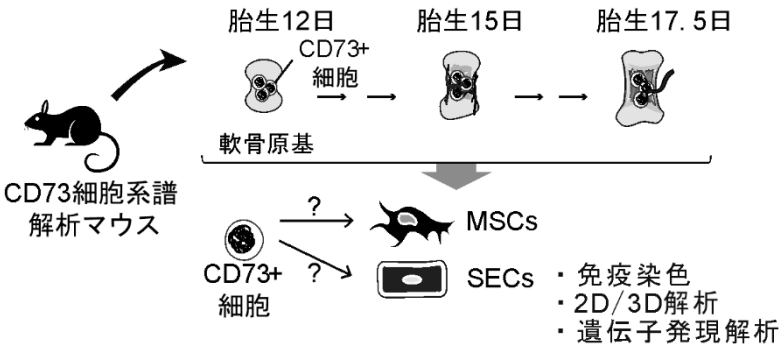
140　細胞系譜解析から紐解く骨髄微小環境形成機構の解明	木村　健一

【目的】間葉系幹細胞（MSCs）は、その多分化能や組織再生能を利用した再生医療のツールとして注目され、骨疾患治療など多くの疾患に対し臨床試験が始まっている。しかし、MSCs の生体内での動態や分化能について未だ不明な点が多く、治療の有効性や作用機序が不明確なまま、臨床応用が先行しているケースも少なくない。そのため、安全で効果的な治療法の確立のため、生体内の MSCs の性質の解明が望まれている。MSCs は生体内で特殊な微小環境（ニッチ）によって保持されている。そのニッチの一つとして知られる骨髄ニッチは、類洞血管内皮細胞（SECs）、造血細胞、周皮細胞などにより形成され、様々な液性因子、サイトカイン、細胞間接着により緻密に制御されている。近年、骨髄内ニッチを構成する細胞群の特徴が明らかになりつつあるが、ニッチを構成する細胞の起源やニッチの維持に関わる分子機構は未だ不明である。本研究では、ニッチを形成する MSCs と SECs に高発現する CD73 に着目し、これら CD73 陽性細胞がどこから発生し、どのようにニッチを形成するかを明らかにし、骨髄ニッチ維持機構における役割の解明を目指した。

【方法】CD73 発現細胞がどのように組織障害に応答し、ニッチの再構築に関わるかについて、CD73-BAC-EGFP マウスに大腿骨骨折モデルを作製し解析した。7、14、28 日後に組織切片を作製し、免疫染色による細胞種の特定および造血幹細胞との関わり、骨髄内の MSCs、SECs が血管新生、骨・軟骨形成およびニッチの再構築にどのように寄与するか解析した。さらに、このマウスから CD73 陽性 MSCs と CD73 陰性 MSCs を単離し、*in vitro* での性質を比較するとともに、骨折部位に細胞を移植し *in vivo* における骨形成能を解析した。CD73 陽性細胞がニッチを形成する挙動を追跡するために、CD73CreER^{T2} : R26-tdTomato マウスを作製した。胎生から段階的にタモキシフェンを投与し、骨組織への分布を解析した。

【結果】骨修復における CD73-EGFP 陽性細胞の動態を解析したところ、CD73-EGFP 陽性細胞は骨芽細胞や軟骨細胞に分化し、新生骨軟骨形成に寄与していた。一方、骨折部位の新生血管は、術後 7 日目において EGFP の発現は見られなかったが、14 日目になると一部の新生血管において EGFP 発現が認められた。この EGFP 陽性血管周囲には、c-kit 陽性造血幹前駆細胞が集積していたことから、骨髄類洞血管における CD73 発現はニッチの再構築に重要な役割を示すと考えられた。細胞系譜解析では、tdTomato 陽性細胞は胎生 14.5 日から出現し、海綿骨、関節軟骨、滑膜において存在が確認された。また、tdTomato 陽性細胞は血管周囲に局在し、マウスの成熟とともに皮質骨内へ移動し骨細胞へと分化することが明らかとなった。本研究により、CD73 陽性細胞が骨髄ニッチ形成に果たす役割の一端を明らかにできた。今後は、細胞系譜解析をさらに進め、骨髄ニッチを構成する CD73 陽性細胞を包括的に解析する予定である。

