

博士論文

間葉系細胞の骨分化に伴う細胞運動変化

市田 勝紀

奈良先端科学技術大学院大学

バイオサイエンス研究科 動物遺伝子機能学（川市 正史 教授）
大阪府立成人病センター研究所 生物学部門（伊藤 和幸 部長）

平成 24 年 3 月 8 日 提出

目次

1. 序論	3-
2. 材料および方法	7-
3. 結果	13-
4. 考察	19-
5. 図・表	23-
6. 謝辞	48
7. 参考文献	49-

1. 序論

骨は、脊椎動物の体内で最も重要な組織の 1 つであり、体の支持、ミネラル貯蔵庫、造血組織としての 3 つの役割を果たしている。骨格の支持機能により個体は重力下での形態を維持し、骨に付着した筋肉の作用により運動が可能となる。また、カルシウムやリンをはじめとする各種ミネラルの最大の貯蔵庫として機能している。さらに骨髄中には造血幹細胞が存在し、造血の場となっている。

骨格の力学的強度は、骨に特異的な硬い骨基質によってもたらされている。また、骨は体重を支えたり運動に重要であるのみならず骨芽細胞による骨形成と破骨細胞による骨吸収が常にくり返し、リモデリングが行われている(1)。骨組織の再生能力は強く、骨折などの損傷が起こるとその部位に新しい骨の形成が行われる。従って骨の修復過程は外傷や外科的手術後に骨全体の統合性を回復するのに非常に重要である。しかし骨修復には時間がかかり、特に骨折治癒は長期の修復期間が必要であり、治療期間の短縮が切望される。脊椎動物においては概ね同様の修復過程をたどるが、人間を初めとする霊長類ではげっ歯類や馬や犬などの他の哺乳類に比べ修復が遅い(2)。骨折の治癒過程は複数のステップより成っており、骨折後ただちに膜性骨化、内軟骨性骨化の応答が開始される(3, 4)。血腫形成について血管新生、軟骨形成、軟骨石灰化、石灰化軟骨の吸収、骨形成といった過程である。これらの過程は炎症期、修復期、リモデリング期と分けられることが多い。炎症期では骨損傷部位に出血が起き、血腫が形成される。その後、白血球・単球・貧食細胞が動員され炎症反応が起こる。それらの細胞からサイトカインや様々な増殖因子が分泌される(5-7)。炎症は骨折後 2～3 日間でピークを迎え、骨折後数日後には修復期に入り、新しい骨の元となる仮骨の形成が始まる。仮骨にはカルシウムが沈着して、成熟な仮骨へと変わっていく。成人においては 2～6 週間ほど時間を要する。その後、リモデリング期となり、数カ月～数年の期間を経て、成熟仮骨が層板骨へと置換され、またそれらがリモデリングにより皮質骨、海綿骨が形成され仮骨量減少とともに元来の解剖学的構造へと復元する(8)。治癒過程においては①血球系細胞、軟骨細胞、骨芽細胞や破骨細胞の増殖、②修復部位への細胞の移動、③それらの前駆体からの細胞分化の 3 つの過程が必要である。骨芽細胞や軟骨細胞へと分化を行う細胞は間葉系幹細胞であり、治癒過程への寄与が重要であると考えられている(9-11)。

間葉系幹細胞(mesenchymal stem cell)の発見は 1960 年後半であり、骨髄より取り出された細胞集団の一部に接着性の性質を持ち、自己維持、自己複製、造血の補助を行う細胞群の存在が確かめられたのが最初である(12)。その当時は骨髄から得られ

た細胞が低密度で培養した時にコロニーを形成することから colony-forming unit fibroblast (CFU-F)と言及されていたが、後に mesenchymal stem cell と命名された。それから多くの研究が行われ、間葉系幹細胞は骨、軟骨組織、筋肉、靱帯、腱、脂肪、間質細胞などの細胞への多様な分化能を有していることが明らかとなった(13-18)。In vitro の実験や動物実験の結果から間葉系幹細胞もしくは間葉系幹細胞を含む細胞集団の多分化能、自己複製能が再生医療への貢献に大きな期待をされるようになった(19-29)。近年の研究によって in vitro への単離、培養が多くの方法で行われており(17, 30)、間葉系幹細胞の研究が進められている。よく知られている特徴としては①接着し、紡錘状の細胞形態をとる、②低密度でのコロニー形成にみられる高い複製能、③多分化能を持つことである。また、細胞膜受容体の発現も詳しく調べられている。ポジティブなマーカーとしては integrin β 1 (CD29)、integrin β 3 (CD61)、Hyaluronate receptor (CD44)、Transferrin receptor (CD71)、Thy-1 (CD90)、VCAM-1 (CD106)、TNF- α -1R (CD120a)、IL-4R (CD124)、IL-6R (CD126)などが知られており、ネガティブなマーカーとしては LPS receptor (CD14)、Hematopoietic marker (CD34)、Leukocyte antigen (CD45)などが知られている(30-34)。しかし、抽出方法や抽出してくる組織や生物種の違いなどから増殖能や分化能に大きく差がみられ、間葉系幹細胞の研究は造血幹細胞などの他の幹細胞の研究に比べ不明な点も多く残されている。本研究においてはマウスの間葉系細胞による骨形成のメカニズムに焦点をあてた解析を行い、間葉系幹細胞の研究に貢献したいと考えている。

骨形成における間葉系の未分化な細胞を解析することは、骨形成のメカニズムの解明、さらには骨折治療や再生医療などの医療への応用に繋がり重要である(35, 36)。適切な骨形成を行うために未分化間葉系細胞は①骨分化を行うこと、②骨形成部位へ移動してくることの両者が必要であり、生体内では厳密に制御されている。骨分化をする未分化な細胞は骨膜(37)、骨髄(38, 39)、循環している血液(40)、骨形成周辺部位(41)より動員され、骨形成に関与していることがこれまでに報告されている。細胞運動と骨分化については多くの研究が成されてきたが、それぞれ個々に研究され、細胞運動と分化を考慮した包括的な研究はなされていなかった。例えば未分化な細胞が移動するのか、もしくは分化した細胞が移動するのかなどの報告はほとんどない。

細胞運動については未分化な細胞の骨分化後の骨芽細胞の運動についての報告が多く、transforming growth factor- β (TGF- β)、platelet derived growth factor (PDGF)、insulin-like growth factor (IGF)、bone morphogenetic protein (BMP)、vascular endothelial growth factor (VEGF)などの因子が骨芽細胞の走化性などを誘導することが知られている(42-46)。本研究室においても IGF-1 が骨芽細胞自身から分泌され、他

の骨芽細胞の走化性を引き起こすことを中崎らが報告している(47)。これらの可溶性因子は骨芽細胞の走化性だけではなく、未分化な細胞の運動、骨分化の両方に影響しているのではないかと考えられる。

また、骨分化については未分化な細胞は BMP や VEGF などの細胞間シグナル分子または parathyroid hormone (PTH)のような内分泌系ホルモンによるシグナルを受け骨芽細胞への分化が引き起こされる。骨分化時には *runx2* や *osterix* などの骨分化を促進する遺伝子の発現が誘導され、前駆細胞を経て成熟した骨芽細胞へと分化し、骨形成を行うことが知られている(48, 49)。骨分化の誘導メカニズムの 1 つとして、本研究室において吉川らが低分子量 GTP 結合タンパク質 RhoA とそのエフェクタータンパク質である ROCK (Rho-associated kinase)が骨分化を制御していることを報告している(50)。この研究において Rho-ROCK シグナリングの特異的阻害剤である Y-27632 の処理がマウスの異所性骨形成モデルにおいて骨形成が促進されることを明らかにしている。Y-27632 処理は骨分化を促進する BMP-4 の発現を誘導し、骨形成を増強する。しかし、ROCK の阻害による骨形成増強の機序については不明な部分も多い。Rho-ROCK シグナリングについてはアクチン細胞骨格の制御を介して細胞運動などに作用していることが様々な細胞において知られているが、未分化間葉系細胞の細胞運動での寄与は明らかではない。ROCK の阻害による細胞運動への影響は細胞種や実験系によって異なる(51, 52)。例えば ROCK の阻害が上皮系細胞や血球系細胞において細胞収縮力、アクチン骨格の形成、接着斑の代謝の減少などを引き起こし、細胞運動を抑制するという報告がある(53-55)。一方、ROCK の阻害がラット胎児由来線維芽細胞やマウス骨肉腫細胞において細胞運動を促進するという報告(56-59)もある。このことから ROCK の阻害効果は複雑である事がわかる。未分化な間葉系細胞における ROCK の阻害効果が細胞運動にどのように作用するかを調べることは未分化間葉系細胞が骨形成をはじめとする特定の組織への移動機構の解明に繋がり重要である。そのためには Rho ファミリー低分子量 GTP 結合タンパク質の未分化間葉系細胞での働きを解析する必要がある。

Rho ファミリー低分子量 GTP 結合タンパク質は RhoA、Cdc42、Rac1 がよく研究されており、不活性型の GDP 結合型と活性型の GTP 結合型の間を往復して細胞反応の分子スイッチとして働いていることが知られている(60)。その作用は細胞基質間接着、細胞移動、神経突起の退縮、細胞質分裂、細胞周期 G1→S 期進行、腫瘍細胞の転移・浸潤などさまざまである(61-65)。これらの作用はアクチン細胞骨格の時間空間特異的な再編成によって発揮されている。細胞の移動においてはアクチンからなる進行方向への糸状突起(フィロポディア)、膜状突起(ラメリポディア)の進展と先端部での細胞外

基質への接着、つづいて細胞体の牽引と尾部の脱離が行われる。Rho は細胞の牽引に作用し、フィロポディアとラメリポディアが各々 Cdc42 と Rac1 の活性化によって誘導される(61)。このことから細胞運動は Rho ファミリー低分子量 GTP 結合タンパク質の活性化のバランスによって引き起こされていると考えられる。未分化な間葉系細胞における細胞運動についての研究は少なく、どのような運動様式が未分化な細胞の移動に重要であるかはわかっていない。運動様式については Rho ファミリー低分子量 GTP 結合タンパク質の働きを中心としたアクチンストレスファイバーの再編成による形態変化、細胞基質間接着、細胞間接着などによっていくつかの様式が提唱されている(66, 67)。ROCK 依存性の細胞が丸くアメーバー状に移動する amoeboid migration mode (68)、上皮系細胞にみられ細胞間の相互作用が関与すると考えられる collective migration mode (67)、間葉系細胞にみられ Cdc42 や Rac1 の活性化が高いとされる mesenchymal mode (56, 57, 66)これらの運動様式を調べることによって未分化間葉系細胞の移動機構が明らかとなり、さらには組織への動員のメカニズムの解明に近づくと考えられる。

そこで本研究では未分化な間葉系細胞の細胞運動が骨分化時にどのように変化するのか、そしてその運動はどのような運動様式をとるのかを未分化間葉系細胞株(ST2)とマウスより単離した骨髄由来細胞(BMDCs)を用いて調べた。これまで個々に行われてきた細胞運動と骨分化を包括的に観察し、解析を行った。また、骨分化を促進する ROCK の阻害がこれらの細胞の運動にどのような効果があるのかを解析し、Rho-ROCK シグナリングが間葉系細胞においてどのように機能しているのかについて調べた。そして最後に、マウスの異所性骨形成モデルを用いて細胞の骨形成部位への移動を調べ、細胞運動と骨形成についての検討を行った。本研究によって細胞運動と骨分化の関係について新たな知見を示し、骨折治癒や再生医療に応用できると考えている。

2. 材料および方法

2. 1. 試薬

ヒト組換え型 BMP-2 (rhBMP-2)は R&D Systems Inc. (Ellisville, MO)より購入した。
本研究で使用した抗体は下記の各メーカーより購入した。

ポリクローナル抗体

抗 Rac1 抗体(BD Pharmingen, San Jose, CA)

抗 FAK 抗体, 抗 RhoA 抗体(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)

抗 phosphotyrosine397-FAK 抗体(Biosource, Camarillo, CA)

抗 Cdc42 抗体、抗 phospho-myosin light chain 20 (Ser19)抗体(Cell Signaling, Beverly, MA)

モノクローナル抗体

抗 myosin 20kDa light-chain 抗体(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)

抗 actin 抗体(Millipore Bioscience Research, Temcula, CA)

Blebbistatin は Sigma-Aldrich より、Rhodamine-phalloidin は Molecular Probes (Eugene, OR)より購入した。Y-27632 は Mitsubishi Parma Co. (Tokyo, Japan)より供与して頂いた。Platelet-derived growth factor (PDGF)は PeproTech (New Jersey, USA)より購入した。

2. 2. 細胞培養

マウス未分化間葉系細胞株 ST2 (RCB0224)、マウス C3H10T1/2 (RCB0247)、マウス筋芽細胞株 C2C12 (RCB0987)、マウス骨芽細胞株 MC3T3-E1 (RCB1126)は理化学研究所 Cell Bank (Tsukuba, Japan)より購入した。ST2 細胞は RPMI1640 培地 (Invitrogen, Tokyo, Japan)に 10%のウシ胎児血清(FBS; MP Biomedicals, Illkirch, French)を添加した培地で培養を行った。10T1/2 細胞は BME 培地(Invitrogen)に 10% FBS を添加した培地で培養を行った。C2C12 細胞は DMEM 培地(Invitrogen)に 10% FBS を添加した培地で培養を行った。MC3T3-E1 細胞は α -MEM 培地(Invitrogen)に 10% FBSを添加した培地で培養を行った。培養はすべて 37 °C、5% CO₂ インキュベーター内で行った。継代は細胞が 80~100% コンフルエントになった時に行った。PBS で 2 回洗浄後、Trypsin-EDTA (0.25% トリプシン, EDTA-4Na) (Invitrogen)でトリプシン処理を 37 °Cで 5 分間行い、細胞をはがし、新たに培養を行った。

2. 3. 骨分化誘導実験

ST2 細胞 7.5×10^4 個を 6-cm dish (BDFalcon, Bedford, MA) に撒種した。骨分化の誘導のために培養培地を骨分化誘導培地に交換し、培養を行った。骨分化培地は α -MEM に 10% FBS と 50 ng/ml の rhBMP-2 を添加した培地を使用した。そして図 5. A に示す期間(1~3 日間)の培養を行った。

2. 4. 骨分化の検出

アルカリフォスファターゼ(ALP)染色および、アリザリンレッド染色は過去の論文を参考にして行った(69)。ALP 染色は固定液(3.7% formaldehyde, PBS)を処理し、室温で 15 分間インキュベーションを行い固定した後、alkaline phosphatase buffer (100 mM Tris-HCl, pH 9.5, 100 mM NaCl, and 5 mM $MgCl_2$) に nitro blue tetrazolium (Promega, Madison, WI) と 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate (Promega) を混合したものと室温で反応させ、検出を行った。カルシウムの沈着は骨分化誘導培地で 12 日間培養し、固定液(3.7% formaldehyde, PBS)処理で固定し、alizarin red S (Sigma) を用いて染色し、検出を行った。アルカリフォスファターゼ活性は p-ニトロフェニルフォスフェイトを基質とした活性測定キット LabAssayTM ALP (Wako, Osaka, Japan) を用いて測定した。また、タンパク質濃度はタンパク質定量キット BCA protein assay reagents (Pierce, Rockford, IL) を用いて測定した。タンパク質の定量は BSA(Thermo Scientific, Rockford, U. S. A.) をコントロールとして用いた。定量したタンパク量からアルカリフォスファターゼ活性を算出した。計算式を下記に示す。

$$\text{活性}(\text{units}/\mu\text{l}) = \frac{c}{t} \times a$$

$$(\text{units}/\mu\text{g protein}) = \frac{\text{活性}(\text{units}/\mu\text{l})}{\text{タンパク量}(\mu\text{g}/\mu\text{l})}$$

c=p-ニトロフェノール濃度(nmol/ μ l)

t=反応時間(分)

a=希釈倍率

2. 5. RNA の抽出精製と polymerase chain reaction (PCR)

RNA の抽出精製は TRIzol reagent (Invitrogen) を用いて行った。1 μ g の RNA を鋳型とし High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, Foster

City, CA)を用いて逆転写を行った。Taq DNA Polymerase (Promega, Madison, WI)を使用し、標的遺伝子のプライマーを設計し、PCR を行った。各プライマーセットについては表 1 に表記する。PCR の条件は *osteocalcin* 以外のすべてのプライマーにおいてアニーリング温度は 60 °Cで行い、サイクル数は 37 回で行なった。*osteocalcin* のプライマーのみアニーリング温度 60 °C、サイクル数 35 回で行なった。

2. 6. 顕微鏡観察

免疫蛍光染色は 8-well culture slides (BD Falcon)に 1000～2000 個の細胞を撒種し行った。細胞は培養を行った後、1%の paraformaldehyde in PBS で固定し、0.2% Triton X-100 in PBS で膜透過処理を行い、0.5% BSA (Invitrogen)と 1% FBS, 0.1% Tween20 in PBS でブロッキングを行った(70)。接着斑は抗 vinculin 抗体(Sigma)を緩衝液(5% non-fat drymilk, 1% BSA, 0.1% TritonX-100, 0.1% Tween20, PBS)で希釈(1:500)し反応させ、二次抗体に Alexa 488 結合抗体(Molecular Probes)を 0.1% Tween20 in PBS で希釈(1:1000)したものを使用し、検出した。F-actin の染色を rhodamine-phalloidin を 0.1% Tween20 in PBS で希釈(1:500)して検出した。顕微鏡での観察は CCD camera VB-7010 (Keyence, Osaka, Japan)と UplanApo 40×/1.00 Oil Iris Ph3 lens を用いた BX60 (Olympus, Tokyo, Japan)を使用して行った。また、撮影した画像は ImageJ (NIH Software, Bethesda, MD)ソフトを用いて解析した。伸長し、細胞突起を多く形成している細胞を motile phenotype を持つ細胞と定義し、細胞形態変化の定量を行った。

motile phenotype の定義…アクチンストレスファイバーが消失し、アクチン染色が細胞の辺縁部に観察され、接着斑の染色も減弱する。細胞形態は細長くなり、多くの細胞突起の形成が見られる。これまでの観察より上記のような形態変化を起こした細胞が速く移動することが wound healing assay のタイムラプスビデオの観察より明らかとなったため motile phenotype と定義した。Motile phenotype の特徴を持つ細胞を陽性とし、それ以外の細胞を陰性とし、陽性の細胞の割合を%で表示した。定量は図 6 については 288 個の細胞を図 13 については 75 個の細胞を評価した。また、公正に定量するために 5 人が独立して評価することにより行った。

2. 7. 細胞運動実験

Modified Boyden chamber migration assay は孔径 8 μm の trans-well chamber (BD Biosciences)と 24-well plate (BD Falcon)を使用して行った。trans-well chamber の下

面のメンブレンには 10 µg/ml のフィブロネクチン(BD Biosciences)を 37 °C で 1 時間処理することによりコートを行った。2.5×10⁴ 個の細胞を chamber の上層に撒種し、37 °C で 4 時間インキュベーションした後、下層に移動した細胞を 70%エタノールで固定後、ギムザ染色で染色し、細胞数を数えた。模式図を図 1 に記載する。

Wound healing assay は ST2 細胞および bone marrow derived cells (BMDCs)をコンフルエントに培養し、200 µl イエローチップの先端で傷をつけ、観察した。試薬を用いての実験では試薬を 1 時間の前処理を行った後に傷をつけ、その後は常に薬剤存在下の条件で行った。観察は Cool Snap Cf camera (Roper Scientific, Ottobrunn, Germany)、IX70 inverted microscope (Olympus)を用いて行った。動画の作製には iMovie software (Apple Inc., Tokyo, Japan)を用いた。定量方法は同じ場所の写真を定期的(0-12 時間)に写真に撮る。ソフトウェア ImageJ で最初(0 時間)の wound の面積を計測する。その後、各時間の wound の面積の計測を行う。0 時間の面積を 100 とし、細胞運動によって縮小した傷の割合を算出する。PDGF に対する走化性の運動は EZ-TAXIScan (GE Healthcare Bio-Sciences, Little Chalfont, UK)を用いて測定した。

