



Local Transplantation of Ex Vivo Expanded Bone Marrow-derived CD34-positive Cells Accelerates Fracture Healing.

川上, 洋平

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2013-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲5863

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1005863>

※ 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。



論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第2312号	氏 名	川上 洋平
論文題目 Title of Dissertation	Local Transplantation of Ex Vivo Expanded Bone Marrow-derived CD34-positive Cells Accelerates Fracture Healing. 体外培養増幅骨髄由来 CD34 陽性細胞の局所移植は骨折治癒を促進する		
審査委員 Examiner	主 査 西 慎一 Chief Examiner 副 査 寺 師 浩 人 Vice-examiner 副 査 伊 藤 裕 雄 Vice-examiner		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

【背景・目的】骨組織の再生医療は近年注目されている。骨折は日常診療でみられる一般的な外傷であり、通常は保存的治療で骨癒合に至る。しかし、5～10%は難治性骨折で偽関節になる。手術治療による侵襲は大きく、低侵襲の治療法が求められている。著者らは、血管内皮前駆細胞を多く含む末梢血 CD34 陽性細胞を無胸腺ヌードラット骨折モデルに移植することで、骨折治癒を促進する成果を発表してきた。今回は、より効率のよい骨折治癒促進を図ることを期待し、骨髄由来 CD34 陽性細胞の有用性を確認する目的で、ラット難治性骨折モデルに増殖骨髄由来 CD34 陽性細胞を移植し治療効果を検討した。

【方法】ヒト骨髄由来 CD34 陽性細胞を 5 つの成長因子(VEGF, SCF, IL-6, Flt-3lig, TPO)を無血清培地に添加し 1 週間培養し増殖させた。培養前骨髄由来 CD34 陽性細胞も準備し、培養細胞を用いた vitro 条件で、これらの骨髄由来 CD34 陽性細胞の血管新生能と骨分化能を検討した。無胸腺ヌードラットの大腿骨骨幹部の横骨折を作製し、その骨折部周囲の骨膜を電気メスにて除去しラット難治性骨折モデルを作製した。骨折部に各々増殖骨髄由来 CD34 陽性細胞 1×10^4 個、高濃度培養前骨髄由来 CD34 陽性細胞 1×10^4 個、低濃度培養前骨髄由来 CD34 陽性細胞 1×10^3 個を移植し、骨折治癒状態を評価した。

【結果】ヒト骨髄由来 CD34 陽性細胞を 1 週間の培養により平均 22.7 倍に増殖させることができた。これらの細胞には、CD31, CD133, CD44 など他の表現形質の細胞も含有されていたが、主たる細胞は CD34 であった。増殖骨髄由来 CD34 陽性細胞は培養前増殖骨髄由来 CD34 細胞と比較し、HUVEC との共培養で血管 tube 構造の形成能、Alizarin Red 染色での骨分化誘導能に優れていた。ラット難治性骨折モデルの評価では、骨折部の経時的レントゲン評価、8 週後のマイクロ CT 所見で、増殖骨髄由来 CD34 陽性細胞移植群が他の群より優れた治癒所見を示した。術後 1 週の蛍光免疫染色では、CD34 陽性細胞移植群で、骨折部周位の血管内に分化したヒト由来内皮細胞、また新生仮骨内に分化したヒト由来骨芽細胞を認めた。ラット自身の宿主由来の血管・骨新生については、術後 2 週の骨折部における骨折部肉芽組織内の血管新生の亢進、骨芽細胞密度の増加が増殖骨髄由来 CD34 陽性細胞移植群において有意に認められた。術後 2 週の骨折部組織の rVEGF、rAng-1 などの血管内皮マーカー、rBMP-2,4 骨細胞マーカーは、renal time PCR にて検討したところ、やはり増殖骨髄由来 CD34 陽性細胞移植群において有意に上昇していた。

【考察】本研究の結果から、増殖骨髄由来 CD34 陽性細胞移植群を骨折部に移植することで、培養前骨髄由来 CD34 陽性細胞移植より優れた血管形成能、骨分化能が得られることが示された。この事実は、骨折治癒に繋がる可能性を示唆するものと考えられた。また、画