骨髄内の MSCs・SECs の細胞系譜追跡実験



140. 細胞系譜解析から紐解く骨髄微小環境形成機構の解明

木村　健一

筑波大学 生存ダイナミクス研究センター 循環ダイナミクス

Key words：間葉系幹細胞，血管内皮細胞，微小環境，細胞系譜，骨修復

緒　言

間葉系幹細胞（MSCs）は、その多分化能や組織再生能を利用した再生医療のツールとして注目され、骨疾患治療など多くの疾患に対し臨床試験が始まっている。しかし、MSCs の生体内での動態や分化能について未だ不明な点が多く、治療の有効性や作用機序が不明確なまま、臨床応用が先行しているケースも少なくない。そのため、安全で効果的な治療法の確立のため、生体内の MSCs の性質の解明が望まれている。

MSCs は生体内で特殊な微小環境（ニッチ）によって保持されている。そのニッチの一つとして知られる骨髄ニッチは、類洞血管内皮細胞（SECs）、造血細胞、周皮細胞などにより形成され、様々な液性因子、サイトカイン、細胞間接着により緻密に制御されている。近年、骨髄内ニッチを構成する細胞群の特徴が明らかになりつつあるが、ニッチを構成する細胞の起源やニッチの維持に関わる分子機構は未だ不明である。

本研究では、ニッチを形成する MSCs と SECs に高発現する CD73 に着目し、これら CD73 陽性細胞がどこから発生し、どのようにニッチを形成するかを明らかにし、骨髄ニッチ維持機構における役割の解明を目指した。CD73 陽性細胞は増殖能、分化能の高い集団であり、骨修復モデルを用いた解析では骨軟骨細胞へと分化し、骨修復を促進することを明らかにした［1］。

方　法

1. CD73 陽性細胞の単離および骨修復への関与の評価

CD73 発現細胞がどのように組織障害に応答し、ニッチの再構築に関わるかについて、CD73-BAC-EGFP マウス［2］に大腿骨骨折モデル［3］を作製し解析した。7、14、28 日後に組織切片を作製し、免疫染色による細胞種の特定および造血幹細胞との関わり、骨髄内の MSCs、SECs が血管新生、骨・軟骨形成およびニッチの再構築にどのように寄与するか解析した。さらに、このマウスから CD73 陽性 MSCs と CD73 陰性 MSCs を単離し、*in vitro* での性質を比較するとともに、骨折部位に細胞を移植し *in vivo* における骨形成能を解析した。

2. 細胞系譜追跡モデルの作製

CD73 陽性細胞がニッチを形成する挙動を追跡するために、タモキシフェン投与により時期特異的に DNA 組換えを誘導できる CD73CreER^{T2} ノックインマウスを CRISPR/Cas9 により作製した。成体期にタモキシフェン投与を行い、上記 BAC-EGFP マウスによりラベルされた細胞と生体内分布を比較検討した。

その後、胎生 13.5 日から段階的にタモキシフェン投与（100 μg/g、i.p.）を行い、生後 14 日および成体期に骨組織を採取し、CD73 陽性細胞が骨組織にどのように分布していくか解析した。

3. 細胞系譜追跡モデルにおける CD73 陽性細胞の骨修復への評価

上記 BAC-EGFP マウスでは、MSC が成熟骨軟骨細胞へと分化すると、CD73 発現が消失し、その細胞系譜を追跡することが困難であった。そのため、CD73CreER^{T2}マウスを用いて、CD73 陽性細胞の挙動を解析した。骨折作製前にタモキシフェン投与により細胞をラベルし、骨折 7 日後に骨組織を採取し、骨修復への寄与を解析した。