2. 8. 細胞接着実験

細胞を 2×10⁵ 個/well で 12-well culture plate (BD Falcon)に撒種し、37 °C で 30 分インキュベーションを行った。その後、非接着細胞を PBS による洗浄を 3 回行って取り除き、接着した細胞を数えた。実験方法は竹中聡博士(大阪大学大学院医学系研究科 器官制御外科学講座)に指導して頂いた(71)。

2. 9. 骨髄由来細胞(BMDCs)の抽出と培養

C57BL/6 マウス(SLC, Shizuoka, Japan)をジエチルエーテルの深麻酔下で安楽死させ、大腿骨と脛骨を取り出した。余分な組織を取り除き、骨髄を注射器(Terumo, Tokyo, Japan)と注射針(23 G) (NIPRO, Osaka, Japan)を用いて採取した。採取した骨髄はα-MEM に 20% FBS、100 units/ml penicillin、100 µg/ml streptomycin、55 µM 2-mercaptoethanol を添加した培地で培養した。非接着細胞は 2 日に一度培養培地の半分を交換することを繰り返し行うことにより取り除いた。接着細胞が 80%サブコンフルエントになった時に、トリプシン処理を行い、継代を行った。骨分化は骨分化誘導培地(α-MEM, 10% FBS, 100 units/ml penicillin, 50 ng/ml rhBMP-2)を用いて培養を行った。脂肪分化は 2 µM の troglitazone (Sigma)によって分化誘導を行った。脂肪分化の確認は staining kit (Diagnostic Biosystems, Pleasanton, CA)を用いて Oil red O 染色を行い、脂肪滴の検出を行った。

2. 10. 軟骨分化実験

ST2 細胞 2×10^7 個を 20 μ l で 12-well plate に滴下し、37 °C で 90 分インキュベーションを行い、その後 2 ml の軟骨分化誘導培地(DMEM, 10% FBS, 50 or 100 ng/ml rhBMP-2)をウェルに加えた。4 日間培養した後、アルシアンブルー染色を行い軟骨分化の確認を行った(72)。

2. 11. 活性型の低分子量 GTP 結合タンパク質の検出

GTP 型 RhoA、Rac1、Cdc42 の活性は GST タンパク質を融合させた RhoA のエフェクター(rhotekin)又は Cdc42、Rac1 結合ドメイン(PAK)のプルダウンを行い計測した(57)。細胞を type I-collagen coated dish (BD Falcon)で 24 時間培養した後、細胞溶解液(25 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.25% Na deoxycholate, 10% glycerol, 10 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 10 μ g/ml leupeptin, 10 μ g/ml aprotinin, pH 7.9)で回収し、ソニケーションを行い、細胞抽出液を作製した。大腸菌(DH5 α)に融合タンパク質 GST-rhotekin、GST-p21 activated kinase (PAK) を 0.5 mM の Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG)で発現誘導し、大腸菌溶解液(20 mM HEPES, 120 mM NaCl, 10% glycerol, 2 mM EDTA)で溶解し、タンパク質を精製した。精製したタンパク質を glutathione-Sepharose beads (Amersham Pharmacia Biotech., Buckinghamshire, UK)と反応させ、その後、細胞抽出液と混ぜ、4 °C で 2 時間インキュベーションを行った。活性型 RhoA のプルダウンには GST-rhotekin を活性型 Cdc42 と Rac1 のプルダウンには GST-PAK をそれぞれ用いた。プルダウンしたサンプルはウェスタンブロッティング法で検出を行った。低分子量 GTP 結合タンパク質 RhoA、Cdc42、Rac1 の全量と活性型のタンパク質量を検出し、全量に対する活性型の比率を算出した。

2. 12. 細胞増殖測定法(WST-8 法)

500 もしくは 1000 個の細胞を 96-well plate (BD Falcon)に撒種し、Cell Counting Kit-8 (Dojindo, Kumamoto, Japan)を使用して細胞増殖を測定した。

2. 13. ウェスタンブロッティング法

氷上で SDS sample buffer (125 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 10% glycerol)に 40 mM dithiothreitol を添加した溶液で細胞を溶解し、サンプルを作製した。サンプルは 5 分間、100 °C で煮沸し、SDS-PAGE 法でタンパク質を分離させた。分離した後、タ

ンパク質は nitrocellulose membranes (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) にトランスファーを行った。メンブレンは 3% BSA を添加した PBS-0.1% Tween20 (T-PBS) でブロッキングを行い、一次抗体を添加した T-PBS で一晩インキュベーションを行った。T-PBS で洗浄後、二次抗体を添加した T-PBS でインキュベーションし、二次抗体の反応を行った。タンパク質は alkaline phosphatase buffer (100 mM Tris-HCl, pH 9.5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂) に nitro blue tetrazolium (Promega) と 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate (Promega) を添加して反応させ検出した。メンブレンを GT9500 flat scanner (Epson, Tokyo, Japan) で読み取り、ImageJ でバンドの強度を計測した。

2. 14. マウス異所性骨形成モデル

マウス異所性骨形成モデルは吉川らが報告した方法(50)を参考にして行い、中瀬尚長先生(星ヶ丘厚生年金病院 整形外科)に *in situ* ハイブリダイゼーションを指導して頂いた。5 µg rhBMP-2 (Astellas Pharma Inc., Tokyo, Japan) と 3 mg atelocollagen (Nitta Gelatin, Osaka, Japan) を用いて rhBMP-2-collagen1 composite を作製した。rhBMP-2-collagen1 composite は 5 週齢の C3H マウスの広背筋筋膜下に移植した。Y-27632 は Alzet osmotic pumps (Alza Corp., Palo Alto, CA) を用いてマウス体内に供給した。マウスは移植 4 日後、1 週間後に処分し、骨形成の石灰化を X 線撮影、病理染色、*in situ* ハイブリダイゼーションを行い観察した。レントゲンは soft X-ray apparatus (Softex Type SM, Osaka, Japan) を用いて撮影した。*in situ* ハイブリダイゼーションは 4 µm の切片を作製し、マウス osteopontin の digoxigenin 標識したアンチセンス、センス cRNA プローブをハイブリダイゼーションさせ、nucleic acid detection kit (Roche Diagnostic, Japan) を用いて検出した(73, 74)。

2. 15. 統計処理

測定データは平均値と標準偏差(SD)を求めた。対照群との有意差は Student-*t* 検定により算出した。Student-*t* 検定により 0.05 より小さい値の場合、統計的に有意差があるとした。

すべての動物実験は、大阪府立成人病センター研究所内の動物実験委員会です承されたプロトコールに基づいて行った。

3. 結果

3. 1. 分化段階によって細胞の運動速度が変わる。

細胞運動と骨分化の関係を調べるために、骨分化を誘導できるマウスの4つの細胞株についてFBSを走化性因子としてboyden chamber assayを行い、運動能を調べた。4つの細胞は分化段階が違う細胞株である事が知られている(図2. A)。細胞の分化段階の違いを確かめるため骨分化、脂肪分化、軟骨分化、筋分化についてよく知られている分化マーカーの遺伝子発現をRT-PCRによって調べた(図2. B)。分化段階が違う4つの細胞はそれぞれ違った分化マーカー遺伝子の発現をしていることが確認できた。運動はFBSの濃度を変えて調べた(図3. A-D)。すると4つの細胞間で運動能に差があることがわかった。走化性因子のない場合においては、ST2細胞とC2C12細胞は各々全体量(2.5×10^4)に対して約17%と約25%の細胞が移動したのに対して、10T1/2細胞とMC3T3-E1細胞では4~8%の細胞しか移動せず、細胞間でフィブロネクチンに対するハプトタキシス(走触性)の運動能力において差が見られた。またFBSに対する応答性も細胞間で異なり、ST2細胞とMC3T3-E1細胞においては加えたFBSに対する応答性が高いことがわかった。これらのことから分化段階の違いが細胞運動に影響しているのではないかと示唆された。

3. 2. ST2細胞は未分化な間葉系細胞である。

3. 1.で使用した細胞株のうちST2細胞はマウスの骨髄由来の間葉系幹細胞株であり、多分化能を有していることが知られている(75)。また、幹細胞性の分化マーカーと知られている*nanog*遺伝子(76, 77)が発現していることが確認でき(図4. A)、さらに間葉系幹細胞と特徴である骨分化、脂肪分化、軟骨分化を誘導できる事を確かめることができた(図4. B)。このことからST2細胞は多分化能をもつ未分化な間葉系細胞である事が確認できた。骨分化と細胞運動を調べるために未分化なST2細胞に骨分化の誘導を行い、解析を行った。

3. 3. 骨分化に伴って運動速度が変化する。

ST2細胞に50 ng/mlのrh-BMP2を処理し、図に示した期間の培養を行い、分化誘導を行った(図5. A)。例えば、誘導3日の細胞は最初 7.5×10^4 個の細胞を撒種し、24時間後に培地を骨分化誘導培地へと変え、その後3日間の培養を行った細胞である。誘導1日の細胞は最初に同量の細胞を撒種し、通常培地で3日間培養した後、骨分化誘導培地で1日間培養を行った。他の細胞も分化培地での培養時間を変えたもので

あり、準備した4つの細胞(0 d~3 d)はすべて4日間の培養をしている。そのため分化最終日には細胞密度がおおよそ揃っている。細胞密度は細胞運動に影響することが考えられるため培養密度をそろえる必要があった。骨分化の確認のために細胞のALP染色、ALP活性測定を行った(図5. B)。ALP活性は誘導期間に依存して強くなっていくが、誘導2日後の細胞と3日後の細胞では大きな変化はなく一定となった。また、いくつかの骨分化マーカー遺伝子のmRNAの発現を調べた(図5. C)。Runx2、osteopontin(OPN)、type1 collagenは常に発現していた。一方、parathyroid hormone receptor (PTHrP)とosterix (Ox)は分化誘導1日後に発現した。骨分化後期マーカーであるosteocalcin (OCN)は2日後以降に発現が見られた。これらの遺伝子発現は分化誘導期間に依存して発現量が増加した。これらの結果から今回の骨分化実験によってST2細胞を段階的に骨分化誘導することができていると考えられる。

次に段階的に骨分化を誘導したST2細胞を用いて骨分化時に細胞形態が変化するかを調べた(図6. A)。アクチン細胞骨格と接着斑の形成を観察したところ、分化させていないコントロールのST2細胞(0 d)ではアクチンストレスファイバーが強く形成され、多くの接着斑の形成が見られた。一方、分化誘導1日後の細胞ではアクチンストレスファイバー、接着斑の形成が顕著に消失し、伸長した細胞形態を示した。それらの細胞をmotile phenotypeと定義(方法と材料の項目に記載)し、定量を行った(図6. B)。さらに、細胞の面積の測定も行った(図6. C)。これらのことから骨分化初期段階において細胞面積が少なくなり、細胞突起を多くもつ伸長した細胞形態に変化することがわかった。さらに、分化が進むとアクチンストレスファイバー、接着斑の形成が再度出現することも明らかとなり、未分化な細胞は骨分化によってダイナミックに形態を変化させることがわかった。

次に細胞運動をboyden chamber assayを用いて測定した(図7. A)。すると分化1日後に運動速度がコントロールの細胞と比べ2倍ほど促進されることが明らかとなった。さらに、分化が進むと運動速度はコントロールの細胞と同程度まで減少していく。wound healing assayを用いた実験においても同様の結果を得ることができた(図7. B)。骨分化誘導に使用したrhBMP-2の添加が直接細胞運動に影響しているのか、分化が運動に影響しているかを区別するために、rhBMP-2の短期間での細胞運動への影響を調べた。するとrhBMP-2は短期間では細胞運動に直接影響を与えないことを分化していないST2細胞(0 d) (図7. C)と分化した細胞(3 d) (図7. D)で確認することができた。短期間では分化の誘導も引き起こされない(図7. E)。骨分化には遺伝子発現の変化などが関わり、ある程度の時間が必要であり、4時間という短期間ではALP活性が上昇するほどまでには分化は進まないと考えられる。これらのことから骨分化によって細胞の性質

が変化することによって、分化初期段階に細胞の運動速度が一時的に亢進し、分化後期では減少することが明らかとなった。細胞接着は分化初期段階では変化が見られないが、分化後期に優位に亢進することがわかった(図8)。分化後期の細胞接着能の増加が分化後期にみられる運動速度の低下に影響していることが考えられるが、詳細についてはさらなる検討が必要である。

3. 4. 未分化な間葉系細胞はmesenchymal modeの様式によって速く運動する。

細胞運動についてさらなる解析を行うためにアクチン細胞骨格の制御に重要であるRhoファミリー低分子量GTP結合タンパク質について調べた。すると細胞運動の促進が見られた分化初期段階に、Cdc42, Rac1の活性が高くなっていることがわかった。運動速度が減少する分化後期ではそれらの活性はコントロールの細胞と同程度まで減少した(図9)。一方、RhoAの活性には有意な変化は見られなかった。細胞接着の形成に重要であるfocal adhesion kinase (FAK)の397番目のチロシンのリン酸化を調べると、接着能が高くなる分化後期段階にリン酸化が有意に減少することがわかった(図10. A)。一方、myosin light chain (MLC)の19番目のセリンのリン酸化は分化を通して変化しなかった(図10. B)。これらのことから未分化な細胞は骨分化誘導を受けるとCdc42, Rac1の活性が高くなり一時的に運動速度が亢進し、さらに分化が進むと運動速度が減少することがわかった。分化後期段階では細胞接着が有意に亢進することも明らかとなり、細胞接着の亢進が細胞運動の抑制に関わっていることが示唆された。細胞接着能の亢進については、FAKのリン酸化が分化後期の時期に抑制されていることから、接着斑の代謝が遅くなり、より成熟した接着斑の形成が引き起こされているためだと考えられる。FAKの代謝と接着能についてはさらなる検討が必要である。さらに、タイムラプスビデオを用いて細胞運動を詳細に観察すると、速く運動する細胞はコントロールの細胞と比べ細胞突起、細胞膜のラフリングの形成が促進されていることがわかった(図11.)。これらのことから未分化な細胞が骨分化の誘導を受け、速く運動するときにはmesenchymal modeと言われる運動様式によって位置移動するのではないかと示唆された。

3. 5. Mesenchymal modeによる細胞運動はY-27632によるRho-ROCK-myosinシグナリングの抑制によって促進される。

Mesenchymal modeによる運動様式はこれまでの報告によってCdc42, Rac1の活性化によって引き起こされている事などが報告されており、さらに低分子量GTP結合タンパク質のRhoAの下流で働くROCK (Rho-associated kinase)の抑制によって促進される

ことがわかっている(56-59)。そこで、ST2細胞にROCK inhibitorであるY-27632を処理し、解析を行った。

Y-27632は24時間処理を行い、分化誘導1日後(rhBMP-2)またはY-27632とrhBMP-2を同時に処理した細胞(rhBMP-2/Y-27632)を比較した(図12. A)。本研究で使用したRho-ROCK-myosinシグナリング阻害剤(10 μ M Y-27632; ROCK阻害剤、10 μ M blebbistatin; ミオシン II 特異的阻害剤)が10 μ M程度の低濃度では細胞増殖には影響しないことを細胞内脱水素酵素の活性を測定することによって細胞数を定量するWST-8法により確認した(図12. B)。骨分化をALP染色、ALP活性測定によって調べた(図12. C)。するとY-27632を処理した細胞はrhBMP-2と同程度のALP活性を示した。また、Y-27632とrhBMP-2を併用するとALP活性は増強することがわかった。細胞形態はY-27632を処理すると大きな変化がみられた(図13. A, B)。Y-27632を処理した細胞はrhBMP-2を処理した時と同様にアクチンストレスファイバー、接着斑の形成が減弱した。また、Y-27632を処理した細胞はrhBMP-2を処理した細胞に比べ顕著に細胞突起が増えていた。Y-27632とrhBMP-2を併用した細胞の形態はY-27632単独で処理した細胞の形態に似ており、細胞突起の形成が顕著に見られた。

次に、Y-27632による運動速度の変化を観察した。するとコントロールの細胞に比べ、Y-27632を処理した細胞では運動速度が促進されることがわかった(図14. A, B)。また、タイムラプスビデオの観察により移動している細胞はmesenchymal modeの特徴である細胞突起を多く出して運動していることが観察された(図15)。rhBMP-2とY-27632を併用した細胞でも運動速度が促進されたが、rhBMP-2単独で処理した細胞の運動速度と同程度で、相加的な効果は得られなかった。これは細胞の運動速度がrhBMP-2単独で最大値に達してしまうために、rhBMP-2とY-27632の併用時で相加的な運動速度促進の効果がみられなかったと考えられる。rhBMP-2の濃度を少なくするなどのさらなる実験が必要である。次にY-27632を処理した細胞の接着能を調べるとコントロールの細胞と比べ減少していることがわかった(図14. C)。また、Cdc42とRac1の活性化を測定するとrhBMP-2を処理した細胞とは異なり有意な活性化は見られなかった(図14. D)。これらのことからY-27632処理によって、細胞突起を多くみられるmesenchymal modeによる細胞運動が促進されることがわかった。しかし、接着能や低分子量GTP結合タンパク質の活性がrhBMP-2を処理した細胞とは異なることから、rhBMP-2とY-27632は一部異なった機構によってmesenchymal modeによる細胞運動を促進するのではないかと示唆された。また、Y-27632の濃度を変え、運動速度の測定を行った(図16.)。するとY-27632を20 μ Mを加えた時でもコントロールの細胞と比べると細胞運動は促進された。5~10 μ MのY-27632を処理した時に最大の細胞運動促進作用が見られた。

3. 6. Y-27632の細胞運動促進作用は骨分化誘導による効果と骨分化非依存的な効果によって引き起こされる。

Y-27632の細胞運動促進は骨分化を誘導することによるものかを検討した。過去に本研究所より、Y-27632を処理するとBMP-4の発現量が増加し、骨分化を誘導することを報告している(50)。本研究においてもY-27632処理によってrhBMP-2を加えた時と同様にBMP-4の発現が促進されることをRT-PCRによって確認した(図17. A, B)。このことからY-27632の作用はBMP-4の発現誘導を介して骨分化を引き起こすことによって細胞運動を促進することが考えられる。さらにrhBMP-2の添加する量を増やし、骨分化を調べた(図17. C)。するとrhBMP-2を100 ng/mlに増やしても50 ng/ml加えた時と同程度のALP活性だった。rhBMP-2とY-27632を併用した時のALP活性は相加的に増加した。この結果はY-27632の骨分化誘導作用はBMPの発現誘導以外にも骨分化を誘導する機構があるのではないかと考えられる。Y-27632の運動促進の効果は骨分化誘導の効果だけによるものかを検討するためにROCKの下流であるmyosin II ATPaseの阻害剤であるblebbistatinを処理し細胞運動を観察した。BlebbistatinはY-27632とは異なり骨分化は誘導せずにRho-ROCK-myosin経路を阻害する薬剤である (図18. A)。また、Y-27632を処理した細胞ではMLCの19番目のセリンのリン酸化は処理して10分以内に減少するのに対してblebbistatinを処理した細胞ではリン酸化は変わらない(図18. B)。このことからY-27632とblebbistatinのRho-ROCK-myosinシグナリングへの作用機序が違う事が確認できる。BlebbistatinをST2細胞に処理し、運動速度を測定した。すると、blebbistatinを処理した細胞はコントロールの細胞に比べ速く動く事がわかった(図18. C)。このことからST2細胞は骨分化誘導がなくてもRho-ROCK-myosinシグナリングを抑制すると運動速度が促進されることがわかった。これらのことからST2細胞においてY-27632による運動能促進の作用はBMPの発現誘導を介した骨分化の促進による効果と、Rho-ROCK-myosinシグナリング抑制による効果の両方の効果によって細胞運動が促進されているのではないかと考えられる。

3. 7. 未分化な間葉系細胞はRho-ROCK-myosinシグナリングの抑制によって運動能が促進される。

さらにST2細胞以外の未分化な間葉系細胞に対するRho-ROCK-myosinシグナリングの抑制作用を調べるためにマウスの骨髄より細胞(BMDCs)を抽出し、培養を行った。得られた細胞は間葉系幹細胞の特徴である紡錘状の形態を示していた(図19. A) (30)。また、BMDCsは骨分化、脂肪分化を誘導できることが確認できた(図19. B)。このことか

