

令和 3 年 4 月 27 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09030

研究課題名(和文) ヒト脂肪由来再生幹細胞による難治性骨折治療に関する基礎研究

研究課題名(英文) Therapeutic effects of adipose derived regenerative cells for fracture healing using rat unhealing fracture model.

研究代表者

松本 知之 (Matsumoto, Tomoyuki)

神戸大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：50546588

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)：ヒト新鮮・凍結保存ADRCの増殖能・多分化能・細胞表面マーカーの評価においては、新鮮・凍結保存ADRCにおいて同等の増殖能・多分化能を示すことが確認された。さらに、免疫不全ラットを用いた難治性骨折モデルへのADRCの局所投与では、血管新生ならびに骨形成を促進し、画像および組織学的評価において骨癒合を促進することが確認され、ADRCが実臨床の難治性骨折や偽関節への有望な治療戦略となりうることを示唆されている。さらに、凍結群は新鮮群とほぼ同等の骨折治癒効果を示しており、ADRCは凍結保存下でも骨折修復効果を維持できることが確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脂肪由来再生幹細胞(Adiposederived regenerative cells; ADRCs)の再生医療としての臨床での使用が普及しているが、その機序に関してはいまだに不明な点が多い。本研究では難治性骨折モデルにおけるその有用性が細胞自身の分化およびパラクライン効果が関与していることが証明された。さらに凍結細胞での治癒能も新鮮細胞と同様に確認されたことにより、臨床での凍結細胞使用の有用性を示唆するものであり、患者が自身の細胞を凍結することで複数回治療を受けれるという恩恵につながる。

研究成果の概要(英文)：In this study, therapeutic potential of adiposederived regenerative cells (ADRCs) for unhealing fracture was investigated in vitro and in vivo experiment. In the in vitro experiment, frozen and fresh ADRCs showed similar potential for proliferation and multi-differentiation. In the in vivo experiment using immunodeficient rat unhealing fracture model, transplantation of ADRCs exhibited enhanced fracture healing via angiogenesis and osteogenesis in the radiological and histological assessment. Furthermore, fresh and frozen ADRCs showed similar potential healing as well. Therapeutic potential of fresh and frozen ADRCs for nonunion fracture was confirmed.

研究分野：整形外科、再生医療

キーワード：脂肪幹細胞 骨折治癒

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 骨折は様々な原因で起こり、患者の日常生活動作や生活の質を著しく障害する。閉鎖性骨折のうち約 5-10%、開放骨折のうち約 17%が正常に治癒しない難治性骨折に陥るとされており、これらは治療に難渋することも少なくない。従って、骨折治癒をより改善・促進させるような治療法の開発が望まれていた。

(2) 幹細胞治療が骨折治療の新たな strategy として注目される中、脂肪組織は、骨髄と比較し低侵襲性でより多くの幹細胞を採取可能であることから、幹細胞の新たな供給源として期待されていた ()。脂肪幹細胞を含む間質血管細胞群 (Stromal Vascular Fraction ; SVF) は、より容易に採取可能であり、その有用性が様々な分野で報告されていたが(、)、骨折治癒に及ぼす影響についての報告は少なく、その詳細はいまだ不明であった。

(3) 凍結保存(Cryopreservation)は SVF 治療が実臨床での応用を拡大するためのセルバンキングとして有効と考えられていた。しかし、骨折治療において不可欠となる骨分化能や血管新生能をベースとした治療効果が、凍結検体においても維持できるかは不明であった。

2. 研究の目的

- (1) ラット難治性骨折モデルを用いて SVF の骨折治癒促進効果を検討すること
- (2) 新鮮(Freshly isolated) SVF と凍結 SVF の骨折治癒促進効果を比較すること。

3. 研究の方法

(1) In Vivo

生後 9 週齢のヌードラットの大腿骨に難治性骨折モデル()を作成し、30 匹×3 群に分け骨折部に各製剤を投与した (F-SVF 群：ヒト新鮮 SVF, C-SVF 群：ヒト凍結 SVF, control 群：リン酸緩衝生理食塩水)。画像評価は、術後 8 週の Xp との micro-CT により骨癒合率と callus area を評価した。組織学的評価は 術後 4, 8 週の H&E 染色と Safranin-O 染色にて行い、過去の報告 ()に基づいた骨折治癒スケール (4 点満点) も評価した。力学的評価として、術後 8 週の大腿骨の 3 点曲げ試験を行い、ultimate stress (N)、extrinsic stiffness (N/mm)、failure energy (Nmm) を評価し、健側比を計測した。免疫学的評価として、術後 2 週に isolectinB4 と osteocalcin(OC)の蛍光免疫染色による骨折部の血管新生と骨形成の定量評価 (isolectinB4, OC の陽性細胞数) を行った。結果を 3 群で比較した(chi-squared test or one-way analysis of variance)。

