

主論文の要旨

Stem cell-conditioned medium accelerates distraction osteogenesis through multiple regenerative mechanisms

〔 幹細胞由来液性因子は多面的な効果により
骨延長における仮骨形成を促進する 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 細胞情報医学専攻
頭頸部・感覚器外科学講座 顎顔面外科学分野

(指導: 古川 鋼一 教授)

安藤 友二

【緒言】

骨延長術(Distracted Osteogenesis; DO)は骨格系組織の再生を可能にする治療法である。骨延長術は様々な臨床的メリットがあるが、長期にわたる治療期間、創外固定装置による感染などの問題もある。骨延長術の治療期間の短縮を目的として骨髄由来間葉系幹細胞(MSC)移植が検討されている。しかしながら他の疾患モデルでは、細胞移植治療において移植細胞の生着率は低く、MSC移植による組織再生促進効果の多くがMSCに由来するパラクリン因子によるものであると報告されている。本研究では骨延長術の治療期間の短縮を目的として、ヒトMSCから得られた無血清培養上清(MSC-CM)の局所投与がマウス骨延長術の仮骨形成に与える影響を検討した。

【方法】

ヒトMSC、ヒト線維芽細胞(FB)の各細胞を、無血清のDulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)にて5%CO₂の条件下で48時間培養後に培養液を回収し、遠心分離機にて細胞成分を除去し培養上清(CM)とした。実験には8週齢の雌性ICRマウスを用いた。歯科矯正用エクспанションスクリューを用いて骨延長装置を作製した。マウス右脛骨に骨延長装置を装着後、骨切りを行った。3日間の待機期間の後、12時間毎に0.2mmの骨延長を8日間(計3.2mm)行うControl DO(C-DO)群、12時間毎に0.4mmの骨延長を4日間(計3.2mm)行うHigh-Speed DO(H-DO)群を設定した(図1 A)。細胞移植実験として、H-DO群には術後5日目にPBS20 μ l、またはヒトFB(3 \times 10⁵個)やヒトMSC(3 \times 10⁵個)を骨延長部に移植した。CM局所投与実験として、延長の前後と延長期間中の合計3回、20 μ lのDMEMやFB-CM、MSC-CMそれぞれをtype I collagenゲル20 μ lに混和し局所投与した。それぞれ延長終了後4日間の骨硬化期間の後、組織学的検討としてHE染色を行った。移植細胞の生存を確認するため、ヒト細胞に特異的な抗体である抗MHC class I抗体を用いて、術後5、7、11日目(移植後0、2、4日目)に観察し、骨延長部の抗MHC class I抗体陽性細胞を経時的に計測した。骨形成量の評価のため、骨延長領域(distraction zone)を設定し(図1 C)、H-DOにおける新生骨の面積を比較、検討した。

延長中期の術後5日目に免疫組織学的検討を行った。抗体は、マウス幹細胞共通マーカー抗Sca-1抗体、間葉系マーカー抗PDGFレセプター α (PDGFR α)抗体、血管内皮細胞/血管内皮前駆細胞(EC/EPC)マーカー抗CD31抗体、血管平滑筋細胞マーカー抗 α SMA抗体を用いた。抗Sca-1抗体と抗PDGFR α 抗体の共陽性の分画はマウスMSCが含まれる分画であると報告されている。

MSC-CMに含まれるタンパクを調べるために、274種類のヒトタンパク抗体アレイによって解析を行った。発現が認められたタンパクのうち、MSCの遊走、血管新生、骨芽細胞分化促進に影響することが報告されているMCP-1、MCP-3、IL-3、IL-6についてELISA法にて定量を行った。

MSC-CMによるマウス骨髄細胞とヒト血管内皮細胞(HUVEC)の細胞遊走効果を*in vitro* migration assayにて評価した。細胞はマウス大腿骨、脛骨より採取し、密度勾配遠心分離法にて単核球分画を採取し、接着細胞をマウス骨髄細胞とした。HUVECはロンザ社

より購入した。MSC-CMの有効なタンパクを特定するために、それぞれのタンパクの中和抗体により機能抑制を行い、MSC-CMの細胞遊走促進効果について検討した。

MSC-CMのマウス骨髄細胞の骨芽細胞分化に与える影響を検討するため、マウス骨髄不死化細胞株KUM9を用いてアルカリフォスファターゼ活性、アリザリンレッドS染色を骨芽細胞分化の指標にして評価した。MSC-CMの有効なタンパクを特定するために、タンパクの中和抗体により機能抑制を行い、MSC-CMの骨芽細胞分化促進効果について検討した。

