

# 論 文 内 容 要 旨

Angiogenic conditioning of peripheral blood mononuclear cells promotes fracture healing

(生体外血管新生能増幅ヒト末梢血単核球は骨折治癒を促進する)

Bone & Joint Research, 6(8) 489-498, 2017.

主指導教員：安達 伸生教授

(医歯薬保健学研究科 整形外科学)

副指導教員：大段 秀樹教授

(医歯薬保健学研究科 消化器・移植外科学)

副指導教員：久保 忠彦准教授

(医歯薬保健学研究科 整形外科学)

三藤 建志

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

【目的】ヒト末梢血単核球 (peripheral blood mononuclear cell:PBMNC) は骨再生や血管再生を目的とする細胞療法の細胞ソースとして低侵襲、低コストを実現する非常に有用なソースと考えられるが、その治療効果は低い。PBMNC の質を改善する新たな培養方法 (無血清培地に SCF(Stem Cell Factor), Flt-3(Flt-3 ligand), TPO(Thrombopoietin), IL-6(Interleukin-6), VEGF(Vascular Endothelial Growth Factor)を添加し、7日間培養する方法: Quality and Quantity conditioning culture(QQ culture) が報告されており、ラット下肢虚血モデルを用いた血管再生の効果において良好な成績が報告されている。この培養方法で、機能を増強した PBMNC (QQMNC)を用い、その血管新生及び骨癒合促進能を検討し、ラット大腿骨難治性骨折モデルにおいて骨形成が促進されるかについても検討した。

【方法】健常成人の末梢血から比重遠心法により PBMNC を分離し、SCF, Flt-3, TPO, IL-6, VEGF を含む無血清培地にて 7日間 QQ culture を行った。細胞数をカウント後、フローサイトメトリーで細胞表面抗原(CD34、VEGFR2、CCR2、CD206)の発現を、real-time PCR で血管新生関連遺伝子(VEGF、Angiopoietin1、Angiopoietin2)の発現を評価し、培養前後で比較した。また、QQMNC の骨分化促進作用を評価するためにヒト間葉系幹細胞 (MSC) と共培養した状態で骨分化誘導を行い、コントロール群、PBMNC 群、QQMNC 群の 3群に分け、共培養後 3, 7日における骨関連遺伝子発現(1型コラーゲン、RUNX2、オステオカルシン)を real-time PCR にて評価し、共培養後 14日目に、アリザニンレッド染色を行い、染色面積を評価した。血管新生の評価として、ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)との共培養を行い、tube formation assay を用いて、コントロール群、PBMNC 群、QQMNC 群の 3群にて、血管新生を評価した。In vivo として、免疫不全ラット大腿骨骨折癒合不全モデルを作製し、コントロール群、PBMNC 群、QQMNC 群の 3群に分け、レントゲン、 $\mu$ CT、組織学的評価を行った。 $\alpha$  smooth muscle actin ( $\alpha$ SM) 染色にて血管新生、トルイジンブルー染色にて骨癒合を評価した。術後 2週の骨折部周囲組織を real-time PCR で血管新生関連因子(VEGF、FGF2)と骨関連遺伝子(1型コラーゲン、RUNX2、オステオカルシン)を評価した。

【結果】細胞数は QQ culture 後に約 30%減少したが、フローサイトメトリーにて前駆・幹細胞集団としての CD34 陽性細胞は約 7倍に、抗炎症細胞である CD206 陽性細胞は約 20倍に増加し、VEGFR2 陽性細胞は約 0.33倍に、炎症細胞である CCR2 陽性細胞は約 0.5倍に減少した。血管新生関連因子として、VEGF、Angiopoietin2 は培養前後で比較し、培養後で有意に増大していた。MSC との共培養において、共培養後 3日目においては、QQMNC 群は他の 2群と比較して、1型コラーゲン、RUNX2 の発現が有意に高く、7日目においては、QQMNC 群は他の 2群と比較し、オステオカルシンの発現が有意に高かった。共培養後 14日のアリザニンレッド染色では、QQMNC 群がコントロール群と比較し、有意に染色面積が大きかった。HUVEC との共培養において、QQMNC 群の tube formation の全長は他の 2群と比較し、有意に長かった。In vivo において、移植後 2週の組織学的評価

から QQMNC 群では他の群と比較して有意に血管新生の亢進が確認でき、8 週のレントゲン撮影で PBMNC 群は 12.5% (1/8) に、QQMNC 群は 62.5% (5/8) に骨癒合を認めた。μCT、組織学的評価においても同様の骨癒合が確認できた。また、骨折部周囲組織の遺伝子解析から、QQMNC 群で有意に VEGF、FGF2 の発現が上昇していた。

【考察】 本研究において QQ culture で培養した PBMNC は *in vitro* における血管新生及び骨癒合促進能が有意に増強されることが示された。また、*In vivo* においても、骨折周囲の血管新生を有意に亢進させることで、骨癒合が、有意に促進されることが推測された。QQMNC は低侵襲で比較的容易に調整可能であるため、今後の骨折、偽関節治療の一つの選択肢として期待できると考える。