らBMDCsが未分化な間葉系の細胞であることが確認できた。軟骨分化については分化誘導をしていない細胞と差があまり見られなかった。このことは、抽出したBMDCsは未分化な細胞を含んだ不均一な細胞集団であることが原因であると考えられる。軟骨分化は未分化な細胞が高密度の状態では分化誘導が引き起こされるため(72)、本研究で抽出した不均一な細胞群では未分化な細胞の純度が不十分であると考えられる。今後、精製などを行い、未分化な細胞の純度を高めて、さらに実験を進めないといけない。次にBMDCsにY-27632とblebbistatinを処理し、運動速度の測定を行った。すると薬剤を処理した細胞はコントロールの細胞と比べて速く運動することがわかった(図20)。これらのことからRho-ROCK-myosinシグナリングの抑制はST2細胞だけではなくBMDCsの細胞運動も促進することがわかった。さらにY-27632が未分化な細胞と分化した細胞のどちらに作用しているかを確かめるために、骨分化の進んだST2細胞(3 d)と骨芽細胞株MC3T3-E1に処理し、運動速度を調べた。すると、骨分化が進んだそれらの細胞においては運動促進作用が見られないことがわかった(図21. A-C)。これらのことからY-27632の運動促進作用は未分化な細胞特異的に作用していることがわかった。

3. 8. 未分化な細胞の運動促進はマウス異所性骨形成を増強する。

最後に、*in vivo*においても同様に運動促進が引き起こされるかをマウスの異所性骨形成のモデルを用いて調べた。rhBMP-2-collagen1 compositeはマウスの広背筋筋膜下に移植し、Y-27632はosmoticポンプによって供給した(図22. A)。移植4日後にrhBMP-2-collagen1 compositeを取り出し、骨分化の初期マーカーであるOPNの発現を調べた。すると、Y-27632を供給することによってマウスの骨形成部位にリクルートされている細胞の量がコントロールのマウスと比べて顕著に多くなっていることがわかった(図22. B)。このことから*in vivo*においてもY-27632は未分化な細胞の運動を促進し、骨形成部位への細胞のリクルートを促進していることが示唆された。さらに移植1ヵ月後に骨形成を観察すると興味深いことにコントロールのマウスと比べてY-27632を供給したマウスに大きな骨が形成されることがわかった(図23. A, B)。レントゲン撮影によって石灰化も確認することができた(図23. C)。このことからY-27632によって細胞運動を促進することにより、骨形成部位での骨形成が促進されることも明らかとなった。

4. 考察

未分化間葉系細胞が骨形成や骨修復に寄与していることはこれまでに報告されており、細胞分化や細胞運動のメカニズムの解明は骨折治療などの医療への応用に繋がり重要である(34, 35)。未分化な細胞が骨形成に寄与するためには骨形成部位に移動すること、骨を作る細胞に分化をすることの両者が必要である。骨分化や細胞運動については多くの研究が行われてきたが、両者を考慮した研究はほとんどない。未分化な細胞が骨形成部位に移動してから分化を行うのか、分化してから移動してくるのかなどわかっていない事が多い。そこで本研究では分化と細胞運動について焦点をあて研究を行った。

分化段階の違う細胞株は違った運動能を示し、分化段階の違う事が細胞運動へ影響があるのではないかと示唆された。ケモアトラクタントを加えていない状態の細胞運動はフィブロネクチンに対するハプトタキシス(走触性)の細胞運動を見ており、これまで骨芽細胞などで報告されている(70)。外堀らの報告ではインテグリン β 1を介した細胞内シグナルがPhosphoinositide 3-kinase (PI3K)、AKT、FAKの活性化に作用し、ハプトタキシスの細胞運動を制御していることを報告している。このことからハプトタキシスで運動に差が見られる4つの細胞間でPI3K、AKT、FAKなどの因子の活性に違いがあることが考えられる。さらには骨分化段階でも異なることが考えられ、分化段階で運動速度が変わるメカニズムについてはこれらの因子の細胞内での動態を解析することによって明らかとなるかもしれない。また、FBSを走化性因子として細胞運動を観察すると、細胞間で差があることがわかった。このことから分化段階が変わるとある特定の因子に対する走化性が変化することが考えられる。本研究では様々な増殖因子などが含まれる血清を用いたが、これまで骨芽細胞の走化性を誘導することが知られている因子に対しての走化性を解析することによって、骨分化のいつの時期にどのような因子に応答し、移動していくのかが明らかになると考えられる。本研究においても、これまでに報告(43)があるようにPDGFが骨芽細胞株MC3T3-E1の細胞運動を促進することが確認できた(図24)。一方、ST2細胞はPDGFに対して明らかな走化性は認められなかった(図25. A-B)。このことから未分化細胞と骨分化した細胞において走化性因子への応答性に違いがあることが明らかであり、骨分化による走化性因子への応答性の変化を解析することによって、骨形成部位や骨修復部位への細胞の移動機構がさらに詳しく知ることができると考えられる。

また、未分化な間葉系細胞株ST2にrhBMP-2を添加することによって段階的に骨分化を追跡できる実験系を構築し、骨分化によって細胞形態が大きく変化すること、運

動速度が変化することが明らかとなった。骨分化した細胞は初期段階に接着斑の少ない形態を示し、細胞の運動速度が一時的に速くなる。その時期の細胞ではCdc42、Rac1の活性が高くなり、mesenchymal modeと言われる運動様式で運動することが示唆されたが、どのようなメカニズムで速く動くかについてはまだ不明な点が多い。分化による形態変化や接着能の変化がどのように低分子量GTP結合タンパク質の活性化に作用するのかについての詳細はわからない。今後、細胞形態や接着を制御する因子が分化段階でどういった変化をするのかを生化学的な研究を行うことにより明らかになると考えられる。本研究で示唆された分化段階における細胞形態変化と運動能の変化について模式図を記載する(図26)。

次に、Y-27632によるRho-ROCKシグナリングの抑制によっても未分化な間葉系細胞の運動速度が促進されることが明らかとなった。Y-27632処理による細胞運動促進作用は形態変化やタイムラプスビデオによる観察から骨分化時に見られたときと同様に細胞突起の形成が促進され、mesenchymal modeによる運動を行い、速く移動するのではないかと示唆された。しかしながら、低分子量GTP結合タンパク質の活性や接着能において、rhBMP-2処理した細胞とY-27632処理した細胞では異なっていた。このことからどちらの薬剤もmesenchymal modeによる運動を誘導するがその作用機序が違うのではないかと考えられる。その違いを考える上で、細胞運動において自動車のアクセルとブレーキのような機構が細胞にも存在し、運動の制御を行っているのではないかと考えている。分化段階初期の時期では、Cdc42やRac1の活性化が引き起こされ、自動車というアクセルを踏んだ状態となり、移動速度の加速が引き起こされているのではないかと考えている。さらに分化が進むと接着能が高くなり、ブレーキがかけられた状態となり移動速度が減少する。一方、未分化な細胞にY-27632処理した細胞では細胞接着能が減少する。このことにより、細胞のブレーキが解除され、その結果、移動速度が加速するのではないかと考えている。これらのことから、どちらの処理も作用機序は異なるが細胞突起をだすmesenchymal modeによる細胞運動を引き起こし、移動速度が上がるかと考えている。また、Y-27632はBMPの発現を引き起こすことによる骨分化誘導と骨分化誘導とは独立してRho-ROCK-myosinシグナリングを抑制することによる作用によって細胞運動を促進していることが示唆された。今後詳細なメカニズムを解明するにはさらなる研究が必要である。

運動様式についてはこれまで多くの研究がされており、細胞と細胞外マトリックスとの接着、細胞間接着、Rhoファミリー低分子量GTP結合タンパク質の関与などが報告されている(78)。Mesenchymal modeの運動については上皮細胞由来の癌細胞が転移する時にみられる上皮間葉移行(Epithelial-Mesenchymal Transition; EMT)において

よく研究されており、運動様式の研究は正常細胞だけではなく癌細胞の運動についても重要である。本研究で見られたmesenchymal modeによる移動は一時的に運動様式を変化させて移動したと考えられ、上皮細胞由来の癌細胞が転移をする時のEMTと同様な機構があるのではないかと考えられる。上皮細胞由来の癌細胞以外にも骨肉腫細胞の運動にもmesenchymal modeが高肺転移性を引き起こしていると報告されており(57)、今後ますます運動様式についての研究が重要ではないかと考えられる。本研究で未分化間葉系細胞がmesenchymal modeによって速く運動することが明らかとなり、癌細胞における運動メカニズムの解明に正常な未分化間葉系細胞が活かせるのではないかと考えている。

また、癌細胞の転移以外にも間葉系幹細胞の解明をすることにより腫瘍について新たに分かることは多いと考えられる。近年の研究で骨軟部腫瘍などの一部の腫瘍が多分化能をもつ未分化な細胞を起源とした腫瘍であると報告されている(79)。これらの腫瘍は間葉系幹細胞に染色体転座などの変異が起こり腫瘍化したものと考えられており、自己複製能や転移能が高く非常に予後が悪い。腫瘍化のメカニズムもわかっていないことが多く今後さらなる研究が必要とされている。正常な間葉系細胞は生体内で厳密に維持と分化が制御されている。腫瘍化は正常な制御がされなくなり無秩序な増殖を繰り返す細胞へと変化することであり、間葉系幹細胞の正常な制御が解明されることにより腫瘍化のメカニズム、さらには新規の治療法の開発へと繋がると考えられる。

最後に、本研究によって細胞運動を促進することにより*in vivo*において骨形成を増大することが明らかとなった。過去に本研究所よりY-27632の処理がBMPの発現を誘導することによって骨形成を促進していることはわかっていたが、細胞の運動や骨形成部位への細胞の動員についてはわかっていなかった。しかし、本研究によってY-27632が未分化な細胞特異的に運動を促進することがわかり、*in vivo*においても骨形成部位への未分化な細胞の動員が促進されることが明らかとなった。マウス異所性骨形成モデルではrhBMP-2-collagen1 compositeへの細胞の動員、骨形成の増大が見られた。しかし、本研究において未分化な細胞はrhBMP-2に対する走化性はないことがわかった。このことからrhBMP-2-collagen1 compositeへの移動はrhBMP-2以外の他の因子の関与が考えられる。rhBMP-2-collagen1 compositeの場所には骨芽細胞や血球系細胞が存在していることが考えられる。それらの細胞が走化性因子などを分泌し、未分化な細胞がそれに応答して、移動していくのではないかと考えられる。また、未分化な細胞が分化することによりBMP-2を含めた走化性因子への応答性が変化することも考えられる。今後さらに、分化と細胞運動のメカニズムが解明されていくことにより、骨折治療や再生医療などの臨床への展開が多いに期待される。

間葉系幹細胞は分化によって細胞形態、細胞運動を含めた細胞の性質はダイナミックに変化する。これまで個々に細胞運動、遺伝子の発現、細胞内の代謝などが研究されてきたが、未分化な細胞の性質を解析するためには分化を考慮した包括的な研究が重要であると考ええる。

5. 図・表

表1. PCRで使用したプライマーシーケンス

	Forward primer	Reverse primer
<i>Runx2</i>	CGCATTCCTCATCCCAGTAT	TAAAGGTGGCTGGGTTAGTGC
<i>PTHr</i>	AGCGAGTGCCTCAAGTTCAT	CCCTCCACCAGAATCCAGTA
<i>Osterix</i>	CTTAACCCAGCTCCCTACCC	GCAGGCAGGTGAACTTCTTC
<i>Osteocalcin</i>	GCGCTCTGTCTCTCTGACCT	GCCGGAGTCTGTTCACTACC
<i>Osteopontin</i>	TCTGATGAGACCGTCACTGC	TCTCCTGGCTCTCTTTGGAA
<i>type1 collagen1a</i>	ACTGGTACATCAGCCCCGAAC	GGTGGAGGGAGTTTACACGA
<i>PPARγ2</i>	CCCTGGCAAAGCATTTGTAT	AATCCTTGGCCCTCTGAGAT
<i>LPL</i>	CCTACTTCAGCTGGCCTGAC	TGGGAGCAAATGATTCCTTC
<i>FABP4</i>	CACCTGGAAGACAGCTCCTC	AATTTCCATCCAGGCCTCTT
<i>Sox9</i>	AGGAAGCTGGCAGACCAGTA	CCCTCTCGCTTCAGATCAAC
<i>type10 collagen</i>	GCCAGGTCTCAATGGTCCTA	AAAAGCAGACACGGGCATAC
<i>type2 collagen</i>	GCCAAGACCTGAAACTCTGC	CTTGCCCCACTTACCAGTGT
<i>MyoD</i>	AGCACGCACACTTCCCTACT	GCATCTGAGTCGCCACTGTA
<i>B2MG</i>	ACGCCTGCAGAGTTAAGCAT	TGGGGGTGAGAATTGCTAAG
<i>GAPDH</i>	AACTTTGGCATTGTGGAAGG	CCCTGTTGCTGTAGCCGTAT

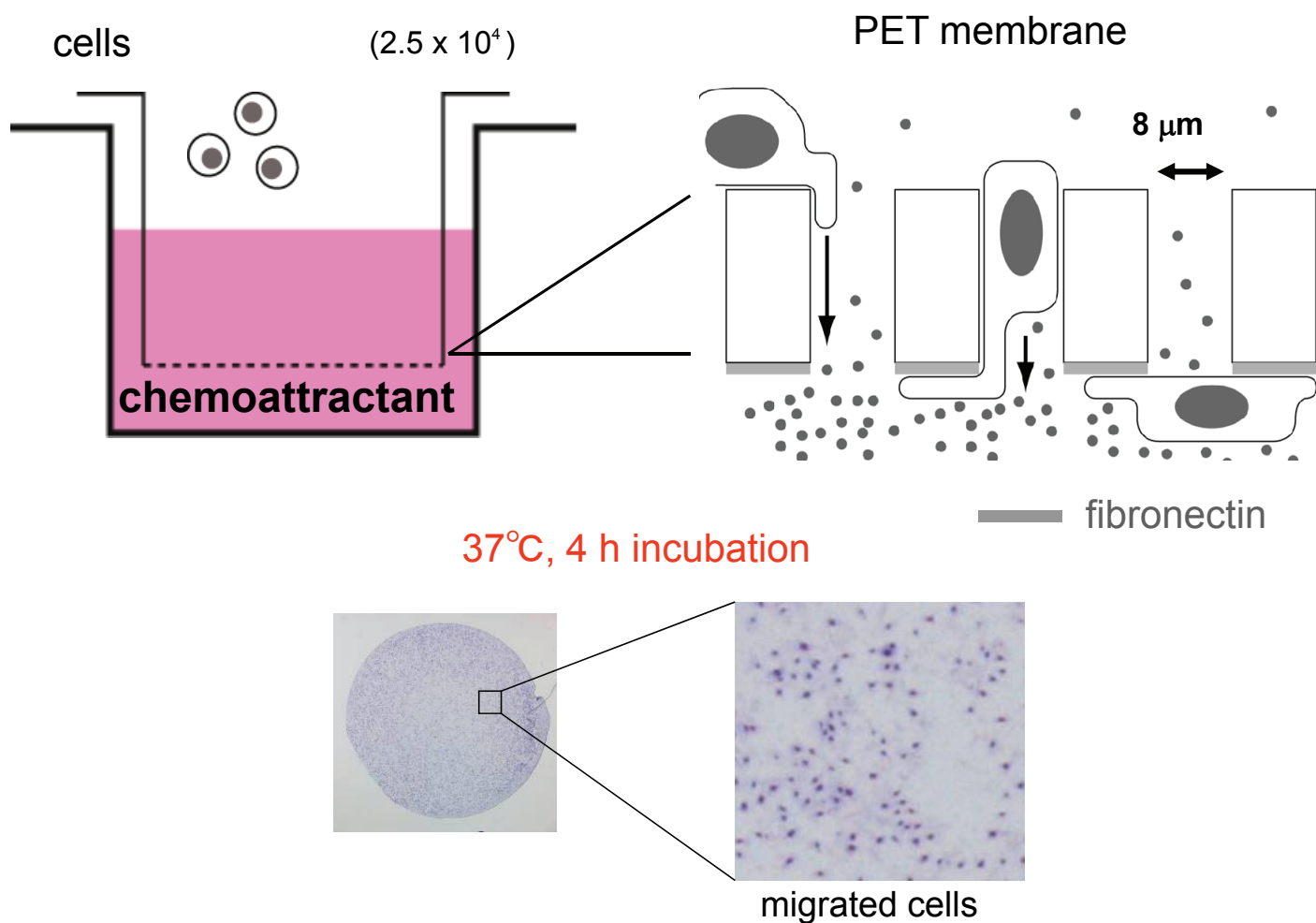
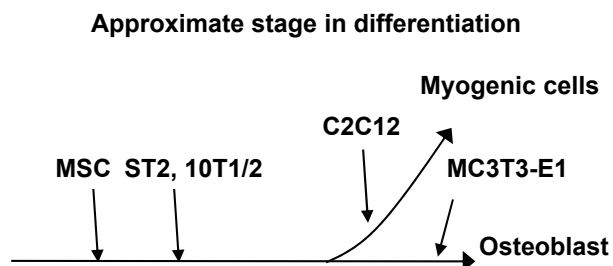


図1. boyden chamber assayによる細胞運動の測定。

孔径8 μmのtrans-well にfibronectinを下面のメンブレンにコートし、上記のように24 well-plateにセットする。そして、上層に細胞をアブライし、インキュベーターで4時間培養する。すると上層の細胞が穴を通過して下面のメンブレンの方に移動する。移動した細胞を数える為に細胞を固定し、ギムザ染色を行い、顕微鏡下で細胞を数える。また、PDGFなどの因子に対する走化性を計測する時は上層、下層に異なる濃度を加える。すると、走化性因子の濃度勾配ができ、その因子に対する移動を観察する。

A



B

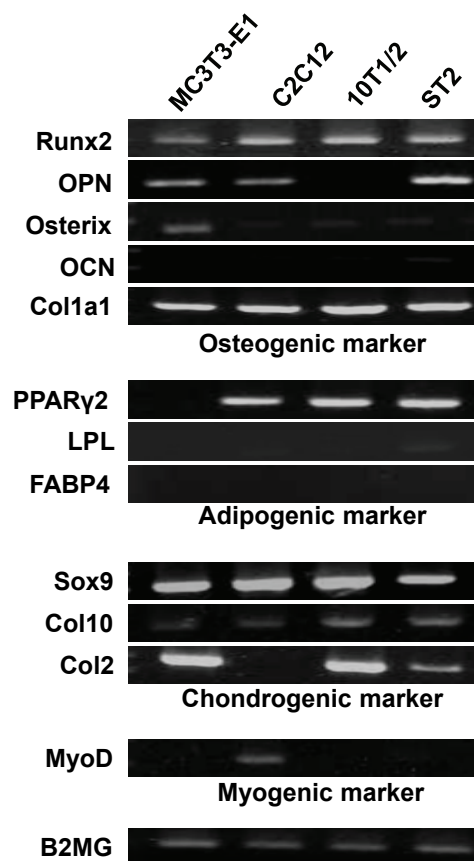


図2. 4つの細胞株は異なる分化段階の細胞株である。

(A)4つの細胞株は異なる分化段階に存在する。ST2、10T1/2は未分化な細胞株とされる。C2C12は筋芽細胞株であり、筋分化している。MC3T3-E1は骨芽細胞株であり骨分化が少し進んでいると考えられる。(B)4つの細胞株における骨、脂肪、軟骨、筋肉の分化関連マーカー遺伝子の発現をRT-PCRを用いて調べた。1 μ gのcDNAを鋳型としそれぞれの遺伝子に対するプライマーを設計し、PCRを行った。B2MGをローディングコントロールとして使用した。略語に関して以下に示す。OPN, osteopontin; OCN, osteocalcin; PPAR γ , Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ ; LPL, lipoprotein lipase; FABP, Fatty acid binding protein, Col, collagen。 B2MG, beta-2-microglobulin。