(2) In Vitro

Human 由来の F-SVF と C-SVF を培養後、acLDL と lectin による蛍光免疫染色と Matrigel culture を用いた tube formation による血管新生能評価、ALP 染色と Alizarin red 染色を用いた骨分化能評価を行った。結果を 2 群間で比較した (Mann-Whitney U test)。

4. 研究成果

(1) 画像評価

術後 8 週の F-SVF 群、C-SVF 群の Xp による骨癒合率は 60% (6/10)、50.0% (5/10)と、コントロール群 (0%, 0/10) よりも有意に高かった。また、callus area も術後 4、8 週において両群ともに、コントロール群よりも大きかった。F-SVF, C-SVF の 2 群間には有意差はなかった。

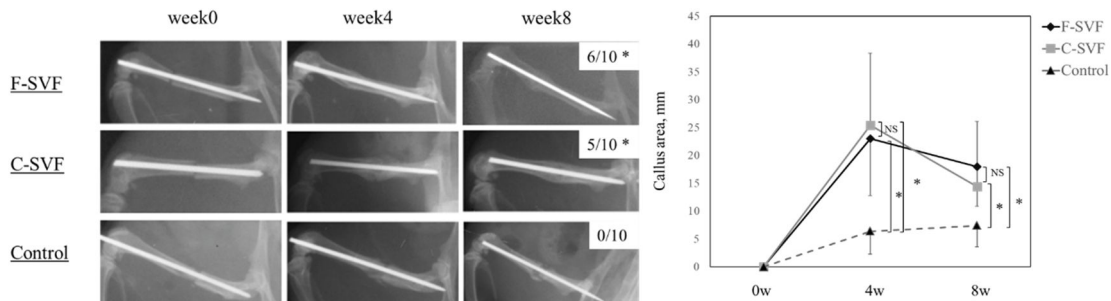


図 1 画像評価 -骨癒合率と callus area の比較-

(2) 組織学的評価

HE 染色と、Safranin-O 染色による組織評価では、F-SVF 群、C-SVF 群は術後 4 週で軟骨細胞浸潤と仮骨形成を呈し、8 週で骨癒合を認めたが、control 群では骨折部への軟骨細胞浸潤は乏しく、8 週で偽関節に至った。骨折治癒スケールも、F-SVF 群と C-SVF 群 (は control 群よりも有意に高かった。また、F-SVF 群と C-SVF 群の両群にはいずれも有意差はなかった。

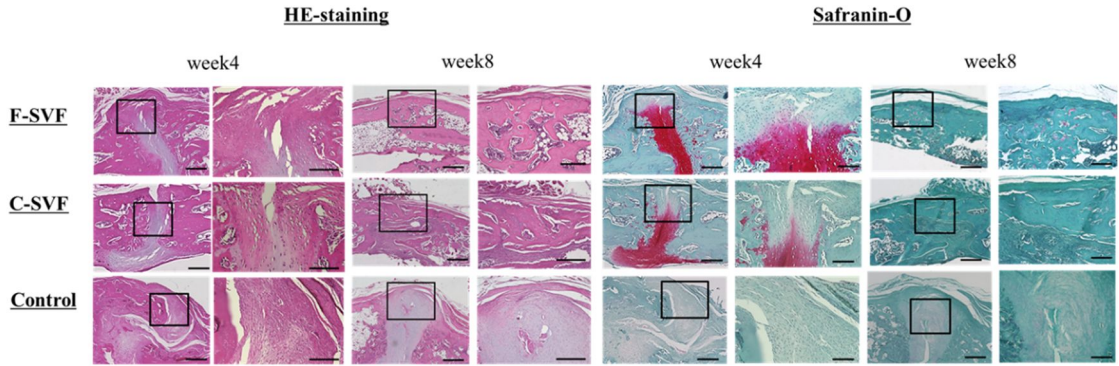


図2 組織学的評価 -HE染色とSafranin-O染色の比較-

(3) 力学的評価

Ultimate stress, extrinsic stiffness, failure energy の健側比はいずれも、F-SVF、C-SVF の両群共に control 群よりも有意に高く、F-SVF 群と C-SVF 群の両群にはいずれも有意差はなかった。(ultimate stress: F-SVF, 0.79 ± 0.29 ; C-SVF, 0.71 ± 0.26 ; control, 0.29 ± 0.21 . extrinsic stiffness: F-SVF, 0.88 ± 0.25 ; C-SVF, 0.94 ± 0.36 ; control, 0.15 ± 0.14 . failure energy: F-SVF, 0.71 ± 0.34 ; C-SVF, 0.65 ± 0.36 ; control, 0.34 ± 0.13 .)

