

令和 2 年 5 月 18 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10962

研究課題名(和文) 骨軟部腫瘍切除後欠損に対する脂肪由来幹細胞再生医療の新たなアプローチ

研究課題名(英文) A new approach of adipose-derived stem cell regenerative medicine for postoperative defects after bone and soft tissue tumor surgery

研究代表者

林 克洋 (Hayashi, Katsuhiro)

金沢大学・医薬保健学総合研究科・特任教授

研究者番号：80507054

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：脂肪由来幹細胞(ADSC)の骨腫瘍切除後の欠損に対する骨再生効果を確認した。in vitroにおいて、ADSCによる凍結自家処理骨再生能を検討し骨芽細胞のSmadシグナルやJNKシグナルが有意に活性化、骨形成を促す液性因子を産生している可能性が確認され、in vivo実験モデルで、凍結自家処理骨にADSCを添加することで、骨再生の亢進が確認された。In vitroでのBMPの発現効果やDilの分布などとあわせ、ADSCは骨に直接分化したより、周囲に存在して骨形成サイトカインを分泌し骨形成を促進したと考えられた。今後ADSC添加による臨床応用が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨軟部腫瘍手術で切除した骨軟部組織欠損を補填する医療技術を発展させることは重要な課題である。骨肉腫などの腫瘍を含む骨は、熱や放射線、低温処理などを行うことで腫瘍を壊死させ、骨を再利用して使用できるが、当教室では液体窒素を使用した処理方法を開発、臨床応用を行ってきた。今回、その再生能力の改善のため、採取が容易で細胞数が多くとれる脂肪由来幹細胞を用いて再生医療を行うことを研究、結果を得た。日本オリジナルの治療方法を更にすすめて行く橋掛かりとなった。

研究成果の概要(英文)：Adipose-derived stem cells (ADSCs) have multipotentiality equivalent to bone marrow derived stem cells. We examined the ability of ADSCs to revitalize frozen bone toward clinical application of bone tumor surgery. In a conditioned culture method, proliferation and signaling pathways (Smad and JNK) of osteoblasts affected by ADSCs were examined using cell proliferation and Western blotting assays, and they were significantly enhanced. The methods confirmed osteoblast differentiation and osteogenesis-promoting action of ADSCs. Next, the femoral shafts of rats were excised, frozen in liquid nitrogen, and then reimplanted as an autologous bone transplant. Histopathologic examination was performed to assess its revitalization ability, and bone revitalization was observed significantly more with than without ADSCs in week 8. The osteogenesis-promoting action of ADSCs for frozen bone was suggested. Using ADSCs to promote revitalization of frozen bone is expected in the future.

研究分野：整形外科

キーワード：脂肪由来幹細胞 骨軟部腫瘍 再生医療

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

癌の外科的治療には、腫瘍と一塊にして発生した臓器の切除が必要である。小病変に対しては臓器障害も少ないが、大きな腫瘍では欠損となった臓器の機能障害が必発である。四肢に発生する骨腫瘍、軟部腫瘍の切除手術でも、骨や筋肉や神経を一塊とした切除が必要であり、骨欠損、軟部組織欠損が生じ、機能的な問題も生じる。臨床ではさまざまな再建手術が行われており、骨の欠損に関しては、人工関節、人工骨移植、自家骨移植などがあり、軟部組織欠損に関しては、皮弁術などがある。理想的な再建方法は、採取部位の犠牲が少なく、かつ自己の組織で再生され、永続的に機能するものである。

近年、細胞を使った組織の再生医療は、あらゆる生体組織で盛んに試みられている。細胞のソースとして、ES細胞やiPS細胞、骨髄間葉系幹細胞などがあげられる。しかし、ヒトの細胞を体外で培養、分化させることには、倫理的な面や操作上の問題などが多くあるのが現実である。骨軟部腫瘍では大きな欠損となることが多く、細胞の量も問題となる。

