Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-05

Effects of parathyroid hormone 1-34 on osteogenic and chondrogenic differentiation of human fracture haematoma-derived cells in vitro

Dogaki, Yoshihiro

(Degree)
博士（医学）

(Date of Degree)
2014-03-25

(Resource Type)
doctoral thesis

(Report Number)
甲第6057号

(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1006057

※ 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

Effects of parathyroid hormone 1-34 on osteogenic and chondrogenic differentiation of human fracture haematoma-derived cells *in vitro*

ヒト骨折血腫由来細胞の骨・軟骨分化に対する
ヒト副甲状腺ホルモン(1-34)の効果

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）

堂垣　佳宏

【背景】

我々は、ヒトの骨折部血腫中には多分化能を有する細胞（以下、骨折血腫細胞）が含まれることを過去に報告し、骨折血腫細胞を用いて骨折治癒過程の研究を行ってきた。Parathyroid hormone (1-34)（以下、PTH）は、骨形成促進作用を持つ骨粗鬆症治療薬であり、その作用から骨折治癒促進剤としての利用が期待されている。Aspenberg らは、閉経後の女性の橈骨遠位端骨折患者へのPTH の間歇的投与によって骨癒合が促進したと報告している。しかし、PTH の連続投与または間歇的投与による骨折治癒促進の作用機序は未だ不明な点が多く、骨折治癒課程と PTH の投与方法に言及してその効果を評価した報告は少ない。骨折の治癒課程は血腫形成期（炎症期）・軟性仮骨形成期・硬性仮骨形成期・再造形（リモデリング）期に分けられ、血腫つまり骨折血腫細胞は初期の骨折治癒に重要な役割を持つと報告されている。今回我々は、PTH の骨折血腫細胞に対する効果が投与方法（連続投与と間欠投与）によって異なると仮説を立て、ヒト骨折血腫細胞の骨分化能および軟骨分化能に対する PTH の作用を in vitro にて検討した。

【対象と方法】

対象は骨折患者 7 例（平均年齢 29.6 歳、男性 4 例・女性 3 例）で、骨折後平均 5.5 日で術中に骨折部血腫を採取した。採取した血腫を細切後、シャーレ上に撒き、血腫より遊走し増殖した接着細胞を骨折血腫細胞とし、培養を行った。

i) 骨分化実験：6 well-plate を用いて、骨折血腫細胞の平面培養を行った。骨分化誘導培地は α-MEM に 10%FBS・ascorbate-2-phosphate・β-glicerophosphate を添加したものを使用した。①PTH 投与を行わず維持培地で培養を行った維持培地群（Growth medium (GM)群）、②PTH 投与を行わず骨分化培地で培養を行った Control 群（Control）、③100nM の PTH を添加した骨分化培地で培養を行った PTH 連続的投与群（PTH-C）、④100nM の PTH を添加した骨分化培地で培養を 6 時間行った後、PTH を添加しない骨分化培地で 42 時間培養を行った PTH 間欠的投与（48 時間中最初の 6 時間のみ PTH 添加）群（PTH-P）の 4 群に分けて骨分化誘導を行った。48 時間ごとに培地交換し、20 日間培養を行い、骨分化能を比較検討した。骨分化能は Alkaline phosphatase (ALP) 活性、骨分化マ

ーカーである Runx2・ALP の mRNA 発現量を real-time PCR、Alizarin red 染色を用いて評価した。また、培養 8 日目までの細胞増殖能を MTS assay にて検討した。

ii) 軟骨分化実験：骨折血腫細胞の三次元培養（ペレット培養）を行った。軟骨分化培地は DMEM-high glucose に ascorbate-2-phosphate・sodium pyruvate・ITS+ Premix・TGF-β3・BMP-6 を添加した培地を使用した。①PTH を添加せず軟骨分化培地のみで培養を行った PTH 非投与群（Control），②軟骨分化培地に 100nM の PTH を添加して培養を行った PTH 連続的投与群（PTH-C）の 2 群に分けて軟骨分化誘導を行った。48 時間ごとに培地交換し、3 週間培養を行い、軟骨分化能を比較検討した。軟骨分化能は、ペレットの Safranin-O 染色、軟骨分化マーカーである collagen-II・collagen-X の mRNA 発現量を real-time PCR にて評価を行った。

【結果】

i) 骨分化能について

細胞増殖能（MTS assay）：0，2，4，8 日目に評価を行った。増殖能については PTH-P 群、PTH-C 群とも Control 群との有意差は認めず、PTH-P 群と PTH-C 群の間にも有意差はなかった。

