



Therapeutic Potential of Vasculogenesis and Osteogenesis Promoted by Peripheral Blood CD34-positive Cells for Functional Bone Healing

Matsumoto, Tomoyuki

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2006-09-25

(Date of Publication)

2012-08-29

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲3725

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1003725>

※ 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。



【 81 】

氏 名・(本 籍) 松本 知之 (兵庫県)
博士の専攻分野の名称 博士 (医学)
学 位 記 番 号 博い第1779号
学位授与の 要 件 学位規則第5条第1項該当
学位授与の 日 付 平成18年9月25日

【 学位論文題目 】

Therapeutic Potential of Vasculogenesis and Osteogenesis
Promoted by Peripheral Blood CD34-positive Cells
for Functional Bone Healing
(末梢血 CD34 陽性細胞による骨・血管再生療法の機能的
骨折治癒に対する可能性)

審 査 委 員

主 査 教 授 横 崎 宏
教 授 熊 谷 俊 一
教 授 杉 村 和 朗

[背景] 近年、再生医療の分野において、器官形成や組織再生の研究が推し進められている。整形外科領域においてはその際たる現場であり、現在、骨髄間葉系幹細胞を用いた骨・軟骨再生が注目され、すでに一部の施設においては臨床応用が実現している。しかし、骨髄採取による侵襲性、細胞培養にかかる手間や手技、また、その効果においては必ずしも満足のものではないと考えられる。そこで、より低侵襲でかつ、より効果的な治療が今後展開されるべきであろうと思われる。

一方、整形外科領域に先駆けて血管研究の分野においては、ヒト末梢血血管内皮前駆細胞 (EPC) が 1997 年に発見されて以来、従来の既存血管内皮細胞の再形成 (angiogenesis) のほかに血管内皮前駆細胞からの発生 (vasculogenesis) のメカニズムが関与することが明らかとなり、現在では、下肢虚血や虚血性心疾患の血管再生療法として行われるようになってきている。今後は他の幹細胞治療における血管再構築を促すために血管内皮前駆細胞を併用するなど、血管再生が再生医療の基盤となっていくことが予想される。整形外科領域においても、以前より特に骨再生における血管形成の重要性が指摘されており、血管医学は欠かせない分野であると言える。

末梢血細胞による血管再生が可能となった現在、血管内皮前駆細胞に分化するヒト末梢血 CD34 陽性細胞が骨再生を促進することは容易に想像がつく。さらに、骨髄 CD34 陽性細胞、末梢血 CD133 陽性細胞が骨芽細胞に分化するという報告からも、末梢血 CD34 陽性細胞が直接骨芽細胞に分化することは十分に考えられる。そこで、我々は健康人より得られた末梢血 CD34 陽性細胞のヌードラット難治性骨折モデルへの経静脈移植を試み、ヒト末梢血 CD34 陽性細胞は骨折部に集積し、骨折部において血管発生のみならず骨新生を通じて骨折治癒に適正な環境を誘導し、機能的骨折治癒に貢献することを明らかにした。

[方法と結果] まず、ラット難治性骨折モデルは、全身麻酔を施行したラットを保定、その後 K-wire を大腿骨顆部より挿入し、三点支持力により大腿骨骨幹部に骨折を作成、骨折部周囲の骨膜を焼灼する国分モデルを使用した。ヌードラットの難治性骨折モデル作成後に、健康人末梢血 CD34 陽性細胞 (ボランティアから磁気細胞分離法により分離したもの) を 10^6 個経静脈的に移植した。対照群として同細胞数の末梢血単核球細胞、PBS を同様に移植した。その結果、経時的 X 線 (0、2、4、8 週)、組織学的評価 (0、2、4、8 週) では、術後 8 週において、対照群では偽関節に移行しているのに対し (国分モデルに一致)、CD34 陽性細胞群では 4 週目で 66%、8 週目では全例で骨癒合が得られた。機能的評価としての 3 点曲げ試験による力学的評価 (8 週) では、CD34 陽性細胞群では対照群に比較し、有意な強度もつ機能的骨折治癒が証明された。さらに、様々な手法により、この治癒過程の機序が明らかになった。Qtracker により蛍光標識された CD34 陽性細胞は、骨折部に選択的に集積し、ラット由来の内皮細胞、骨芽細胞と共同して骨折部での血管再生、骨再生に寄与していることが免疫染色により明らかとなり、さらにヒト特異的抗体 (HLA-ABC) により再確認された。移植 2 週間後には、ヒト由来の成熟血管内皮細胞、骨芽細胞が骨折部で組織学的 (ヒト特異的マーカーを用いた免疫組織染色)、分子生物学的 (ヒト特異的プライマーを用いた RT-PCR) に認められ、CD34 陽性細胞が標的部位で成熟内皮細胞、骨芽細胞へ分化することが証明された。さらに、single cell RT-PCR 解析により、約 20% の分離直後の CD34 陽性細胞は骨芽細胞特異的マーカーとされるオステオカルシンを共発現していることが明らかとなり、ヒト CD34 陽性細胞はラット細胞との細胞融合ではなく骨芽細胞へ直接分化するものと考えられた。CD34 陽性細胞群においては、移植 2 週間後のレーザー Doppler による血流動態は有意に改善し、新生骨量も有意に増大していた。さらに、移植 2 週間後の骨折部で

