

学位請求論文の内容の要旨

論文提出者氏名	機能再建再生科学領域脊椎脊髄病態修復学教育研究分野 氏名 原田義史
(論文題目) Osteogenic lineage commitment of mesenchymal stem cells from patients with ossification of the posterior longitudinal ligament (脊椎後縦靭帯骨化症患者由来間葉系幹細胞の骨化傾向)	
<p>【背景】 間葉系幹細胞(MSCs)は骨・脂肪・軟骨や靭帯に分化する組織幹細胞で、ヒトの様々な組織から同定されている。MSCsは生体内で組織修復に寄与するとされる一方、異所性骨化の細胞起源として注目されている。これまで我々は脊柱靭帯から間葉系幹細胞を分離・同定し、脊柱靭帯および骨化部におけるMSCsの局在を報告してきた。今回我々はMSCsが脊柱靭帯骨化の細胞起源であるとの仮説を基に、MSCsの性質と病態との関連を検討した。</p> <p>【目的】 脊柱靭帯骨化症患者由来MSCsの性質を評価し、非骨化症患者由来MSCsとの性質の違いを検討すること。</p> <p>【対象と方法】 脊柱靭帯骨化症患者8例(骨化症群, 66.9±6.9歳)および頸椎症性脊髄症患者8例(対照群, 65.9±6.6歳)から術中に黄色靭帯を採取し、過去の文献に従いコラゲナーゼで処理しMSCsを単離した。得られた細胞からFluorescence-activated cell sorter(FACS)を用いて、MSCsに特徴的な細胞表面マーカーであるCD34陰性、CD105陽性を満たす細胞を選別し実験に用いた。96ウェルディッシュュ2枚で単細胞培養を行い、コロニー形成能を検討した。14日間の培養後30細胞以上に増殖していた場合をコロニー形成有りと判断した。 また得られた細胞を骨・脂肪・軟骨誘導培地で培養し、それぞれへの分化能を骨化症群と対照群で比較・検討した。21日間の骨・脂肪誘導培養後、組織特異的染色であるAlizarin Red S染色(骨組織)、Oil Red O染色(脂肪組織)を行い、それぞれの吸光度を計測することで定量的に評価を行った。骨分化能に関しては、通常培養と誘導培養中のALP活性を0、7、14日で評価した。軟骨誘導はペレット培養にて行い、21日間の誘導培養で形成された軟骨ペレットの重量と最大径を計測した。またペレット切片のAlcian Blue染色を行い、染色される軟骨基質面積の割合を定量的に評価した。また各誘導培養中の7、14、21日の時点でtRNAを回収し、骨・脂肪・軟骨関連遺伝子発現を検討した。</p> <p>【結果】 初代培養で得られた細胞は両群とも線維芽細胞様の形態を呈し、細胞形態にあきらかな違いを認めなかった。FACSによる細胞表面マーカーの解析では、第1継代細胞におけるCD34陰性、CD105陽性を満たす細胞の割合は対照群90.7±4.5%、骨化症群89.6±4.9%で両群間に有意差を認めなかった。コロニー形成能は対照群48.3±3.9コロニー、骨化症群52.0±8.9コロニー/192ウェルで、両群間に有意差を認めなかった。 骨分化誘導において、骨化症群では対照群と比較しAlizarin Red S染色で赤色に染色される石灰化を認めるコロニーを多数認めた。Alizarin Red S染色の吸光度を計測すると、対照群1.89±0.93、骨化症群13.1±3.95で骨化症群は有意に骨分化能が高かった。ALP活性は誘導開始時には両群間に差を認めないが、通常培</p>	

養 14 日と誘導培養 7 日および 14 日では骨化症群で有意に高値であった。脂肪分化誘導では、Oil Red O 染色で両群とも脂肪滴の形成を認め、その吸光度は対照群 0.30 ± 0.06 、骨化症群 0.27 ± 0.07 で有意差を認めなかった。軟骨分化誘導では、形成された軟骨ペレットの重量は対照群 $0.49 \pm 0.09\text{mg}$ 、骨化症群 $0.43 \pm 0.05\text{mg}$ 、最大径は対照群 $0.97 \pm 0.07\text{mm}$ 、骨化症群 $0.99 \pm 0.06\text{mm}$ であり、いずれも有意差を認めなかった。各軟骨ペレット全体の面積に占める Alcian Blue で染色される面積の割合は、対照群 $42.7 \pm 3.7\%$ 、骨化症群 $38.6 \pm 6.2\%$ で有意差を認めなかった。

骨分化関連遺伝子である BMP2 と ALP が誘導後 7 日において骨化症群で有意に高値であり、また Runx2 が誘導後 14 日と 21 日において骨化症群で有意に高値であった。脂肪分化関連遺伝子である PPAR γ 2 と LPL、軟骨分化関連遺伝子である Sox9、COL2A1、COL10A1 の発現には有意差を認めなかった。

【考察】

脊柱靭帯骨化症の病因として遺伝子、内分泌、環境因子などが報告されているが、いまだ解明されていない点が多い。また、これまで異所性骨化の起源となる細胞は不明であった。間葉系幹細胞は進行性骨化性線維異形成症、熱傷後の異所性骨化、大動脈弁石灰化といった異所性骨化の細胞起源として報告されている。脊椎疾患との関連としては、黄色靭帯に存在する MSCs が黄色靭帯肥厚症の病態に関与しているとの報告がなされている。

本研究の結果、骨化症患者群由来 MSCs は骨分化能、ALP 活性、骨化関連遺伝子発現が高値であることがあきらかとなった。MSCs の分化能の違いが脊柱靭帯骨化の病態に関与している可能性がある。MSCs の性質の違いをもたらす因子として、遺伝的背景の他に遺伝子のエピジェネティクス制御、miRNA などが報告されており、そのメカニズムを解析することで、新たな検査・治療法の開発につながることを期待される。

【まとめ】

- ・骨化症患者由来 MSCs は骨分化能、骨分化関連遺伝子の発現が高値であった。
- ・MSCs の分化能が脊柱靭帯骨化の発生・伸展に関与する可能性がある。