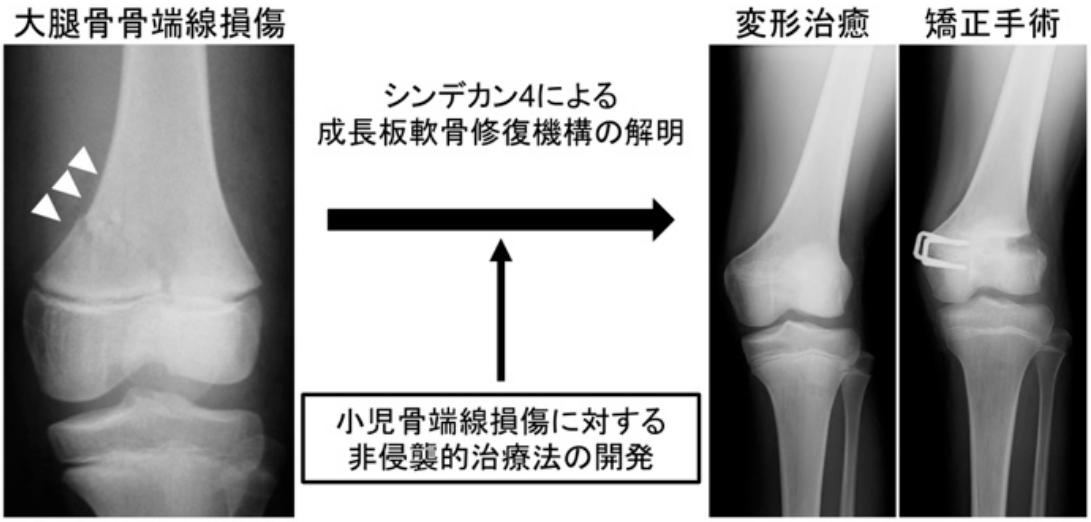
190　小児骨端線損傷後の治癒におけるシンデカン4の影響	松岡　正剛

【目的】小児骨端線損傷は小児骨折における 30%を占め、そのうち 10%が四肢の短縮、変形をきたすため社会的に重要な問題である。長管骨の長軸方向の成長は、成長板での軟骨細胞肥大化に引き続く血管侵入による骨組織への置換（内軟骨性骨化）により主に制御される。成長板軟骨損傷は損傷軟骨の部分的な骨化により成長障害を来たし、若年者に大きな負担を与えるがその詳細な機序は未だ明らかにされていない。一方、ケモカイン Stromal cell-derived factor-1（SDF-1）／pre-B cell growth-stimulating factor（以下 SDF-1）は、さまざまな組織の修復過程において重要な役割を担うことが知られている。我々はこれまでケモカイン SDF-1 が骨髄間葉系幹細胞を損傷部に誘導し、軟骨修復を促進することを明らかにした。さらに、生体内に広く分布する細胞膜貫通型ヘパラン硫酸プロテオグリカンであるシンデカン 4 が、骨髄間葉系幹細胞の遊走に重要な役割を担う SDF-1 と分子相互作用を有することに着目し、シンデカン 4 欠損が自己免疫性疾患における関節軟骨の恒常性維持に促進的役割を担うことを明らかにした。そこで、関節軟骨の恒常性維持に重要な役割を担うシンデカン 4 欠損は、成長板修復過程においても損傷軟骨細胞に対して促進的作用を及ぼす可能性があると着想し、成長板軟骨修復機構の更なる解明を目指す。

【方法】本研究の最終到達目標は、小児骨端線損傷による骨成長障害に対する非侵襲的新規治療法を開発することである。本研究期間内の到達目標はシンデカン 4 が成長板軟骨損傷の修復過程において果たしている役割を明らかにすることである。シンデカン 4 が果たす役割を明らかにするために、3 週齢の野生型マウスに成長板損傷モデルを作製しその表現型を解析した。*In vitro* の実験系としては、野生型マウス、シンデカン 4 ノックアウトマウス（KO マウス）より回収した間葉系幹細胞を用いて、増殖試験・遊走能試験を行った。