結果および考察

1.　CD73 陽性細胞は高い増殖・分化能を有し、骨修復を促進する

CD73-BAC-EGFP マウスの大腿部に骨折を作製し、骨修復における CD73-EGFP 陽性細胞の動態を解析した。術後 4 日目には、骨折部位に遊走した CD73 陽性 MSCs が多数観察された。術後 7 日目、14 日目において、CD73-EGFP 陽性細胞は骨芽細胞や軟骨細胞に分化し、新生骨軟骨形成に寄与していた。一方、骨折部位の新生血管は、術後 7 日目において EGFP の発現は見られなかったが、14 日目になると一部の新生血管において EGFP 発現が認められた。この EGFP 陽性血管周囲には、c-kit 陽性造血幹前駆細胞が集積していたことから、骨髄類洞血管における CD73 発現はニッチの再構築に重要な役割を示すと考えられた（図 1C）。

そして、CD73-BAC-EGFP マウスから CD73 陽性 MSCs と CD73 陰性 MSCs を単離し、*in vitro* での性質を比較した。これら細胞は、いずれも MSCs に特徴的なマーカー発現を示していた。一方、細胞増殖や分化能を解析すると、CD73 陽性 MSCs は CD73 陰性 MSCs と比較して、生体外における高い増殖能と骨・軟骨細胞への分化能を有していた。さらに、CD73 陽性 MSCs と CD73 陰性 MSCs を野生型マウスの骨折部位に移植し、組織再生能を評価した。移植された CD73 陽性 MSCs は骨折部位で骨・軟骨へと分化し、骨修復を促進することが明らかとなった。

