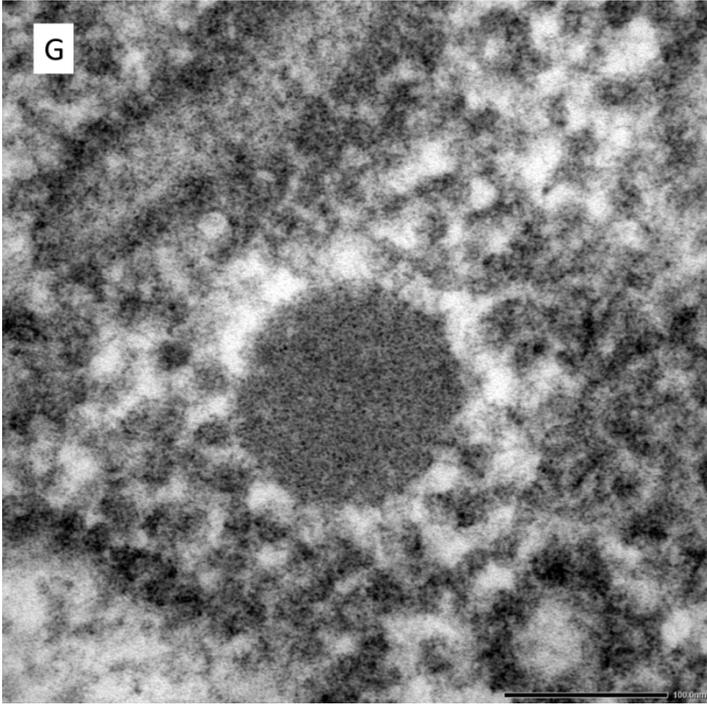


図 19 電子顕微鏡による評価

G : F の点線で囲まれた範囲を拡大 (Scale bar)= 100 nm

*M: Mitochondria (ミトコンドリア), N: Nucleus (核), QD: Quantum dot (量子ド

ット), RER: Rough endoplasmic reticulum (粗面小胞体)

引用論文

1. 松野丈夫. 標準整形外科学(第 8 版); p. 219-223, 2002
2. Fukushima, W., et al., Nationwide epidemiologic survey of idiopathic osteonecrosis of the femoral head. Clin Orthop Relat Res, 2010. 468(10): p. 2715-24.
3. Lieberman, J.R., et al., Which factors influence preservation of the osteonecrotic femoral head? Clin Orthop Relat Res, 2012. 470(2): p. 525-34.
4. Wang, G.J., et al., The effect of core decompression on femoral head blood flow in steroid-induced avascular necrosis of the femoral head. J Bone Joint Surg Am, 1985. 67(1): p. 121-4.
5. Mont, M.A., et al., Corrective osteotomy for osteonecrosis of the femoral head. J Bone Joint Surg Am, 1996. 78(7): p. 1032-8.
6. Atsumi, T., et al., Posterior rotational osteotomy for nontraumatic osteonecrosis with extensive collapsed lesions in young patients. J Bone Joint Surg Am, 2006. 88 Suppl 3: p. 42-7.
7. Charnley, J., Arthroplasty of the hip. A new operation. Lancet, 1961. 1(7187): p. 1129-32.
8. Wassenaar, R.P., et al., Avascular osteonecrosis of the femoral head treated

with a vascularized iliac bone graft: preliminary results and follow-up with radiography and MR imaging. *Radiographics*, 1996. 16(3): p. 585-94.

9. Nagoya, S., et al., Predictive factors for vascularized iliac bone graft for nontraumatic osteonecrosis of the femoral head. *J Orthop Sci*, 2004. 9(6): p. 566-70.
10. Connolly, J.F. and R. Shindell, Percutaneous marrow injection for an ununited tibia. *Nebr Med J*, 1986. 71(4): p. 105-7.
11. Sakai, S., et al., Concentration of bone marrow aspirate for osteogenic repair using simple centrifugal methods. *Acta Orthop*, 2008. 79(3): p. 445-8.
12. Hernigou, P. and F. Beaujean, Treatment of osteonecrosis with autologous bone marrow grafting. *Clin Orthop Relat Res*, 2002(405): p. 14-23.
13. Gangji, V., V. De Maertelaer, and J.P. Hauzeur, Autologous bone marrow cell implantation in the treatment of non-traumatic osteonecrosis of the femoral head: Five year follow-up of a prospective controlled study. *Bone*, 2011. 49(5): p. 1005-9.
14. Sen, R.K., et al., Early results of core decompression and autologous bone marrow mononuclear cells instillation in femoral head osteonecrosis: a randomized control study. *J Arthroplasty*, 2012. 27(5): p. 679-86.

