

Vol.19 No.1

Dec 2010



— 卷頭論文 —

STR/OrtCrlj マウスの病態とその評価
マウス臍帯血移植モデル

日本チャールス・リバー株式会社

STR/OrtCrlj マウスの病態とその評価

内田健太郎¹、占部 憲¹、成瀬康治¹、高相晶士¹、糸満盛憲²

北里大学医学部整形外科学¹

九州労災病院²

1. はじめに

STR/IN は、高脂血症を示す STR/N (F29) よりまだら模様で膝関節変形を呈する個体として分離された。STR/Ort は STR/IN より派生した 1 系統であり[1]、欧米を中心に変形性膝関節症の基礎研究に用いられている。本稿においては、米国チャールス・リバー社（ボストン）で SFP 化された後、日本チャールス・リバー株式会社（神奈川県）から STR/OrtCrlj として 2005 年から 2008 年 12 月まで販売された。我々は、様々な側面から STR/OrtCrlj の病態について検討を行ってきた。本稿では変形性膝関節症、高脂血症の二つの側面から検討した結果得られた STR/OrtCrlj に関する知見と我々が行ってきた評価法を述べることにする。結果の詳細については文献を参照してほしい[2;3]。

2. 変形性膝関節症自然発症マウスとしての STR/OrtCrlj

STR/Ort は加齢とともに膝関節の変形性変化が進行する変形性膝関節症自然発症モデルマウスとして基礎研究に用いられている。これまでにいくつかの膝関節の変形性変化所見が報告されているが、それらの所見はいずれも個体差や左右差が存在する。我々は、これまでに報告されている STR/Ort の所見との比較検討を行うとともに、個体差や左右差の少ない所見について検討した。本稿では評価法を中心に述べることにする。結果の詳細については文献[2;3]を参照してほしい。

2-1. 軟 X 線を用いた STR/OrtCrlj 膝関節の形態学的検討

15,25,35,45 週齢 雌雄の STR/OrtCrlj の軟 X 線を撮影した。軟 X 線による評価では、大腿骨内顆と外顆が完全に重なる側面像を用いることが極めて重要である。軟 X 線装置は、Softex 社（東京）製 Type-CMB₄ を用いた。撮影条件は、管球からの距離 40cm, 電圧 25kV, 電流 10mA, 焦点 R, 照射時間 10 秒とした。臨床で用いられる膝 OA の X 線分類である Kellren & Lawrence 分類及び腰野分類を参考に評価した。評価項目を表 1 に、各評価項目に対応する X 線像を図 1 に示した[2]。軟 X 線上の異常所見 35 週齢以上の雄 STR/OrtCrlj で陽性率が高かったが、非発症齢、左右差を認めた[2]。45 週齢 雌 STR/OrtCrlj の膝関節に異常所見は認められなかった。これらの結果はこれまでの報告と一致するものであった。

表1. 軟X線による評価項目

1. 関節裂隙の狭小化
関節裂隙が一部または全部消失している
2. 軟骨下骨の変化
硬化、不整または海綿骨梁の不鮮明化
3. 骨棘形成
4. 膝関節周囲の石灰化
膝蓋腱、膝蓋下部、膝窩部
5. 膝蓋骨の形態変化
菲薄化、骨折、断片化
6. 脱臼・偏位