【結果】3 週齢の野生型マウスの修復過程を調査した。全身麻酔下に実体顕微鏡で観察を行い、膝関節に 5 mm の皮膚切開により脛骨近位成長板を明らかにし、脛骨外側より内側に向かって 25-G 針で直径 500 μm の成長板軟骨損傷を作製した。術後経時的に検体を回収し、成長板軟骨損傷が脛骨長を測定したところ損傷を受けた脛骨の全長は骨橋を形成し、健側と比較して短縮していた。本モデルを用いて KO マウスの表現型を評価したところ、術後 3 週において KO マウスの脛骨全長は WT と比較して成長障害が促進される傾向を示した。また、マウスより回収した骨髄間葉系幹細胞において増殖能試験では KO マウスと野生型マウスに差はなかったが、遊走能試験では KO マウスにおいて野生型マウスよりも有意に増加していた。

本研究計画の治療戦略



190. 小児骨端線損傷後の治癒におけるシンデカン 4 の影響

松岡　正剛

北海道大学病院 整形外科

Key words：シンデカン 4，成長板軟骨損傷，動物モデル，SDF-1

緒　言

小児骨端線損傷は小児骨折における 30%を占め、そのうち 10%が四肢の短縮、変形をきたすため社会的に重要な問題である。長管骨の長軸方向の成長は、成長板での軟骨細胞肥大化に引き続く血管侵入による骨組織への置換（内軟骨性骨化）により主に制御される。成長板軟骨損傷は損傷軟骨の部分的な骨化により成長障害を来たし、若年者に大きな負担を与えるがその詳細な機序は未だ明らかにされていない。

一方、ケモカイン Stromal cell-derived factor-1（SDF-1）／pre-B cell growth-stimulating factor（以下 SDF-1）は、さまざまな組織の修復過程において重要な役割を担うことが知られている。我々はこれまでケモカイン SDF-1 が骨髄間葉系幹細胞を損傷部に誘導し、軟骨修復を促進することを明らかにした［1，2］。さらに、生体内に広く分布する細胞膜貫通型ヘパラン硫酸プロテオグリカンであるシンデカン 4 が、骨髄間葉系幹細胞の遊走に重要な役割を担う SDF-1 と分子相互作用を有することに着目し、シンデカン 4 欠損が自己免疫性疾患における関節軟骨の恒常性維持に促進的役割を担うことを明らかにした［3］。そこで、関節軟骨の恒常性維持に重要な役割を担うシンデカン 4 欠損は、成長板修復過程においても損傷軟骨細胞に対して促進的作用を及ぼす可能性があると着想し、成長板軟骨修復機構の更なる解明を目指す。

本研究の目的は 1. 成長板損傷修復過程において SDF-1 およびシンデカン 4 が関与する、2. シンデカン 4 の発現を調整することで、損傷軟骨細胞修復過程に対して促進的作用を及ぼすことの 2 点を、シンデカン 4 ノックアウトマウスを用いて証明することである。我々の先行研究から、シンデカン 4 の発現を抑制することで損傷成長板軟骨細胞の形質を維持し、損傷部の部分的骨化を抑制することで軟骨損傷の治癒過程に促進的作用を及ぼすことは明らかである。そのためシンデカン 4 の発現を抑制した遺伝子改変マウスに対して、我々が独自に開発した成長板軟骨損傷モデルを用いて解析することによって、損傷成長板軟骨細胞修復メカニズムに関する新しい知見が得られる可能性がある。

方　法

本研究の最終到達目標は、小児骨端線損傷による骨成長障害に対する非侵襲的新規治療法を開発することである。本研究期間内の到達目標はシンデカン 4 が成長板軟骨損傷の修復過程において果たしている役割を明らかにすることである。

1. マウス成長板軟骨損傷モデルの確立

3 週齢の野生型マウスの修復過程を調査した。全身麻酔下に実体顕微鏡で観察を行い、膝関節に 5 mm の皮膚切開により脛骨近位成長板を明らかにし、脛骨外側より内側に向かって 25-G 針で直径 500 μm の成長板軟骨損傷を作製した。逆側膝は皮膚切開のみとし、術後 21、28 日において組織学的評価を行った。また、μCT 解析により骨橋の定量的評価、1 次海綿骨の骨密度を調査した。

