京都大学	博士（医学）	氏　名	北折　俊之
論文題目	Stromal cell-derived factor 1/CXCR4 signaling is critical for the　recruitment of mesenchymal stem cells to the fracture site during skeletal repair in a mouse model (Stromal cell-derived factor 1/CXCR4 のシグナルはマウスモデルの骨修復に際して間葉系幹細胞の骨折部への誘導に必須である)		

（論文内容の要旨）

【目　的】　ケモカイン stromal cell-derived factor 1（SDF-1）は血球系幹細胞に対する遊走作用が知られているが、近年、間葉系幹細胞（mesenchymal stem cells：MSCs）にもその受容体 CXCR4 が発現し SDF-1 が MSCs を誘導するという報告もされている。心筋梗塞、脳虚血では組織傷害部で SDF-1 が高発現し MSCs を誘導することが動物モデルで示されている。一方、骨治癒において MSCs が関与していることも知られている。しかし、骨治癒における SDF-1 の MSCs 誘導作用は解明されていない。骨治癒部における SDF-1 の MSCs 誘導作用を解明すべく以下の研究を行った。

【方　法】

１．）マウス大腿骨の同種自家骨、同種他家骨の骨移植モデルを作成した。移植骨及び周囲組織を経時的に採取し SDF-1 の遺伝子発現を評価した。また、組織免疫染色で SDF-1 の発現部位を同定した。

２．）マウス骨髄から採取培養した MSCs を用いて in-vitro / in-vivo cell migration assay を行った。

３．）自家骨移植モデルに抗 SDF-１中和抗体、もしくは CXCR4 ｱﾝﾀｺﾞﾆｽﾄを投与し骨治癒を評価した。

４．）SDF-1+/-マウス、CXCR4+/-マウスに自家骨移植を行い、骨治癒を組織学的に評価した。また、両マウス間で大腿切除骨を交換移植し骨治癒を評価した。

【結　果】　自家骨移植では化骨形成が良好で骨治癒したが、他家骨移植では治癒が遷延した。移植骨周囲組織の SDF-1 mRNA 発現は自家骨で亢進し骨移植後２日目に有意差を認めた。他家骨では SDF-1 mRNA の発現亢進は認めなかった。自家骨移植モデルの組織免疫染色では自家移植骨の骨膜で SDF-1 の高発現を認めた。

In-vitro migration assay では SDF-1 は濃度依存性に MSCs を誘導した。この誘導作用は濃度差の消失、CXCR4 ｱﾝﾀｺﾞﾆｽﾄの投与によって抑制された。In-vivo migration assay では MSCs が骨治癒部に誘導された。しかも、誘導された MSCs が軟骨細胞に分化し内軟骨化骨形成に貢献することが確認された。

自家骨移植モデルに抗 SDF-１中和抗体、CXCR4 ｱﾝﾀｺﾞﾆｽﾄを投与すると、化骨形成が有意に減少した。SDF-1+/-マウス、CXCR4+/-マウスで自家骨移植を施行すると化骨形成は有意に減少した。CXCR4+/-マウスの切除骨を SDF-1+/-マウスに移植すると減少した化骨形成が改善した。一方 SDF-1+/-マウスの切除骨を CXCR4+/-マウスに移植しても化骨形成の改善は認めなかった。

【考　察】　自家骨移植モデルと他家骨移植モデルを用いて骨治癒における SDF-1 の作用を示した。自家骨モデルで SDF-1 mRNA の発現が亢進し骨治癒との関与が示された。組織免疫染色では自家移植骨の骨膜が SDF-1 の発現源であることが確認された。

In vivo cell migration assay では MSCs が骨治癒部に誘導された。CXCR4 ｱﾝﾀｺﾞﾆｽﾄの投与でこの作用が抑制されることから SDF-1/CXCR4 シグナルを介した誘導作用と考えられた。しかも誘導 MSCs は軟骨細胞に分化し内軟骨骨化の細胞源になっていることが示された。

自家骨移植モデルに SDF-1 の中和抗体、CXCR4 のｱﾝﾀｺﾞﾆｽﾄを投与すると、ともに化骨形成が抑制され、さらに、SDF-1+/-マウス、CXCR4+/-マウスの自家骨移植モデルでも化骨形成が減少した。SDF-1/CXCR4 シグナルの骨治癒における機能的関与を支持する結果であった。

SDF-1+/-マウスと CXCR4+-/-マウスの切除骨を交換移植するモデルでは CXCR4+/-マウス由来の移植骨を SDF+/-マウスに移植すると化骨形成の減少が改善された。CXCR4+/-由来の移植骨では SDF-1 発現が正常で MSCs 誘導しえたこと、宿主の SDF-1+/-マウスの MSCs では CXCR4 発現は正常で SDF-1 に応答しえたことが化骨形成回復に寄与したと考察された。これは、組織免疫染色で SDF-1 発現を移植骨の骨膜に認めた結果とも矛盾せず、骨治癒における骨膜での SDF-1 発現の重要性を支持する結果であった。また、SDF-1+/-マウス由来の移植骨を CXCR4+/-に移植しても化骨形成の回復が得られなかったという結果は上記考察を支持するものであった。

【結　論】　SDF-1/CXCR4 シグナルは内軟骨骨化において MSCs を誘導し骨治癒を促進することをマウスの自家骨、他家骨の骨移植モデルを用いて証明した。

（論文審査の結果の要旨）

ケモカインSDF-1は損傷組織に発現し間葉系幹細胞(MSCs)を誘導して組織修復を促すことが知られているが、骨治癒への作用は証明されていない。マウスの骨移植モデル(自家骨と凍結アルコール処理同種骨(以下、同種骨)を比較評価)を用いて骨治癒におけるSDF-1の作用を研究した。その結果、骨治癒良好な自家骨移植では骨膜でSDF-1の発現亢進を認めたが、骨形成不良な同種骨移植ではSDF-1の発現上昇は認めなかった。また、自家骨移植のモデルでSDF-1がマウスMSCsを骨治癒局所に誘導することを確認した。同モデルに抗SDF-1中和抗体、CXCR4アンタゴニストを投与すると骨形成そのものが阻害された。SDF-1、CXCR4のノックアウトマウスでの自家骨移植モデルでは骨形成が阻害され、さらに、CXCR4ノックアウトマウスの移植骨をSDF-1ノックアウトマウスに移植すると阻害された骨形成の回復が認められた。この結果は損傷においてもSDF-1がMSCを局所に誘導し骨治癒を促進することを示している。

以上の研究は骨治癒にMSCが関与するメカニズムの解明、SDF-1の機能的役割の解明に寄与するところが大きい。従って本論文は博士(医学)の学位論文として価値あるものとして認める。

なお、本学位授与申請者は、平成21年8月17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