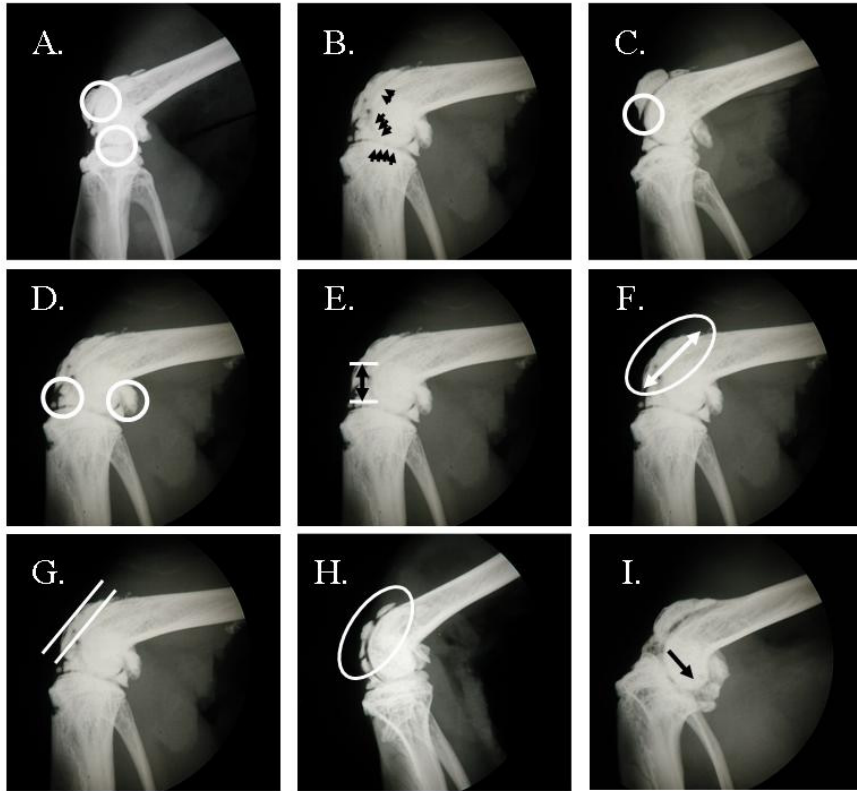


図 1. 35 週齢 雄 STR/OrtCr1j の軟 X 線像における異常所見

- A. 関節裂隙の狭小化
- B. 軟骨下骨の骨化像
- C. 骨棘形成
- D. 関節周囲の石灰化
- E. 膝蓋腱の石灰化
- F. 膝蓋骨横径の増大化
- G. 膝蓋骨厚みの菲薄化
- H. 膝蓋骨の骨折・断片化
- I. 大腿脛骨関節の脱臼・偏位

2-2. STR/OrtCrlj 膝関節の組織学的検討

ICR マウス、CBA/JN マウスをコントロールとして 5, 10, 15, 20, 26, 35, 45 週齢 STR/OrtCrlj 膝関節の組織学的検討を行った。後肢を採取後、4% パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液 (Wako) にて 48 時間固定後、20% EDTA 溶液で 2-3 週間脱灰を行った。パラフィン包埋後、矢状断面、水平断面での薄切切片を作成した。切片の厚さは 3 μ m とした。ヘマトキシリン、エオジン染色、サフラニン-O 染色を行った後、Mankin histological-histochemical grading (表 2) を用いて評価した[2]。

2-2-1. 矢状断面組織像を用いた評価

STR/Ort を用いた論文の多くは、矢状断面組織像を用いて評価している。そこで、まず初めに矢状断面での評価を行った。矢状断面を用いた評価では 26 週以降で異常所見陽性率が高くなった。組織学的異常所見は、脛骨側の前十字靭帯附着部の関節軟骨と大腿脛骨関節の内側において早期から認められた。これまでの報告と同様、矢状断面を用いた大腿脛骨関節の組織学的評価では個体差、左右差を認めた[2]。

表2 Mankin histological-histochemical grading

Structure	Normal	0	
	Surface irregularities	1	
	Pannus and surface irregularities	2	
	Clefts to transitional zone	3	
	Clefts to radial zone	4	
	Clefts to calcified zone	5	
Cell	Complete disorganization	6	
	Normal	0	
	Diffuse hypercellularity	1	
	Cloning	2	
Safranin-O staining	Hypocellularity	3	
	Normal	0	
	Slight reduction	1	
	Moderate reduction	2	
Tidemark integrity	Severe reduction	3	
	No dye noted	4	
	Intact	0	
	Crossed by blood vessels	1	計14点

2-2-2. 水平断面組織像を用いた評価

軟X線による評価、矢状断面での組織学的検討では、これまで同様個体差、左右差が認められた。我々は、個体差、左右差の少ない所見について検討を行った。STR/OrtCrlj は加齢に伴って膝蓋骨脱臼の頻度が増加することから、早期に膝蓋大腿関節に組織学的変化が認められる可能性があると考えた。我々は、10週齢 10匹 20

膝、20週齢 12匹 24膝に対水平断面組織像を用いて膝蓋大腿関節の組織学的検討を行った。水平断面での薄切切片の作成法を図2に示した。その結果、大腿骨側の関節軟骨組織の異常所見(図3)が個体差、左右差なく認められることが明らかとなった[2]。