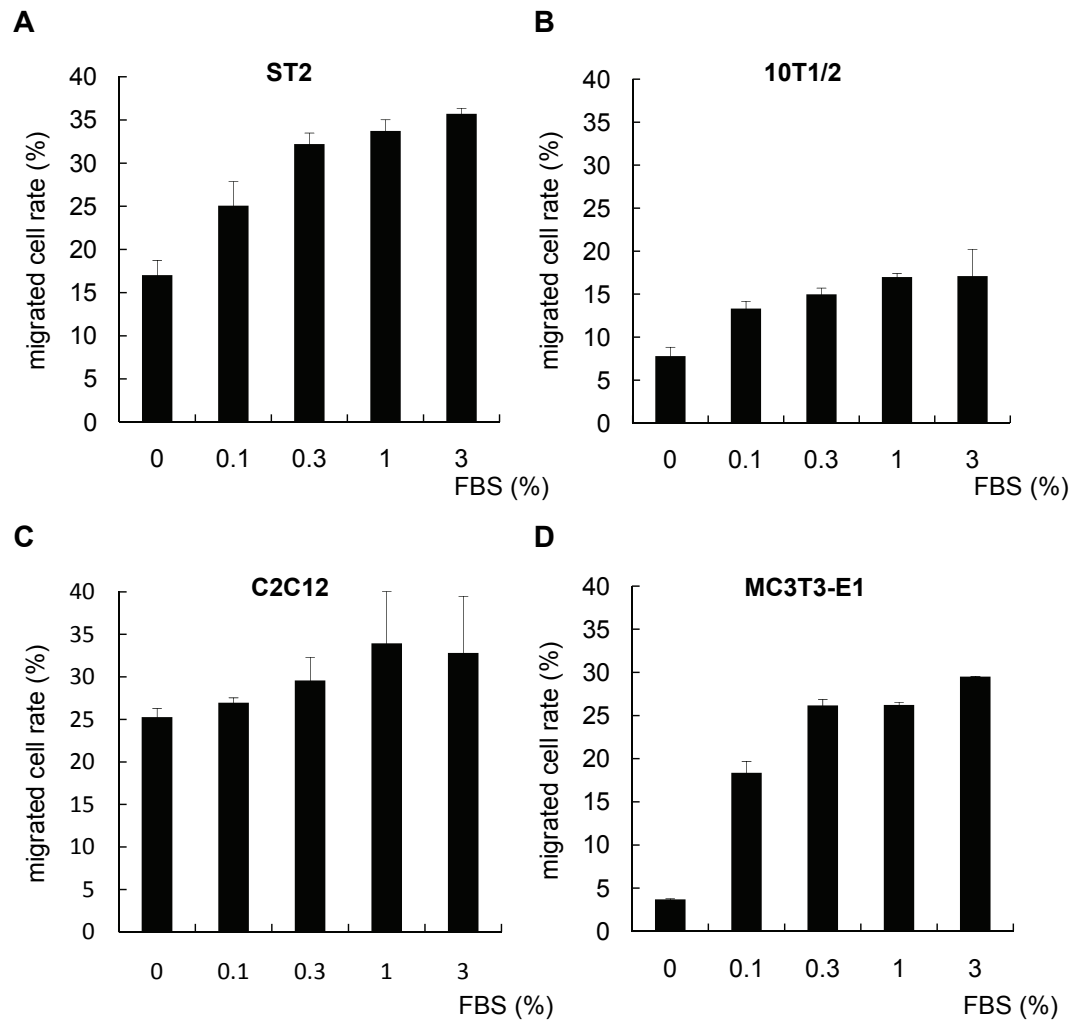


図3. 分化段階の異なる4つの間葉系細胞株は違う運動能をもつ。

FBSを走化性因子としてBoyden chamber migration assayを用いて(A) ST2細胞、(B) 10T1/2細胞、(C) C2C12細胞、(D) MC3T3-E1細胞の細胞運動を調べた。上層にアプライした細胞数(2.5×10^4 個)を100%とし、運動した細胞数のmigrated cell rate (%)を算出し、グラフに示す。また、示してある量のFBSを走化性因子とし、下層に添加した。

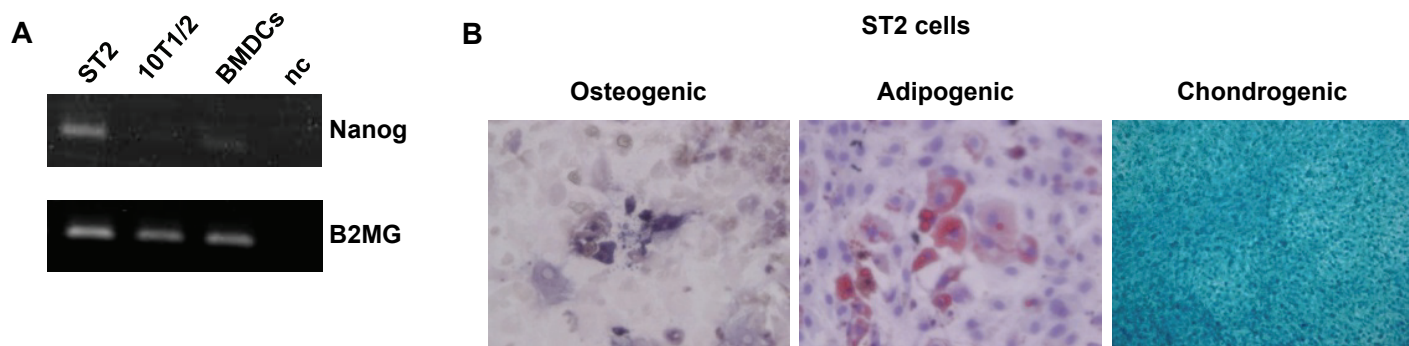


図4. ST2細胞は未分化な間葉系の細胞である。

(A) 未分化関連遺伝子 *nanog* 遺伝子の発現をRT-PCRで調べた。BMDCsはマウス骨髄より抽出した細胞のcDNAを用いた。(B) ST2細胞における骨分化、脂肪分化、軟骨分化を示す。骨分化をALP染色、脂肪分化をOil red O染色、軟骨分化をアルシアンブルー染色を行い検出した。

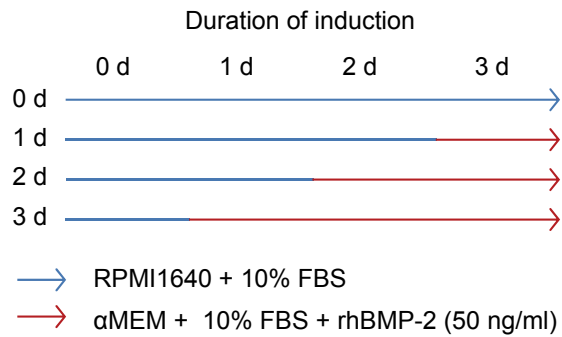
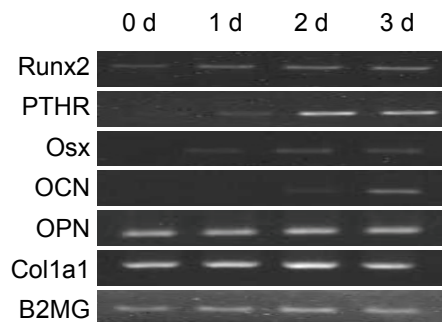
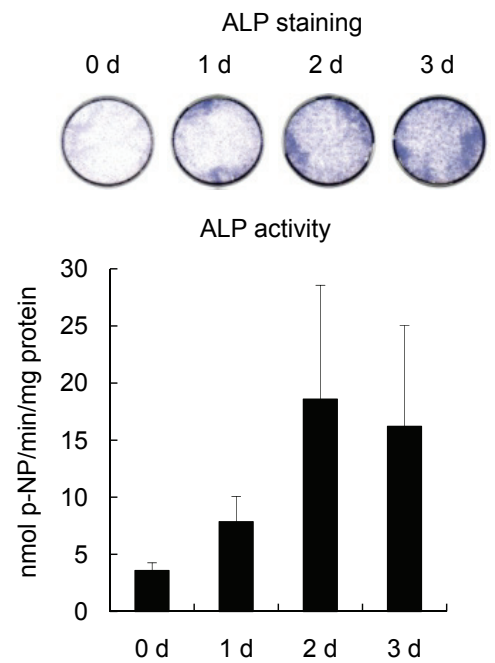
A**C****B**

図5. 段階的に骨分化の誘導を行った。

(A) ST2細胞を用いてrhBMP-2 (50 ng/ml)添加による段階的な骨分化実験系を構築した。矢印は培養を行った培地を示している。骨分化誘導培地に培地交換し、示してある期間の培養後を行った。青矢印;通常培養培地、赤矢印;骨分化誘導培地。(B)骨分化誘導を確かめる為にALP染色(上段)、ALP活性測定(n = 7) (下段)を行った。タンパク量で標準化しALP活性を算出した。(C)骨分化マーカーの遺伝子発現をRT-PCRを用いて確認した。

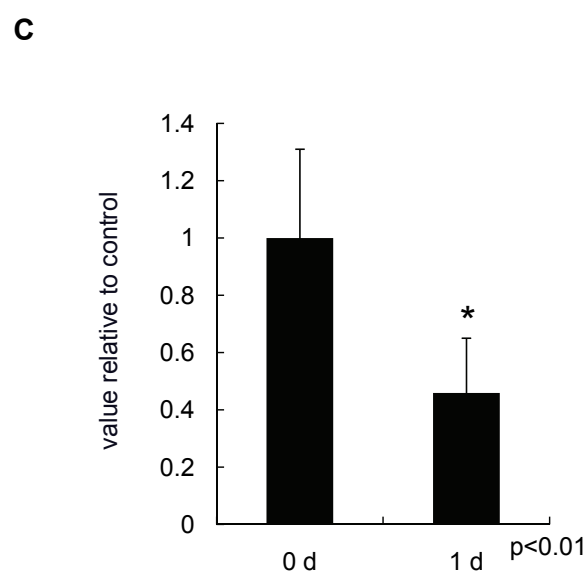
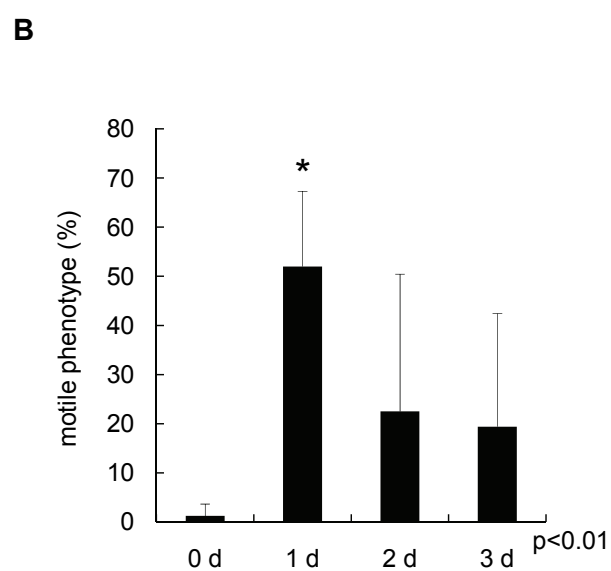
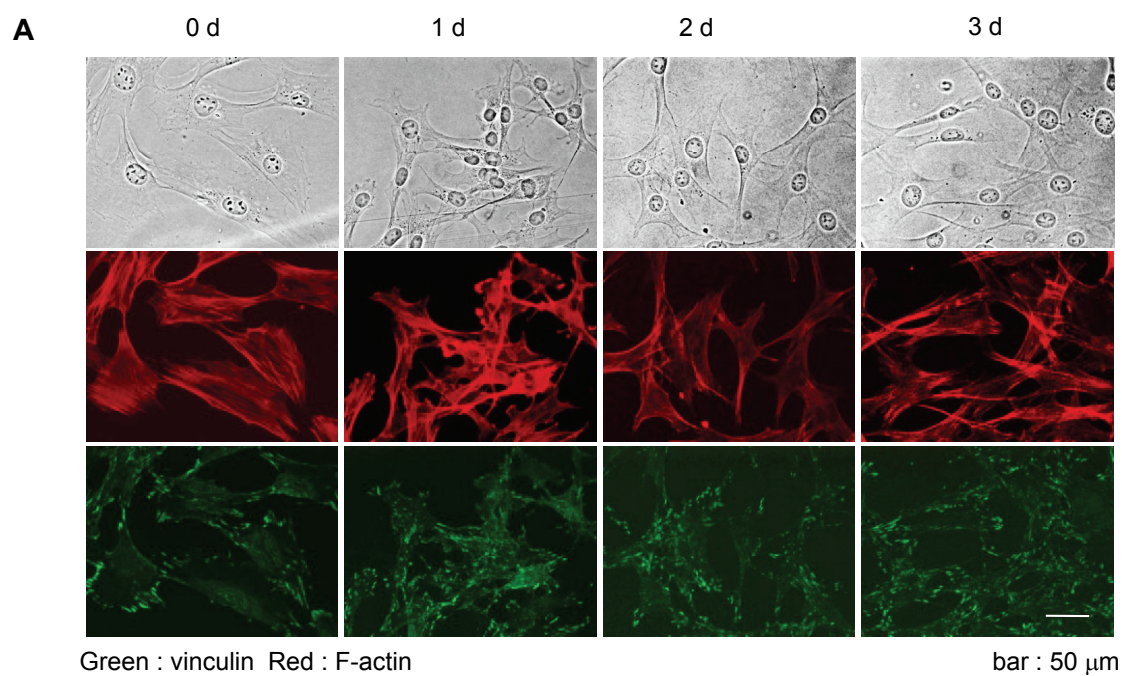


図6. 骨分化によって細胞形態が変化する。

(A)骨分化誘導後、誘導時間の違う細胞のアクチン細胞骨格、接着斑を免疫蛍光染色を行い細胞形態変化を観察した。位相差顕微鏡での観察を上段に示す。(B) motile phenotypeを骨分化後に定量を行った($n = 5$)。評価はブラインドで5人で観察し、行った。(C)骨分化後の細胞の面積を計測した($n > 100$)。* $P < 0.01$ versus 0 d。

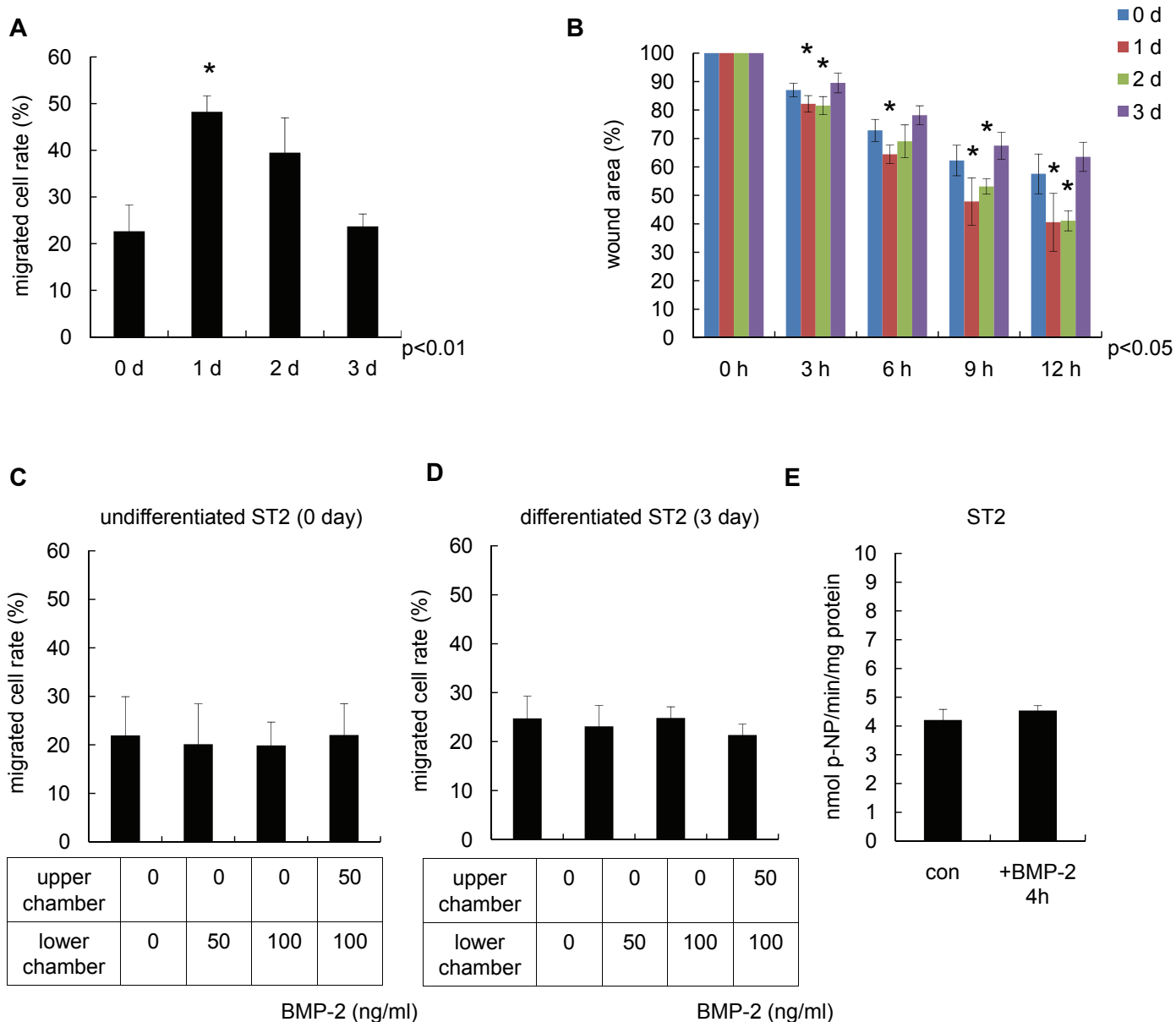


図7. 骨分化によって細胞運動が変化する。

(A) 骨分化後の細胞運動をboyden chamber assayによって調べた(n = 6)。* P<0.01 versus 0 d。(B) wound healing assayによる骨分化時の細胞運動の測定(n = 5)。* P<0.05 versus 0 d。(C) rhBMP-2を走化性因子としてboyden chamber assayを用いて細胞運動を調べた(n = 4)。Boyden chamberの上層、下層に表に示す濃度のrhBMP-2を添加し4時間培養を行った。分化していないST2細胞をもちいた時(C)、骨分化3日後のST2細胞をもちいた時(D)の結果を示す。(E) rhBMP-2処理4時間後のALP活性の測定を行った。

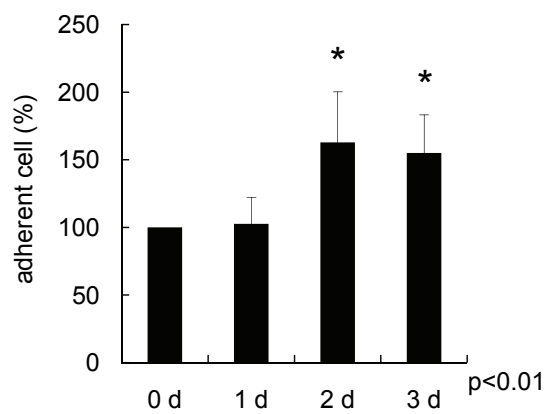


図8. 骨分化後期に細胞接着能が亢進する。

骨分化後の細胞接着を測定した(n = 6)。細胞を35 mm dishに撒種し、30分間37 °Cで培養を行う。その後PBSで、洗浄し、非接着細胞を取り除き、接着した細胞を数えた。最初に撒種した細胞から接着した細胞数の割合を算出した。* P<0.01 versus 0 d。

