



## Human pseudoarthrosis tissue contains cells with osteogenic potential

Takahara, Shunsuke

---

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

2017-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第6790号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1006790>

※ 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

Human pseudoarthrosis tissue contains cells with osteogenic potential

### ヒト偽関節組織の生物学的特性の検討

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)

高原 俊介

#### 【背景】

骨折の5~10%は遷延治癒や骨癒合不全(広義の偽関節; nonunion)に至り、しばしば治療に難渋する。骨癒合不全は感染の有無、画像的特徴、理学所見、生物学的活性、部位、形態学的特徴から様々なtypeに分類され、分類に応じた治療方法が選択される。過去に我々は、骨癒合不全分類の中の一つであるhypertrophic nonunionにおいて、偽関節部に介在する組織(以下、偽関節組織)には、間葉系幹細胞様の特性を持ち、骨・軟骨・脂肪分化する能力を有して細胞が存在していることを *in vitro* で証明した。このことは、hypertrophic nonunionにおいて、偽関節組織を温存した状態での治療が可能であることの基礎的な evidence と考えられる。

骨癒合不全の分類のうち、pseudoarthrosisは骨折間隙に滑液が貯留した偽関節腔を形成し、大きな異常可動性を呈するものと定義され、他の骨癒合不全とは異なる病理学的形態をとることから、「真の偽関節」として区別される。骨癒合不全の治療において、偽関節組織の生物学的特性を明らかにすることは重要であるが、pseudoarthrosisにおける偽関節組織に、どのような生物学的特性があるかは未だ明らかでない。我々は pseudoarthrosis の偽関節組織から分離した細胞(以下、偽関節細胞)の細胞増殖能、細胞表面抗原および骨・軟骨分化能を *in vitro* にて検討した。

#### 【対象と方法】

Pseudoarthrosisと診断された患者4例を対象とした。平均年齢は65歳で、受傷から平均14.8ヶ月(4~26ヶ月)経過していた。偽関節部位は上腕骨2例、大腿骨1例、鎖骨1例であった。全例に手術が行われ、ロッキングプレートを用いた強固な固定と、偽関節組織の搔把、自家骨移植が施行された。全例、偽関節部は大きな異常可動性を有しており、滑液の貯留した偽関節腔を形成していた。偽関節腔を覆う線維性組織、偽関節組織を採取し、一部を組織検体としてホルマリン固定し、残りの組織を collagenase 处理し、細胞を分離した後、

維持培地 (α-MEM に 10% FBS・2 mM L-glutamine を添加) で培養し以下の assay を行った。

1) 偽関節組織染色

ホルマリン固定した組織をパラフィン包埋し、5  $\mu$ m のスライド切片を作成し、haematoxylin and eosin 染色を行い、顕微鏡にて観察を行った。

2) 細胞増殖能

偽関節細胞を  $4 \times 10^3$  個/cm<sup>2</sup> の密度で培養皿に播種し、14 日毎に  $4 \times 10^3$  個/cm<sup>2</sup> の密度で継代を行い続け (第 10 繼代まで)、継代時に細胞数を計測した。

3) 細胞表面抗原

FACScalibur を用い、第 2 もしくは 3 繼代の偽関節細胞における CD29・CD31・CD34・CD44・CD45・CD105・CD133・CD166 の細胞表面抗原量を測定した。

4) 分化能 (骨・軟骨分化)

i. 骨分化能 : 28 日間の骨分化誘導を行った (平面培養)。骨分化誘導培地には、維持培地に 10 nM dexamethasone・50  $\mu$ g/ml アスコルビン酸・10 mM  $\beta$ -glycerophosphate を添加したものを使用した。誘導後 7・14・21・28 日目に alkaline phosphatase (以下 ALP) 活性測定、誘導後 21 日目に reverse transcription polymerase chain reaction (以下 RT-PCR) による骨分化関連遺伝子 (ALP・bone sialoprotein (以下 BSP)・osteocalcin (以下 OC)・osterix (以下 OSX)・runt-related transcription factor 2 (以下 Runx2)) の mRNA 発現の評価、誘導後 21 日目に Alizarin Red 染色を行い、骨分化能を評価した。

ii. 軟骨分化能 : 21 日間の三次元培養 (ペレット培養) による軟骨分化誘導を行った。軟骨分化培地には、DMEM-high glucose に 100 nM dexamethasone・50  $\mu$ g/ml アスコルビン酸・0.4 mM proline・1% ITS+Premix・10 ng/ml TGF- $\beta$ 3・500 ng/ml BMP-6 を添加したものを使用した。RT-PCR による軟骨分化関連遺伝子 (aggrecan・type II collagen (以下 Col II)・type X collagen (以下 Col X)・Sry-type high-mobility group box 5 (以下 SOX5)・SOX9) の mRNA 発現の評価と、ペレットの Safranin-O 染色を誘導後 21 日目