論文審査の結果の要旨

受付番号	甲 第 1780 号	氏名	松本 知之
論文題目 Title of Dissertation	Therapeutic Potential of Vasculogenesis and Osteogenesis Promoted by Peripheral Blood CD34-positive Cells for Functional Bone Healing 末梢血 CD34 陽性細胞による骨・血管再生療法の機能的 骨折治癒に対する可能性		
審査委員 Examiner	主 査 横 崎 宏 Chief Examiner 副 査 熊 谷 俊 一 Vice-examiner 副 査 杉 村 知 朗 Vice-examiner		
審査終了日	平成 18 年 7 月 19 日		

(要旨は 1000字～2000字程度)

の免疫染色によるラットの微小血管密度 (isolectin B4 による化学染色)、骨芽細胞様細胞密度 (オステオカルシンによる化学染色) の定量評価において、CD34 陽性細胞群では骨折部における血管新生および骨新生は、対照群 (PBS 群およびヒト単核球細胞移植群) に比して、有意に亢進していた。これは、RT-PCR 解析により骨折部でのヒト由来の angiogenic factor (VEGF、FGF2、HGF) が CD34 陽性細胞群でのみ同定できたことより、CD34 陽性細胞が局所で paracrine の役割を担っているものと考えられた。さらに、VEGF の antagonist である soluble Flt1 の投与により血管新生だけでなく骨新生も抑制されたことより、CD34 陽性細胞による骨折治癒過程は血管新生が中心的な役割を果たしていることが明らかになった。

[考察] 末梢血 CD34 陽性細胞を用いたこの新たな治療法の確立により、他の再生医療のソースとしての骨髄細胞、臍帯血細胞、胚性幹細胞に比較して、より簡便で低侵襲、また安価で効果的な理想の骨再生医療が実現できることと確信する。現在の標準治療では治癒をみるのが困難な難治性骨折で苦しむ多大な人々に対し、末梢血細胞を使った難治性骨折治療の安全性・効果が確認できれば、その恩恵を受ける者はあとを絶たないであろう。

[結論] これらの結果により、難治性骨折治療の新たな選択肢の一つとして、末梢血 CD34 陽性細胞移植が有用であることが示唆された。

292

ヒト末梢血管内皮前駆細胞(EPC)が1997年に発見され、様々な基礎研究成果の集積により、現在では下肢虚血や虚血性心疾患の血管再生療法に応用される様になってきている。本研究では整形外科領域における血管再生療法の応用を想定し、ラット大腿骨難治性骨折モデルへのヒト末梢血 CD34 陽性細胞移植を行い、その有用性を検討することを目的とした。

ヌードラット(F344/nude rat, 8-12W)の難治性骨折モデル(国分モデル)作成後に、健康人末梢血 CD34 陽性細胞(ボランティアから磁気細胞分離法により分離したもの)を 10^5 個経静脈的に移植した。対照群として同細胞数の末梢血単核球細胞、PBSを同様に移植した。術後、経時的に分子生物学的、組織学的、X線学的、及び力学的評価を行った。

経時的X線(0、2、4、8週)、組織学的評価(0、2、4、8週)では、術後8週において、対照群では偽関節に移行しているのに対し、CD34陽性細胞群では4週目で66%、8週目では全例で骨癒合が得られた。機能的評価としての3点曲げ試験による力学的評価(8週)では、CD34陽性細胞群では対照群に比較し、有意な強度もつ機能的骨折治癒が証明された。さらに、様々な手法により、この治癒過程の機序が明らかになった。Qtrackerにより蛍光標識されたCD34陽性細胞は、骨折部に選択的に集積し、ラット由来の内皮細胞、骨芽細胞と共同して骨折部での血管再生、骨再生に寄与していることが免疫染色により明らかとなり、さらにヒト特異的抗体(HLA-ABC)により再確認された。移植2週間には、ヒト由来の成熟血管内皮細胞、骨芽細胞が骨折部で組織学的(ヒト特異的マーカーを用いた免疫組織染色)、分子生物学的(ヒト特異的プライマーを用いたRT-PCR)に認められ、CD34陽性細胞が標的部位で成熟内皮細胞、骨芽細胞へ分化することが証明された。さらに、single cell RT-PCR解析により、約20%の分離直後のCD34陽性細胞は骨芽細胞特異的マーカーとされるオステオカルシンを共発現していることが明らかとなり、ヒトCD34陽性細胞はラット細胞との細胞融合ではなく骨芽細胞へ直接分化するものと考えられた。CD34陽性細胞群においては、移植2

週後のレーザードップラーによる血流動態は有意に改善し、新生骨量も有意に増大していた。さらに、移植2週後の骨折部での免疫染色によるラットの微小血管密度(isolectin B4免疫活性)、骨芽細胞様細胞密度(オステオカルシン免疫活性)の定量評価において、CD34陽性細胞群では骨折部における血管新生および骨新生は、対照群(PBS群およびヒト単核球細胞移植群)に比して、有意に亢進していた。これは、RT-PCR解析により骨折部でのヒト由来のangiogenic factor(VEGF、FGF2、HGF)がCD34陽性細胞群でのみ同定できたことより、CD34陽性細胞が局所でparacrineの役割を担っているものと考えられた。さらに、VEGFのantagonistであるsoluble Flt1の投与により血管新生だけでなく骨新生も抑制されたことより、CD34陽性細胞による骨折治癒過程は血管新生が中心的な役割を果たしていることが明らかになった。

以上、本研究は、難治性骨折に対するヒト末梢血CD34陽性細胞移植の有用性について検討したものであるが、現在の標準治療では治癒をみることが困難な難治性骨折に対し、重要な知見を得たものとして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ものと認める。

293