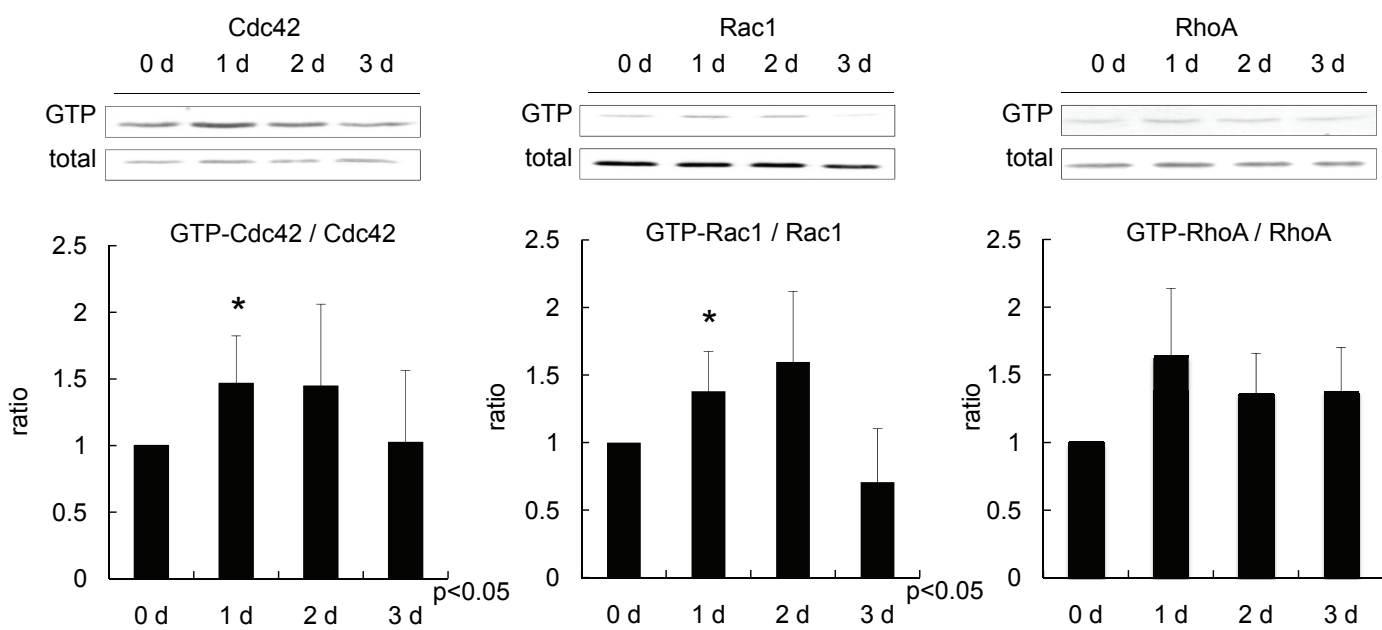


図9. 骨分化時のRhoファミリー低分子量GTP結合タンパク質の活性測定。

Rhoファミリー低分子量GTP結合タンパク質Cdc42、Rac1、RhoAの活性をGTP活性型のプルダウンを行い調べた(n = 4)。活性はGTP型の量と細胞内のGTPaseの量をウェスタンブロッティング(上段)で定量し、0 dのサンプルの活性型の比率を1とし算出した。算出した結果を下段のグラフに示す。* P<0.05 versus 0 d。

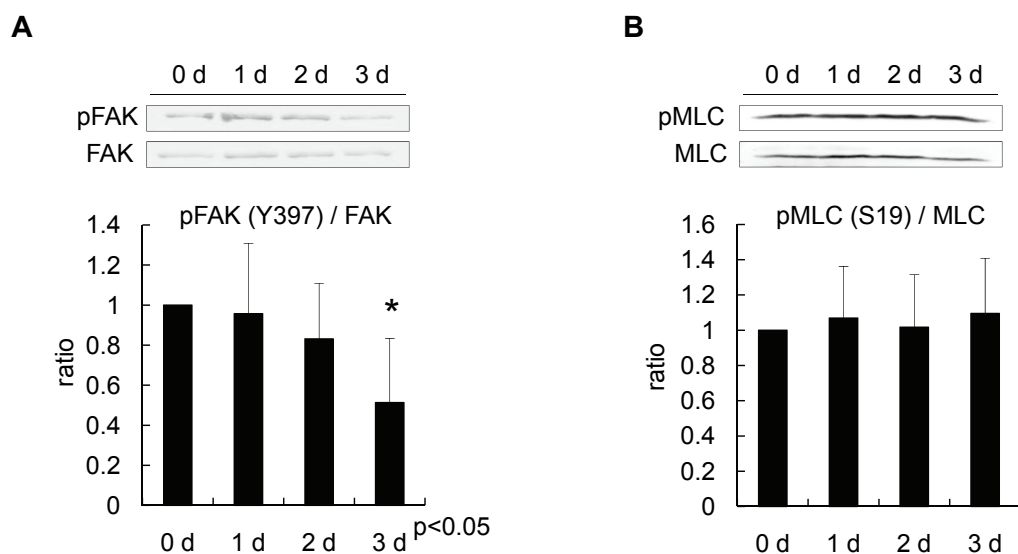


図10. 骨分化時のFAKとMLCのリン酸化測定。

(A) FAKの397番目のチロシンと(B) MLCの19番目のセリンのリン酸化を調べた。上段にウェスタンブロッティング、下段に定量したグラフを示す(n = 4)。全体のFAKに対するリン酸化されたFAKの割合をバンドから読み取り、0 dのサンプルの比率を1としratioを算出した。MLCについても同様に行った。* P<0.05 versus 0 d。

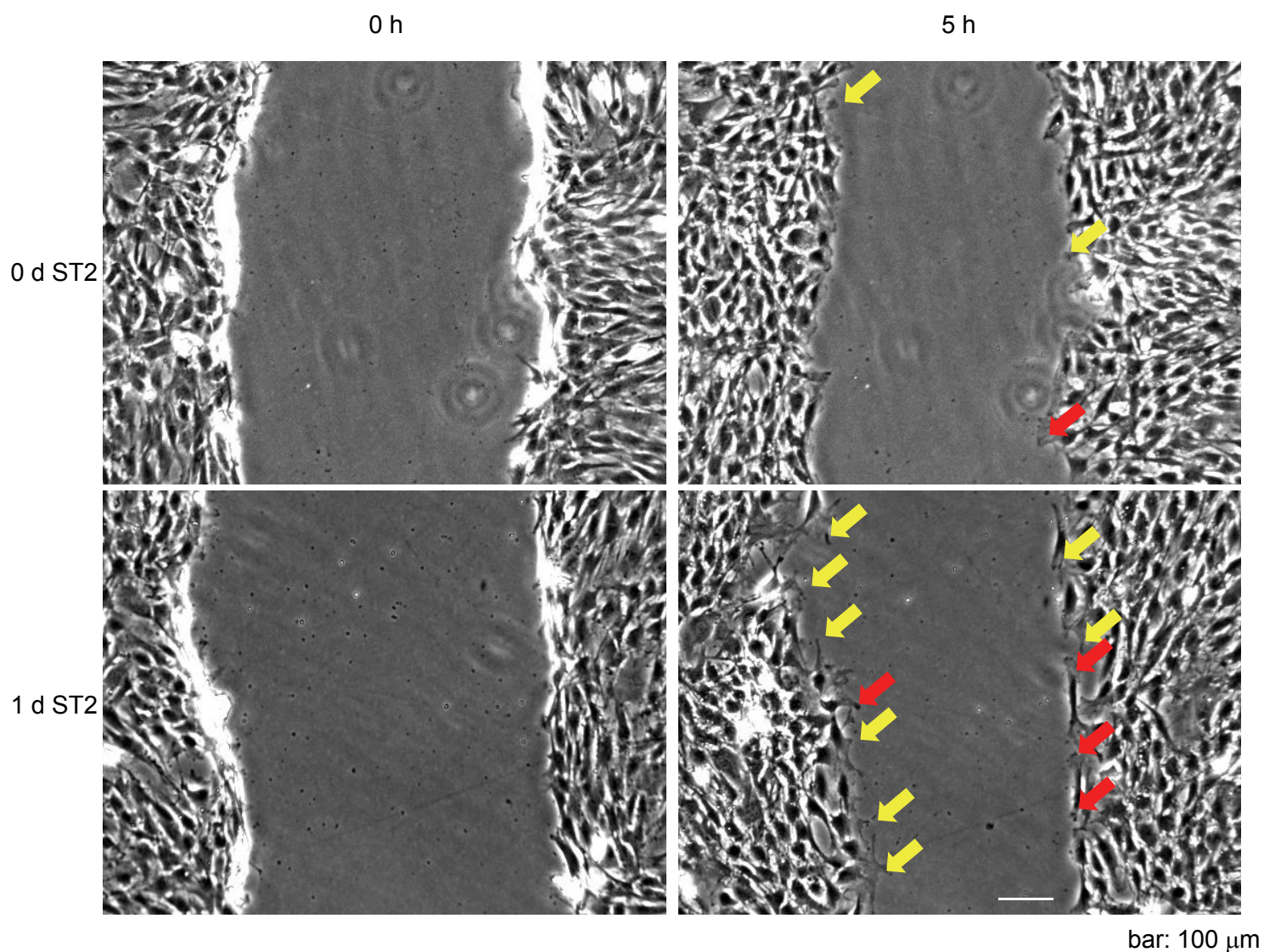


図11. 分化1日後の細胞は細胞突起や細胞膜のラフリングの形成が多く、速く運動する。

骨分化後のwound healing をタイムラプスビデオで撮影した。Wound healing開始(0 h) (左)と5時間後(5 h) (右)の写真を示す。分化を誘導(0 d)していない細胞(上段)に比べ、分化を誘導した細胞(1 d) (下段)は速く移動する。分化した細胞では細胞突起や細胞膜のラフリングの形成が多く見られる。細胞突起を黄色矢印、細胞膜のラフリングを赤矢印で示す。

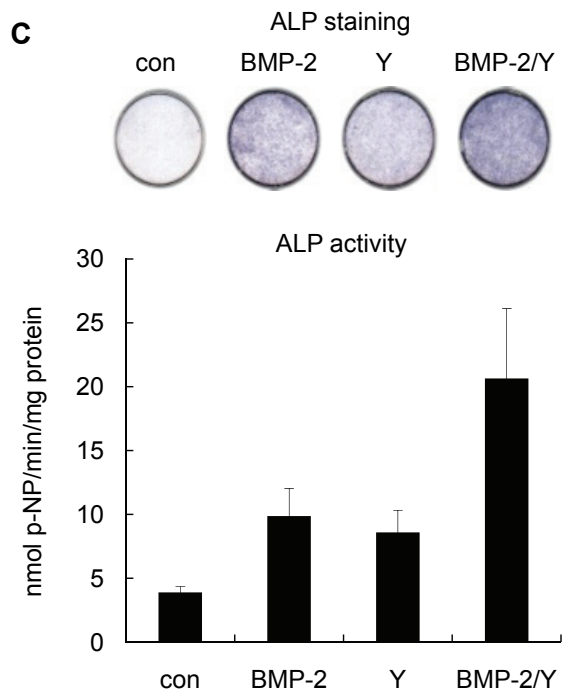
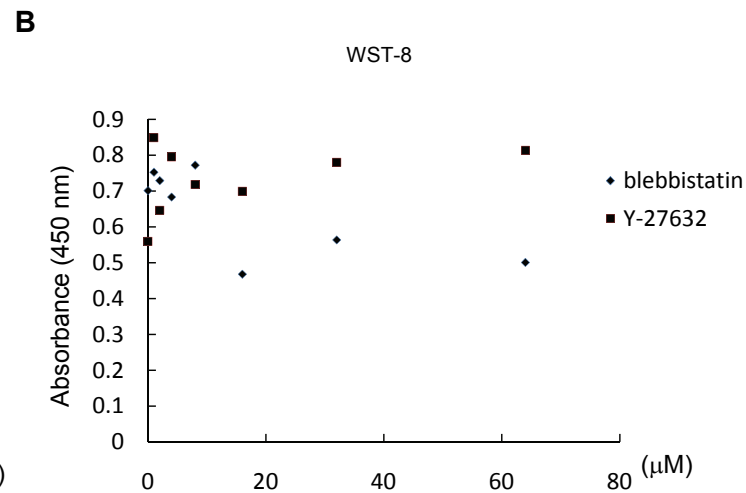
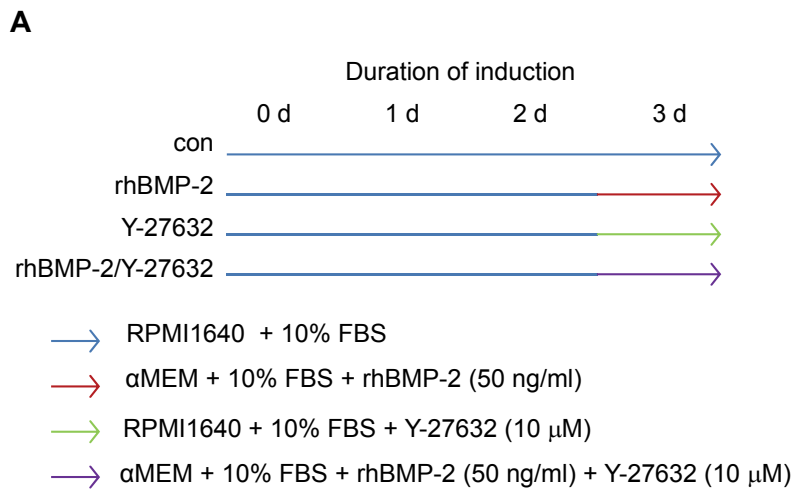


図12. ST2細胞にY-27632によるROCK阻害を行った。

(A) ST2細胞を用いてrhBMP-2 (50 ng/ml)、Y-27632 (10 μM)、rhBMP-2/Y-27632の処理を行い24時間の培養を行った。矢印は培地を示す。青矢印;通常培養培地、赤矢印;骨分化誘導培地、緑矢印;Y-27632、紫矢印;Y-27632とrhBMP-2。(B) Y-27632とblebbistatinの細胞増殖への影響を濃度を変えて、WST-8法により確認した(n=6)。(C)薬剤処理24時間後のALP染色(上段)、ALP活性測定(下段)を行った(n=5)。

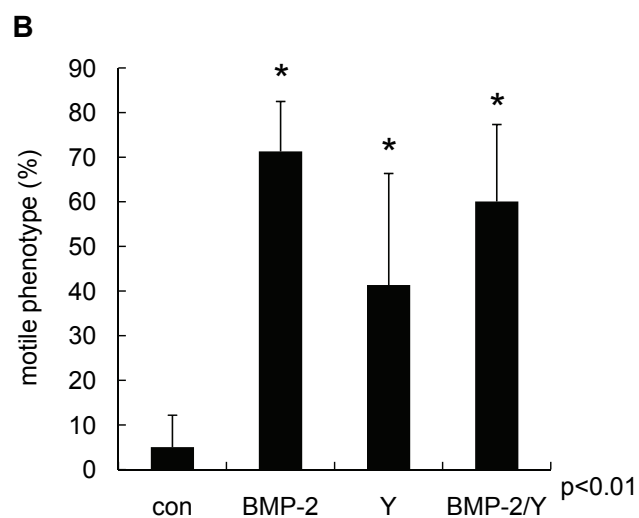
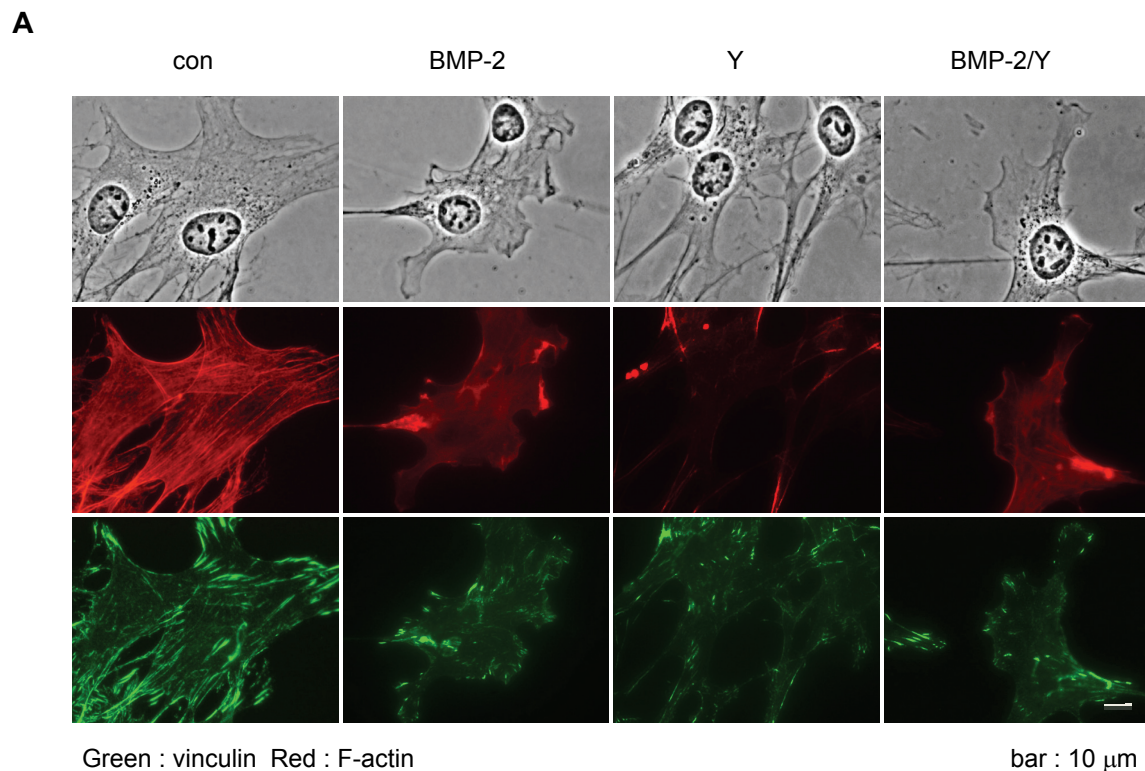


図13. Y-27632によるROCK阻害によって細胞形態変化が起こる。

(A)ST2細胞を用いてrhBMP-2 (50 ng/ml)、Y-27632 (10 μ M)、rhBMP-2/Y-27632の処理を行い24時間の培養を行い、細胞形態の変化を免疫蛍光染色を行い観察した。アクチン細胞骨格、接着斑の形成を染色し、観察した。位相差顕微鏡による観察を上段に示す。(B)細胞形態変化の定量測定を行った(n = 6)。* P<0.01 versus control。

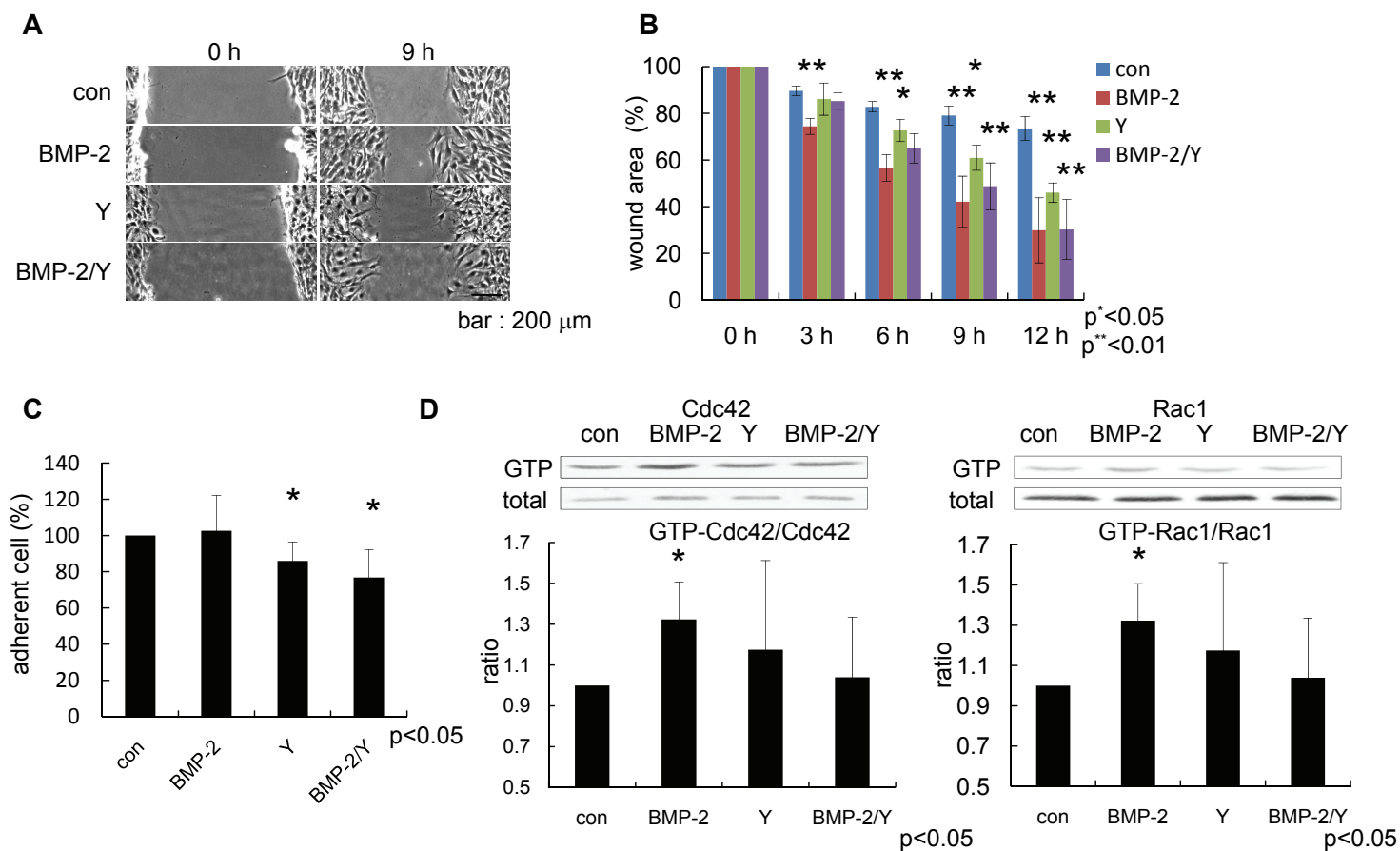


図14. Y-27632によるROCK阻害によって細胞運動が促進される。

(A) ST2細胞を用いてrhBMP-2 (50 ng/ml)、Y-27632 (10 μ M)、rhBMP-2/Y-27632の処理を行い、wound healing assayを行った。9時間後の写真を示す。(B) wound healing assayを行い、細胞運動を計測した(n = 4)。* $P < 0.05$ versus control ** $P < 0.01$ versus control。(C) 細胞接着の測定を行った(n = 6)。* $P < 0.05$ versus control。(D) Cdc42、Rac1の活性をGTP型のプルダウンアッセイを行い計測した(n = 4)。上段にウェスタンブロットティング、下段に細胞内のGTPase量より算出したGTP型の量を示す。* $P < 0.05$ versus control。