15. 平野正美. ビジュアル臨床血液形態学(第3版); p. 1, p. 96-98, 2012
16. Pittenger, M.F., et al., Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 1999. 284(5411): p. 143-7.
17. Dominici, M., et al., Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 2006. 8(4): p. 315-7.
18. Gupta, R. and T.Q. Lee, Contributions of the different rabbit models to our understanding of rotator cuff pathology. *J Shoulder Elbow Surg*, 2007. 16(5 Suppl): p. S149-57.
19. Warden, S.J., Animal models for the study of tendinopathy. *Br J Sports Med*, 2007. 41(4): p. 232-40.
20. Amini, A.R., C.T. Laurencin, and S.P. Nukavarapu, Differential analysis of peripheral blood- and bone marrow-derived endothelial progenitor cells for enhanced vascularization in bone tissue engineering. *J Orthop Res*, 2012. 30(9): p. 1507-15.
21. Matsuya, H., et al., Regenerative effects of transplanting autologous mesenchymal stem cells on corticosteroid-induced osteonecrosis in rabbits. *Mod Rheumatol*, 2008. 18(2): p. 132-9.

22. Gu, S., et al., Differentiation of rabbit bone marrow mesenchymal stem cells into corneal epithelial cells in vivo and ex vivo. *Mol Vis*, 2009. 15: p. 99-107.
23. Tan, S.L., et al., Isolation, characterization and the multi-lineage differentiation potential of rabbit bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J Anat*, 2013. 222(4): p. 437-50.
24. 松野丈夫. 標準整形外科学(第 8 版); 20-21, 2002
25. 黒川清. ハリソン内科学(日本語版、第 4 版); 2668-9, 2013
26. 中村耕三. 整形外科クルズス(第 4 版); 22-23, 2003
27. Shao, X.X., et al., Evaluation of a hybrid scaffold/cell construct in repair of high-load-bearing osteochondral defects in rabbits. *Biomaterials*, 2006. 27(7): p. 1071-80.
28. Weir, C., et al., Mesenchymal stem cells: isolation, characterisation and in vivo fluorescent dye tracking. *Heart Lung Circ*, 2008. 17(5): p. 395-403.
29. Yan, Z., et al., Fate of mesenchymal stem cells transplanted to osteonecrosis of femoral head. *J Orthop Res*, 2009. 27(4): p. 442-6.
30. Dominici, M., et al., Donor cell-derived osteopoiesis originates from a self-renewing stem cell with a limited regenerative contribution after transplantation. *Blood*, 2008. 111(8): p. 4386-91.

31. Lee, E.S., et al., Microgel iron oxide nanoparticles for tracking human fetal mesenchymal stem cells through magnetic resonance imaging. *Stem Cells*, 2009. 27(8): p. 1921-31.
32. Riegler, J., et al., Superparamagnetic iron oxide nanoparticle targeting of MSCs in vascular injury. *Biomaterials*, 2013. 34(8): p. 1987-94.
33. Ranjbarvaziri, S., et al., Quantum dot labeling using positive charged peptides in human hematopoietic and mesenchymal stem cells. *Biomaterials*, 2011. 32(22): p. 5195-205.
34. Wang, Y. and L. Chen, Quantum dots, lighting up the research and development of nanomedicine. *Nanomedicine*, 2011. 7(4): p. 385-402.
35. Wadhwa, R., et al., Identification of a novel member of mouse hsp70 family. Its association with cellular mortal phenotype. *J Biol Chem*, 1993. 268(9): p. 6615-21.
36. Wadhwa, R., et al., Induction of cellular senescence by transfection of cytosolic mortalin cDNA in NIH 3T3 cells. *J Biol Chem*, 1993. 268(30): p. 22239-42.
37. Kaul, Z., et al., Quantum dot-based mortalin staining as a visual assay for detection of induced senescence in cancer cells. *Ann N Y Acad Sci*, 2007.

1100: p. 368-72.

