

# 骨髓機能に着目した大腿骨近位部骨折の予防戦略

東北大学 大学院医学系研究科 分子代謝生理学分野

日本学術振興会 特別研究員 PD

荒井 誠

## 目的

本研究では骨の内部にある骨髓に着目し、骨髓の機能が骨脆弱性にどのような影響を与えているかを検討することを目的とした。

## 結果

大腿骨近位部骨折や変形性股関節症のために股関節の手術を受ける患者（女性）を対象とした。

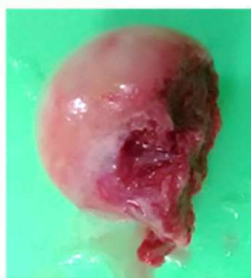
患者および家族に研究の説明を行い同意を得た上で、手術の際に摘出される大腿骨頭を用いて、骨髓の間葉系幹細胞の初代培養を行った。

なお、本研究は当該機関における倫理審査委員会の承認を事前に受けている。

実験の一例を以下に記す。

次図は摘出された大腿骨頭である。

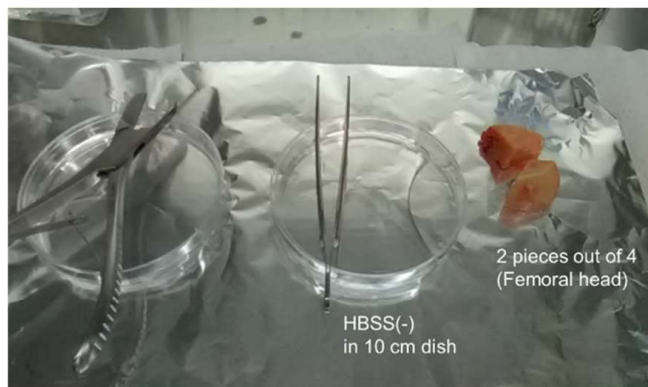
Femoral head



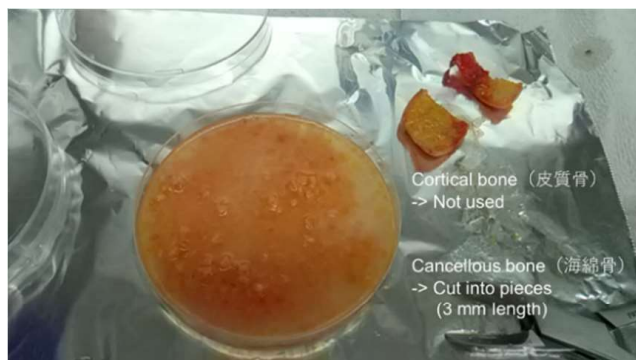
大腿骨頭の中央付近の断面を出し、分割した。



4分割したうちの2個を細胞の採取に用いた。



海綿骨の部分を骨切りばさみで切り刻んで小片とした。



切り刻まれた海綿骨の小片を一定量使用した。Collagenase DとDispase IIによる酵素処理を繰り返して、骨の表層の細胞を単離した。

なお、次図の右端に酵素処理後に残った骨片を参考として示している。初代培養で使用するのは酵素処理によって得られた細胞懸濁液であり、次図右端の骨片は細胞懸濁液を回収した後に残ったものである。

Bone pieces -> Enzymatic digestion -> Cell collection



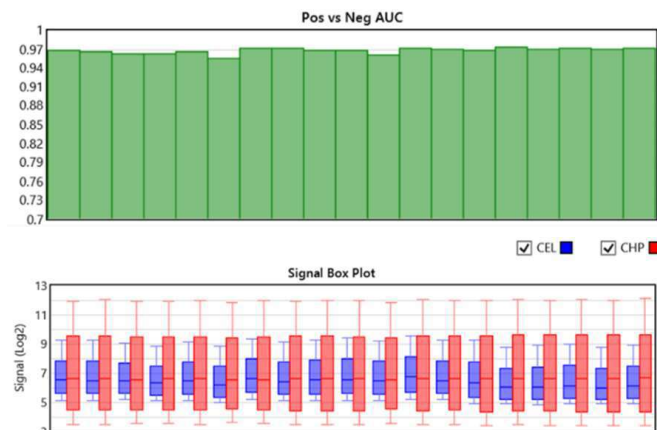
細胞懸濁液を更に溶血処理や洗浄を行った後に Fibronectin でコーティングしたディッシュ上に播種し、間葉系幹細胞培養用の培地で培養した。コンフルエントにならないように 1-2 回継代し、一定数の細胞を 35 mm ディッシュ複数枚に播種した。一部は分化誘導をかけずにそれまでの培地と同じ培地で培地交換を行いながら培養し、一部は骨分化誘導培地を用いて分化誘導をかけた。