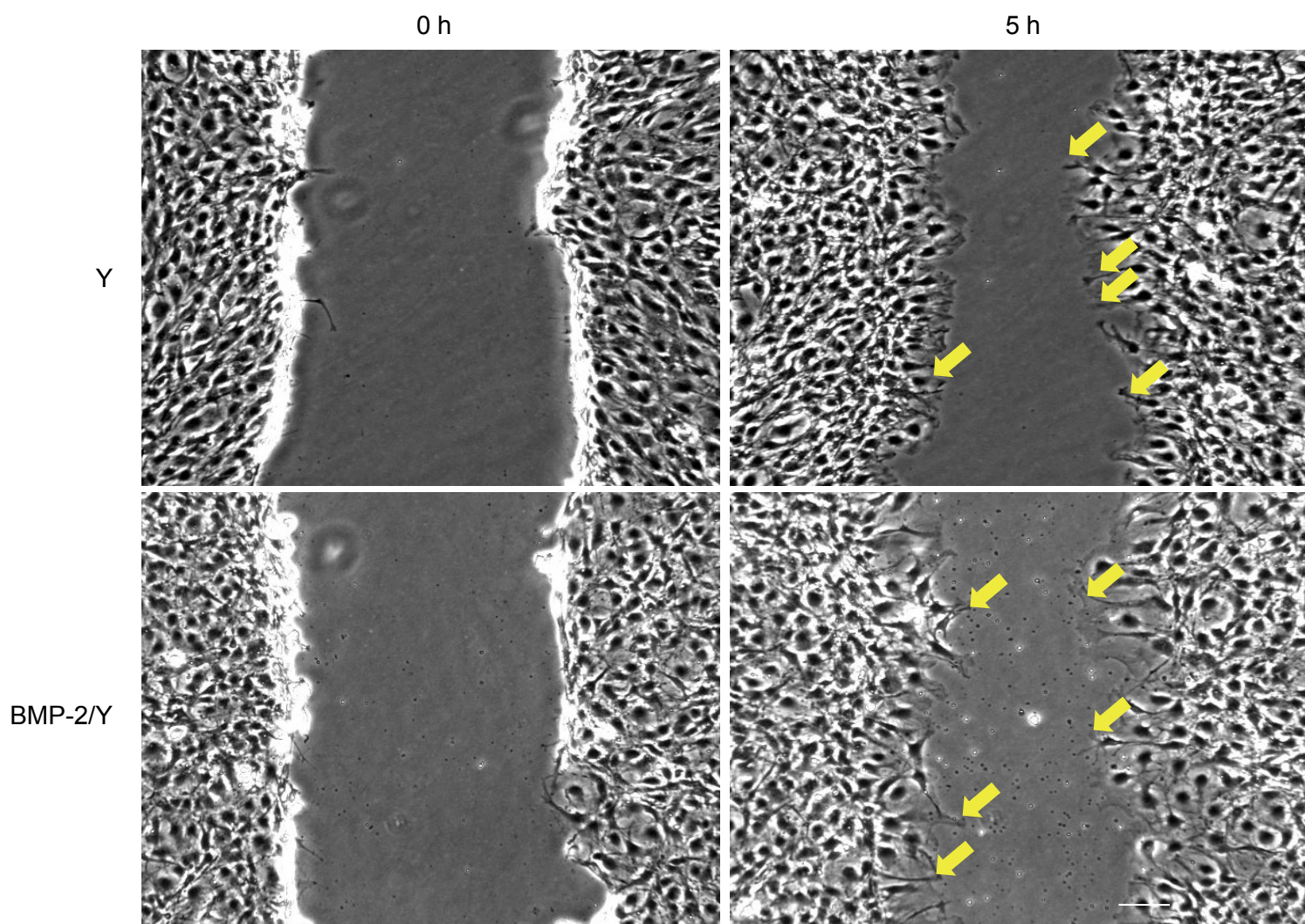


図15. Y-27632もしくはY-27632とrhBMP-2を同時に処理した時、細胞は細胞突起を出し速く運動する。

薬剤処理後のwound healing をタイムラプスビデオで撮影した。Wound healing開始(0 h) (左)と5時間後(5 h) (右)の写真を示す。Y-27632のみを処理した細胞(上段)、もしくはY-27632とrhBMP-2を同時に処理した細胞(下段)は細胞突起を形成し、運動する。細胞突起を黄色矢印、細胞膜のラフリングを赤矢印で示す。

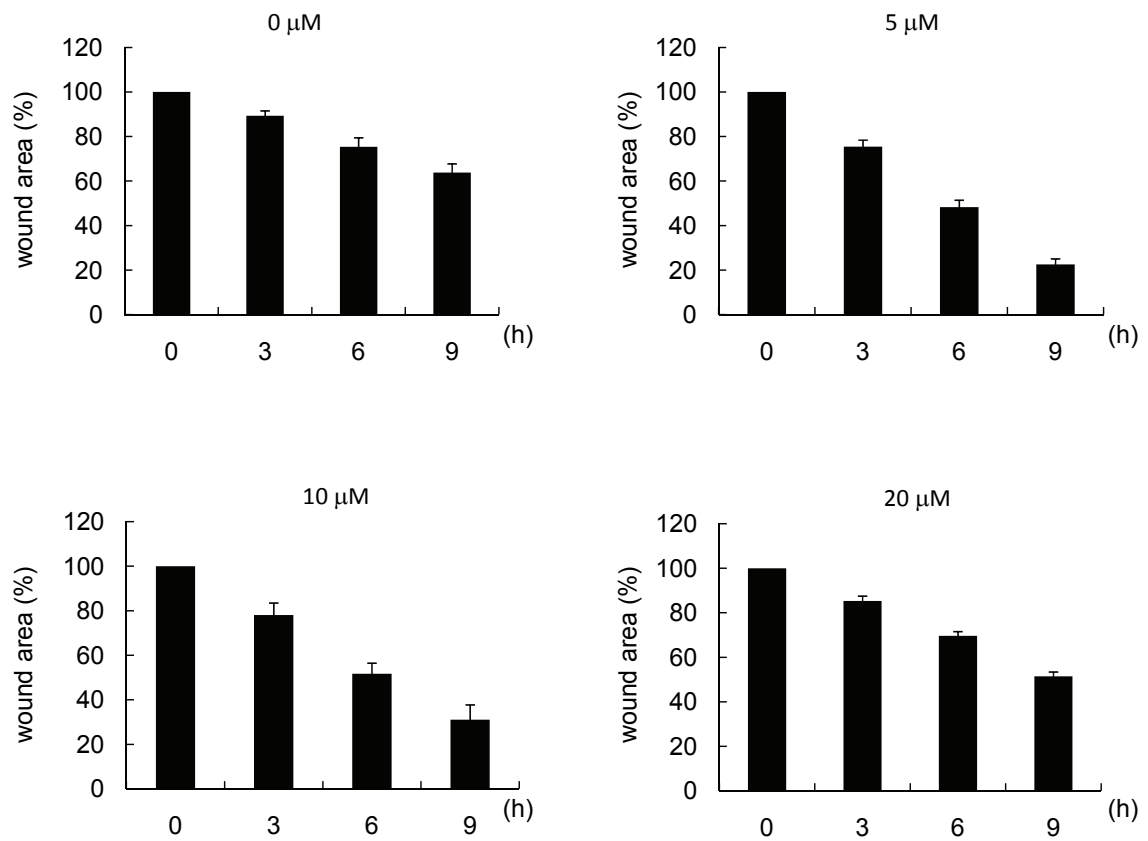


図16. Y-27632の細胞運動に対する作用を濃度を変えて行った。

ST2細胞に0 – 20 μMのY-27632を処理し、wound healing assayによって細胞運動への影響を調べた(n = 3)。Y-27632を処理するとコントロールの細胞に比べ速く運動した。10 μM以下の濃度で、より細胞運動を促進した。

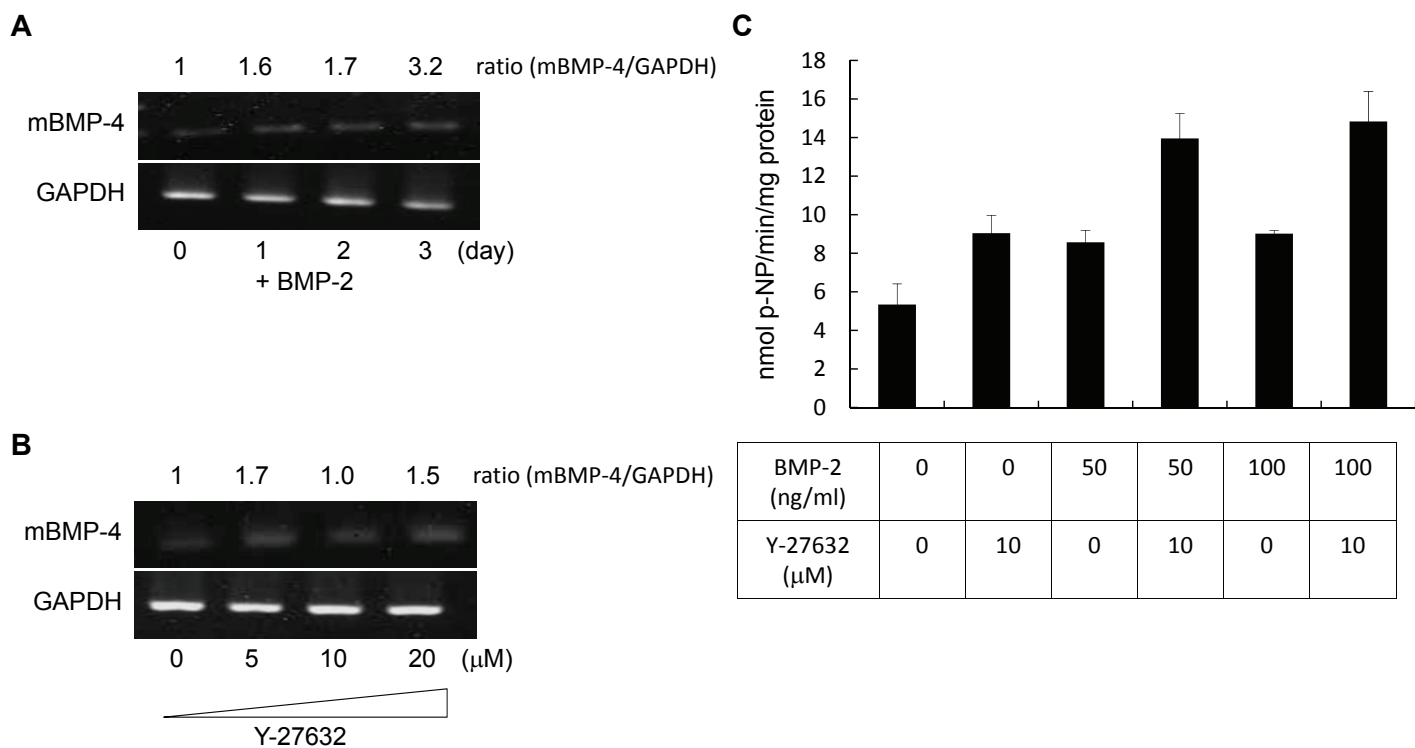


図17. rhBMP-2とY-27632はBMP-4の発現を誘導する。

(A) ST2細胞を用いてrhBMP-2 (50 ng/ml)を処理し、RT-PCRによってBMP-4の発現を調べた。培養時間に依存して、BMP-4の発現が増加した。GAPDHをコントロールとして発現量を比較した。(B) Y-27632の濃度を変え、ST2細胞に処理を行い、RT-PCRによってBMP-4の発現を調べた。GAPDHをコントロールとして発現量を比較した。(C) rhBMP-2の濃度を変え、Y-27632 (10 μM)との併用時のALP活性測定を行った。使用した薬剤の量は下の表に示す。

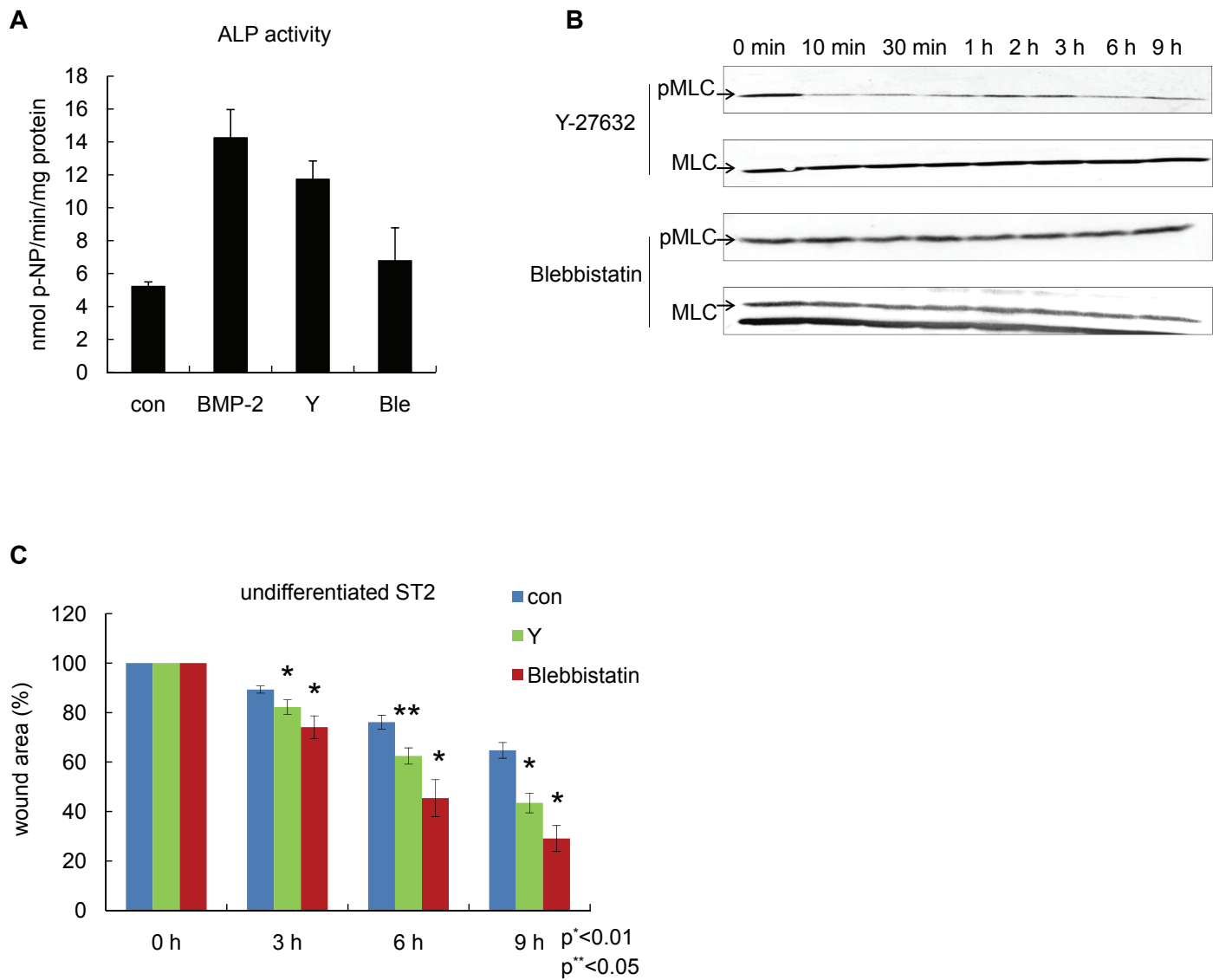


図18. blebbistatinは分化誘導を起こさずST2細胞の運動を促進する。

(A) myosin II ATPase特異的阻害剤であるblebbistatin (10 μ M)の骨分化への影響をST2細胞を用いてALP活性測定を行い、調べた (n = 3)。rhBMP-2、Y-27632処理した細胞と比較した。(B) Y-27632とblebbistatinによるMLC19番目のセリンのリン酸化の変化を調べた。(C) wound healing assayを行い、Y-27632、blebbistatinの細胞運動への影響を調べた (n = 5)。* P < 0.01 versus control ** P < 0.05 versus control。

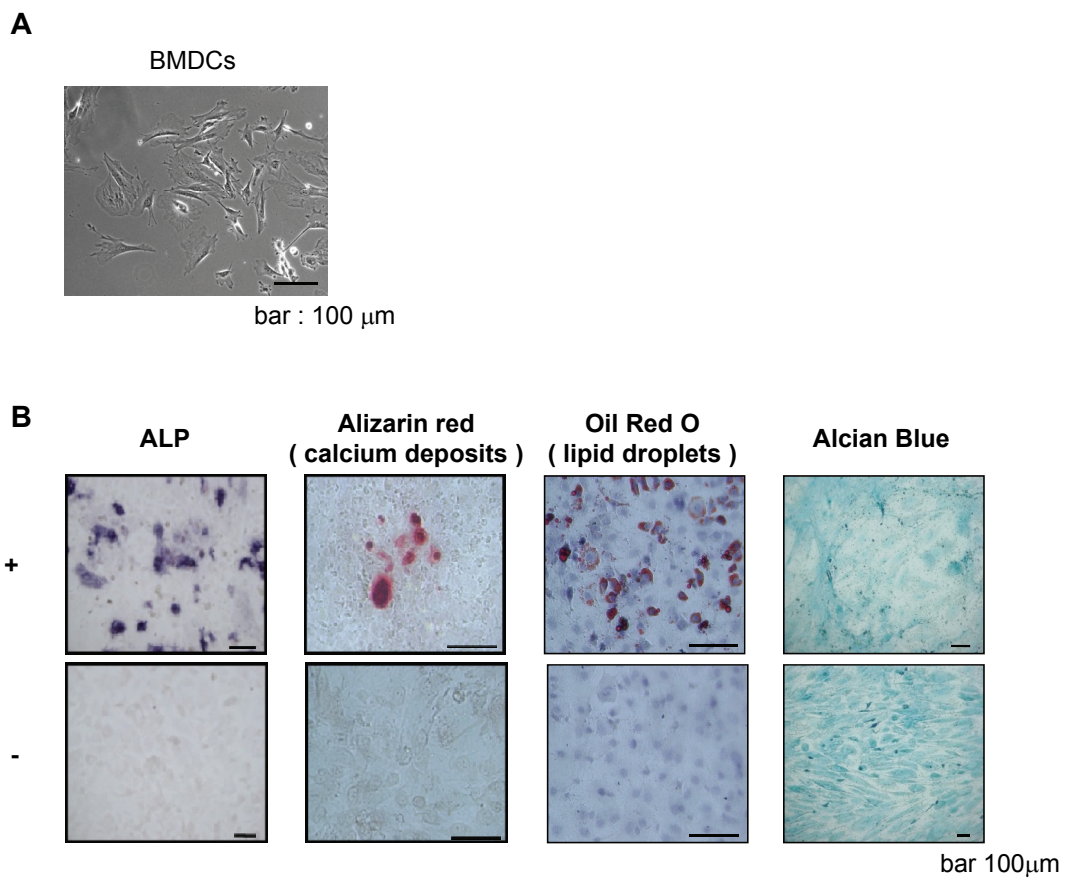


図19. マウスの骨髄より骨髄由来細胞(BMDCs)を単離、培養した。

(A) C57BL/6 マウスの骨髄より骨髄由来細胞(BMDCs)を単離した。図には4回継代後の細胞の写真を示す。(B) 単離した細胞の分化能を調べるために骨分化、脂肪分化、軟骨分化を行った。分化の確認のため骨分化; ALP染色とアリザリンレッド染色、脂肪分化; Oil red O染色、軟骨分化; アルシアンブルー染色を行いそれぞれ確認した。分化誘導かけたものを上段に、かけていないものを下段に示す。