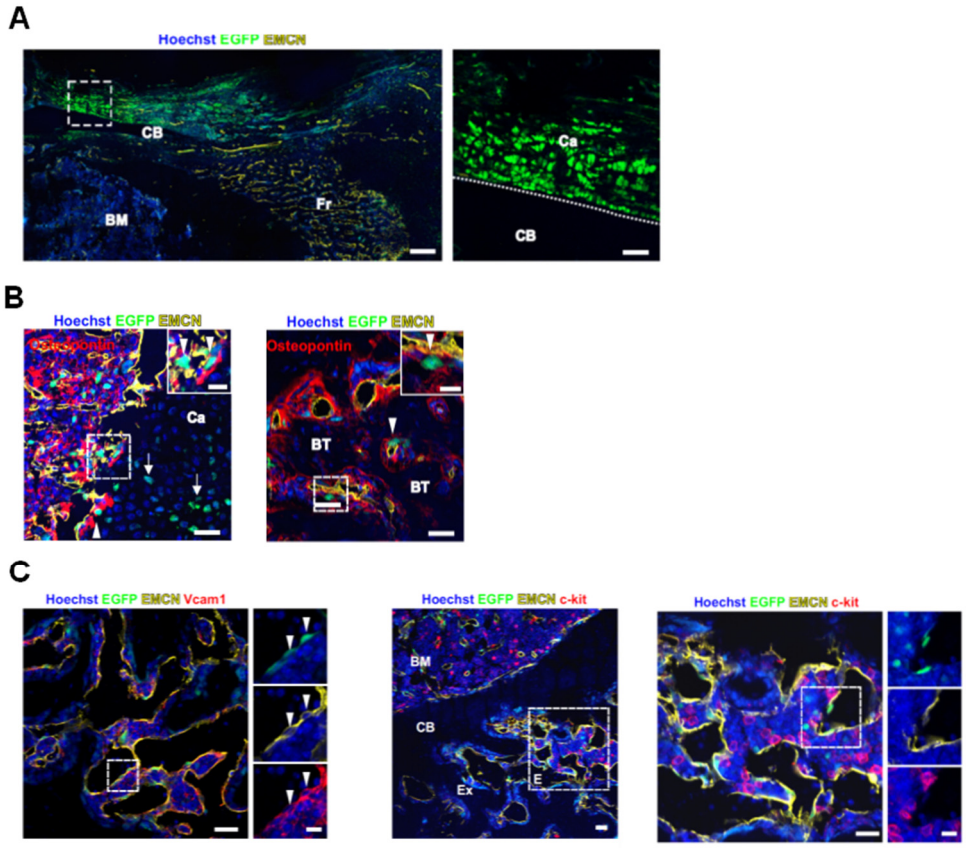


図 1.　骨修復における CD73 陽性細胞の寄与

A）　CD73-BAC-EGFP マウスの大腿部に骨折を作製し、CD73-EGFP 陽性細胞の骨修復に対する寄与を解析した。術後 7 日目、CD73-EGFP 細胞は骨外膜面に盛んに増殖し、軟骨細胞へと分化していた。

B）　新生骨内では、EGFP 陽性細胞は新生軟骨や骨芽細胞へと分化していた。

C）　術後 14 日目、一部の新生血管に EGFP 発現が観察され、それらの EGFP 陽性血管内皮細胞の周囲には c-kit 陽性細胞が集積し、ニッチの再構築が行われていた。

CB：皮質骨、BM：骨髄、BT：骨梁、Ca：軟骨、Fr：骨折部位、スケールバー：100 μm（A 左、C 中央）、25 μm（A 右、B、C）。

2. 細胞系譜モデルを用いた CD73 陽性細胞の骨髄ニッチ形成の評価

CD73CreER^{T2}マウスと R26-tdTomato マウスを交配し、CD73CreER^{T2}：R26-tdTomato マウスを作製した。胎生期の母親マウスにタモキシフェンを投与し、生後 14 日目に骨組織を採取し、tdTomato 陽性がどの時期に出現し、どのように分布していくか解析した。tdTomato 陽性細胞は胎生 14.5 日から出現し、海綿骨、関節軟骨、滑膜において存在が確認された。関節軟骨組織における tdTomato 陽性細胞は Sox9 を発現していたことから、軟骨前駆細胞であることが示唆された。また、Metaphysis 付近は骨芽前駆が多く存在し、盛んに骨分化・成熟が行われる場所である。tdTomato 陽性細胞は Metaphysis の血管周囲に局在し、マウスの成熟とともに皮質骨内へ移動し骨細胞へと分化することが明らかとなった（図 2）。それに対し、骨髄内の tdTomato 陽性 SECs は観察されず、成体マウスにタモキシフェン投与を行った場合においても、tdTomato 発現が認められなかった。BAC を用いたトランスジェニックマウスとノックイン Cre マウスによる発現量の差が SECs のラベル効率に影響を与えたと考えられた。また、細胞系譜モデルに大腿骨骨折モデルを作製したところ、tdTomato 陽性細胞は軟骨・骨芽細胞へと分化し、新生軟骨・骨形成に寄与する事が明らかとなった。

以上のことから、CD73 陽性 MSCs は、増殖能および骨軟骨細胞への分化能の高い集団であることが明らかとなった。これらの細胞群は骨損傷時の骨軟骨形成およびニッチの再構築に重要な役割を果たすことが明らかとなった。今後、細胞系譜解析をさらに進め、骨髄ニッチを構成する CD73 陽性細胞を包括的に解析する予定である。また、CD73 は AMP からアデノシン（ADO）を生成する細胞表面酵素であり、ADO 受容体（ADO-R）の活性化を介して骨髄内の免疫細胞の増殖・分化などの調節に働いている。CD73 陽性細胞は高い増殖能、組織再生能を示したことから、CD73 を介した ADO シグナルが生体内の MSCs/SECs の生理機能にどのように影響を与えているかについても検討する予定である。