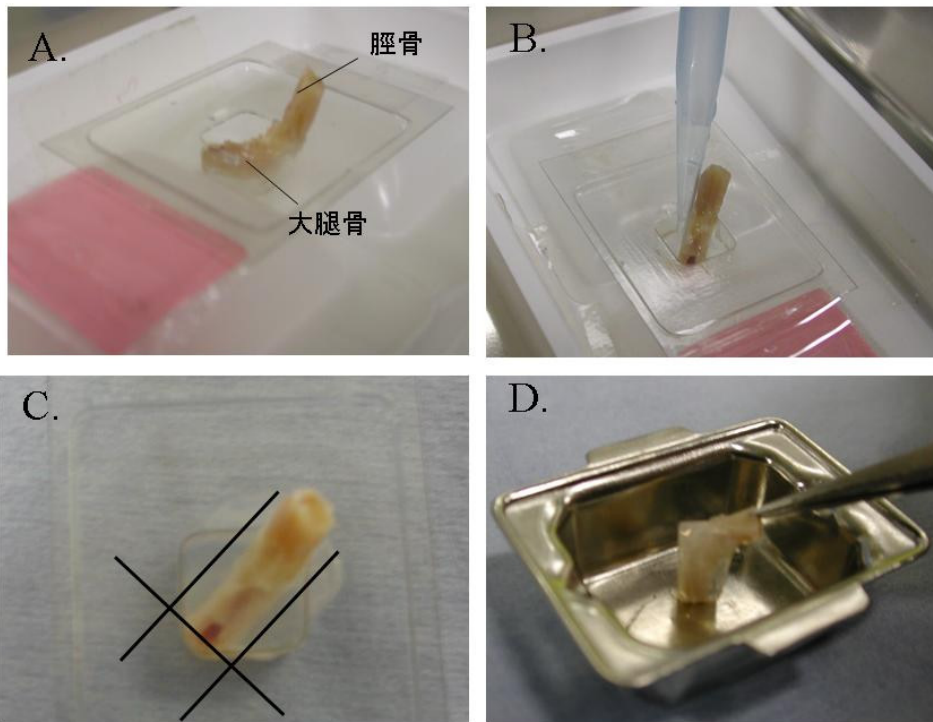


図2. 水平断面での薄切切片の作成法

- 凍結切片用包埋皿をトレイに固定後、大腿骨を包埋皿側にして膝蓋骨が真下になるよう設置する。
- 3%アガロースゲルを包埋皿に流し込む。
- アガロースが固まったら組織を包埋皿からはずし実線にそってカットする。
- 薄切面が膝蓋骨軸と垂直になるよう包埋する。

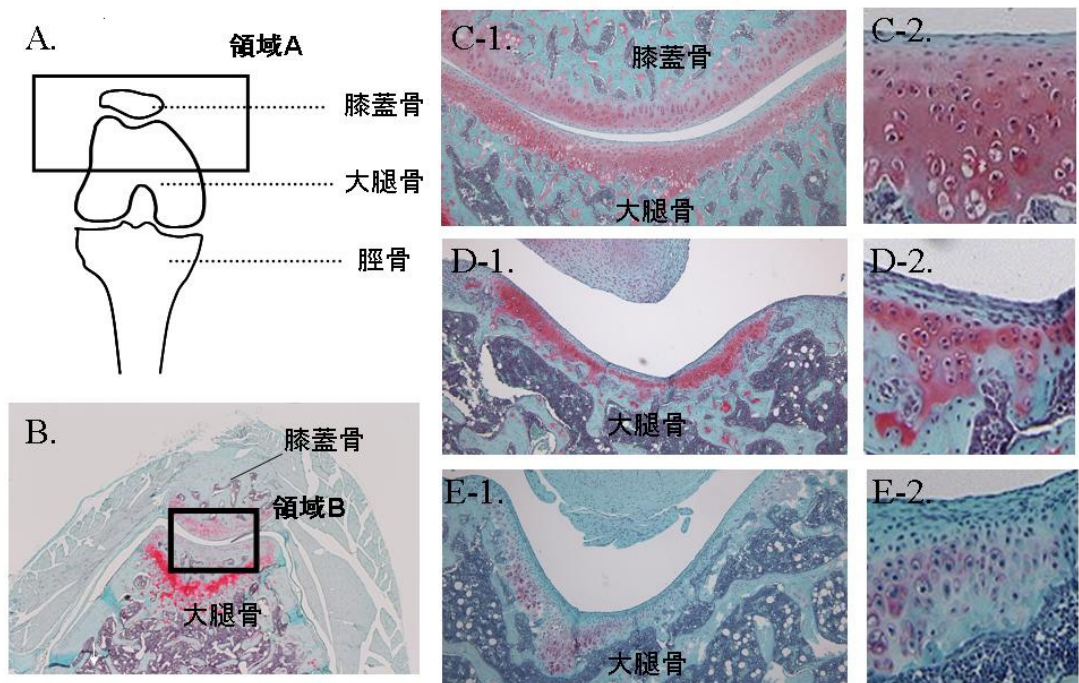


図 3. 水平断面の組織像

- A. 水平断面組織像の模式図
- B. 水平断面組織のサフラニン-O 染色像
- C,D,E. 領域 B の拡大像、
- C-1, -2. 正常な膝蓋大腿関節のサフラニン-O 染色像
- D-1, -2. サフラニン-O 染色性の低下、細胞勾配の異常、細胞密度の増加が認められる
- E-1, -2. サフラニン-O 染色性の著しい低下、細胞勾配の異常、細胞密度の著しい増加が認められる。

(文献[2]より一部抜粋、改変)

3-1. 肥満、高脂血症の観点から観た STR/OrtCrlj の特性

前述の通り STR/OrtCrlj は高脂血症を示す STR/IN より派生した系統である。STR/IN の高脂血症については、1963 年 Yamamoto 等によって報告されているが[4]、STR/Ort に関する報告はなされていない。また、STR/IN, STR/Ort は肥満を呈するとの報告がなされている[5]。我々は、肥満、高脂血症の観点から STR/OrtCrlj の特性を検討した。結果の詳細については文献[3]を参照してほしい。