2. *In vivo* における増殖能試験・遊走能試験

2 週齢マウスの四肢骨についてコラゲナーゼ処理をした後に、間葉系幹細胞を回収した。増殖能試験として、回収した間葉系幹細胞を 96 well プレートに野生型マウス、KO マウスそれぞれ培養し、Cell Count Kit-8（DOJINDO）によ

り測定した。また、遊走能試験として 24 well プレートで間葉系幹細胞を培養した後に Cytoselect（コスモ・バイオ株式会社）を用いて測定した。

3. マウス成長板軟骨損傷モデルにおけるシンデカン 4 欠損の表現型についての解析

我々が独自に開発したマウス成長板軟骨損傷モデルを用いて、3 週齢の野生型マウスならびに KO マウスの修復過程を調査した。評価方法としては組織学的評価ならびに、μCT による骨量の定量の評価を行った。

結　果

1. マウス成長板軟骨損傷モデルの確立

3 週齢の野生型マウスの近位脛骨成長板に 25-G 針で成長板軟骨損傷を作製し、術後経時的に検体を回収し解析した。術後 3、5 週において損傷を作製した脛骨全長は Sham 手術を行った健側と比較して、脛骨全長が有意に短縮した（図 1a）。1 次海綿骨の骨密度については術後 3 週で一過性に手術を受けた群で増加するものの、術後 5 週ではその効果はキャンセルされていた（図 1b）。このことは 1 次海綿骨については損傷による影響は経時的に回復し、成長障害の主因としては骨橋形成である可能性を示唆した。組織学的解析では 3 週で骨端と骨幹は骨性に架橋され、5 週で骨量構造を伴った骨橋が形成されていた（図 1c、d）。以上より、我々が独自に開発したマウス成長板軟骨損傷モデルは再現性を持って、臨床における骨端線損傷を模倣するモデルとして解析可能であることが示された。

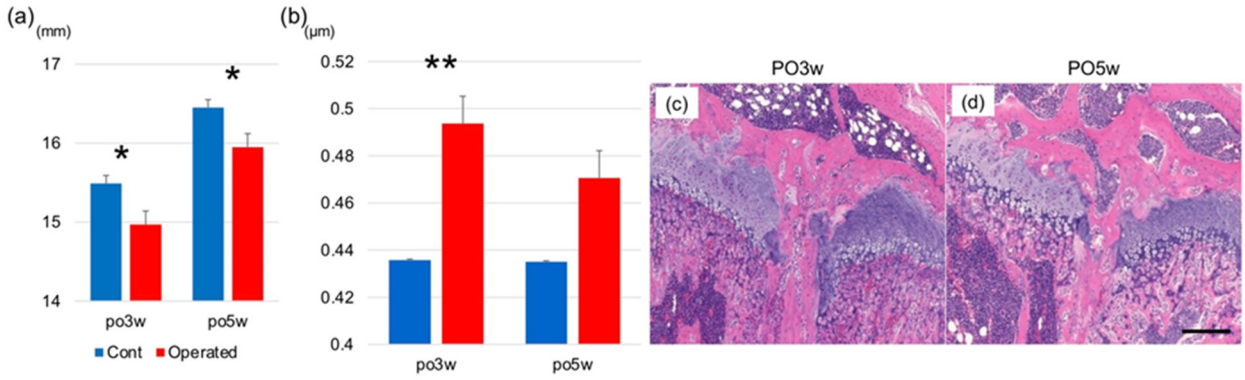


図 1. マウス成長板軟骨損傷モデル後の経時的解析

a)　術後 3、5 週での脛骨全長。いずれのタイムコースでも成長板軟骨損傷を受けた脛骨は Sham 手術を受けた健側と比較して短縮した。

b)　術後 3、5 週での 1 次海綿骨での骨密度（Bone volume／Total volume として算出）。

c、d）成長板軟骨損傷後の組織学的評価。（c）術後 3 週、（d）術後 5 週でのヘマトキシリン・エオジン染色（Scale bar：100μm）。

Unpaired t-test により解析（*P＜0.05、**P＜0.01）（a、b）。

2. シンデカン 4 欠損は細胞増殖能に影響を与えない

次に間葉系幹細胞に対し、細胞増殖試験を行うと野生型マウス、KO マウスにおいて大きな差はなかった（図 2a）。さらに骨髄間葉系幹細胞を損傷部に誘導するのに中心的役割を担うケモカイン SDF-1 存在下（10、100 ng/ml）でも細胞増殖試験を行ったが、同様に大きな差はなかった（図 2b）。この結果より、シンデカン 4 欠損は細胞増殖には影響を与えないことが示唆された。