ALP activity：14 日目において、Control 群と PTH-C 群は PTH-P 群に比べて有意に上昇を示したが、Control 群と PTH-C 群の間には有意差はなかった。

Real-time PCR：14 日目において、Runx2・ALP の mRNA の発現について、Control 群は PTH-P 群に比べて有意に上昇を示した。また、PTH-C 群と PTH-P 群の間に有意差は認めなかった。PTH-C 群と Control 群の間にも有意差は認められなかった。

Alizarin red S 染色：Control 群と PTH-C 群では、PTH-P 群と比較して有意に強度な染色性を示したが、Control 群と PTH-C 群の間に有意な差は認めなかった。

ii) 軟骨分化能について

Safranin-O 染色：PTH-C 群のペレットは、Control 群のペレットと比べ明らかにサイズが小さかった。また、PTH-C 群ではプロテオグリカンの染色性が乏しかった。

Real-time PCR： collagen-II・collagen-X の mRNA の PTH-C 群での発現量は、Control 群と比べて有意な低下を示した。

【考察】

本研究は、ヒトの骨折部に存在する骨折血腫細胞の骨分化・軟骨分化能に対し、PTH の持続投与・間欠投与がどのような直接的作用を有するかを明らかにした初めての報告である。PTH は投与法にかかわらず、骨折血腫細胞の増殖には作用しなかった。また、骨折血腫細胞に対する PTH 連続投与の効果は、骨分化に関して有意な作用を与えず、軟骨分化に関しては抑制的に作用した。また、PTH 間欠投与では骨分化に関して抑制的に作用した。

Ishizuya らは、骨芽細胞に対する PTH の間欠投与は骨分化を促進するが、PTH 連続投与ではこの作用は阻害されると報告している。これに反して、血腫細胞を用いた本研究では、PTH 間欠投与は骨分化を阻害し、連続投与は骨分化に影響を与えなかった。一方、PTH 連続投与は軟骨分化を抑制していた。これらの結果は、血腫細胞への連続的または間欠的な PTH の作用が、骨芽細胞のような他の細胞とは異なった機序で作用している可能性を示唆している。細胞による PTH の効果の違いについては、骨芽細胞の分化段階に応じて PTH の効果が異なるといった Isogai らによる報告や、骨髄間葉系幹細胞の骨分化に対しては PTH の間欠および連続投与が影響を与えなかったという Yang らによる報告がある。これらは PTH の効果が細胞の分化レベルによって異なる可能性を示唆している。

軟骨分化については、本研究結果では PTH 連続投与は抑制的に作用した。PTH の軟骨分化に関する報告は少ないが、Hollnagel らは PTH 連続投与が骨髄間葉系幹細胞の後期軟骨分化を阻害すると報告し、Liu らは PTH の連続投与が下顎骨由来軟骨細胞の成熟化を抑制すると報告している。これらは本研究結果を支持するものであると考えられる。

動物実験や臨床試験において、PTH の連続または間欠投与が骨折治癒を促進するという報告は多い。本研究結果は骨折血腫中の血腫細胞への PTH の効果を in vitro で評価したものであり、PTH の骨折治癒促進作用の生体内でのメカニズムとしては、PTH が骨膜由来細胞など他の骨折部周辺の細胞に作用したり、幹細胞の骨折部への動員・誘導に関与したりしていると考えられる。本研

究結果より、PTH が骨折部へ局所投与された場合、PTH は骨折血腫中の細胞に直接的に positive な影響を与えないことが示唆され、PTH が間歇的投与された場合は、PTH は骨折血腫中の細胞に negative な影響を与えることが示唆された。本研究は、骨折治癒課程早期に生じる骨折血腫に限って言えば、PTH 投与は positive な効果を示さないことを示唆し、PTH の骨折部に対する作用の機序解明の一助になりうると考えられた。

神戸大学大学院医学(系)研究科（博士課程）

論文審査の結果の要旨

受付番号	甲 第 2419 号	氏 名	堂垣 佳宏
論文題目 Title of Dissertation	Effect of parathyroid hormone 1-34 on osteogenic and chondrogenic differentiation of human fracture haematoma-derived cells in vitro ヒト骨折血腫由来細胞の骨・軟骨分化に対するヒト副甲状腺ホルモン(1-34)の効果		
審査委員 Examiner	主 査 Chief Examiner 西 慎一 副 査 Vice-examiner 平井 みどり 副 査 Vice-examiner 中村 俊一		