3-1-1. STR/OrtCrlj における肥満

これまでの STR/Ort の肥満に関する報告は、肥満であるとするものとそうではないとするもの両方が存在する。これまで肥満であるとしているのは、体重を測定したものであり[5]、肥満でないとするものは皮下と腹部の脂肪量を測定したものである[6]。我々は、ICR, CBA, C57BL/6J, BKS.C g -*Dock7^m* + /+ *Lepr^{db}*/J (以下 db/db) マウスとの体重比較を行った。その結果 STR/OrtCrlj の体重は、CBA, C57BL/6J マウスより高値を示したが、ICR や肥満マウスとして知られる db/db より低値を示した[3]。内臓周囲の脂肪重量についても検討したが、過去の報告同様 CBA マウスと同等であった。ヒトにおける肥満は BMI で定義され、近年は内臓脂肪蓄積型肥満も注目されている。マウスにおける肥満の定義は存在しないが、体重の関点から見ても内臓脂肪の蓄積(後述)の観点から見ても、STR/OrtCrlj は少なくとも過度の肥満ではないと言えるだろう。

3-1-2. 総コレステロール、トリグリセリド

1963 年、STR/IN は DBA/2JN, A/LN より血漿コレステロール値が高いことが報告されて以来、著者の知るかぎり、STR/IN の高脂血症に関する報告はなされていない。また、STR/Ort に関する論文報告はなく、学会レベルでの報告に限られている。我々は、STR/OrtCrlj の血清総コレステロール、トリグリセリドを ICR, CBA, C57BL/6J, db/db と比較した。測定にはラボアッセイシリーズ(和光純薬工業(株))を用いた。STR/OrtCrlj は他系統に比べ、コレステロール高値、トリグリセリド高値であることが明らかとなった(図 4A, B) [3]。ヒトの高脂血症は WHO により、総コレステロール、トリグリセリド、リポ蛋白のプロファイルによって定義されているが、肥満と同様、マウスにおける定義は存在しない。今後、STR/OrtCrlj が高脂血症モデルと成り得るかは、リポ蛋白等さらなる詳細な検討が必要と考えられる。

3-1-3. インスリン

インスリン抵抗性や高インスリン血症は、高血圧や高脂血症と密接に関連することが知られている。現在、インスリン抵抗性の実験モデルとしてマウスでは B6.V-*Lep^{ob}*/J (以下 ob/ob) や db/db マウスなどが用いられている。我々は、STR/OrtCrlj が高インスリン血症を示すかを検討した。測定にはマウス・ラットインスリン ELISA キット(株森永生科学研究所製)を用いた。STR/OrtCrlj は C57BL/6J, CBA, ICR に比べ血清インスリン値が高値であったが、db/db マウスに比べると低値であった(図 4D)。STR/OrtCrlj がインスリン抵抗性を示すかについては更なる検討が必要であると考えられる。

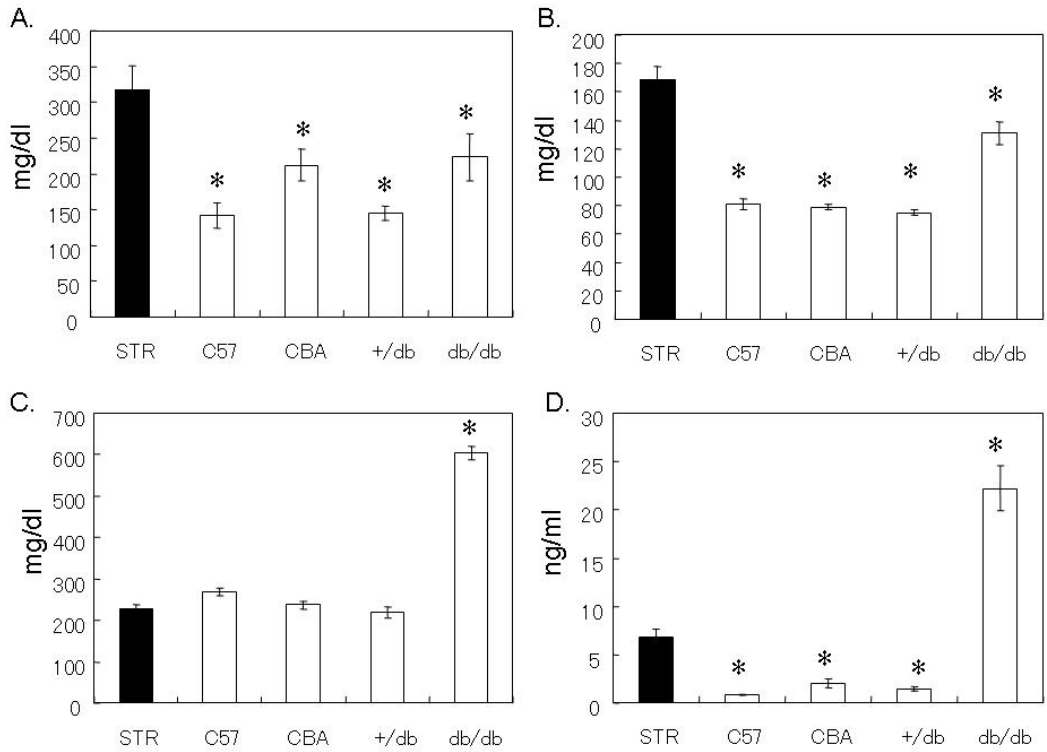


図 4. 10 週齢 STR/OrtCrlj, C57BL/6J, CBA, +/db, db/db マウス血清における生化学的検査値

- A. トリグリセリド
- B. 総コレステロール
- C. グルコース
- D. インスリン の濃度

(文献[3]より一部抜粋、改変)