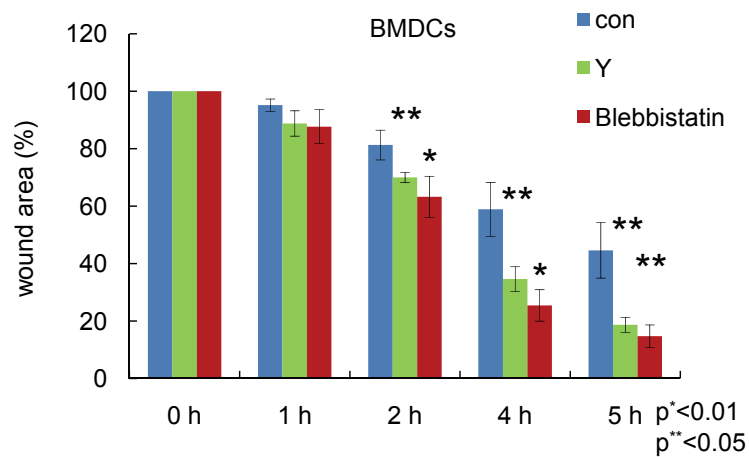


図20. Rho-ROCK-myosinシグナリングの抑制は未分化な間葉系細胞の細胞運動を促進する。

単離した細胞にY-27632 (10 μM)、blebbistatin (10 μM) 処理を行い、wound healing assayを行った(n = 4)。* P < 0.01 versus control ** P < 0.05 versus control。

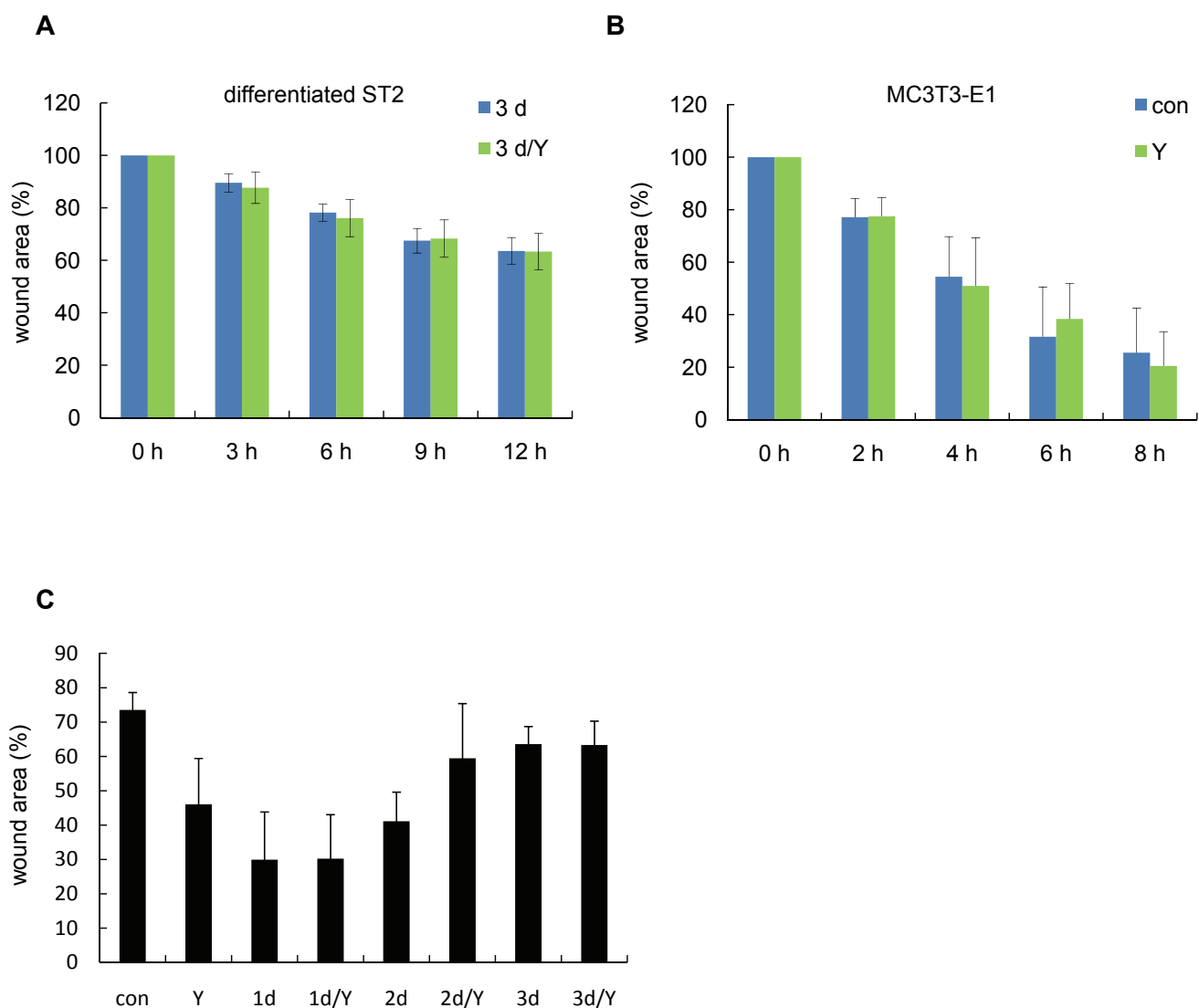
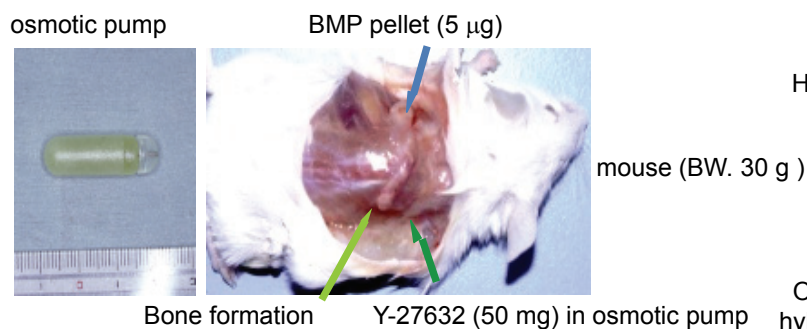


図21. Rho-ROCK-myosinシグナリングの抑制は分化した細胞の細胞運動は促進しない。

(A)骨分化させたST2細胞(3 d)にY-27632 (10 μ M)を処理し、wound healing assayを行い細胞運動を調べた(n = 6)。(B)骨芽細胞株MC3T3-E1にY-27632を処理し、細胞運動を調べた(n = 8)。(C)分化段階の違う細胞(0 d – 3 d)の細胞にY-27632を処理し、wound healing assayによって細胞運動を調べた。グラフにはwound healing assay開始12時間後のwound areaを計測したものを示した(n > 3)。

A



B

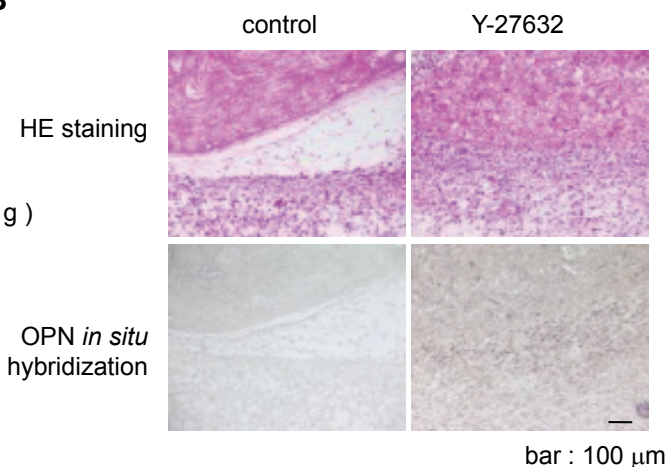
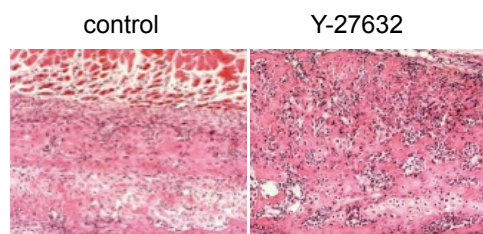


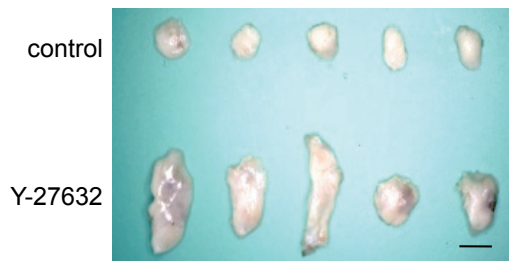
図22. マウス異所性骨形成モデルにおいてY-27632処理は未分化な細胞の骨形成部位への動員を促進する。

(A) rhBMP-2-collagen1 compositeをマウスの広背筋筋膜下に移植し、異所性骨形成を行った。Y-27632はosmotic pumpによって供給した。(B) 移植4日後にrhBMP-2-collagen1 compositeを取り出し、HE染色を行った(上段)。OPNの発現を*in situ*ハイブリダイゼーションにより検出した(下段)。

A



B



C

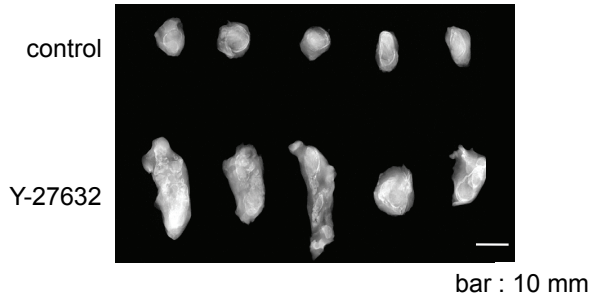


図23. 未分化な細胞の運動促進はマウス異所性骨形成を増強する。

rhBMP-2-collagen1 compositeを移植1ヵ月後に取り出し、骨形成を調べた。(A) rhBMP-2-collagen1 composite切片。(B) rhBMP-2-collagen1 compositeの写真、(C) rhBMP-2-collagen1 compositeのレントゲン撮影(上段、コントロール; 下段、Y-27632供給マウス)。

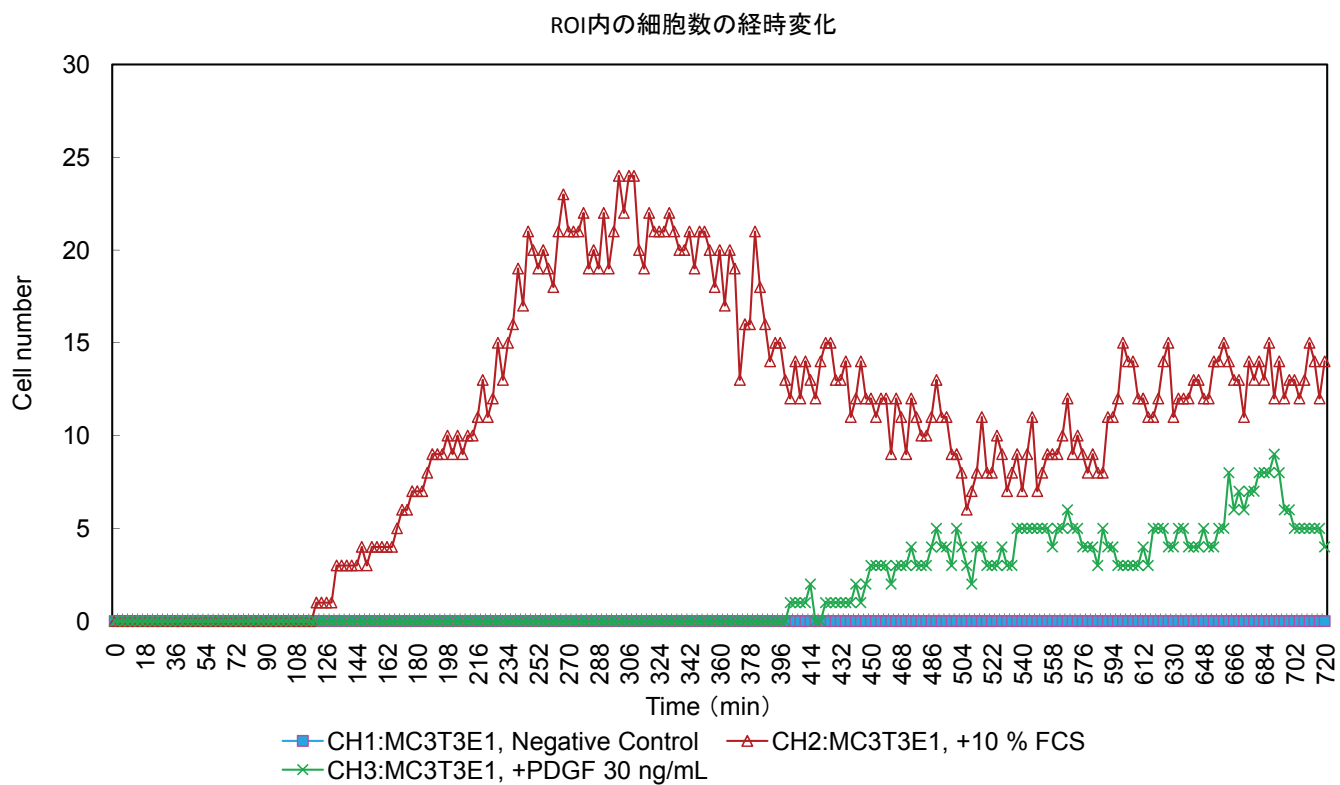


図24. 骨芽細胞株MC3T3-E1は血清、PDGFによって運動が促進される。

MC3T3-E1細胞を用いて血清、PDGFに対する走化性をEZ-TAXIScanを用いて計測した。計測は特定の領域(ROI)内を通過した細胞数を時間をおって数えた。

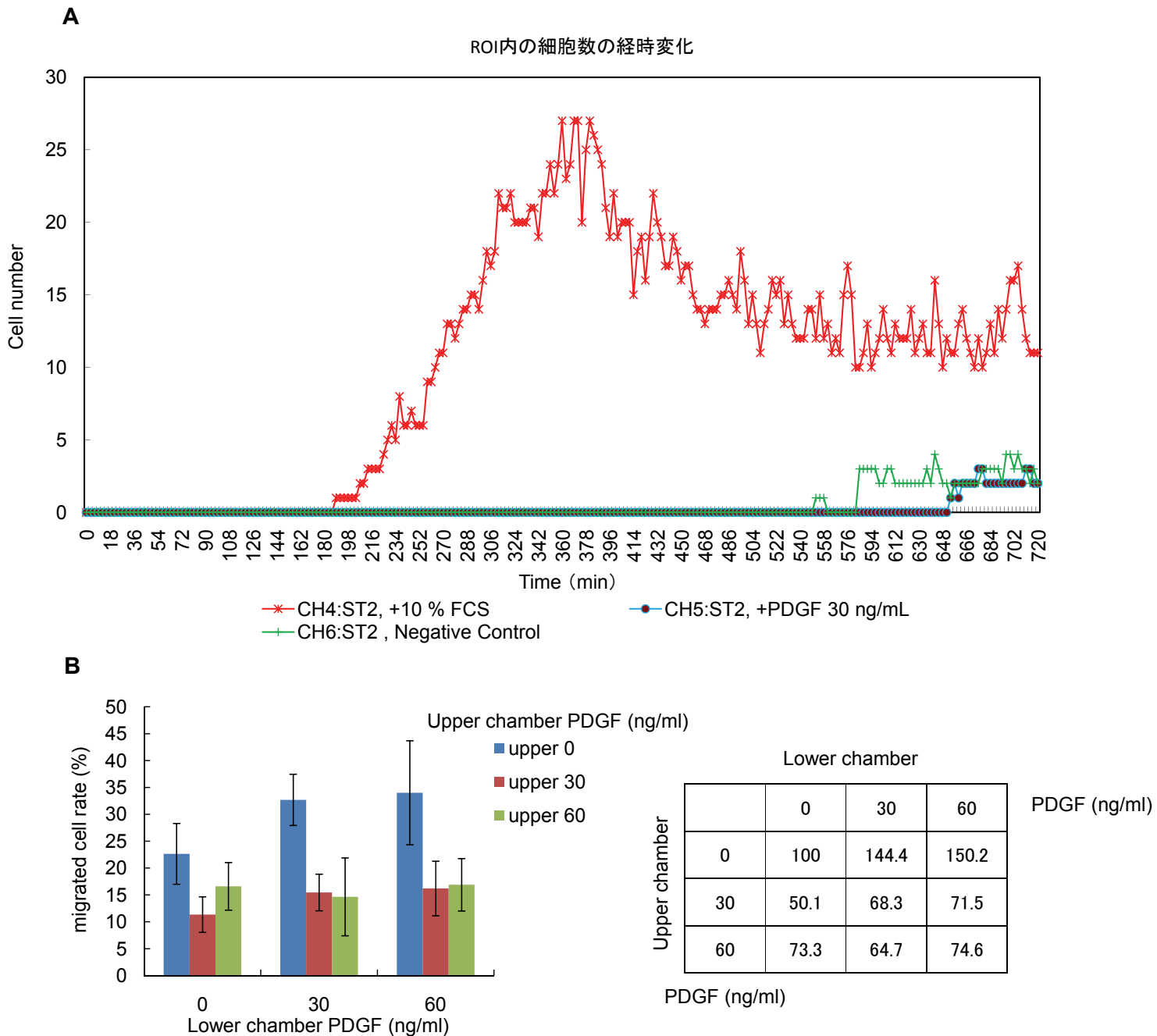


図25. ST2細胞はPDGFに対する走化性をもたない。

(A) ST2細胞を用いて血清、PDGFに対する走化性をEZ-TAXIScanを用いて計測した。計測は特定の領域(ROI)内を通過した細胞数を時間をおって数えた。(B) boyden chamber assayを用いてST2細胞のPDGFに対する走化性を調べた。chamberの上層と下層に表に示した量のPDGFを加え、運動した細胞の数を数えた。