像検査でも骨折治癒が増殖骨髓由来 CD34 陽性細胞移植群で高く、血管形成、骨芽細胞分化が促進されていたためと考えられた。この現象は、移植 CD34 細胞のパラクライン効果ではないかと推測された。CD34 陽性細胞の 1 週間の培養期間で、22~23 倍近くに細胞増加させることが可能であった。ただし、他の細胞への分化が認められ、約 60%が CD34 陽性細胞に留まっていた。また、テロメア長の短縮はなく、細胞増殖能は維持されていると考えられた。今後臨床応用するにあたっては、腫瘍形成、幹細胞移植副作用などを確認していくことが必要と判断された。

【結果】骨髓由来 CD34 陽性細胞は採取時に保存しておくことも可能であり、臨床応用の道も十分にあり得ると考えられ、本方法が、難治性骨折の新しい治療法として発展していく可能性が示唆された。

本研究は、骨髓由来幹細胞を骨折部位に局所移植し、その治癒過程を研究したものであるが、従来ほとんど行われなかった体外培養増殖骨髓由来 CD34 陽性細胞の有用性について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。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。

(課程博士関係)

学 位 論 文 の 内 容 要 旨

Local Transplantation of Ex Vivo Expanded Bone Marrow-derived CD34-positive Cells Accelerates Fracture Healing.

体外培養増幅骨髓由来 CD34 陽性細胞の局所移植は骨折治癒を促進する

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：黒坂 昌弘 教授)

川上 洋平

【背景】近年さまざまな分野で幹細胞についての研究が進むにつれ、骨組織は再生医療のターゲットの一つとして注目が集まっている。骨折は、日常頻繁にみられる一般的な外傷であり、その多くは保存的治療もしくは観血的治療にて骨癒合に至る。しかし、約 5~10% は骨癒合が遅延し、難治性骨折や偽関節となる。この骨癒合不全の主な原因として、骨折部局所の新生血管の欠如が挙げられる。このような病態に対し、近年血管柄付き骨移植などの新たな治療が導入されているが、その手術侵襲の大きさは無視できるものではなく、より低侵襲で効果的な治療法が求められている。我々はこれまで、血管内皮前駆細胞を多く含む細胞群であるヒト末梢血 CD34 陽性細胞（以下 PBCD34）をラット大腿骨難治性骨折モデルに移植することで、血管・骨新生/再生を通じて骨折治癒に貢献することを示してきた。また、基礎研究をもとに、臨床研究も開始し、良好な成績を得ている。しかしながら、さらなる臨床応用を考えた際、末梢血の場合 CD34 陽性細胞の希少性や、G-CSF やアプフェレーシスが必要となりその副作用などが問題となる。一方、骨髓由来の CD34 陽性細胞（以下 BMCD34）は骨折部から採取し保存しておく事が可能である。そこで、今回我々は、ラット難治性骨折モデルを用いてヒト骨髓由来 CD34 陽性細胞を培養増幅させた細胞を用いた移植治療法についてその治療効果を検討した。

【方法】ヒト骨髓由来 CD34 陽性細胞(以下 BMCD34)を 5 つの成長因子(VEGF, SCF, IL-6, Flt-3lig, TPO) 添加幹細胞用無血清培地で 1 週間培養し、培養増幅 CD34 陽性細胞(以下 cExBMCD34)を得た。培養前の BMCD34、及び cExBMCD34 は各々、FACS にて解析し、

血管新生能と骨分化能を *in vitro* で検討した。In vivo では免疫不全ラットの大腿骨骨幹部に横骨折を作成し髄内釘固定をしたのちに、骨折部周囲の骨膜を電気メスで全周性に焼灼した難治性骨折モデルを作成した。対象は 4 群とし、骨折部に各々 (1)cEx-BMCD34+ cells 1×10^4 個 (約 5×10^2 個の BMCD34+ cells より作成) (cEx-BMCD34 群)、(2)高濃度 BMCD34+ cells (BMCD34Hi) 群 1×10^4 個、(2)低濃度 BMCD34+ cells (BMCD34Lo) 群 1×10^3 個および (3)PBS (PBS 群)のみをアテロコラーゲンを担体として骨折部に局所移植し、分子生物学的、組織学的、X 線学的に骨折治癒を評価した。