3-1-4. 肝臓への脂肪沈着

肝臓や筋肉への脂肪沈着は高インスリン血症やインスリン抵抗性を惹起することが知られている。我々は、STR/OrtCrIj の肝臓において脂肪沈着が認められるか否かを検討した。脂質の抽出には Folch 法を用いた。10 週齢 STR/OrtCrIj 雄における肝臓のトリ

グリセリドは C57BL/6J より高値を示したが、CBA, +/db との間に有意な差は認められなかった (図 5)。また、内臓脂肪蓄積が認められる db/db に比べると STR/OrtCrIj 肝臓におけるトリグリセリド量は 1/4 程度であった。

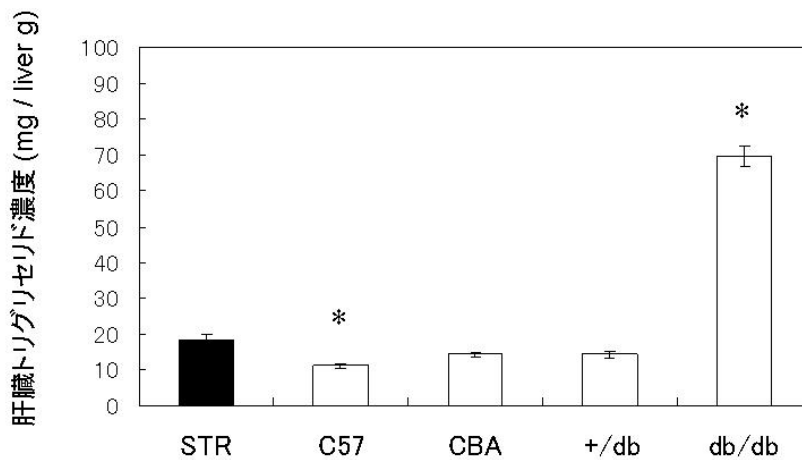


図 5. 肝臓トリグリセリド量

10 週齢 STR/OrtCrIj, C57BL/6J, CBA, +/db, db/db マウスの肝臓におけるトリグリセリド量

(文献[3]より一部抜粋、改変)

3-2-3. アディポネクチン

ヒト、サル、マウスにおいて、血中アディポネクチン濃度は全身のインスリン感受性と強く相関することが明らかとなっている。我々は、STR/OrtCrljにおける血清アディポネクチン濃度をマウス/ラットアディポネクチンELISAキット（大塚製薬(株)製）を用いて測定した。

STR/OrtCrljにおける血清アディポネクチン濃度は、ICR, CBA, C57BL/6J, db/dbに比して低値を示した[3]。STR/OrtCrljにおける高インスリン血症と低アディポネクチンとの関連性については今後更なる検討が必要である。

終わりに

STR/OrtCrljの変形性膝関節症、高脂血症の病態とその評価法について述べた。STR/OrtCrljは変形性膝関節症、高脂血症の病態を持つユニークなマウスである。STR/OrtCrljは2008年12月をもって販売が終了したが、凍結受精卵として保存されており、今後も日本チャールス・リバー(株)より入手可能である。STR/OrtCrljが変形性関節症や高脂血症のモデルとして使用されることを期待している。

参考文献

- (1) Mason RM, Chambers MG, Flannelly J, Gaffen JD, Dudhia J, Bayliss MT: The STR/ort mouse and its use as a model of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2001; 9(2):85-91.
- (2) Naruse K, Urabe K, Jiang SX, Uchida K, Kozai Y, Minehara H, Mikuni-Takagaki Y, Kashima I, Itoman M: Osteoarthritic changes of the patellofemoral joint in STR/OrtCrlj mice are the earliest detectable changes and may be caused by internal tibial torsion. *Connect Tissue Res* 2009; 50(4):243-255.
- (3) Uchida K, Urabe K, Naruse K, Ogawa Z, Mabuchi K, Itoman M: Hyperlipidemia and hyperinsulinemia in the spontaneous osteoarthritis mouse model, STR/Ort. *Exp Anim* 2009; 58(2):181-187.
- (4) YAMAMOTO RS, CRITTENDEN LB, SOKOLOFF L, JAY GE, Jr.: GENETIC VARIATIONS IN PLASMA LIPID CONTENT IN MICE. *J Lipid Res* 1963; 4:413-418.
- (5) SOKOLOFF L, BARILE MF: Obstructive genitourinary disease in male STR/IN mice. *Am J Pathol* 1962; 41:233-246.
- (6) Walton M: Obesity as an aetiological factor in the development of osteoarthrosis. *Gerontology* 1979; 25(1):36-41.

