

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2021

課題番号：17K10953

研究課題名（和文）細胞治療の観点から行う難治性骨折の病態解明と新規治療法の開発

研究課題名（英文）The clarification of pathology and the development of brand-new treatment for nonunion in the point of cell-based therapy

研究代表者

三島 初 (Mishima, Hajime)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：60361341

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：ラット難治性骨折モデルに間葉系幹細胞を移植した動物実験で、脂肪由来間葉系幹細胞移植群では8関節中7関節で、骨髄由来間葉系幹細胞移植群では8関節中5関節で骨癒合が得られた。この脂肪由来間葉系幹細胞の方が細胞増殖能が高かったことが一因として考えられた。実験数が少ないため、さらに数を多くした場合に同様の結果が得られるのかを検証することが望ましいと考えている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脂肪組織から培養した間葉系幹細胞を移植する骨再生治療を難治性骨折に対して適用することで、骨髄血から培養した間葉系幹細胞を移植した骨再生治療に対する優位性を検討するとともに、いままで複数回の治療により移植骨が採取できずドナー不足で治療が難渋していた難治性骨折に対して十分な骨新生が得られる可能性を示唆する結果が得られた。

研究成果の概要（英文）：In an animal experiment in which mesenchymal stem cells were transplanted into a rat non-union model, bony union occurred in 7 out of 8 joints in the adipose-derived mesenchymal stem cell transplantation group and in 5 out of 8 joints in the bone marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation group. One of the reasons was that this adipose-derived mesenchymal stem cell had higher cell proliferation ability. Since the number of experiments is small, it is desirable to verify whether similar results can be obtained when the number is further increased.

研究分野：整形外科

キーワード：間葉系幹細胞 骨形成 難治性骨折

## 1. 研究開始当初の背景

骨折の治療原則は適切な整復と固定であるが、その5~10%が難治性骨折へ移行すると報告されている。骨折全体の総患者数(54万人:厚生労働省:平成23年患者調査報告より)のうち5%が難治性骨折とした場合、新規年間患者数は1万名超と患者数は多いにも関わらず、難治性骨折となった場合には、患者は疼痛や日常生活動作の制限により社会活動への参加が著しく制限され、医療者側もその治療に難渋し、治癒までには年単位の期間を要するため、社会的・経済的にも損失が大きい。既存の難治性骨折の治療として自家骨移植があり自家組織を移植できる利点がある一方で、移植骨(ドナー)部位の障害や複数回の治療あるいは広範囲な罹患部位のためにドナーが不足し治療が難渋するといった問題を抱えている。また難治性骨折は骨折部の生物学的活性が低下し骨形成に至らない症例が多く存在し、これらに対する新しい治療法の開発が必要である。

申請者は、骨盤から採取した骨髓血に含まれる骨髓間質細胞・成長因子を移植することを目的として、これらを含む雑多な集団を遠心分離後に有核細胞層を中心としたパフィーコート層として抽出し、壊死部に移植する骨再生を目的とした治療法(濃縮自家骨髓血移植術)を開発し、大腿骨頭壊死症に対する新規骨新生治療として臨床研究を行ってきた。骨髓血を移植することで、間葉系幹細胞のみならず内皮前駆細胞や成長因子といった血管新生に有利な成分も同時に移植できる利点をもつ反面、移植細胞の量が少なく不均一であり移植細胞が壊死組織に生着するののかという課題があった。

そこで、移植細胞の量を補完するために脂肪組織に着目した。ヒト同一患者から採取した骨髓由来間葉系幹細胞と脂肪由来間葉系幹細胞とを比較してみると、分化能が同程度にも関わらず脂肪由来間葉系幹細胞で増殖速度が5倍以上速いという結果を得た。この結果から、多くの骨新生を追求した場合には骨髓由来間葉系幹細胞よりも脂肪由来間葉系幹細胞の方が同数の細胞を移植した場合には有利である可能性があることがわかった。

よって、脂肪組織から培養した間葉系幹細胞を移植する骨再生治療を難治性骨折に対して適用することで、骨髓血から培養した間葉系幹細胞を移植した骨再生治療に対する優位性を検討するとともに、いままで複数回の治療により移植骨が採取できずドナー不足で治療が難渋していた難治性骨折に対して十分な骨新生が可能となり、停止した生物学的活性を安定して再開させる機序を明らかにできるものと考え、本研究を着想した(前項右図)。