（要旨は１，０００字～２，０００字程度）

Parathyroid hormone (1-34)（以下、PTH）は、骨形成促進作用を持つ骨粗鬆症治療薬であり、その作用から骨折治癒促進剤としての利用も期待されている。しかし、PTH の連続投与または間歇的投与による骨折治癒促進の作用機序は未だ不明な点が多く、骨折治癒課程と PTH の投与方法に言及してその効果を評価した報告はあまりない。骨折治癒課程は血腫形成期（炎症期）・軟性仮骨形成期・硬性仮骨形成期・リモデリング期に分けられ、骨折部血腫中に含まれる多分化能を有する細胞（以下、骨折血腫細胞）は初期の骨折治癒に重要な役割を持つと報告されている。本研究では、PTH の骨折血腫細胞に対する効果が連続投与と間欠投与によって異なるのではいなかと仮説を立て、ヒト骨折血腫細胞の骨分化能および軟骨分化能に対する PTH の作用を in vitro にて検討した。

【対象と方法】

対象は骨折患者 7 例で、骨折後平均 5.5 日で術中に骨折部血腫を採取した。

i) 骨分化実験：①PTH 投与を行わず維持培地で培養を行った維持培地群、②PTH 投与を行わず骨分化培地で培養を行った Control 群、③100nM の PTH を添加した骨分化培地で培養を行った PTH 連続的投与群（PTH-C）、④100nM の PTH を添加した骨分化培地で培養を 6 時間行った後、PTH を添加しない骨分化培地で 42 時間培養を行った PTH 間欠的投与群（PTH-P）の 4 群に分け、48 時間ごとに培地交換し、20 日間培養を行った。骨分化能は Alkaline phosphatase (ALP) 活性、Runx2・ALP の mRNA 発現量を real-time PCR、Alizarin red 染色を用いて評価した。培養 8 日目までの細胞増殖能を MTS assay にて検討した。

ii) 軟骨分化実験：三次元培養（ペレット培養）を行った。①PTH を添加せず軟骨分化培地のみで培養を行った Control 群、②軟骨分化培地に 100nM の PTH を添加して培養を行った PTH 連続的投与群（PTH+）の 2 群に分け、48 時間ごとに培地交換し、3 週間培養を行った。Safranin-O 染色と、collagen-II・collagen-X の mRNA 発現量を real-time PCR にて評価を行った。

【結果】

i) 骨分化能について

細胞増殖能（MTS assay）：増殖能については 4 群間に有意差は認めなかった。

ALP activity：14 日目において、Control 群と PTH-C 群は PTH-P 群に比べて有意に上昇を示したが、Control 群と PTH-C 群の間には有意差はなかった。

Real-time PCR：14 日目において、Runx2・ALP の mRNA の発現について、Control 群は PTH-P 群に比べて有意に上昇を示した。また、PTH-C 群と PTH-P 群の間に有意差は認めなかった。

Alizarin red S 染色：Control 群と PTH-C 群では、PTH-P 群と比較して有意に強度な染色性を示したが、Control 群と PTH-C 群の間に有意な差は認めなかった。

ii) 軟骨分化能について

Safranin-O 染色：PTH+群のペレットは、Control 群のペレットと比べサイズが小さく、染色性も乏しかった。

Real-time PCR：collagen-II・collagen-X の mRNA の PTH+群での発現量は、Control 群と比べて有意な低下を示した。

【考察および結論】

骨折血腫細胞に対する PTH 連続投与の効果は、骨分化に関して有意な作用を与えず、軟骨分化に関しては抑制的に作用した。これらの結果は、血腫細胞への連続的または間欠的な PTH の投与が、骨芽細胞のような他の細胞とは異なった機序で作用している可能性を示唆している。

動物実験や臨床試験において、PTH の連続または間欠投与が骨折治癒を促進するという報告は多い。しかし本研究結果より、PTH が骨折部へ局所投与された場合、PTH は骨折血腫中の細胞に直接的に positive な影響を与えないことが示唆され、PTH が間歇的投与された場合は、PTH は骨折血腫中の細胞に negative な影響を与えることが示唆された。

本研究は、PTH の骨折血腫由来細胞に対する効果を連続投与・間欠投与について初めて評価したものであり、血腫形成が生じる骨折治癒課程早期に限って言えば、PTH 投与は positive な効果を示さないことを示唆し、PTH の骨折部に対する作用の機序解明の一助と成り得るとし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ものと認める。