マウス臍帯血移植モデル

内田健太郎¹ 占部 憲¹ 成瀬康治¹ 高相晶士¹ 糸満盛憲²

北里大学医学部整形外科学¹

九州労災病院²

はじめに

臍帯血移植はドナーの負担がない、サイトメガロウイルスをはじめとして感染症伝播の可能性が低い[1]、急性 GVHD (Graft Versus Host Disease 移植片対宿主病) の発症頻度が低い[2,3]などの利点を有することから、造血器悪性腫瘍、骨髄不全症候群、骨髄異形成症候群、先天性代謝性疾患の治療の選択肢の一つとして注目されている。一方で、骨髄移植と比較して生着率が低いことが知られており[4,5]、生着率向上のための基礎研究が数多く行われている。臍帯血移植の基礎研究ではヒト臍帯血由来の造血幹細胞を免疫不全マウスに移植するモデルが多く用いられている[6-9]。このモデルは実際に治療に使用されるヒト臍帯血由来造血幹細胞の特性を知る上で極めて重要なモデルである。近年、遺伝子改変マウスを用いることによって造血幹細胞のホーミングや増殖、分化制御に関与する因子の同定が可能となった。従って、マウス臍帯移植モデルは臍帯血移植の生着率向上のための基礎研究に有用なツールであると考えられる。ここでは我々が用いているマウス臍帯血

移植モデルについて紹介する。

マウス臍帯血移植モデル

マウス臍帯血移植モデルを用いた臍帯由来血造血幹細胞移植の研究は 2003 年 Migishima 等、2007 年 Oikawa 等によって報告されている[10,11]。近年、我々は、このモデルを用いて臍帯血移植後の臍帯血由来間葉系細胞の動態について報告した[12]。ここでは、マウス臍帯血移植モデルの作成手順と移植後のキメラ率測定、臍帯血由来細胞の局在の観察法について述べる。

マウス臍帯血移植モデルの作成手順

(図 1)

GFP トランスジェニックマウス オスと C57BL/6J マウス メスを交配させる。GFP トランスジェニックマウス同士を交配しても良いが母親マウス由来の細胞が混入した場合に胎児由来のものと区別できない。そのため、メスは C57BL/6J を用いた方がよい。胎生 18 日の胎児を取り出し、羊膜を切除する。胎児をへパリン含有 PBS

のに入ったシャーレに移し、実体顕微鏡下で臍帯を切断する。3-5 分後間静置後、シャーレ中の臍帯血を採取する。臍帯血中の有核細胞を分離後、10.5 Gy γ 線照射した C57BL/6J に移植する。有核細胞分離から移植までの時間をできるだけ短くすることが高いキメラ率を得るのに極めて重要である。そのため、1 腹 (6-8 胎児) ずつ臍帯血を採取し、移植することをお勧めする。