脂肪組織の中には、未分化な多能性細胞が存在することが明らかになっている (Zuk PA, et al.: *Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. Tissue Eng* 7: 211-228, 2001)。すなわち、脂肪の間質には未分化な細胞群が存在し、その一部に単一クローンから多方向に分化する幹細胞が確認され、脂肪由来幹細胞とよばれる。これは、脂肪、軟骨、骨、骨格筋、心筋、腱、神経、血管などへ分化誘導できる可能性が示されている (Cowan CM, et al. *Adipose-derived adult stromal cells heal critical-size mouse calvarial defects. Nature Biotechnology*. 22, 560, 2004 他)。他の骨髄間葉系幹細胞などくらべると、採取が容易でかつ大量にとることができるため、再生医療でネックとなる培養操作を行わない、または短期間の培養で十分な移植細胞数が得られる。世界では乳癌切除後の乳房再建に対する臨床試験などがすでに始められているが、整形外科分野での応用はまだ少ない。

我々はこれまで、脂肪由来幹細胞から神経や骨の再生に関する研究報告を行っており (腱骨移行部再生 Kosaka M, et al *Arthroscopy* 2016, 変形性関節症予防 Kuroda K, et al *BMC Musculoskelet Disord* 2015、骨再生細胞シート Fang X et al. *PLoS One*. 2014、骨再生 Nomura I et al. *Clin Orthop Relat Res*. 2014) *in vivo* での再生医療の手がかりを得ている。

### 2. 研究の目的

本研究は、骨軟部腫瘍手術で切除した骨軟部組織欠損に対して、採取が容易で細胞数が多くとれる脂肪由来幹細胞を用いて再生医療を行うことを目標とした。これまで、脂肪由来幹細胞は、乳癌切除後の乳房再建などに対して使用され、良好な成績をおさめており、骨軟部腫瘍領域への応用も期待される。

本研究では腫瘍骨の再利用のため、液体窒素処理した壊死骨に対する幹細胞併用で再生能力を検討した。骨肉腫などの腫瘍を含む骨は、熱や放射線、低温処理などを行うことで腫瘍を壊死させ、骨を再利用して使用できる。当教室では、液体窒素を使用した処理方法を行っており、臨床応用も行ってきたが、体内で壊死骨が再生するには年単位の時間がかかるのがネックである。その間に感染や骨折などの合併症を起こすと骨温存に限界もあるため、極力早期に骨が再生する方法を脂肪由来幹細胞を用いて研究を行った。

### 3. 研究の方法

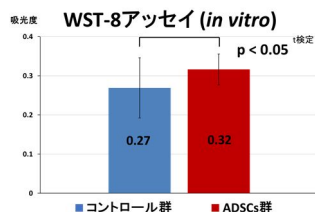
*In vitro* 実験モデルとして、ラットの皮下脂肪組織を採取し、コラゲナーゼで分解、遠心、ペレットを培養することで得られる脂肪由来幹細胞 (ADSC) を使用した。抽出した脂肪由来幹細胞 (ADSC) の DMEM 培養上清から得られた培養液 (条件培養群) と、DMEM (コントロール群) とを用いて、ラット骨芽細胞の培養を 24 時間行い、骨芽細胞の増殖能を WST-8 アッセイを用いて検討した。また、骨芽細胞の骨形成能や分化能を western blotting 法を用いて Smad, JNK について検討した。更に、ラット ADSC で非接触型共培養 (0.4  $\mu$ m PET membrane insert BD Falcon) を 3 日間行ったラット骨芽細胞 (共培養群) と、非共培養のラット骨芽細胞 (コントロール群) のそれぞれで RNA を抽出し、リアルタイム PCR を用いて bone morphogenetic protein-2 (BMP-2), alkaline phosphatase-1 (ALP-1) 遺伝子の発現量を検討した。