38. Kaul, Z., et al., An antibody-conjugated internalizing quantum dot suitable for long-term live imaging of cells. *Biochem Cell Biol*, 2007. 85(1): p. 133-40.
39. Ohyabu, Y., et al., Stable and nondisruptive in vitro/in vivo labeling of mesenchymal stem cells by internalizing quantum dots. *Hum Gene Ther*, 2009. 20(3): p. 217-24.
40. Yoshioka, T., et al., Fate of bone marrow mesenchymal stem cells following the allogeneic transplantation of cartilaginous aggregates into osteochondral defects of rabbits. *J Tissue Eng Regen Med*, 2011. 5(6): p. 437-43.
41. Ogawa, T., et al., Effectiveness of bone marrow transplantation for revitalizing a severely necrotic small bone: experimental rabbit model. *J Orthop Sci*, 2010. 15(3): p. 381-8.
42. Buhning, H.J., et al., Novel markers for the prospective isolation of human MSC. *Ann N Y Acad Sci*, 2007. 1106: p. 262-71.
43. Enneking, W.F., et al., Physical and biological aspects of repair in dog cortical-bone transplants. *J Bone Joint Surg Am*, 1975. 57(2): p. 237-52.
44. Ye, L., et al., A pilot study in non-human primates shows no adverse response to intravenous injection of quantum dots. *Nat Nanotechnol*, 2012.

7(7): p. 453-8.

45. Jin, L.H., et al., Implantation of bone marrow-derived buffy coat can supplement bone marrow stimulation for articular cartilage repair. *Osteoarthritis Cartilage*, 2011. 19(12): p. 1440-8.
46. Aguirre, A., et al., Extracellular calcium modulates in vitro bone marrow-derived Flk-1+ CD34+ progenitor cell chemotaxis and differentiation through a calcium-sensing receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010. 393(1): p. 156-61.
47. Aguirre, A., J.A. Planell, and E. Engel, Dynamics of bone marrow-derived endothelial progenitor cell/mesenchymal stem cell interaction in co-culture and its implications in angiogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010. 400(2): p. 284-91.
48. Fang, X., et al., Bone marrow-derived endothelial progenitor cells are involved in aneurysm repair in rabbits. *J Clin Neurosci*, 2012. 19(9): p. 1283-6.
49. Nishida, K., et al., Pitavastatin may reduce risk of steroid-induced osteonecrosis in rabbits: a preliminary histological study. *Clin Orthop Relat Res*, 2008. 466(5): p. 1054-8.

50. Mikami, T., et al., Prevention of steroid-induced osteonecrosis by intravenous administration of vitamin E in a rabbit model. *J Orthop Sci*, 2010. 15(5): p. 674-7.
51. Hernigou, P. and F. Beaujean, Abnormalities in the bone marrow of the iliac crest in patients who have osteonecrosis secondary to corticosteroid therapy or alcohol abuse. *J Bone Joint Surg Am*, 1997. 79(7): p. 1047-53.
52. Nakajima, A., et al., Mechanisms for the enhancement of fracture healing in rats treated with intermittent low-dose human parathyroid hormone (1-34). *J Bone Miner Res*, 2002. 17(11): p. 2038-47.
53. Peichl, P., et al., Parathyroid hormone 1-84 accelerates fracture-healing in pubic bones of elderly osteoporotic women. *J Bone Joint Surg Am*, 2011. 93(17): p. 1583-7.
54. Vahle, J.L., et al., Skeletal changes in rats given daily subcutaneous injections of recombinant human parathyroid hormone (1-34) for 2 years and relevance to human safety. *Toxicol Pathol*, 2002. 30(3): p. 312-21.
55. Vahle, J.L., et al., Bone neoplasms in F344 rats given teriparatide [rhPTH (1-34)] are dependent on duration of treatment and dose. *Toxicol Pathol*, 2004. 32(4): p. 426-38.

学会発表

1. 第41回日本人工関節学会

2011年2月25日(金)・26日(土) グランドプリンスホテル赤坂

摘出した表面置換型人工骨頭の海綿骨セメント浸透度と組織学的検討

菅谷久、河村春生、三島初、宮川俊平

2. 第37回日本骨折治療学会

2011年7月1日(金)・2日(土) パシフィコ横浜

濃縮自家骨髄血移植後1年以上経過した骨癒合不全9例の治療成績

菅谷久、三島初、青戸克哉、李梅花、福田恵子、吉岡友和、酒井晋介、赤荻博、鎌田浩史、坂根正孝、落合直之

3. 第38回日本股関節学会

2011年10月7日(金)・8日(土) 鹿児島県民交流センター

Harris/Galante セメントレス人工股関節の短期成績から長期成績が予測できたか

菅谷久、河村春生、三島初、宮川俊平、落合直之

4. 2012 Annual Meeting of the Orthopaedic Reserch Society (ORS)