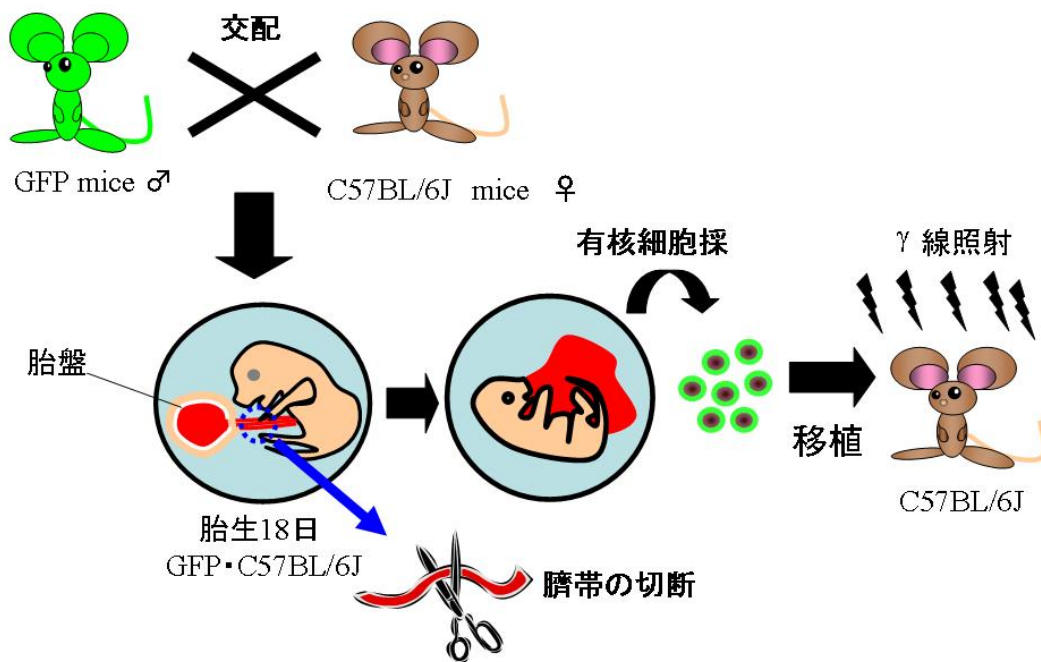


図 1. マウス臍帯血移植モデルの作製手順

移植後のキメラ率測定

移植後、フローサイトメトリーを用いて末梢血中の GFP 陽性細胞の割合を測定する。3-4 胎児分の臍帯血由来の有核細胞を移植すると 3 ヶ月後 80-90% 程度のキメラ率が得られる (図 2A)。また、造血幹細胞の B 細胞、T 細胞など各細胞系統への分化が確認できる (図 2B-D) [10,11]。ホモマウスを用いると GFP の蛍光強度が

強すぎるため、他のマーカーの検出の際に妨げとなる。

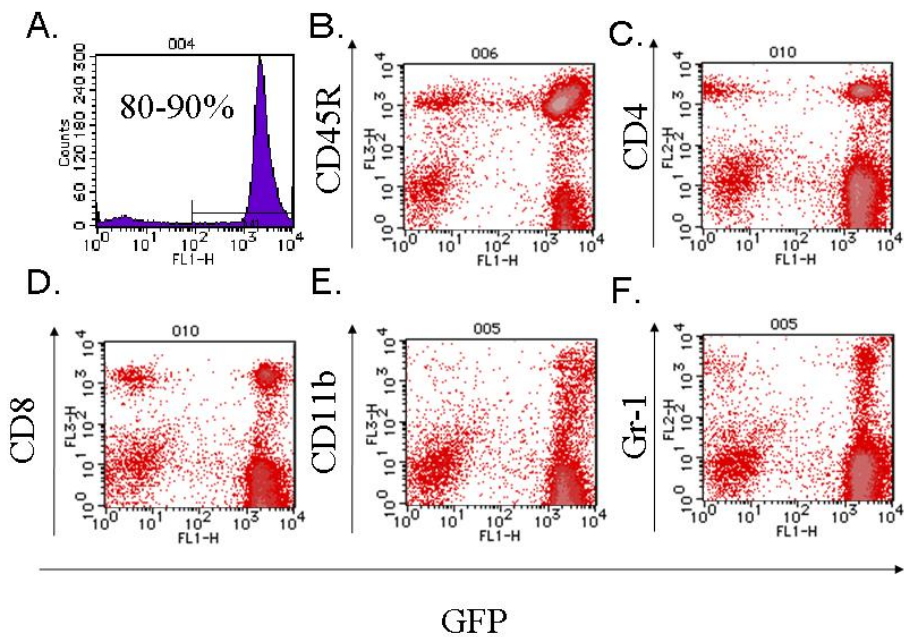


図 2. マウス臍帯血移植後の造血系細胞の再構築

- A.キメラ率
- B.CD45R
- C.CD4
- D.CD8
- E.CD11b
- F. Gr-1

臍帯血由来細胞の局在の観察

4%パラホルムアルデヒド燐酸緩衝液を用いて還流固定を行った後に、組織をカルボキシメチルセルロース（硬組織でなければ OCT コンパウンドでも良い）に包埋すると GFP の蛍光が良く保たれる。浸漬固定の場合でも 4%パラホルムアルデヒド燐酸緩衝液を用いて固定することで

蛍光は保たれる。凍結切片（硬組織の場合は非脱灰凍結切片）の作成により、骨髓やその他の組織のマウス臍帯血由来細胞（GFP 陽性細胞）の局在が観察できる（図 3） [12]。