を行い、軟骨分化能を評価した。

分化実験においては、negative control としてヒト皮膚由来纖維芽細胞、positive control としてヒト骨髓由来間葉系幹細胞を使用した。

【結果】

1) 偽関節組織染色

偽関節組織の大部分は線維性組織であり、骨化組織や軟骨組織は認められなかつた。微小血管の形成が散見された。

2) 細胞増殖能

偽関節細胞は第 10 繼代まで増殖能は保たれていた。

3) 細胞表面抗原

間葉系幹細胞関連マーカーである CD29・CD44・CD105・CD166 は強陽性であり、造血幹細胞マーカーである CD31・CD34・CD45・CD133 は陰性であった。

4) 分化能 (骨・軟骨・脂肪分化)

i. 骨分化能 : ALP 活性は、誘導後 14・21 日目で、維持培地で培養した対照群と比して有意に高値であった。RT-PCR では、ALP・BSP・OC・OSX・Runx2 の mRNA の強発現を認め、Alizarin Red S 染色で染色性を認めた。

ii. 軟骨分化能 : 誘導後 21 日目において、RT-PCR では aggrecan・Col II・Col X・SOX5・SOX9 の発現は認められず、Safranin-O 染色も陰性であった。

【考察】

骨再生に必要な因子は生物学的要素と力学的要素である。特に巨大骨欠損を伴う骨折や、骨癒合不全などの難治例では、力学的な安定性に加え、骨伝導能・誘導能を持つ scaffold、

骨形成を促進する成長因子、骨分化能を持つ細胞の存在が重要である。今回我々は、骨癒合不全の中でも特殊な形態を示す pseudoarthrosis において、偽関節組織内に骨分化能を有する細胞が存在していることを初めて明らかにした。

偽関節細胞は第 10 繼代まで増殖能が維持され、間葉系幹細胞に特異的な細胞表面抗原を有し、骨分化誘導により骨分化することが明らかとなった。一方、軟骨分化誘導による軟骨分化能は認めなかった。過去に我々が hypertrophic nonunion において行った実験では、偽関節組織由来の細胞に軟骨分化能は存在しており、pseudoarthrosis と hypertrophic nonunion では、偽関節組織の生物学的特性が異なっていることが示された。骨癒合の形式には膜性骨化と軟骨内骨化の 2 種類の経路があり、軟骨内骨化の経路においては軟骨分化能を有する軟骨前駆細胞の存在が重要である。Pseudoarthrosis においては、偽関節組織中の細胞の軟骨分化能が失われており、軟骨内骨化の経路が阻害されることで骨癒合が進行せず、骨癒合不全に至る成因となりうることが考えられる。

骨癒合不全の治療は、一般的に強固な内固定と偽関節組織の搔扒、自家骨移植が行われる。近年では、多くの hypertrophic nonunion において、偽関節組織の搔扒・自家骨移植は行わず、強固な内固定のみが行われている。このことは、我々の先行研究で示されたように偽関節部に骨・軟骨分化能を有する間葉系幹細胞様の細胞が存在し、骨癒合に必要な生物学的活性が残存していることを考慮すれば、理にかなっていると言える。今回の我々の研究により、pseudoarthrosis において偽関節部に骨分化能を有する間葉系幹細胞様の細胞が存在していることが明らかとなったことから、強力な骨形成促進因子の局所投与の使用が将来的に可能となれば、「真の偽関節」部の生物学的特性を生かし、偽関節組織を温存した手術治療も選択肢となり得る可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第2651号	氏名	高原 俊介
論文題目 Title of Dissertation	Human pseudoarthrosis tissue contains cells with osteogenic potential ヒト偽関節組織の生物学的特性の検討		
審査委員 Examiner	主査 Chief Examiner	竹内 伸平	
	副査 Vice-examiner	勝田 郁夫	
	副査 Vice-examiner	青井 一貴	

神戸大学大学院医学(系)研究科(博士課程)

(要旨は1,000字~2,000字程度)

