

京都大学	博士 (医 学)	氏 名	村尾 浩樹
論文題目	Periosteal cells are a major source of soft callus in bone fracture (骨折修復過程における軟性仮骨は主に骨膜細胞に由来する)		
(論文内容の要旨)			
<p>骨折の治癒過程では血腫が生じる炎症期に始まり、骨膜の肥厚を伴う軟性仮骨の形成、血管侵入によって仮骨が骨化する硬性仮骨への置換を経て、最終的に骨芽細胞・破骨細胞によって骨組織がリモデリングされる。組織修復過程では皮質骨の外・内表面に存在する骨膜の細胞や骨髄の細胞が軟性仮骨の形成に重要な役割を果たすという報告がある。しかし、実際に生体での骨折治癒過程において軟性仮骨の由来細胞を明らかにした報告はない。そこで本研究では、Cre リコンビナーゼ : loxP リコンビネーションシステムによるコンディショナル遺伝子組換えシステムを利用し、種々の Cre マウスと ROSA26 reporter(R26R)マウスを掛け合わせた遺伝子改変マウス(Cre;R26R)を用いて、骨折治癒過程における軟性仮骨の細胞系譜を in vivo で検証した。Cre;R26R マウスでは、一旦 Cre リコンビネーションが起きた細胞は、その後恒常的に LacZ を発現するため、X-gal 染色によって Cre を発現するようになった細胞の追跡が可能となる。実験では、肢芽の多能性間葉系細胞に発現する Prx1-Cre、未分化間葉系細胞に発現する Col1a1(3.6 kb)-Cre、成熟骨芽細胞に発現する Col1a1(2.3 kb)-Cre、および tamoxifen の投与によって任意のタイミングで遺伝子特異的に Cre の発現を誘導できる Sox9-CreERT2 マウスを用いた。Sox9 は未分化間葉系細胞から骨軟骨前駆細胞への分化および軟骨分化におけるマスター遺伝子として知られており、本実験では Sox9 遺伝子に LacZ をノックインした Sox9-LacZ マウスも使用した。これらのマウスの脛骨に骨折を施し、その治癒過程を組織学的に解析した。</p> <p>Prx1-Cre;R26R マウスでは骨膜中の全ての細胞が LacZ 陽性であり、骨折 7 日目における軟性仮骨の細胞も全て LacZ を発現していた。また、Col1a1(3.6 kb)-Cre;R26R マウスの骨膜も一部 LacZ 陽性であり、骨折後 7 日目における軟性仮骨も部分的に LacZ の発現を認めた。一方、Col1a1(2.3 kb)-Cre;R26R マウスでは骨膜の cambium layer に存在する成熟骨芽細胞が LacZ 陽性を示したが、骨折後の軟性仮骨に LacZ 発現細胞は認められなかった。これらの結果は軟性仮骨を構成する多くの細胞は骨膜内にある間葉系幹細胞に由来しており、骨膜内の成熟骨芽細胞に由来している訳ではないことを示している。また、Sox9-LacZ マウスでは、骨折後 3 日の時点で骨折部近傍の骨膜に LacZ 陽性細胞が出現し、5 日目では肥厚した骨膜内および軟性仮骨内の軟骨様細胞全てに LacZ の発現を認めた。一方、骨髄内に LacZ 陽性細胞は見られなかった。さらに Sox9-CreERT2;R26R マウスの骨折後 3 日目に tamoxifen を腹腔内投与すると、骨折後 5 日目に形成された軟性仮骨の大部分の軟骨様細胞が LacZ 陽性を示した。また骨折後 28 日目の硬性仮骨の細胞も LacZ の発現を示したことから、骨折後 3 日目に Sox9 を発現していた骨膜中の細胞が主に軟性仮骨および硬性仮骨を構成する細胞に分化したことが示され</p>			

た。
以上の結果から、仮骨を形成する軟骨細胞や骨芽細胞は主に骨折後骨膜に出現する **Sox9** を発現している細胞に由来することが **in vivo** において示され、骨折の治癒機序の一端が明らかになった。

(論文審査の結果の要旨)

本研究は骨折治癒課程における軟性仮骨の由来細胞を、種々の遺伝子改変マウスを用いて **in vivo** で検証した。

分化段階特異的遺伝子 **Cre** と **ROSA26 reporter** マウスを交配したマウス (**Cre;R26R**) を **X-gal** 染色し細胞系譜の追跡を行った。肢芽の未分化間葉系細胞に発現する **Prx1** や骨軟骨前駆細胞以降に発現する **Col1a1(3.6kb)** の **Cre;R26R** マウスの骨膜には **X-gal** 陽性細胞があり、軟性仮骨も陽性であった。一方、分化骨芽細胞に発現する **Col1a1(2.3kb)** の **Cre;R26R** マウスの骨膜に **X-gal** 陽性細胞はあるものの、軟性仮骨では陽性は認めなかった。これらの所見より、軟性仮骨は骨膜に存在する分化骨芽細胞ではなく、骨膜のより未分化な間葉系細胞に由来する可能性が示唆された。

内軟骨性骨化のマスター遺伝子である **Sox9** 発現の検証を行った。**Sox9-LacZ** マウスの骨折後 3 日の骨膜に **Sox9** 発現細胞が出現した。**Sox9-CreERT2;R26R** マウスを用いて骨折後 3 日の **Sox9** 発現細胞を追跡したところ、軟性仮骨が **X-gal** 陽性であった。これらのことより、骨折後骨膜の未分化間葉系細胞が **Sox9** を発現する骨軟骨前駆細胞へ分化し、軟性仮骨を形成したことが示唆された。

本研究は、骨折治癒過程における骨膜の役割を解明し、今後の骨折治療の開発に寄与するものである。

したがって、本論文は博士 (医学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成 26 年 6 月 10 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日： 年 月 日以降