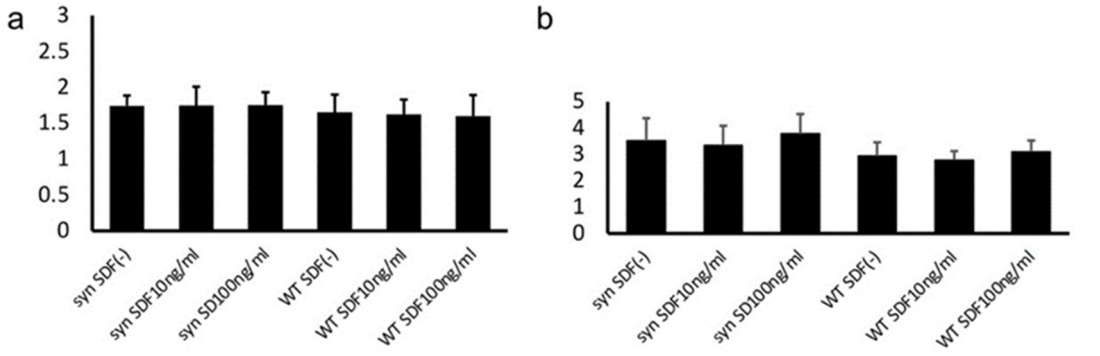


図 2. マウス間葉系幹細胞による細胞増殖試験

間葉系幹細胞を96 wellプレートに培養し、24時間（a）、72時間（b）後に吸光度を測定した。Tukey-Kramer testにより検定。

a）24 時間での測定結果。群間に有意な差はいずれもなかった（P value＞0.9）。

b）72 時間での測定結果。24 時間と同様に群間に有意な差はいずれもなかった（P value＞0.9）。

3. シンデカン 4 欠損は細胞遊走能を低下させる

次に、SDF-1 存在下で間葉系幹細胞の細胞遊走能に影響を与えるかを調査した。間葉系幹細胞に SDF-1（100 ng/ml）導入下において、遊走能試験として 24 well プレートで間葉系幹細胞を培養した後に Cytoselect（コスモ・バイオ株式会社）を用いて吸光度を測定した。シンデカン 4 欠損は野生型と比較して細胞遊走能が低下することが明らかとなった（図 3）。本結果よりシンデカン 4 は間葉系幹細胞の損傷部への動員に重要な役割を担っていることが示唆された。

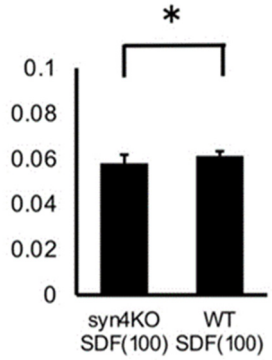


図 3. マウス間葉系幹細胞による細胞遊走能試験

間葉系幹細胞を 24 well プレートに培養し、SDF-1（100ng/ml）投与し 24 時間後に測定。Unpaired t test により検定（*P＜0.05）。

4. シンデカン 4 欠損により成長板軟骨損傷による成長障害が進行する

最後にシンデカン 4 欠損が成長板軟骨損傷後に与える影響を、KO マウスを用いてその表現系を調査した。3 週齢のマウスに我々が独自に開発した脛骨近位成長板軟骨損傷モデルを用いて、術後 3 週で回収した。Drop ratio を（Sham 手術側の脛骨長―損傷側の脛骨長）／（Sham 手術側の脛骨長）と定義した。Drop ratio は KO マウスで野生型マウスと比較して増加する傾向を示し、μCT では成長抑制が著明に進行していた（図 4a、b）。現在、サンプル数を調整し、さらなる検討を行っている。