【結果】1 週間の培養により総細胞数はテロメア長の短縮なく、平均 22.7 倍に増幅され、FACS 解析では、培養後の細胞は約 60% の CD34 陽性細胞を含んでおり CD31、CD133、CD44、CD90、CD105 が陽性であった。In vitro での血管新生能では、cEx-BMCD34 は BMCD34 と比較し、有意なコロニー形成能を示し、HUVEC との共培養でも有意な tube 形成能を示した。また、cEx-BMCD34 及び BMCD34 は 2 週間の培養で MSC 様の接着細胞を認め、骨分化誘導培養では Alizarin Red 染色でのカルシウム塩染色、免疫蛍光染色での osteocalcin 陽性骨芽細胞が確認され、骨芽細胞への分化する可能性が示唆された。In vivo では、骨折部の経時的レントゲン評価では cEx-BMCD34 群でいずれの時点でも有意な骨折治癒効果を認めた。一方、PBS 群では術後 8 週で全例偽関節に移行していた。後 8 週のマイクロ CT での骨折部の新生仮骨量及び骨密度評価では、cEx-BMCD34 群で有意差を認め、経時的な骨折治癒の組織学的評価基準である Allen 分類においても、cEx-BMCD34 群が他

群と比べ有意に高値であった。術後 1 週の免疫蛍光染色では、CD34 陽性細胞を移植した群で骨折部周囲の血管内に分化したヒト由来の内皮細胞および骨折部周囲の新生仮骨内に分化したヒト由来の骨芽細胞を認め、RT-PCR にて、ヒト特異的内皮細胞マーカーおよびヒト特異的骨細胞マーカーの発現を認めた。ラット自身の宿主由来の血管・骨新生については、術後 2 週の骨折部における免疫染色後の骨折部肉芽組織における毛細血管密度は cEx-BMCD34 群において、他の 3 群に対し有意に血管新生が亢進していた。また、骨芽細胞密度も、cEx-BMCD34 群及び、BMCD34(Hi)群において、他の 2 群に対し有意に骨新生が亢進していた。術後 2 週の骨折部周囲組織を用いて行った real time RT-PCR では、ラット特異的血管内皮細胞マーカー (rVEGF、rAng-1) やラット特異的骨細胞マーカー (rBMP-2,4) の上昇を認めた。レーザードップラーによる機能的血流改善評価では、骨折後 1 週、2 週において、cEx-BMCD34 群で他群と比べ有意に、局所の血流改善を認め、同細胞移植が早期の血管新生に寄与している事が示唆された。3 点曲げ試験においても cEx-BMCD34 群で有意に良好な骨強度の改善を認めた。

【考察】本研究の結果から、体外培養増幅 CD34 陽性細胞の局所移植により、より少ないオリジナル細胞数で難治骨折に対して十分な骨折治療効果が得られた。また、今回の我々の実験から、*in vitro* でも cEx-BMCD34 群が BMCD34 群と比較して血管新生能での有意性が示され、さらに *in vivo* でも骨折部局所での血管骨分化能に優れている事が示され、新たな骨折治療につながる可能性が示唆された。我々の 1 週間の新しい培養法は 1 週間で約

23 倍の細胞数の増加を認めたが、CD34 陽性率は約 60%と低下を認めた。FACS 解析からはより血管内皮に近い細胞になっている可能性が示された。過去の文献からは、長期間の増幅培養では、幹細胞は細胞の損傷を受けやすいとの報告があるが、本研究では 1 週間と比較的短期間の培養であり、我々の cEx-BMCD34 はテロメア長の短縮はなく、細胞増殖能はさらに増大が確認され、同様の過去の報告裏付ける結果が得られた。また、本実験では、cEx-BMCD34 群と BMCD34(Hi)群は過去の報告での GSCF 動員末梢血由来 CD34 陽性細胞(PBCD34)と比べても骨折治癒効果が優れており、これは、BMCD34 が PBCD34 と比較してより、より未熟で優れた細胞増殖能をもっている事が要因と考えられた。術後 2 週の骨折部周囲組織を用いて行った real time RT-PCR や免疫染色で、ラット特異的血管内皮細胞、骨細胞マーカーの上昇を認めた要因としては、ヒト由来の CD34 陽性細胞を局所移植する事によるパラクライン効果によるものと考えられた。移植された細胞が hANG-1 や h platelet-derived growth factor (PDGF)-B や hVEGF などの成長因子を骨折部で放出する事による効果が確認されているがまだ不明な点も多い。また、臨床応用を考えると、cEx-BMCD34 の安全性、特に腫瘍形成の可能性や、同細胞の幹細胞としての性質についてのさらなる研究が必要であると考えられた。

【結論】骨髄由来 CD34 陽性細胞は初回骨折治療時に採取し、保存しておく事が可能であり、同細胞を我々の 1 週間の無血清体外培養増幅技術を用いることで、難治性骨折の治療としての効果が確認され、新たな骨折治療法となる可能性が示唆された。