(4) 免疫学的評価

ラット由来の isolectinB4 陽性の血管内皮細胞、OC 陽性骨芽細胞の発現が、F-SVF、C-SVF 群で control 群よりも有意に増加しており、内因性血管新生、骨形成が促進されていた。また、F-SVF と C-SVF の両群で human 由来の CD31 陽性細胞や OC の発現も確認された。

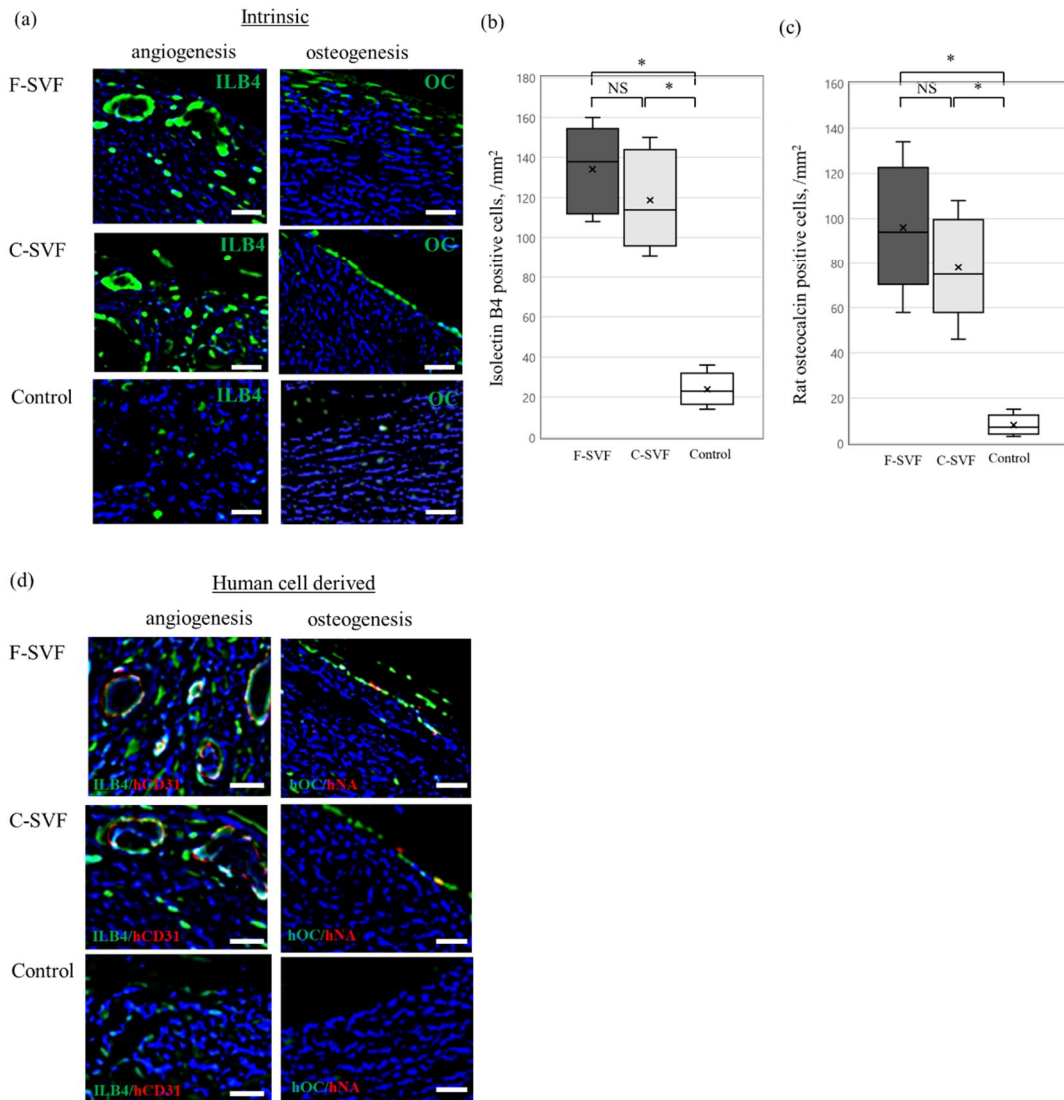


図3 免疫学的評価

(a)(b)(c) isolectinB4、osteocalcin を用いた蛍光免疫染色によるラット由来の内因性血管

新生と骨形成能の評価

(d) Human-CD31、osteocalcin を用いた蛍光免疫染色

(5) 血管新生能、骨分化能 (in vitro)

F-SVF 群、C-SVF 群の両群共に良好な acLDL 取り込み能とレクチン結合能を示し、両群間に血管新生能に有意差は認めなかった。また、tube formation による定量的血管新生評価においても両群で有意差は認めなかった。骨分化能は、両群共に、ALP 染色と Alizarin-red 染色で濃染し、定量的 ALP 活性や石灰化は両群間に有意差はなかった。