## 2. 研究の目的

本研究では、ラット難治性骨折モデルを使用した動物実験で骨髓血由来間葉系幹細胞移植と脂肪由来間葉系幹細胞をそれぞれ移植し、より安定して骨形成が得られる方法を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) 骨髓由来間葉系幹細胞の評価

4週齢 Fischer 344 ラット(雄)10匹を使用し、屠殺した後大腿骨及び脛骨骨髓を基礎培地(10% FBS: Fetal Bovine Serum入り -MEM: Alpha-Minimum Essential Medium)でフラッシュし、フラッシュした溶液をナイロンメッシュ(100 µm cell strainer; BD Falcon, Bedford, MA, USA)で濾過し、50 ml 用チューブ(50 ml conical tube; BD Falcon)に回収した。Phosphate-Buffered Saline (以下 PBS)で2回洗浄した後、75 cm<sup>2</sup> フラスコに播種し、37 °C、5%二酸化炭素の環境下で培養した。培養液は Alpha-Minimum Essential Medium (以下 -MEM; Sigma, St. Louis, MO, USA)、10%牛胎児血清(Fetal Bovine Serum, 以下 FBS; Sigma)、1%抗生物質(Antibiotic-antimitotic; GIBCO, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)で構成され、各フラスコを15 mlの培養液で満たし、24時間後に初回培地交換を行った。以後、2-3日に1回の頻度で培地交換を行い、フラスコ底面の80%以上に培養細胞が増生していること(80% - confluent)を確認した後に初回継代を行った。フラスコ底面に接着した紡錘形の細胞を0.25% Trypsin 1 mM EDTA (Sigma)を用いてフラスコ底面より剥離し、PBSで2回洗浄した後、別の75 cm<sup>2</sup> フラスコに播種し、継代した。初回継代後、2-3日に1回の頻度で培地交換を行い、フラスコ底面の80%以上に培養細胞が増生(80% - confluent)させた。

分化能は、骨分化能および脂肪分化能について骨分化用(Rat Osteoblast Differentiation Medium, Cell Applications, Inc., San Diego, CA, USA)および脂肪分化用(Rat Adipocyte Differentiation Medium, Cell Applications, Inc., San Diego, CA, USA)のメディアウムを使用して評価した。

増殖能については、継代培養後1, 3, 5, 7, 9日目でそれぞれ0.25% Trypsin 1 mM EDTA (Sigma)を用いてフラスコ底面より剥離し、Phosphate-Buffered Saline (以下 PBS)で2回洗浄した後細胞数を計測した。

細胞表面抗原マーカーについては、陽性マーカーとして CD73, CD90, CD105 を、陰性マーカーとして CD31, CD45 を使用してフローサイトメトリー (FACS) による評価を行った。

#### (2) 脂肪由来間葉系幹細胞の評価

(1) で使用した個体と同じ 4 週齢 Fischer 344 ラット (雄) 10 匹を使用し、背面皮下から脂肪塊を 1g 採取する。採取後、PBS : Phosphate Buffered Saline で洗浄し、血管・結合組織等を除去後組織を細分化し、コラゲナーゼを用いて組織を消化し、十分にコラゲナーゼを洗浄・ろ過した後、(1) と同様の基礎培地を加えて 75 cm<sup>2</sup> フラスコに播種し、75 cm<sup>2</sup> フラスコに播種し、37 °C、5 % 二酸化炭素の環境下で培養した。24 時間後に初回培地交換を行った。以後、2-3 日に 1 回の頻度で培地交換を行い、フラスコ底面の 80 % 以上に培養細胞が増生していること (80 % - confluent) を確認した後に初回継代を行った。フラスコ底面に接着した紡錘形の細胞を 0.25 % Trypsin 1 mM EDTA (Sigma) を用いてフラスコ底面より剥離し、PBS で 2 回洗浄した後、別の 75 cm<sup>2</sup> フラスコに播種し、継代した。初回継代後、2-3 日に 1 回の頻度で培地交換を行い、フラスコ底面の 80 % 以上に培養細胞が増生していること (80% - confluent) を確認し、培養細胞を 0.25 % Trypsin 1 mM EDTA を用いてフラスコ底面より剥離し、細胞の解析を行った。

分化能は、骨分化能および脂肪分化能について骨分化用 (Rat Osteoblast Differentiation Medium, Cell Applications, Inc., San Diego, CA, USA) および脂肪分化用 (Rat Adipocyte Differentiation Medium, Cell Applications, Inc., San Diego, CA, USA) のメディアウムを使用して評価した。