次に *in vivo* 実験モデルとして、ラットの大腿骨骨幹部を摘出し、摘出骨を液体窒素にて凍結処理し、再移植、キルシュナーワイヤーにて固定した。I 型コラーゲンゼル 0.1ml に  $5.0 \times 10^6$  個の ADSC を添加したものを ADSC 群とし、ADSC を添加していないものをコントロール群とした。4 週と 8 週で屠殺後大腿骨をホルマリン固定したのち、キルシュナーワイヤーを除去し、矢状断で切片を作成した。HE 染色での組織学的評価および Dil を用いたラベリングで移植 ADSC の残存評価を行った。処理骨内の骨小胞に核を有していることが確認できれば、骨再生したと判断し、骨再生率を有核骨小胞と全骨小胞の比率で定義し、凍結処理骨の近位端、中央部、遠位端を 2 か所ずつの計 6 箇所平均値を算出した。

ADSC による骨軟骨再生のさらなる応用のため、人の移植治療に用いられた検体やデータから解析も行った。腹部皮下脂肪から採取分離した脂肪由来幹細胞で、変形性膝関節症患者の治療を施行された 4 例から臨床情報を得た。治療適応、治療効果の判断のため、患者の採血から IL-6 サイトカイン測定、関節液からヒアルロン酸濃度の測定を行い、治療効果との関連の検討をおこなった。

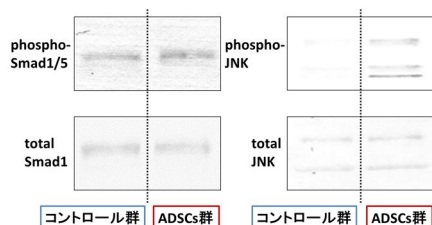
#### 4. 研究成果

In vitro で、ラットの脂肪組織から抽出した脂肪由来幹細胞 (ADSC) の DMEM 培養上清から得られた培養液(条件培養群)と、DMEM(コントロール群)とを用いて、ラット骨芽細胞の培養を行い、骨芽細胞の増殖能を WST-8 アッセイを用いて検討した。条件培養群では、コントロールに比べ細胞増殖能は高かった(p=0.034)



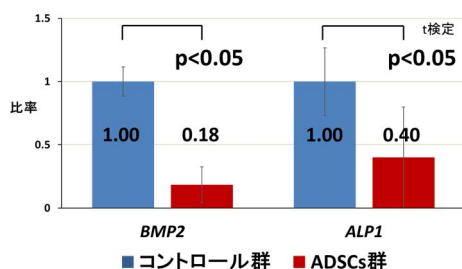
また、骨芽細胞の骨形成能や分化能を western blotting 法を用いて検討した。Smad1 のリン酸化割合は、条件培養群でコントロールより高く、JNK のリン酸化割合も条件培養群で高くなっていた。Smad と JNK のリン酸化が ADSC 上清を使用することで亢進しており、両方のシグナル伝達経路が有意に亢進していることがわかった。ADSC が骨形成および分化を促す液性因子を産生している可能性を確認した。

#### ウェスタンブロッティング法 (in vitro)



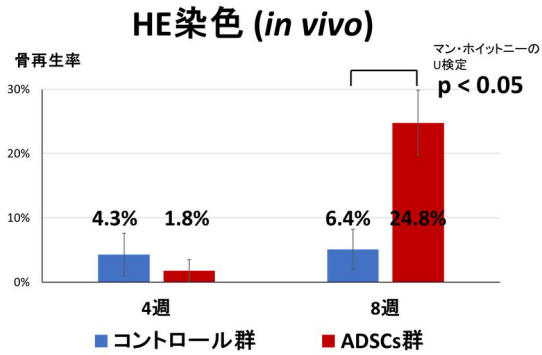
更に、ラット ADSC で非接触型共培養を行ったラット骨芽細胞(ADSC 群)と、非共培養のラット骨芽細胞(コントロール群)のそれぞれで RNA を抽出し、リアルタイム PCR を用いて BMP2, ALP1 遺伝子の発現量を検討した。