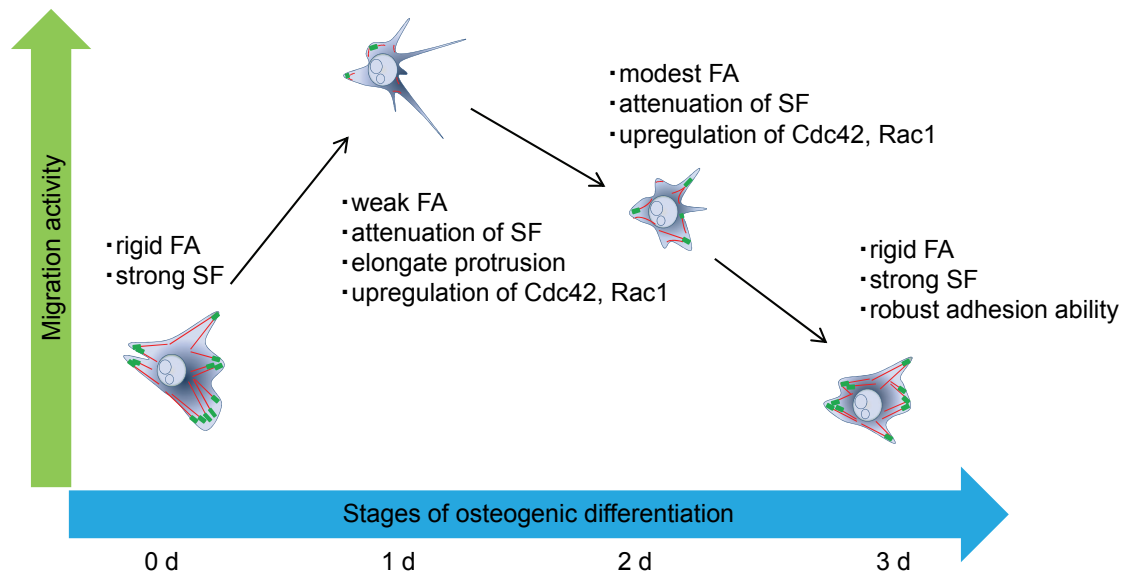


図26. 未分化な間葉系細胞の骨分化に伴う細胞運動の変化について考えられる仮説モデル。

未分化な間葉系細胞の細胞運動は骨分化初期段階に一時的に亢進する。その時にはRhoファミリー低分子量GTP結合タンパク質のCdc42、Rac1の活性化が引き起こされ、細胞突起や細胞膜のラフリング形成が特徴であるmesenchymal modeによる運動が促進される。また、さらに骨分化が進み、骨分化後期段階になると接着能が亢進し、細胞の運動は減少する。

6. 謝辞

本論文は筆者が奈良先端科学大学院大学バイオサイエンス研究科博士後期課程に在籍中の研究成果をまとめたものである。同校教授川市正史先生並びに、大阪府立成人病センター研究所所長加藤菊也先生には指導教官として本研究の実施の機会を与えて頂き、ここに深謝の意を表します。同校教授塩坂貞夫先生、伊東広先生、河野憲二先生には副査としてご助言を戴くとともに本論文の細部にわたりご指導を戴きました。ここに深謝の意を表します。

終始実験のご指導、ご鞭撻を頂いた伊藤和幸先生(大阪府立成人病センター研究所 生物学部門長)、吉岡潔子博士(大阪府立成人病センター研究所 生物学部門)に心より御礼申し上げます。由井理洋博士(大阪府立成人病センター研究所 生物学部門、現University of California, San Francisco)には生化学実験をご協力頂きました、感謝いたします。吉川秀樹教授(大阪大学大学院医学系研究科 器官制御外科学講座)、中瀬尚長博士(星ヶ丘厚生年金病院 整形外科)には動物実験をご協力して頂きました。心より感謝いたします。GE ヘルスケア・ジャパン株式会社湯川博士には細胞運動の実験をご協力して頂きました。深く感謝いたします。

田中太晶先生(大阪大学大学院医学系研究科 器官制御外科学講座)、若松透先生(大阪大学大学院医学系研究科 器官制御外科学講座)、笹川寛博士(大阪府立成人病センター研究所 生物学部門)、竹中聡博士(大阪大学大学院医学系研究科 器官制御外科学講座)、中崎学人博士(大阪府立成人病センター研究所 生物学部門、現University of California, San Diego)、島谷尚子さん(大阪府立成人病センター研究所 生物学部門)には研究遂行にあたり日頃より有益なご討論ご助言を頂きました。ここに感謝の意を表します。

7. 参考文献

- [1] Einhorn TA (1998) The cell and molecular biology of fracture healing. *Clin Orthop. Relat. Res.* **355**, Suppl:S7-21.
- [2] Cho TJ, Gerstenfeld LC and Einhorn TA (2002) Differential temporal expression of members of the transforming growth factor beta superfamily during murine fracture healing. *J. Bone Miner. Res.* **17**, 513-520
- [3] Gerstenfeld LC, Cullinane DM, Barnes GL, Graves DT and Einhorn TA (2003) Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. *J. Cell. Biochem.* **88**, 873-884
- [4] Ferguson C, Alpern E, Miclau T and Helms JA (1999) Does adult fracture repair recapitulate embryonic skeletal formation? *Mech. Dev.* **87**, 57-66
- [5] Aspenberg P (2005) Drugs and fracture repair. *Acta Orthop.* **76**, 741-748
- [6] Gerstenfeld LC, Cullinane DM, Barnes GL, Graves DT and Einhorn TA (2003) Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. *J. Cell Biochem.* **88**, 873-884
- [7] Perren SM (2002) Evolution of the internal fixation of long bone fractures. The scientific basis of biological internal fixation: choosing a new balance between stability and biology. *J. Bone Joint Surg. Br.* **84**, 1093-1110
- [8] Schindeler A, McDonald MM, Bokko P and Little DG (2008) Bone remodeling during fracture repair: The cellular picture. *Semin. Cell Dev. Biol.* **19**, 459-466
- [9] Turner CH (1998) Three rules for bone adaptation to mechanical stimuli. *Bone* **23**, 399-407
- [10] Hernigou P, Poignard A, Beaujean F and Rouard H (2005) Percutaneous autologous bone-marrow grafting for nonunions. Influence of the number and concentration of progenitor cells. *J. Bone Joint Surg. Am.* **87**, 1430-1437
- [11] Jager M, Herten M, Fochtmann U, Fischer J, Hernigou P, Zilkens C, Hendrich C and Krauspe R (2011) Bridging the gap: bone marrow aspiration concentrate reduces autologous bone grafting in osseous defects. *J. Orthop. Res.* **29**, 173-180
- [12] Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI and Frolova GP (1968) Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and

- hematopoietic tissues. *Transplantation* **6**, 230-247
- [13] Prockop DJ (1997) Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* **276**, 71-74
 - [14] Caplan AI (1991) Mesenchymal stem cells. *J. Orthop. Res.* **9**, 641-650
 - [15] Friedenstein AJ, Chailakhyan RK and Gerasimov UV (1987) Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers. *Cell Tissue Kinet.* **20**, 263-272
 - [16] Ashton BA, Allen TD, Howlett CR, Eaglesom CC, Hattori A and Owen M (1980) Formation of bone and cartilage by marrow stromal cells in diffusion chambers in vivo. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **151**, 294-307.
 - [17] Haynesworth SE, Goshima J, Goldberg VM and Caplan AI (1992) Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow. *Bone* **13**, 81-88
 - [18] Johnstone B, Hering TM, Caplan AI, Goldberg VM and Yoo JU (1998) In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp. Cell Res.* **238**, 265-272
 - [19] Bergman RJ, Gazit D, Kahn AJ, Gruber H, McDougall S and Hahn TJ (1996) Age-related changes in osteogenic stem cells in mice. *J. Bone Miner. Res.* **11**, 568-577
 - [20] Cui Q, Wang GJ and Balian G (1997) Steroid-induced adipogenesis in a pluripotential cell line from bone marrow. *J. Bone Joint Surg. Am.* **79**, 1054-1063
 - [21] Wakitani S, Saito T and Caplan AI (1995) Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle Nerve* **18**, 1417-1426
 - [22] Cassiede P, Dennis JE, Ma F and Caplan AI (1996) Osteochondrogenic potential of marrow mesenchymal progenitor cells exposed to TGF-beta 1 or PDGF-BB as assayed in vivo and in vitro. *J. Bone Miner. Res.* **11**, 1264-1273
 - [23] Grigoriadis AE, Heersche JN and Aubin JE (1988) Differentiation of muscle, fat, cartilage, and bone from progenitor cells present in a bone-derived clonal cell population: effect of dexamethasone. *J. Cell Biol.* **106**, 2139-2151
 - [24] Leboy PS, Beresford JN, Devlin C and Owen ME (1991) Dexamethasone induction of osteoblast mRNAs in rat marrow stromal cell cultures. *J. Cell.*

Physiol. **146**, 370-378

- [25] Bellows CG and Aubin JE (1989) Determination of numbers of osteoprogenitors present in isolated fetal rat calvaria cells in vitro. *Dev. Biol.* **133**, 8-13
- [26] Young RG, Butler DL, Weber W, Caplan AI, Gordon SL and Fink DJ (1998) Use of mesenchymal stem cells in a collagen matrix for Achilles tendon repair. *J. Orthop. Res.* **16**, 406-413
- [27] Wakitani S, Goto T, Pineda SJ, Young RG, Mansour JM, Caplan AI and Goldberg VM (1994) Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. *J. Bone Joint Surg. Am.* **76**, 579-592
- [28] Kadiyala S, Young RG, Thiede MA and Bruder SP (1997) Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential in vivo and in vitro. *Cell Transplant.* **6**, 125-134
- [29] Bruder SP, Kraus KH, Goldberg VM and Kadiyala S (1998) The effect of implants loaded with autologous mesenchymal stem cells on the healing of canine segmental bone defects. *J. Bone Joint Surg. Am.* **80**, 985-996
- [30] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S and Marshak DR (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* **284**, 143-147
- [31] Haynesworth SE, Baber MA and Caplan AI (1992) Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies. *Bone* **13**, 69-80
- [32] Majumdar MK, Thiede MA, Mosca JD, Moorman M and Gerson SL (1998) Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells. *J. Cell. Physiol.* **176**, 57-66
- [33] Bruder SP, Jaiswal N, Ricalton NS, Mosca JD, Kraus KH and Kadiyala S (1998) Mesenchymal stem cells in osteobiology and applied bone regeneration. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **355**, Suppl:S247-56.
- [34] Iwaki A, Jingushi S, Oda Y, Izumi T, Shida JI, Tsuneyoshi M and Sugioka Y (1997) Localization and quantification of proliferating cells during rat fracture repair: detection of proliferating cell nuclear antigen by immunohistochemistry. *J. Bone Miner. Res.* **12**, 96-102

- [35] Shapiro F (2008) Bone development and its relation to fracture repair. The role of mesenchymal osteoblasts and surface osteoblasts. *Eur. Cells Mater.* **15**, 53-76
- [36] Malizos KN and Papatheodorou LK (2005) The healing potential of the periosteum molecular aspects. *Injury* **36**, Suppl 3:S13-S19
- [38] Baksh D, Song L and Tuan RS (2004) Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J. Cell. Mol. Med.* **8**, 301-316
- [39] Colnot C, Huang S and Helms J (2006) Analyzing the cellular contribution of bone marrow to fracture healing using bone marrow transplantation in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **350**, 557-561
- [40] Eghbali-Fatourehchi GZ, Lamsam J, Fraser D, Nagel D, Riggs BL and Khosla S (2005) Circulating osteoblast-lineage cells in humans. *N. Engl. J. Med.* **352**, 1959-1966
- [41] Rumi MN, Deol GS, Singapuri KP and Pellegrini VD Jr (2005) The origin of osteoprogenitor cells responsible for heterotopic ossification following hip surgery: an animal model in the rabbit. *J. Orthop. Res.* **23**, 34-40
- [42] Pfeilschifter J, Wolf O, Naumann A, Minne HW, Mundy GR and Ziegler R (1990) Chemotactic response of osteoblastlike cells to transforming growth factor beta. *J. Bone Miner. Res.* **5**, 825-830
- [43] Tsukamoto T, Matsui T, Fukase M and Fujita T (1991) Platelet-derived growth factor B chain homodimer enhances chemotaxis and DNA synthesis in normal osteoblast-like cells (MC3T3-E1). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **175**, 745-751
- [44] Panagakos FS (1993) Insulin-like growth factors-I and -II stimulate chemotaxis of osteoblasts isolated from fetal rat calvaria. *Biochimie* **75**, 991-994
- [45] Lind M, Eriksen EF and Bunger C (1996) Bone morphogenetic protein-2 but not bone morphogenetic protein-4 and -6 stimulates chemotactic migration of human osteoblasts, human marrow osteoblasts, and U2-OS cells. *Bone* **18**, 53-57
- [46] Mayr-Wohlfart U, Waltenberger J, Hausser H, Kessler S, Gunther KP, Dehio C, Puhl W and Brenner RE (2002) Vascular endothelial growth factor stimulates

- chemotactic migration of primary human osteoblasts. *Bone* **30**, 472-477
- [47] Nakasaki M, Yoshioka K, Miyamoto Y, Sasaki T, Yoshikawa H and Itoh K (2008) IGF-I secreted by osteoblasts acts as a potent chemotactic factor for osteoblasts. *Bone* **43**, 869-879
- [48] Athanasopoulos AN, Schneider D, Keiper T, Alt V, Pendurthi UR, Liegibel UM, Sommer U, Nawroth PP, Kasperk C and Chavakis T (2007) Vascular endothelial growth factor (VEGF)-induced up-regulation of CCN1 in osteoblasts mediates proangiogenic activities in endothelial cells and promotes fracture healing. *J. Biol. Chem.* **282**, 26746-26753
- [49] Kawahata H, Kikkawa T, Higashibata Y, Sakuma T, Huening M, Sato M, Sugimoto M, Kuriyama K, Terai K, Kitamura Y and Nomura S (2003) Enhanced expression of Runx2/PEBP2alphaA/CBFA1/AML3 during fracture healing. *J. Orthop. Sci.* **8**, 102-108
- [50] Yoshikawa H, Yoshioka K, Nakase T and Itoh K (2009) Stimulation of ectopic bone formation in response to BMP-2 by Rho kinase inhibitor: a pilot study. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **467**, 3087-3095
- [51] Cheng R, Cheng L, Shao MY, Yang H, Wang FM, Hu T and Zhou XD (2010) Roles of lysophosphatidic acid and the Rho-associated kinase pathway in the migration of dental pulp cells. *Exp. Cell Res.* **316**, 1019-1027
- [52] Salhia B, Rutten F, Nakada M, Beaudry C, Berens M, Kwan A and Rutka JT (2005) Inhibition of Rho-kinase affects astrocytoma morphology, motility, and invasion through activation of Rac1. *Cancer Res.* **65**, 8792-8800
- [53] Sumi T, Matsumoto K and Nakamura T (2001) Specific activation of LIM kinase 2 via phosphorylation of threonine 505 by ROCK, a Rho-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* **276**, 670-676
- [54] Kawano Y, Fukata Y, Oshiro N, Amano M, Nakamura T, Ito M, Matsumura F, Inagaki M and Kaibuchi K (1999) Phosphorylation of myosin-binding subunit (MBS) of myosin phosphatase by Rho-kinase in vivo. *J. Cell Biol.* **147**, 1023-1038
- [55] Mitchison TJ and Cramer LP (1996) Actin-based cell motility and cell locomotion. *Cell* **84**, 371-379
- [56] Nobes CD and Hall A (1999) Rho GTPases control polarity, protrusion, and adhesion during cell movement. *J. Cell Biol.* **144**, 1235-1244

- [57] Yui Y, Itoh K, Yoshioka K, Naka N, Watanabe M, Hiraumi Y, Matsubara H, Watanabe K, Sano K, Nakahata T and Adachi S (2010) Mesenchymal mode of migration participates in pulmonary metastasis of mouse osteosarcoma LM8. *Clin. Exp. Metastasis* **27**, 619-630
- [58] Tian YS, Kim HJ and Kim HM (2009) Rho-associated kinase (ROCK) inhibition reverses low cell activity on hydrophobic surfaces. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **386**, 499-503
- [59] Zhang X, Li C, Gao H, Nabeka H, Shimokawa T, Wakisaka H, Matsuda S and Kobayashi N (2011) Rho kinase inhibitors stimulate the migration of human cultured osteoblastic cells by regulating actomyosin activity. *Cell. Mol. Biol. Lett.* **16**, 279-295
- [60] Etienne Manneville S and Hall A (2002) Rho GTPases in cell biology. *Nature* **420**, 629-35
- [61] Narumiya S and Yasuda S (2006) Rho GTPases in animal cell mitosis. *Curr. Opin. Cell Biol.* **18**, 199-205
- [62] Ishizaki T, Morishima Y, Okamoto M, Furuyashiki T, Kato T and Narumiya S (2001) Coordination of microtubules and the actin cytoskeleton by the Rho effector mDia1. *Nat. Cell Biol.* **3**, 8-14
- [63] Maekawa M, Ishizaki T, Boku S, Watanabe N, Fujita A, Iwamatsu A, Obinata T, Ohashi K, Mizuno K and Narumiya S (1999) Signaling from Rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase. *Science* **285**, 895-898
- [64] Itoh K, Yoshioka K, Akedo H, Uehata M, Ishizaki T and Narumiya S (1999) An essential part for Rho-associated kinase in the transcellular invasion of tumor cells. *Nat. Med.* **5**, 221-225
- [65] Jaffe AB and Hall A (2005) Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **21**, 247-269
- [66] Friedl P and Wolf K (2010) Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model. *J. Cell Biol.* **188**, 11-19
- [67] Ilina O and Friedl P (2009) Mechanisms of collective cell migration at a glance. *J. Cell Sci.* **122**, 3203-3208
- [68] Pinner S and Sahai E (2008) PDK1 regulates cancer cell motility by antagonising inhibition of ROCK1 by RhoE. *Nat. Cell Biol.* **10**, 127-137

- [69] Higuchi C, Myoui A, Hashimoto N, Kuriyama K, Yoshioka K, Yoshikawa H, and Itoh K (2002) Continuous inhibition of MAPK signaling promotes the early osteoblastic differentiation and mineralization of the extracellular matrix. *J. Bone Miner. Res.* **17**, 1785-1794
- [70] Sotobori T, Ueda T, Myoui A, Yoshioka K, Nakasaki M, Yoshikawa H, and Itoh K (2006) Bone morphogenetic protein-2 promotes the haptotactic migration of murine osteoblastic and osteosarcoma cells by enhancing incorporation of integrin beta1 into lipid rafts. *Exp. Cell Res.* **312**, 3927-3938
- [71] Takenaka S, Naka N, Araki N, Hashimoto N, Ueda T, Yoshioka K, Yoshikawa H, and Itoh K (2010) Downregulation of SS18-SSX1 expression in synovial sarcoma by small interfering RNA enhances the focal adhesion pathway and inhibits anchorage-independent growth in vitro and tumor growth in vivo. *Int. J. Oncol.* **36**, 823-831
- [72] Tsuchiya H, Kitoh H, Sugiura F, and Ishiguro N (2003) Chondrogenesis enhanced by overexpression of sox9 gene in mouse bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **301**, 338-343
- [73] Hirota S, Takaoka K, Hashimoto J, Nakase T, Takemura T, Morii E, Fukuyama A, Morihana K, Kitamura Y, and Nomura S (1994) Expression of mRNA of murine bone-related proteins in ectopic bone induced by murine bone morphogenetic protein-4. *Cell Tissue Res.* **277**, 27-32
- [74] Nakase T, Nomura S, Yoshikawa H, Hashimoto J, Hirota S, Kitamura Y, Oikawa S, Ono K, and Takaoka K (1994) Transient and localized expression of bone morphogenetic protein 4 messenger RNA during fracture healing. *J. Bone Miner. Res.* **9**, 651-659
- [75] Nishikawa S and Osawa M (2007) Generating quiescent stem cells. *Pigment Cell Res.* **20**, 263-270
- [76] Takahashi K and Yamanaka S (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126**, 663-676
- [77] Riekstina U, Cakstina I, Parfejevs V, Hoogduijn M, Jankovskis G, Muiznieks I, Muceniece R and Ancans J (2009) Embryonic stem cell marker expression pattern in human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, adipose

- tissue, heart and dermis. *Stem Cell Rev.* **5**, 378-386
- [78] Friedl P (2004) Prespecification and plasticity: shifting mechanisms of cell migration. *Curr. Opin. Cell Biol.* **16**, 14-23
- [79] Naka N, Takenaka S, Araki N, Miwa T, Hashimoto N, Yoshioka K, Joyama S, Hamada K, Tsukamoto Y, Tomita Y, Ueda T, Yoshikawa H and Itoh K (2010) Synovial sarcoma is a stem cell malignancy. *Stem Cells* **28**, 1119-1131

参考図書

鳥巢岳彦、国分正一、中村利孝、松野丈夫、内田淳正 編 「標準整形外科学 第 9 版」 (医学書院) (2005)

Clifford J. Rosen, Juliet E. Compson, and Jane B. Lian 編 「Primer on the Metabolic Bone Disease and Disorders of Mineral Metabolism, seventh edition」 (American Society for Bone and Mineral Research) (2008)

Darwin J. Prockop, Donald G. Phinney, and Bruce A. Bunnell 編 「Mesenchymal Stem Cells *Methods and Protocols*」 (Humana Press) (2008)