増殖能については、継代培養後 1, 4, 7, 10, 14 日目の細胞数を計測した。

細胞表面抗原マーカーについては、陽性マーカーとして CD73, CD90, CD105 を、陰性マーカーとして CD31, CD45 を使用してフローサイトメトリー (FACS) による評価を行った。

#### (3) ラット難治性骨折モデルの作製

12 週齢 Fischer 344 ラット (雄) を使用した。右大腿骨は骨髓腔を 21G 針でリーミングを行った後生理食塩水でフラッシュし骨髓成分を可及的に除去した後、骨幹部中央に骨切りを行って骨折部を作成し、骨折部を中心に周囲の骨膜を 10mm ずつ全周性に切除し、1.25mm の K-wire を髓腔内に挿入し内固定を行い、モデルを作成する。

12 週経過後、骨折部が癒合しておらず偽関節になっているかを放射線学および組織学的に評価した。

#### (4) ラット難治性骨折モデルを使用した骨髓由来間葉系幹細胞と脂肪由来間葉系幹細胞を使用した移植治療の比較評価

(3) と同様の方法で、12 週齢 Fischer 344 ラット (雄) 24 匹にラット難治性骨折モデルを作製する。また、別に準備した 4 週齢 Fischer 344 ラット (雄) 10 匹を使用し、(1)・(2) と同様の方法で骨髓由来・脂肪由来間葉系幹細胞を各々単離培養し、その後 4 週間の培養・継代で 1 回の移植あたり  $1 \times 10^7$  個の細胞が可能となるように細胞数を確保する。対照群、骨髓由来間葉系幹細胞移植群、脂肪由来間葉系幹細胞移植群の 3 群を用意し、N=8 ずつとして、対照群には生理食塩水 1ml を、骨髓群・脂肪群には  $1 \times 10^7$  個の移植細胞を溶解した生理食塩水 1ml を各々難治性骨折部に移植する。移植後 12 週で屠殺し、放射線学および組織学的評価により骨形成・骨癒合を評価した。

### 4. 研究成果

骨髓由来間葉系幹細胞・脂肪由来間葉系幹細胞とも、骨・脂肪いずれにも分化することを確認し、研究に使用する細胞が多分化能を有していることを確認した。

増殖能に関しては、骨髓由来間葉系幹細胞と比較して脂肪由来間葉系幹細胞の方が増殖細胞数は多かった。特に 9 日目には脂肪由来間葉系幹細胞は骨髓由来間葉系幹細胞と比較して 5 倍程度の細胞数に増殖しており、脂肪由来間葉系幹細胞の方が増殖能は高いと思われた。

細胞表面抗原マーカーについては、骨髓由来間葉系幹細胞・脂肪由来間葉系幹細胞とも、陽性マーカー (CD73, CD90, CD105) はいずれも 90% 以上であり、陰性マーカー (CD31, CD45) はいずれも 10% 未満だった。細胞表面抗原マーカーの分布に関して、骨髓由来間葉系幹細胞・脂肪由来間葉系幹細胞との間に特に明らかな差はみられなかった。

12 週齢 Fischer 344 ラット (雄) を使用してラット難治性骨折モデルを作成した。当初は骨髓腔内のフラッシュは行っておらず疾患モデルの作成に苦慮したが、文献 2 の方法を取り入れ骨髓腔を 21G 針でリーミングを行った後生理食塩水でフラッシュし骨髓成分を可及的に除去する処置を追加し、予備実験で行った 5 例とも偽関節だったため、この方法で比較試験を行うこととした。