MSC-CMに含まれるMCP-1、MCP-3を免疫沈降にて不活性化したものをMSC-CM-MCP-1/-3として、MSC-CMと同様にマウス骨延長モデルに局所投与した。そして、新生骨、MSC集積、血管新生について解析を行った。

【結果】

C-D0群において延長後に旺盛な仮骨形成を認めた(図1 B)。H-D0のPBS、FB移植、DMEM、FB-CM群のHE染色像では延長間隙に十分な仮骨形成は認められなかった(図1 C、D、F、G)。MSC移植群、MSC-CM群では仮骨形成が促進した(図1 E、H、K)。移植したヒトMSCは抗MHC class I抗体陽性であるが、術後11日目(移植後4日目)には観察されなかった(図1 I、J)。MSC-CMの局所投与により、MSC移植と同様に骨再生促進効果が示された。

延長中期の組織を用いて免疫組織化学法によって、Sca-1+/PDGFR α +細胞(マウスMSCの分画)、CD31+細胞(血管内皮細胞)、CD31+/ α SMA+細胞(成熟血管)の計測した(図2 A-Q)。Sca-1+/PDGFR α +細胞(マウスMSCの分画)C-D0では増加し、H-D0では減少し、MSC-CM群で増加した(図2 M、N)。また、MSC-CM群では α -SMA陽性血管平滑筋細胞とCD31陽性血管内皮細胞によって構築される成熟血管が多く観察された(図1 O-Q)。

サイトカイン抗体アレイによりMSC-CMに含まれる43種のタンパクを同定した(図3 A、B)。文献より骨再生に関わる因子を検索、ELISA法にてMCP-1、MCP-3、IL-3、IL-6の濃度を計測した(表1)。MSC-CMはマウス骨髄細胞(mBMMNCs)、HUVECの遊走を促進した。mBMMNCsはMCP-1とMCP-3(MCP-1/-3)の中和抗体により、HUVECはIL-3とIL-6(IL-3/-6)中和抗体によりそれぞれ遊走細胞が減少した(図4 A、B)。マウス骨髄細胞の骨芽細胞分化においてアルカリフォスファターゼ(ALP)活性、アリザリン染色により評価したところ、MSC-CMはDMEMに比較しALP活性の上昇、カルシウム沈着の増加を認めた(図5 A-C)。

MSC-CMのMCP-1、MCP-3を免疫沈降により不活性化させる(MSC-CM-MCP-1/-3)とMSC-CMに比べ、血管の評価では変化見られないが、仮骨形成やMSC分画の細胞集積は減少した(図6 A-G)。

【考察】

本研究では、マウス骨延長モデルを用いてMSC-CM局所投与の臨床的な有効性が示唆された。このモデルでは、12時間ごとの延長距離を増やすと遠位端からの仮骨形成

が不十分になった。骨延長部に局所投与されたMSC-CMは、内在性のMSC、EC/EPCの骨延長部への集積を促進させた。MSC-CMはMSC、EC/EPCの遊走だけでなく、骨芽細胞分化、血管新生、細胞増殖、炎症抑制など組織再生に有効とされるタンパクを複数含んでいた。

組織再生の部位では、新血管を形成し、組織再生に必要な酸素、栄養、成長因子や様々な細胞の内在性の幹/前駆細胞の動員が必要である。MSCは骨芽細胞などに分化するだけでなく、MSCが分泌するタンパクには血管新生促進や炎症抑制などの効果がある。急速な骨延長によりEC/EPCやMSCの動員や血液供給が減少、線維性結合組織を増加させた。MSC-CMは、H-D0で減少したMSCの動員をMCP-1、MCP-3により回復させた。また、IL-3、IL-6は骨髄細胞から骨芽細胞への分化を促進させた。これらのタンパクが仮骨形成を促進させることが示唆された。MCP-1、IL-6は炎症性のケモカイン、サイトカインである。しかし、骨延長部では炎症が抑えられており、その効果はMSC-CMの抗炎症作用によるものと考えられる。

MSC移植による組織再生は、細胞補給効果とパラクライン効果によるものである。しかし、移植した細胞の分化や生存、生着率は低いことから、MSC移植による効果はパラクライン効果によるところが大きいと考えられる。そして、細胞移植には免疫拒絶や造腫瘍性の問題もある。今回、無血清培養で得られたCMを用いたが、MSCは低酸素や低血清などのストレスにより治療効果をもつタンパクの分泌が増加する。今回用いたCMは、血清を含まないことで治療に応用しやすいという利点がある。

【結語】

MSC-CMの局所投与は骨形成細胞の集積および血管網の構築を促進することで仮骨形成を促進した。