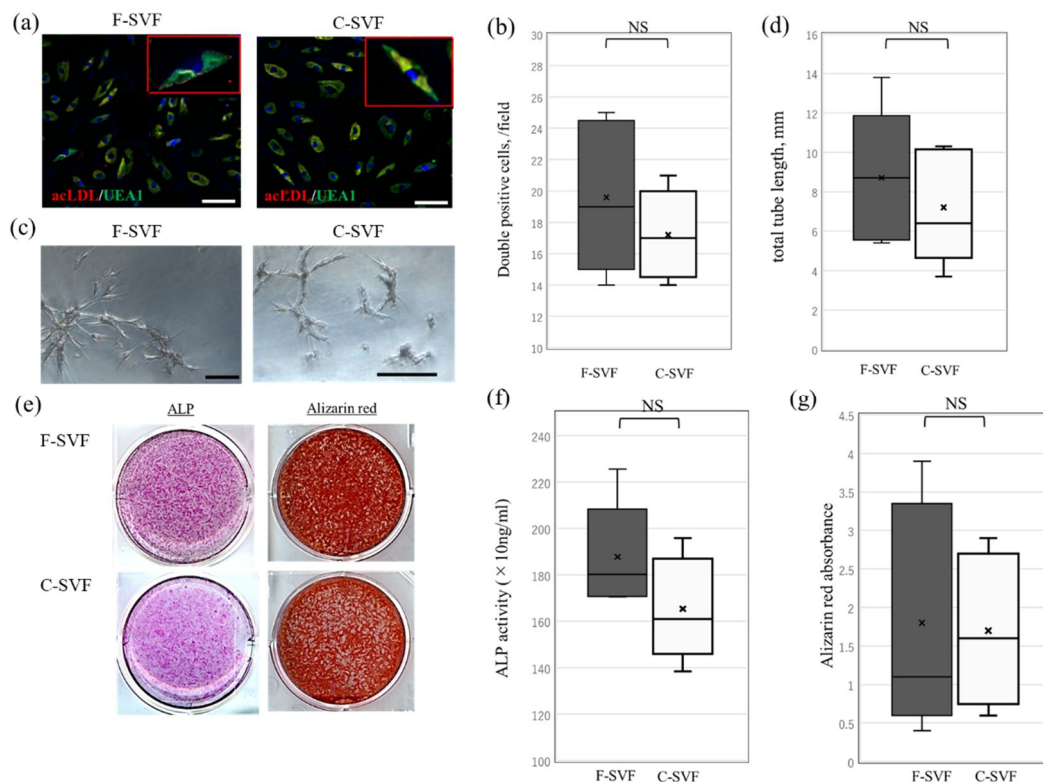


図4 血管分化能、骨分化能の評価 (in vitro)

(a) (b) 蛍光免疫染色による acLDL (red) と lectin (green) の double positive cell の比較

(c) (d) Matrigel culture による tube formation の比較

(e)(f)(g) ALP 染色による ALP 活性、Alizarin red 染色による石灰化評価

<引用文献>

De Ugarte DA et al. Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells Tissues Organs*. 2003;174:101-9.

Mazur S et al. Safety of adipose-derived cell (stromal vascular fraction - SVF) augmentation for surgical breast reconstruction in cancer patients. *Adv Clin Exp Med*. 2018;27:1085-90.