## 諸言

骨折の5~10%は遅延治癒や骨癒合不全(広義の偽関節)に至り、しばしば治療に難渋する。研究者らのグループは、骨癒合不全の治療戦略の確立のため、骨癒合不全の基礎的研究を報告してきた。骨癒合不全の分類のうち、pseudoarthrosisは他の骨癒合不全とは異なる病理学的形態をとることから、「真の偽関節」として区別される。今回研究者らは、真の偽関節(pseudoarthrosis)組織の生物学的特性を *in vitro* にて検討した。

## 対象と方法

Pseudoarthrosisと診断され、手術を施行した患者4例を対象とした。偽関節組織を採取し、一部を組織検体とし、残りの組織を collagenase 处理により細胞を分離した後、維持培地で培養した。得られた接着細胞を偽関節細胞とした。以下の評価を行った。

### 1) 偽関節組織染色

ホルマリン固定した組織をパラフィン包埋し、5 μm のスライド切片を作成し、hematoxylin-eosin 染色を行い、顕微鏡にて観察を行った。

### 2) 細胞増殖能

偽関節細胞を14日毎に  $4 \times 10^3$  個/cm<sup>2</sup> の密度で第10継代まで培養を行い、細胞数を計測して population doubling を評価した。

### 3) 細胞表面抗原

Flow cytometry を用い、第2もしくは3継代の偽関節細胞における細胞表面抗原を測定した。

### 4) 分化能(骨・軟骨分化)

- 骨分化能: 28日間の骨分化誘導を行った(平面培養)。誘導後7・14・21・28日目に alkaline phosphatase(以下ALP)活性測定、誘導後21日目に reverse transcription-polymerase chain reaction(以下RT-PCR)による骨分化関連遺伝子のmRNA発現の評価、誘導後21日目に Alizarin Red 染色を行い、骨分化能を評価した。
- 軟骨分化能: 21日間の三次元培養(ペレット培養)による軟骨分化誘導を行った。RT-PCRによる軟骨分化関連遺伝子のmRNA発現の評価と、ペレットの Safranin-O 染色を誘導後21日目に行い、軟骨分化能を評価した。

## 結果

### 1) 偽関節組織染色

偽関節組織の大部分は線維性組織であり、骨化組織や軟骨組織は認められなかった。微小血管の形成が散見された。

### 2) 細胞増殖能

偽関節細胞は第 10 繼代まで増殖能は保たれていた。

### 3) 細胞表面抗原

間葉系幹細胞マーカーである CD29・CD44・CD105・CD166 は強陽性であり、造血幹細胞マーカーである CD31・CD34・CD45・CD133 は陰性であった。

### 4) 分化能（骨・軟骨・脂肪分化）

- i. 骨分化能：ALP 活性は、誘導後 14・21 日目で、維持培地で培養した対照群と比して有意に高値であった。RT-PCR では、ALP・bone sialoprotein・osteocalcin・osterix・runt-related transcription factor 2 の mRNA の強発現を認め、Alizarin Red S 染色で染色性を認めた。
- ii. 軟骨分化能：誘導後 21 日目において、RT-PCR では aggrecan・type II collagen・type X collagen・Sry-type high-mobility group box 5 (SOX5)・Sry-type high-mobility group box 9 (SOX9) の発現は認められず、Safranin-O 染色も陰性であった。

### 5. 考察

骨再生に必要な因子は生物学的要素と力学的要素である。研究者らは、骨癒合不全の中でも特殊な形態を示す pseudoarthrosis において、偽関節組織の有する生物学的特性を本研究で初めて明らかにした。偽関節組織は、その組織内に血管を形成しており、増殖能と骨分化能を有する間葉系幹細胞様の細胞表面抗原を持つ細胞が含まれるという特徴を有していた。現在の pseudoarthrosis の治療では、強固な内固定と偽関節組織の搔把、自家骨移植が行われている。本研究結果によって、もし強力な骨形成促進因子の局所投与の使用が将来的に臨床で使用可能となれば、偽関節部の生物学的特性を生かして同組織を温存した手術治療も選択肢となり得る可能性が示された。

本研究は偽関節組織の生物学的特性を研究したものであるが、従来行われていない、骨癒合不全の中でも特殊な pseudoarthrosis の偽関節組織中に、高い増殖能と骨分化能を持つ細胞が存在していることを初めて証明した報告である。偽関節組織の生物学的特性を利用した新たな治療アプローチと成り得る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。