2012年2月4日(土)～7日(火) San Francisco, United States of America

A study of the incoming low-intensity pulsed ultrasound (LIPUS) to the inside of the femoral head -The possibility of treating femoral head osteonecrosis with LIPUS-

菅谷久、三島初、李梅花、小川健、武田純、鎌田奈緒子、岡山貴光、富森浩二、坂根正孝、落合直之

5. 13th European Federation of National Associations of Orthopaedics and Traumatology (EFORT) Congress

2012年5月23日(水)～25日(金) Berlin, Germany

Short-term results of percutaneous Concentrated Autologous Bone Marrow Aspirate Transplantation (CABMAT) in eleven cases of non-union

菅谷久、三島初、青戸克哉、李梅花、吉岡友和、酒井晋介、赤荻博、鎌田浩史、坂根正孝、落合直之

6. 第27回日本整形外科学会基礎学術集会

2012年10月26日(金)・27日(土) 名古屋国際会議場

量子ドットを用いた蛍光バイオイメージング技術 家兎骨壊死モデルへ移植した自家骨髄間葉系幹細胞の長期追跡

菅谷久、三島初、青戸克哉、李梅花、吉岡友和、小川健、Ran Gao、Sunil Kaul、Renu Wadhwa、落合直之

7. 33rd Société Internationale de Chirurgie Orthopédique et de Traumatologie (SICOT) Orthopaedic World Conference

2012年11月28日(水)～30日(金) Dubai, United Arab Emirates

Fate of bone marrow mesenchymal stem cells following the autologous transplantation into a rabbit osteonecrosis model

菅谷久、三島初、青戸克哉、李梅花、吉岡友和、小川健、Ran Gao、Sunil Kaul、

Renu Wadhwa、落合直之

8. 第 86 回日本整形外科学会学術総会

2013 年 5 月 23 日（木）～26 日（日） 広島県立総合体育館

経皮的濃縮自家骨髄血移植を行った骨癒合不全 17 例の短期成績

菅谷久、三島初、青戸克哉、李梅花、吉岡友和、酒井晋介、赤荻博、坂根正孝、落合直之、山崎正志

9. 14th European Federation of National Associations of Orthopaedics and Traumatology (EFORT) Congress

2013 年 6 月 4 日（火）～7 日（金） Istanbul, Turkey

One-year results of percutaneous Concentrated Autologous Bone Marrow Aspirate Transplantation (CABMAT) in seventeen cases of non-union

菅谷久、三島初、青戸克哉、李梅花、吉岡友和、酒井晋介、赤荻博、坂根正孝、落合直之、山崎正志

10. 8th tri-annual Combined Meeting of Orthopaedic Research Societies (CORS)

2013 年 10 月 13 日（日）～16 日（水） Venice, Italy

Fate of bone marrow mesenchymal stem cells 24 weeks after autologous transplantation into a rabbit osteonecrosis model

菅谷久、三島初、青戸克哉、李梅花、吉岡友和、小川健、Ran Gao、Sunil Kaul、Renu Wadhwa、落合直之、山崎正志

謝辞

本論文の作成にあたり、ご指導、ご高閲を賜りました山崎正志教授に心から感謝いたします。また、落合直之前教授、医学医療系整形外科の三島初講師および吉岡友和講師、キッコーマン総合病院整形外科の小川健博士、産業技術総合研究所バイオメディカル研究部門細胞増殖制御研究グループの **Renu Wadhwa** グループ長のご指導、ご助言、ご協力にあらためて深謝いたします。

さらに、研究にあたり多大なるご助言とご協力を頂いた産業技術総合研究所バイオメディカル研究部門細胞増殖制御研究グループの **Kaul Sunil** 研究員および **Ran Gao** 研究員、筑波大学医学系技術室の坂本順子技術専門職員および藤澤千寿子技術職員、筑波大学生命科学動物資源センターの文隨和美技術職員、筑波大学大学院の青戸克哉先生、植村健太先生、和田大志先生、李梅花氏に厚く御礼申し上げます。

参考論文

1. Sugaya H, Mishima H, Aoto K, Li M, Yoshioka T, Sakai S, Akaogi H, Ochiai N, Yamazaki M. Percutaneous autologous concentrated bone marrow grafting in the treatment of nonunion. *European Journal of Orthopaedic Surgery & Traumatology*. (Published online: 26 November 2013 [Epub ahead of print])
2. Sugaya H, Tanaka T, Ogawa T, Mishima H. Spinal epidural lipomatosis in lumbar magnetic resonance image scans: A retrospective study. *Orthopaedics*. (Accepted: 9 November 2013)