Kastrup J et al. Rationale and design of the first double-blind, placebo-controlled trial with allogeneic adipose tissue-derived stromal cell therapy in patients with ischemic heart failure: a phase II Danish multicentre study. *Stem Cells Int*. 2017;2017:8506370.

Kokubu T et al. Development of an atrophic nonunion model and comparison to a closed healing fracture in rat femur. *J Orthop Res*. 2003;21:503-10.

Allen HL et al. Indomethacin and aspirin: effect of nonsteroidal anti-inflammatory agents on the rate of fracture repair in the rat. *Acta Orthop Scand*. 1980;51:595-600.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

| | |
|---|-------------------|
| 1. 著者名 Tomoyuki Kamenaga, Yuichi Kuroda, Kanto Nagai, Masanori Tsubosaka, Yoshinori Takashima, Kenichi Kikuchi, Masahiro Fujita, Kenmei Ikuta, Kensuke Anjiki, Toshihisa Maeda, Naoki Nakano, Koji Takayama, Shingo Hashimoto, Shinya Hayashi, Takehiko Matsushita, Takahiro Niikura, Ryosuke Kuroda, Tomoyuki Matsumoto | 4. 巻 12(1) |
| 2. 論文標題 Cryopreserved human adipose-derived stromal vascular fraction maintains fracture healing potential via angiogenesis and osteogenesis in an immunodeficient rat model | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Stem Cell Research & Therapy | 6. 最初と最後の頁 110 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13287-021-02182-3. | 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 - |

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 亀長智幸, 松本知之, 高山孝治, 林申也, 橋本慎吾, 黒田雄一, 壺坂正徳, 高島良典, 黒田良祐 |
| 2. 発表標題 脂肪由来幹細胞の難治性骨折に対する治癒促進効果 |
| 3. 学会等名 第34回日本整形外科学会基礎学術集会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Tomoyuki Kamenaga, Tomoyuki Matsumoto, Koji Takayama, Masahiro Fujita, Kenichi Kikuchi, Yoshinori Takashima, Masanori Tsubosaka, Koji Fukuda, Shingo Hashimoto, Shinya Hayashi, Ryosuke Kuroda |
| 2. 発表標題 Therapeutic effects of adipose derived regenerative cells for fracture healing using rat unhealing fracture model. |
| 3. 学会等名 2019 annual meeting of Orthopaedic Research Society |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 亀長智幸, 松本知之, 高山孝治, 林申也, 橋本慎吾, 黒田雄一, 壺坂正徳, 高島良典, 黒田良祐 |
| 2. 発表標題 脂肪由来幹細胞の難治性骨折に対する治癒促進効果 |
| 3. 学会等名 第18回日本再生医療学会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 亀長智幸、松本知之、高山孝治、林申也、橋本慎吾、黒田雄一、壺坂正憲、高島良典、黒田良祐 |
| 2. 発表標題 脂肪由来幹細胞の難治性骨折に対する治癒促進効果 |
| 3. 学会等名 日本再生医療学会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Tomoyuki Kamenaga, Tomoyuki Matsumoto, Koji Takayama, Masahiro Fujita, Kenichi Kikuchi, Yoshinori Takashima, Masanori Tsubosaka, Koji Fukuda, Shingo Hashimoto, Shinya Hayashi, Ryosuke Kuroda |
| 2. 発表標題 Therapeutic effects of adipose derived regenerative cells for fracture healing. |
| 3. 学会等名 2020 annual meeting of Orthopaedic Research Society |
| 4. 発表年 2020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 |
|-------|--|------------------------------------|----|
| 研究分担者 | 林 申也 (Hayashi Shinya) (20437487) | 神戸大学・医学部附属病院・助教 (14501) | |
| 研究分担者 | 橋本 慎吾 (Hashimoto Shingo) (20457089) | 神戸大学・医学研究科・特命助教 (14501) | |
| 研究分担者 | 松下 雄彦 (Matsushita Takehiko) (40467650) | 神戸大学・医学研究科・講師 (14501) | |

6. 研究組織（つづき）

| | 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 |
|-------|---|---|----|
| 研究分担者 | 黒田 良祐 (Kuroda Ryosuke) (80379362) | 神戸大学・医学研究科・教授 (14501) | |
| 研究分担者 | 高山 孝治 (Takayama Koji) (80546490) | 神戸大学・医学部附属病院・医学研究員 (14501) | |

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 |
|---------|---------|
| | |