



Bone Marrow Mononuclear Cell Transplantation Promotes Bone Healing via Gap Junction-Mediated Cell-Cell Interaction

栖田, 慶仁

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2025-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第9156号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/0100496437>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(課程博士関係)

学 位 論 文 の 内 容 要 旨

Bone Marrow Mononuclear Cell Transplantation Promotes Bone
Healing via Gap Junction-Mediated Cell-Cell Interaction

骨髓単核球移植はギャップ結合を介した細胞間相互作用により骨治癒を促進する

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻

整形外科学

(指導教員：黒田 良祐教授)

栖田 慶仁

【背景】

骨折は多くの場合自然に治癒するものの、5～10%は遅延癒合や非癒合に至ることがある。骨治癒には骨芽細胞の活性化が必須であり、同時に血管新生が重要な役割を果たす。骨髄単核球細胞（bone marrow mononuclear cell; BM-MNC）は、造血幹細胞や血管内皮前駆細胞を含み、血管新生や組織修復を促進することが報告されており、細胞移植による骨折や多くの虚血疾患の治療に用いられている。BM-MNCの効果は、サイトカインの分泌や細胞間相互作用によるものと考えられているが、近年、ギャップ結合を介した細胞間相互作用もBM-MNCの機能に関与することが示唆されている。そこで本研究では、BM-MNC移植の骨折治癒促進効果とギャップ結合を介した細胞間相互作用との関与を明らかにすることを目的とした。

【材料と方法】

*In vivo*では、10週齢の野生型マウスを用いて大腿骨骨折モデルを作成し、7日後に①BM-MNC 1×10^6 個、または②ギャップ結合阻害剤（1-Octanol）で処理をしたBM-MNC 1×10^6 個、③PBS、を静脈内投与した。BM-MNCは6週齢の野生型マウスの長管骨骨髓から比重遠心により分離した。BM-MNC群、BM-MNC+1-Octanol群、対照群（PBS投与）の骨折部周囲組織を骨折作成後2、3週で採取し比較した。骨癒合の程度は、組織学的評価（HE染色、Safranin-O染色）を術後2、3週で、 μ CT解析（骨密度および骨体積率）を術後3週で評価した。血管新生、骨新生の評価は、蛍光免疫染色（CD31, Osteocalcin）を用いて術後2、3週で評価した。また、骨折モデル作成の7日後に水溶性蛍光低分子を内包化したBM-MNC 1×10^6 個を静脈内投与し、10分後に組織を採取した。BM-MNCから血管内皮細胞、骨芽細胞への蛍光物質の移行を蛍光免疫染色（CD31, Osteocalcin, Connexin43）にて評価した。

*In vitro*では、BM-MNCに水溶性蛍光低分子を内包化し、ヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）および骨芽細胞との共培養を行った。骨芽細胞は新生児の野生型マウスの頭蓋骨より採取し、3継代目を使用した。BM-MNCとHUVECおよび骨芽細胞の間での蛍光物質の移行を蛍光免疫染色（CD31, Osteocalcin）で評価した。また、FACSでBM-MNCと骨芽細胞の間での蛍光物質の移行を評価し、ギャップ結合阻害薬の使用および細胞培養インサートの使用の有無で比較した。さらに、ELISA法にてBM-MNCと骨芽細胞を共培養した際の培養上清のVEGF分泌の変化を測定し、BM-MNC単独での培養および細胞培養インサートを使用した場合と比較した。

統計学的評価は、Kruskal-Wallis testとSteel-Dwass testによる事後検定で行い、有意水準を $p<0.05$ とした。

【結果】

組織学的評価において、骨癒合の程度は2週目での各群間に有意差はなかった。3週目ではBM-MNC群は、対照群と比較して有意に骨癒合が進行していた。一方、BM-MNC+1-Octanol群は、対照群との比較で有意な差が認められなかった。μCT解析において、BM-MNC群は、対照群と比較して骨密度、骨体積率が有意に高かった。一方、BM-MNC+1-Octanol群では、対照群との比較で有意な差が認められなかった。蛍光免疫染色では、CD31陽性領域は術後3週では各群に差は見られなかったが、2週においてはBM-MNC群およびBM-MNC+1-Octanol群は対照群と比較して有意に大きかった。また、Osteocalcin陽性領域は2週、3週ともにBM-MNC群およびBM-MNC+1-Octanol群は対照群と比較して有意に大きかった。一方、BM-MNC群とBM-MNC+1-Octanol群の間ではCD31陽性領域およびOsteocalcin陽性領域において有意な差が認められなかった。水溶性蛍光低分子を内包化したBM-MNCを移植後、蛍光物質がギャップ結合を介して骨折部周囲の血管内皮細胞および骨芽細胞に移行していることが確認された。

*In vitro*では、水溶性蛍光低分子を内包化したBM-MNCからHUVECおよび骨芽細胞に蛍光物質が移行していることが確認された。FACSによる解析では、BM-MNCから骨芽細胞への蛍光物質の移行が確認でき、ギャップ結合阻害薬および細胞培養インサートの使用により蛍光物質の移行が減少していることが確認された。また、BM-MNC単独での培養と比較し、BM-MNCと骨芽細胞共培養することにより培養上清のVEGF濃度が有意に上昇した。細胞培養インサートを使用した場合にはVEGF濃度の有意な上昇は見られなかった。

【考察および結論】

本研究では、BM-MNC移植がギャップ結合を介して血管新生および骨形成を促進し、骨折治癒を加速することが示された。BM-MNCはギャップ結合を介して骨芽細胞へ物質を移動させることでVEGF分泌を促進することで血管新生を誘導し、その結果として骨形成が加速されることが明らかとなり、BM-MNC移植が骨治癒を促進する新たなメカニズムの一端が解明された。今後、BM-MNCとギャップ結合の相互