#### リアルタイムRT-PCR法 (in vitro)



コントロール群に比べ ADSC 群の骨芽細胞の BMP2 や ALP1 発現は有意に低下し (p<0.05) ネガティブフィードバックと考えられた。

in vivo 実験モデルとして、ラットの大腿骨骨幹部を摘出し、摘出骨を液体窒素にて凍結処理し、再移植し、ADSC を添加したものをしたものを ADSC 群とし、ADSC を添加していないものをコントロール群として、骨再生能の組織学的検討を行った。4 週の時点では骨再生は少数でのみ認められたが、8 週の時点で、骨再生はコントロール群の 5 例中 2 例で認められたのに対して、ADSC 群では 5 例全例に骨再生が認められ、ADSC の処理骨再生促進作用が示唆された。骨再生率は ADSC 群 8 週で有意に高いことを確認した(p<0.05)。DiI ラベリングでは ADSC は凍結処理骨や健全骨内ではなく、凍結処理骨周囲に存在しており、移植した ADSC が直接骨に分化したというよりは、in vitro で証明されたような液性因子の発現によって骨再生が促進されたと考えられた。



ADSC による骨軟骨再生のさらなる応用のため、人の移植治療に用いられた検体やデータから解析も行った。腹部皮下脂肪から採取分離した脂肪由来幹細胞で、変形性膝関節症患者の治療を施行された4例から臨床情報を得た。脂肪吸引量は平均 206ml、総細胞数  $2.7 \times 10^7$ 、生細胞率 91.6%であった。移植後6ヶ月で疼痛スケールは移植前平均 2.2 から 1.2 に改善、JKOOS は 67.8 から 81.5 に改善していた。移植前の関節症の重症度の定量化のため、患者血中ヒアルロン酸濃度と関節液中 IL-6 を測定し、臨床経過との相関を検討したが、今回の症例内では結論はでない。

今回、ADSC の骨腫瘍切除後の欠損にたいする骨再生効果が確認された。in vitro において、ADSC による凍結自家処理骨再生能を検討し骨芽細胞の Smad シグナルや JNK シグナルが有意に活性化、骨形成を促す液性因子を産生している可能性が確認され、in vivo 実験モデルで、凍結自家処理骨に ADSC を添加することで、骨再生が確認された。In vitro での BMP の発現効果や Dil の分布などとあわせ、ADSC は骨に直接分化したより、周囲に存在して骨形成サイトカインを分泌し骨形成を促進したと考えられた。今後 ADSC 添加による臨床応用が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yoshida Y, Matsubara H, Fang X, Hayashi K, et al	4. 巻 14
2. 論文標題 Adipose-derived stem cell sheets accelerate bone healing in rat femoral defects.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0214488.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Inatani H, Yamamoto N, Hayashi K et al	4. 巻 475
2. 論文標題 Do Mesenchymal Stem Cells Derived From Atypical Lipomatous Tumors Have Greater Differentiation Potency Than Cells From Normal Adipose Tissues?	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Clin Orthop Relat Res.	6. 最初と最後の頁 1693-1701
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11999-017-5259-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 1.林克洋、稲谷弘幸、土屋弘行	4. 巻 32
2. 論文標題 脂肪系腫瘍由来幹細胞と正常脂肪由来幹細胞の分化能の違い	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 BioClinica	6. 最初と最後の頁 1031-1034
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Hayashi K
2. 発表標題 Clinical outcomes of surgery using an external fixator for bone deformities or defects after tumor resection
3. 学会等名 国際整形災害外科学会（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 林克洋
2. 発表標題 骨軟部組織欠損後に対する脂肪由来幹細胞の応用
3. 学会等名 第11回金沢骨軟部腫瘍セミナー
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考