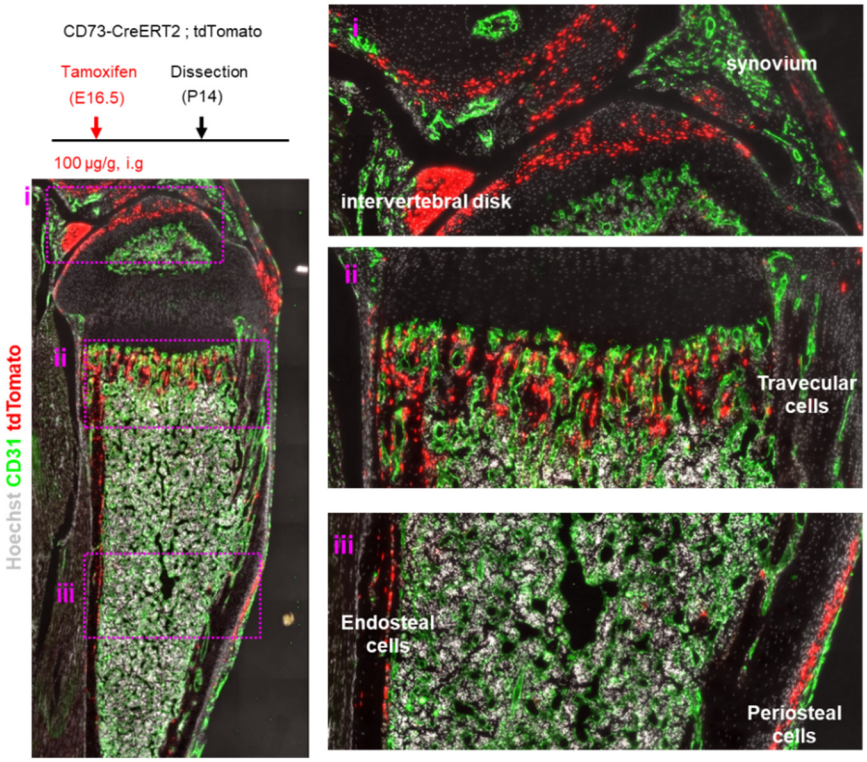


図 2. 細胞系譜解析マウスを用いた CD73 発現細胞の追跡

タモキシフェン投与を胎生 16.5 日に投与し、生後 14 日で大腿部を解析した。tdTomato（赤色）で標識された細胞は、関節軟骨、骨梁表面や CD31（緑色）陽性血管内皮細胞の周囲に存在していた。また、一部の tdTomato 陽性細胞は、皮質骨内の成熟骨細胞や骨内腔面の骨芽細胞へと分化していた。スケールバー：100 μm。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、ドイツ・ボン大学生理学第一教室の Bernd K. Fleischmann 教授、筑波大学生存ダイナミクス研究センターの柳沢裕美教授である。

文　献

1） Kimura K, Breitbach M, Schildberg FA, Hesse M, Fleischmann BK. Bone marrow CD73+ mesenchymal stem cells display increased stemness in vitro and promote fracture healing in vivo. Bone Rep. 2021 Sep 29;15:101133. doi: 10.1016/j.bonr.2021.101133. eCollection 2021 Dec. PMID: 34632004

2） Breitbach M, Kimura K, Luis TC, Fuegemann CJ, Woll PS, Hesse M, Facchini R, Rieck S, Jobin K, Reinhardt J, Ohneda O, Wenzel D, Geisen C, Kurts C, Kastenmüller W, Hölzel M, Jacobsen SEW, Fleischmann BK. In Vivo Labeling by CD73 Marks Multipotent Stromal Cells and Highlights Endothelial Heterogeneity in the Bone Marrow Niche. Cell Stem Cell. 2018 Feb 1;22(2):262-276.e7. doi: 10.1016/j.stem.2018.01.008. PMID: 29451855

3） Kimura K, Nagano M, Salazar G, Yamashita T, Tsuboi I, Mishima H, Matsushita S, Sato F, Yamagata K, Ohneda O. The role of CCL5 in the ability of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells to support repair of ischemic regions. Stem Cells Dev. 2014 Mar 1;23(5):488-501. doi: 10.1089/scd.2013.0307. Epub 2013 Dec 14. PMID: 24171667