作用における分子シグナル経路の詳細を解明し、標的療法の開発や臨床応用に向けた研究が期待される。本研究は骨折治癒メカニズムの新たな理解を提供し、再生医療および整形外科領域におけるBM-MNC治療の発展に寄与する意義深い報告である
と考える。

論文審査の結果の要旨			
受 付 番 号	甲 第 3 4 6 5 号	氏 名	栖田 慶仁
論 文 題 目 Title of Dissertation	Bone Marrow Mononuclear Cell Transplantation Promotes Bone Healing via Gap Junction-Mediated Cell-Cell Interaction 骨髄単核球移植はギャップ結合を介した細胞間相互作用により骨治癒を促進する		
審 査 委 員 Examiner	主 査 宮西 正 寛 Chief Examiner 副 査 菊田 順一 Vice-examiner 副 査 研 谷 隆 Vice-examiner		

（要旨は1，000字～2，000字程度）

【背景】

骨折は通常自然治癒するが、5～10%は遅延癒合や非癒合に至ることがある。骨治癒には骨芽細胞の活性化が必須であり、血管新生も重要な役割を果たす。骨髄単核球細胞 (Bone Marrow Mononuclear Cell; BM-MNC) は血管新生や組織修復を促進することが知られており、細胞移植による治療に利用されている。BM-MNC の治癒促進効果は、サイトカインの分泌や細胞間相互作用によるものとされるが、最近ではギャップ結合を介した細胞間相互作用がその効果に関与している可能性が示唆されている。本研究では、BM-MNC 移植が骨折治癒を促進する効果を明らかにするとともに、ギャップ結合を介した細胞間相互作用の役割を詳細に検討することを目的とした。

【方法】

10週齢の野生型マウスを用いて大腿骨骨折モデルを作成し、7日後に①BM-MNC (1×10^6 個)、②ギャップ結合阻害剤 (1-Octanol) で処理した BM-MNC (1×10^6 個)、③PBS を静脈内投与した。BM-MNC は6週齢の野生型マウスの長管骨骨髓から比重遠心により分離した。骨癒合の評価は、組織学的評価 (HE 染色、Safranin-O 染色) と μ CT 解析 (骨密度および骨体積率) を用い、術後2週および3週で実施した。また、血管新生と骨新生は、蛍光免疫染色 (CD31、Osteocalcin) を用いて評価した。さらに、水溶性蛍光低分子を内包化した BM-MNC を移植し、ギャップ結合を介した物質移行を解析した。*In vitro* では、BM-MNC をヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) および骨芽細胞と共培養し、蛍光物質移行や VEGF 分泌を評価した。蛍光物質移行の抑制効果を検討するため、ギャップ結合阻害剤および細胞培養インサートを使用した条件とも比較した。統計学的解析は Kruskal-Wallis 検定および Steel-Dwass 検定を用い、有意水準を $p < 0.05$ とした。

【結果】

組織学的評価において、骨癒合の程度は2週目での各群間に有意差はなかった。3週目では BM-MNC 群は、対照群と比較して有意に骨癒合が進行していた。一方、BM-MNC + 1-Octanol 群は、対照群との比較で有意な差が認められなかった。 μ CT 解析において、BM-MNC 群は、対照群と比較して骨密度、骨体積率が有意に高かった。一方、BM-MNC + 1-Octanol 群では、対照群との比較で有意な差が認められなかった。蛍光免疫染色では、CD31 陽性領域は術後3週では各群に差は見られなかったが、2週においては BM-MNC 群および BM-MNC + 1-Octanol 群は対照群と比較して有意に大きかった。

また、Osteocalcin 陽性領域は 2 週、3 週ともに BM-MNC 群および BM-MNC+1-Octanol 群は対照群と比較して有意に大きかった。一方、BM-MNC 群と BM-MNC+1-Octanol 群の間では CD31 陽性領域および Osteocalcin 陽性領域において有意な差が認められなかった。水溶性蛍光低分子を内包化した BM-MNC を移植後、蛍光物質がギャップ結合を介して骨折部周囲の血管内皮細胞および骨芽細胞に移行していることが確認された。*In vitro* では、水溶性蛍光低分子を内包化した BM-MNC から HUVEC および骨芽細胞に蛍光物質が移行していることが確認された。FACS による解析では、BM-MNC から骨芽細胞への蛍光物質の移行が確認でき、ギャップ結合阻害薬および細胞培養インサートの使用により蛍光物質の移行が減少していることが確認された。また、BM-MNC 単独での培養と比較し、BM-MNC と骨芽細胞共培養することにより培養上清の VEGF 濃度が有意に上昇した。細胞培養インサートを使用した場合には VEGF 濃度の有意な上昇は見られなかった。

【考察および結論】

BM-MNC 移植はギャップ結合を介して骨芽細胞に物質を移行させ、VEGF 分泌を促進することで血管新生を誘導し、骨折治癒を加速することが示された。本研究は、ギャップ結合を介した細胞間相互作用が BM-MNC の治癒促進効果に重要であることを明らかにし、BM-MNC 治療の新たなメカニズムの解明につながった。さらに、ギャップ結合の阻害により BM-MNC の効果が低下したことから、ギャップ結合を標的とした新たな治療戦略の可能性も示唆される。本研究は、BM-MNC 移植が骨治癒を促進する新たなメカニズムを提示するとともに、再生医療や整形外科領域における新たな治療アプローチの基盤を築いた点で価値ある業績であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。