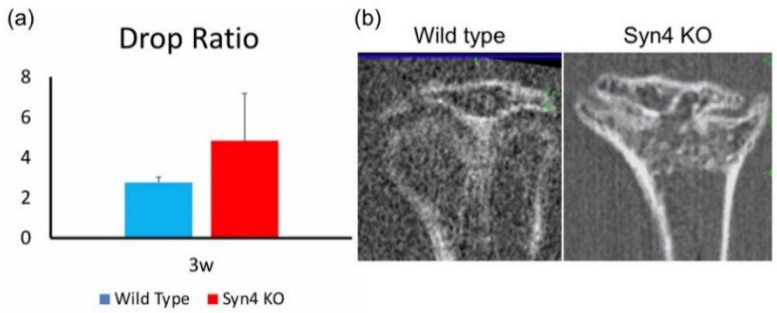


図 4. シンデカン 4 欠損が成長板軟骨損傷後の修復過程に与える影響

3週齢マウスの脛骨近位成長板に損傷を作製し、術後3週で解析。Unpaired t-test。

a) 野生型マウスとKOマウスの脛骨全長の比較（P＝0.24）。

b) μCTによる解析。

考　察

我々はこれまで困難と考えられていたマウス成長板軟骨損傷モデルを独自に作製することに成功した。本モデルを用いて、軟骨代謝に重要な役割を果たすプロテオグリカンであり軟骨恒常性維持に重要な役割を担うシンデカン 4 に着目し、研究を継続している。本助成によりマウス成長板軟骨損傷モデルを確立し、成長板軟骨損傷後の経時的変化について組織学的手法を用いて明らかとした。*In vitro* の解析ではシンデカン 4 は主に間葉系幹細胞の遊走能に重要な役割を担っていることが明らかとなり、*in vivo* ではシンデカン 4 欠損により成長板軟骨損傷による成長障害が促進する傾向を示した。これらの結果はシンデカン 4 が成長板損傷後の治癒過程において、間葉系幹細胞の動員に重要な役割を担っている可能性を示唆している。現在、成長板軟骨損傷後の治癒過程について、特に受傷早期の phase に着目しシンデカン 4 の免疫染色と発現解析を行うとともに、シンデカン 4 ノックアウトマウスを用いた表現型解析を行っている。

我々が現在行っている成長板軟骨損傷後の治癒過程における分子生物学的解析で得られた知見を統合することにより、これまで不可能とされてきた小児骨端線損傷に対する非侵襲的治療法の開発につながることが期待される。これらの研究は全て我々北海道大学医学部整形外科の研究グループが独自に行っており、研究成果を元に北海道の関係企業、研究所と直接連携を行うことにより、北海道から世界に向けて世界初の新規治療法を発信することが見込まれる。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、北海道大学大学院医学研究科整形外科研究室の小野寺智洋博士である。

文　献

1) Shimode K, Iwasaki N, Majima T, Funakoshi T, Sawaguchi N, Onodera T, et al. Local upregulation of stromal cell-derived factor-1 after ligament injuries enhances homing rate of bone marrow stromal cells in rats. Tissue Eng Part A. 2009;15(8):2277-84. Epub 2009/03/31. doi: 10.1089/ten.tea.2008.0224. PubMed PMID: 19327017.

2) Sukegawa A, Iwasaki N, Kasahara Y, Onodera T, Igarashi T, Minami A. Repair of rabbit osteochondral defects by an acellular technique with an ultrapurified alginate gel containing stromal cell-derived factor-1. Tissue Eng Part A. 2012;18(9-10):934-45. Epub 2011/11/22. doi: 10.1089/ten.TEA.2011.0380. PubMed PMID: 22097896.

3) Endo T, Ito K, Morimoto J, Kanayama M, Ota D, Ikesue M, et al. Syndecan 4 Regulation of the Development of Autoimmune Arthritis in Mice by Modulating B Cell Migration and Germinal Center Formation. Arthritis Rheumatol. 2015;67(9):2512-22. Epub 2015/05/20. doi: 10.1002/art.39193. PubMed PMID: 25989265.