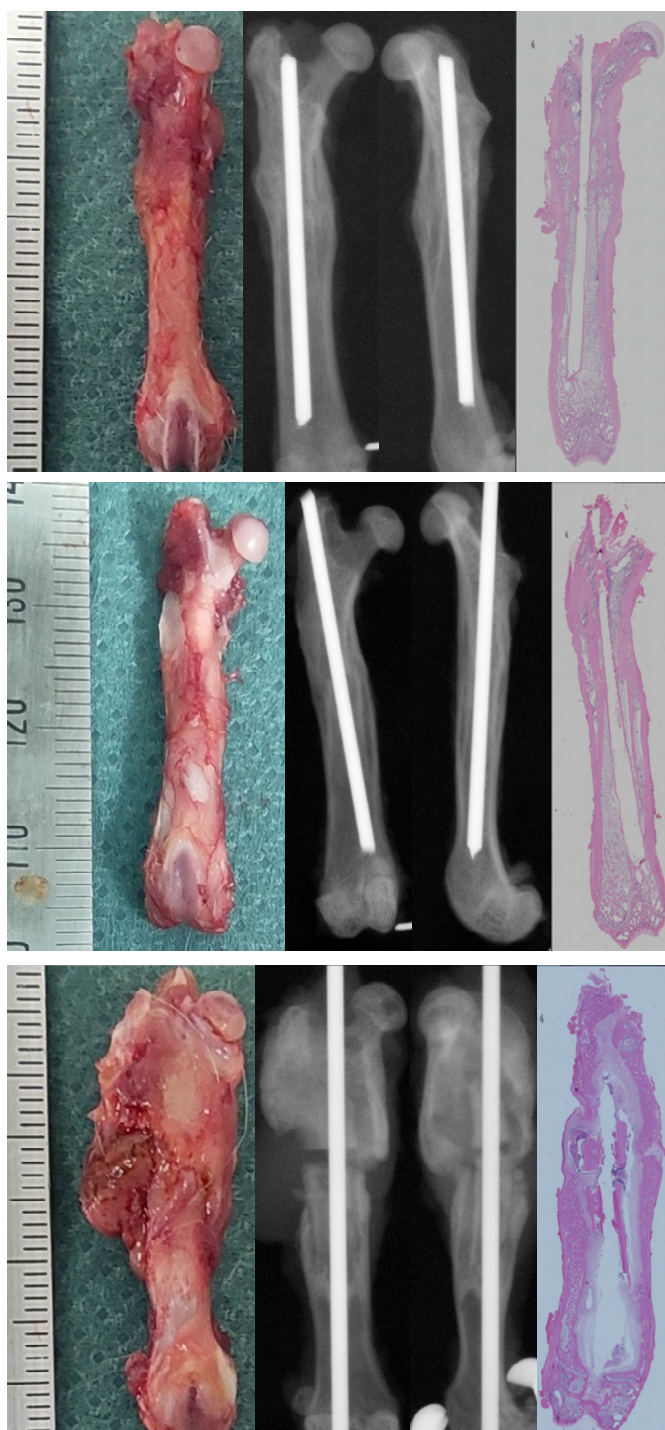
12 週齢 Fischer 344 ラット (雄) 24 匹にラット難治性骨折モデルを作成し、N=8 ずつとして、対照群には生理食塩水 1ml を、骨髓群・脂肪群には  $1 \times 10^7$  個の移植細胞を溶解した生理食塩水 1ml を各々難治性骨折部に移植し移植後 12 週で屠殺した。単純 X 線による評価では、脂肪由来間葉系幹細胞移植群では 8 個体中 7 個体で骨癒合が得られた。骨髓由来間葉系幹細胞移植群では 8 個体中 6 個体で骨癒合が得られた。対照群では 8 個体中 1 個体で骨癒合が得られた。組織

学的評価でも単純 X 線の結果と同様に、脂肪由来間葉系幹細胞移植群では 8 個体中 7 個体、骨髄由来間葉系幹細胞移植群では 8 個体中 6 個体、対照群では 8 個体中 1 個体で骨癒合が得られた。HE 染色では骨癒合が得られたものは骨梁および骨細胞で連続性に覆われているが、骨癒合が得られなかったものは骨折部は肥厚した線維性組織がみられた（図参照）。

骨髄由来間葉系幹細胞移植群と比較して脂肪由来間葉系幹細胞移植群で骨癒合率が高かった要因の一つとして、幹細胞自身が持つ増殖能が結果に影響した可能性が考えられる。ただし N=8 と数が少ないため、N をさらに多くした場合に同様の結果が得られるのかを検証することが望ましいと考えられる。他方、対照群でも 1 個体で骨癒合が得られており、今回採用した難治性骨折モデルにはさらに改善の余地があると考えられ、より広範囲の骨膜（大転子から大腿骨顆部）を全周性に切除する方法を検討している。

X 線 CT を用いた骨形成量の定量解析を進めており、結果をまとめた後論文誌上に公表することを計画している。

図 上：脂肪由来間葉系幹細胞移植群、中：骨髄由来間葉系幹細胞移植群、下：対照群（いずれも左から、肉眼写真正面・単純 X 線正面・単純 X 線側面・HE 染色）



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                      | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                   | 備考 |
|-------|--|---|----|
| 研究分担者 | 菅谷 久<br><br>(Sugaya Hisashi)<br><br>(10752553) | 筑波大学・医学医療系・客員研究員<br><br><br><br>(12102) |    |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|         |         |