

学位論文

Comparing immune-competent and immune-deficient  
mice as animal models for bone tissue engineering  
(骨再生研究モデルとしての免疫正常および免疫不全動物  
の比較について)

張 以鳴

大学院歯学独立研究科 硬組織疾患制御再建学講座  
(主指導教員:各務 秀明 教授 )

松本歯科大学大学院歯学独立研究科博士(歯学)学位申請論文

Comparing immune-competent and immune-deficient mice  
as animal models for bone tissue engineering

Yiming Zhang

Department of Hard Tissue Research, Graduate School of Oral Medicine  
(Chief Academic Advisor : Professor Hideaki Kagami )

The thesis submitted to the Graduate School of Oral Medicine,  
Matsumoto Dental University, for the degree Ph.D. in Science

## 要 旨

### 【目的】

歯周病に伴う重度の歯槽骨萎縮症や、腫瘍や嚢胞の摘出術後にみられる骨欠損に対しては、骨造成とインプラントによる治療の有用性が報告されている。しかしながら、骨造成には自家骨の移植が必要となる場合が多く、手術時間の延長や骨採取部への侵襲が問題なるため、患者負担の少ない新たな治療法が求められている。ティッシュエンジニアリングは、細胞と生体吸収性の担体などを用いて、組織や臓器を再生させる新たな治療法である。骨髄由来の間葉系幹細胞は、高い骨再生能を有することが知られており、すでに臨床研究も行われている。しかしながら、移植された細胞による骨再生のメカニズムには不明な点も多い。これまでの骨再生研究では、用いる細胞の種差の大きさから、ヒト細胞を免疫不全動物へと移植する系が頻用されてきた。しかしながら、培養骨による骨再生では、移植後の炎症によって骨再生が阻害される可能性が報告されており、さらに免疫系細胞は骨形成や骨吸収と密接な関係があることが知られている。したがって、免疫不全動物を用いた骨再生モデルにおける骨形成過程と、免疫正常動物あるいは実際の患者への細胞移植における骨再生過程との間には違いがあるものと想定されるが、その詳細は明らかではない。本研究では、ティッシュエンジニアリングによる培養骨を免疫不全動物と免疫正常動物のそれぞれに移植することで、骨形成過程を比較可能なモデルを作製した。さらに、骨再生過程における局所の炎症や免疫応答を比較することで、免疫不全動物と免疫正常動物を用いた骨再生モデルの違いについて検討を行った。

### 【材料と方法】

BALB/cAJclマウスおよびBALB/cAJcl-nu/nuマウスをそれぞれ免疫正常動物、免疫不全動物として用いた。雌BALB/cAJclマウスの下腿長管骨を摘出し細切後、酵素処理および組織片培養にて接着性の細胞を得た。2継代目の細胞を $\beta$ -TCP顆粒上に播種し、2週間骨分化誘導培地にて培養を行い、培養骨を作製した。得られた培養骨を、全身麻酔下でそれぞれ雄BALB/cAJclマウスおよび雄BALB/cAJcl-nu/nuマウスの背部皮下へ移植した。細胞移植のコントロールとして、 $\beta$ -TCP顆粒のみの移植を行った。埋入後1, 2, 4, 8週後に移植物を摘出し、解析を行った。摘出組織を2分割し、一方は直ちに液体窒素中で凍結し、RNAを抽出した。定量的PCRにて、IL-6、TNF $\alpha$ 、IL-4、RANKLの発現を解析した。もう一方は中性ホルマリンにて固定し、パラフィン包埋、薄切の後、ヘマトキシリン-エオシン染色、TRAP染色、および抗IL-6抗体、抗TNF $\alpha$ 抗体、抗SP-7抗体による免疫組織化学的染色を行った。

### 【結果】

細胞移植1週後のヘマトキシリン-エオシン染色において、BALB/cAJcl群では炎症性細胞浸潤が著明であった。新生骨は細胞移植4週後から認められ、その面積はBALB/cAJcl-nu/nu群ではBALB/cAJcl群と比較して有意に広がった。その後BA

LB/cAJc1-nu/nu群では4週から8週にかけて新生骨の面積は徐々に減少し、8週では両群に有意差を認めなかった。担体のみの移植ではTRAP陽性細胞はほとんど認められず、一方細胞移植群においては移植2週後より認められた。TRAP陽性細胞の占める面積は、BALB/cAJc1-nu/nu群では細胞移植2週後に最大となり、その後減少した。8週後では両群に有意差は認められなかった。TNF- $\alpha$ 陽性細胞およびIL-6陽性細胞は、細胞移植1週後から担体周囲に認められ、4週から8週後にはさらに強い発現を認めたが、その分布には両群で差を認めなかった。IL-4のmRNAはBALB/cAJc1群のみで発現しており、2週から4週にかけて増加した。TNF- $\alpha$ は1週目より両群で発現を認めたが、どの時点においてもBALB/cAJc1群ではBALB/cAJc1-nu/nu群より高値であった。SP-7陽性細胞は1週目より認められ、特に新生骨周囲では強く発現していたが、両群でその分布に差は認められなかった。定量的PCRの結果では、RANKLの発現は細胞移植1週後にBALB/cAJc1-nu/nu群で有意に高値であった。一方、Osterixの発現は細胞移植2週後でBALB/cAJc1-nu/nu群で高い傾向であったが、有意差は認められなかった。

#### 【考察】

本研究で用いた実験系では、免疫不全動物のみでなく、免疫正常動物においても培養骨による骨形成が認められた。特定の実験動物モデルによる結果ではあるものの、免疫正常動物、あるいは患者においても培養骨による骨再生が可能であることが示唆された。しかしながら、移植4週までの早期の骨形成過程には両群で差が認められ、免疫不全動物ではより多くの骨が形成された。免疫不全動物と免疫正常動物では、T細胞に由来するサイトカインとしてIL-4の発現に違いが認められ、IL-4が免疫正常動物では破骨細胞の分化を抑制しているものと考えられた。一方、炎症性サイトカインであるTNF- $\alpha$ は免疫正常動物で高値であり、骨芽細胞のアポトーシスを誘導することで骨形成を抑制した可能性が示唆された。本研究の結果から、T細胞による免疫応答が培養骨による骨形成過程に影響を与えることが明らかとなった。実際の骨形成過程やその制御は複雑であり、本研究ではその影響の一部を解析したに過ぎない。しかしながら、実験動物モデルによる骨再生過程の違いについて理解を深めることは、骨再生メカニズムの解明のみならず、臨床応用における骨再生治療効果の改善にも資することが期待される。