分化誘導を開始する・しないを分ける時点を起点として、その後 7 日ほど培養した後に ISOGEN で回収し、RNA を抽出した。

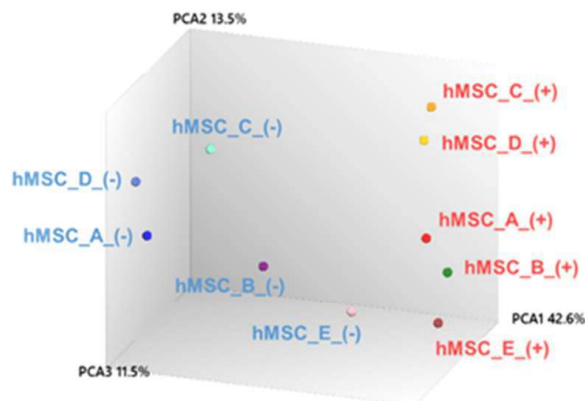
得られた RNA を用いてマイクロアレイ用のプローブを作成し、Clariom S array (Affymetrix) チップを用いてマイクロアレイ解析を行った。

次図はマイクロアレイの各種パラメーターであり、マイクロアレイ解析そのものが問題

なく行われたことを示している。

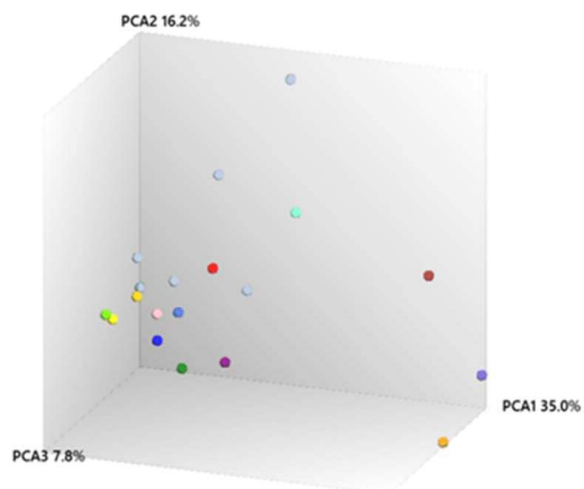


次図は、マイクロアレイ解析の結果得られた遺伝子発現情報を基にした主成分分析の結果である。これは 5 人の患者 (A, B, C, D, E) 由来のサンプルである。(-) は骨分化誘導なし、(+) は骨分化誘導ありを示す。全体としては PCA1 軸に沿って骨分化誘導の有無が大きな差となっていた。一方、骨分化誘導なしの (-) のサンプルだけで見ると、サンプルによって遺伝子発現に特定のパターンがあることが示唆された。



そこで、骨分化誘導なしのサンプルに注目することとし、他の患者に関しても同様に間葉系幹細胞の初代培養を行い、RNA を得た。そして、上記 5 人も含めて合計 19 人の患者から得た間葉系幹細胞の遺伝子発現パターンを示す主成分分析の結果が次図である。この図では各点が各患者由来のサンプルを表

しており、いずれのサンプルも骨分化誘導なしの条件で得られたものである。



なお、初代培養の結果得られた細胞がたしかに間葉系幹細胞であることは、フローサイトメトリーを用いて確認済みである。

### 今後の予定

上記の各患者に関しては、年齢、手術に至った病名（骨折もしくは変形性股関節症）、骨密度、併存疾患、内服薬など様々な臨床情報も同時に取得している。今後はそれらの臨床情報を遺伝子発現データと統合することで両者の関連を探索する予定である。