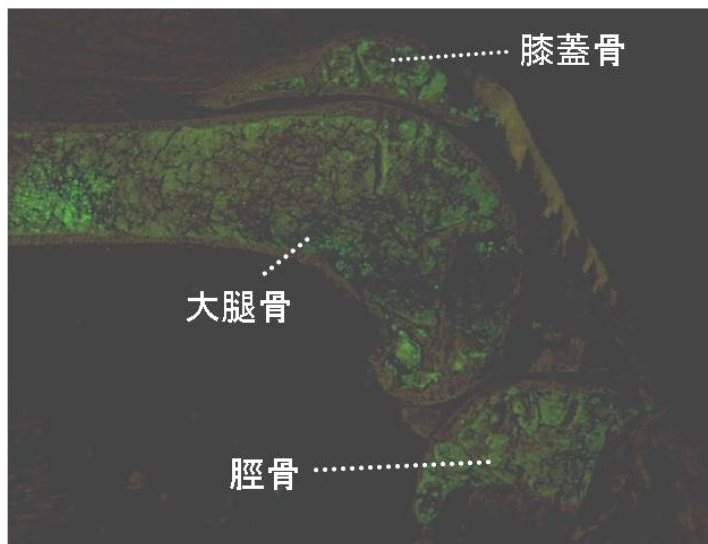


図 3. マウス臍帯血移植後の骨組織におけるマウス臍帯血由来細胞（GFP 陽性細胞）の局在の観察

終わりに

今後、遺伝子改変マウスの臍帯血移植やドナーマウスに遺伝子改変マウスを用いることで臍帯血由来細胞の生着に重要な

因子の同定を行っていきたいと考えている。また、本モデルを用いて生着を促進する因子の模索も行っていきたい。

参考文献

1. Kai S: [Complications of cord blood transplantation: graft failure and infectious disease]. *Rinsho Ketsueki* 41:482-486, 2000.
2. Bofill M, Akbar AN, Salmon M, Robinson M, Burford G, Janossy G: Immature CD45RA(low)RO(low) T cells in the human cord blood. I. Antecedents of CD45RA+ unprimed T cells. *J Immunol* 152:5613-5623, 1994.
3. Madrigal JA, Cohen SB, Gluckman E, Charron DJ: Does cord blood transplantation result in lower graft-versus-host disease? It takes more than two to tango. *Hum Immunol* 56:1-5, 1997.
4. Gluckman E, Rocha V, Boyer-Chammard A, Locatelli F, Arcese W, Pasquini R, Ortega J, Souillet G, Ferreira E, Laporte JP, Fernandez M, Chastang C: Outcome of cord-blood transplantation from related and unrelated donors. Eurocord Transplant Group and the European Blood and Marrow Transplantation Group. *N Engl J Med* 337:373-381, 1997.
5. Rubinstein P, Carrier C, Scaradavou A, Kurtzberg J, Adamson J, Migliaccio AR, Berkowitz RL, Cabbad M, Dobrila NL, Taylor PE, Rosenfield RE, Stevens CE: Outcomes among 562 recipients of placental-blood transplants from unrelated donors. *N Engl J Med* 339:1565-1577, 1998.
6. Civin CI, Meida-Porada G, Lee MJ, Olweus J, Terstappen LW, Zanjani ED: Sustained, retransplantable, multilineage engraftment of highly purified adult human bone marrow stem cells in vivo. *Blood* 88:4102-4109, 1996.
7. Erices AA, Allers CI, Conget PA, Rojas CV, Minguell JJ: Human cord blood-derived mesenchymal stem cells home and survive in the marrow of immunodeficient mice after systemic infusion. *Cell Transplant* 12:555-561, 2003.
8. Laroche A, Vormoor J, Hanenberg H, Wang JC, Bhatia M, Lapidot T, Moritz T, Murdoch B, Xiao XL, Kato I, Williams DA, Dick JE: Identification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating NOD/SCID mouse bone marrow: implications for gene therapy. *Nat Med* 2:1329-1337, 1996.
9. McCune JM, Namikawa R, Kaneshima H, Shultz LD, Lieberman M, Weissman IL: The SCID-hu mouse: murine model for the analysis of human hematolymphoid differentiation and function. *Science* 241:1632-1639, 1988.
10. Migishima F, Oikawa A, Kondo S, Ema H, Morita Y, Nakauchi H, Yokoyama M, Song SY, Nishijima M, Okabe M, Shinohara N: Full reconstitution of hematopoietic system by murine umbilical cord blood. *Transplantation* 75:1820-1826, 2003.
11. Oikawa A, Ito K, Seguchi H, Okabe M, Migishima F, Eshima K, Azuma S, Song SY, Kaneko T, Shinohara N: Development of immunocompetent lymphocytes in vivo from murine umbilical cord blood cells. *Transplantation* 84:23-30, 2007.
12. Uchida, K., Urabe, K., Naruse, K., Itoman, M. Umbilical cord blood-derived mesenchymal cell fate following mouse umbilical cord blood transplantation. *Transplantation*, 90(9):1037-1039

著者プロフィール

うちだ けんたろう
内田 健太郎



平成 16 年 北里大学医療衛生学部卒業

平成 21 年 北里大学大学院医療系研究科博士課程終了

平成 21 年 北里大学医学部整形外科学 助教

研究テーマ

幹細胞研究、骨軟骨代謝に関する研究をおこなっている。

日本チャールス・リバー株式会社

本	社	〒222-0033 横浜市港北区新横浜 3-17-6 (イノテックビル 11 階)	TEL. 045(474)9330
カスタマーサポートセンター(受注)		〒222-0033 横浜市港北区新横浜 3-17-6 (イノテックビル 11 階)	TEL. 045(474)9350
カスタマーサポートセンター(東日本)		〒222-0033 横浜市港北区新横浜 3-17-6 (イノテックビル 11 階)	TEL. 045(474)9340
カスタマーサポートセンター(西日本)		〒243-0303 大阪府茨木市横江 2-9-2	TEL. 072(637)8081

弊社の英文社名は Charles River Laboratories Japan, Inc.です。

お問い合わせ、ご注文は下記にて承ります。

国内飼育動物	カスタマーサポートセンター(受注)	TEL. 045(474)9350
輸入動物	カスタマーサポートセンター(輸出入)	TEL. 045(474)9340
受託サービス他	営業部	TEL. 045(474)9340

<http://www.crj.co.jp>