

令和 2 年 4 月 16 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16649

研究課題名(和文) オリジナルの脂肪由来幹細胞シートを用いた骨欠損再建法の開発

研究課題名(英文) Adipose-derived stem cell sheets accelerate bone healing in rat femoral defects

研究代表者

宇賀治 修平 (Ugaji, Shuhei)

金沢大学・医学系・協力研究員

研究者番号：90782962

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、脂肪由来幹細胞(ADSC)と骨形成誘発ADSCシートの両方がラット遠位大腿骨骨幹端骨欠損モデルで骨治癒を促進できるかどうかを調査した。45匹のラットを3つのグループに割り当てた。(1)対照グループ。(2)ADSCシートグループ。(3)骨形成誘発性ADSCシート群。手術後の毎週のコンピュータ断層撮影スキャンの分析、組織学的分析、およびDilラベリングにより、各グループを評価した。放射線学的、組織学的評価は、穴の一部が手術後4週間でコントロールグループに残存したが、両方のシートグループは完全に復元された。ADSCおよび骨形成誘発性ADSCシートは、骨欠損部で治癒を促進した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨再生医療において骨の欠損は非常に治療難渋し、複数回に及ぶ手術は患者に大きい負担と精神的苦痛を与える。本研究により脂肪幹細胞を用いて骨癒合の促進を促すことができた。脂肪幹細胞自体は非常に簡単に採取が可能で増やすことも可能であり、さらには自己由来の細胞であるために、副作用もほぼないと考えられる。そのためすぐに利用を開始することができる。今後は実臨床でも使用することを考えていける。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we investigated whether both adipose-derived stem cell (ADSC) and osteogenic-induced ADSC sheets could promote bone healing in a rat distal femoral metaphysis bone defect model. Forty-five rats were randomly assigned to three groups: (1) control group; (2) ADSC sheet group; or (3) osteogenic-induced ADSC sheet group. Radiological and histological evaluations showed that a part of the hole persisted in the control group at four weeks after surgery, whereas the hole was restored almost completely by new bone formation in both sheet groups. The ADSC and the osteogenic-induced ADSC sheets promoted significantly quicker bone healing in the bone defect. Moreover, the osteogenic-induced ADSC sheet may be more advantageous for bone healing than the ADSC sheet because of the higher number of osteocalcin positive osteoblasts via the transplantation.

研究分野：整形外科

キーワード：脂肪幹細胞 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

巨大な骨欠損の治療は長期の時間と患者負担を要することから、その治療は国内外でも広く研究されている。同時に脂肪幹細胞を用いた再生医療も広く研究が行われている。当研究室では脂肪幹細胞を用いて骨、軟骨、腱、神経の作成に成功している。その脂肪幹細胞を当研究室で完全オリジナルのシート状にすることに成功した。その自己脂肪由来幹細胞シートは骨に分化することも確認されている。2017年3月に行われたアメリカ整形外科学会においてもその可能性は評価されている。本研究は、それを用いて骨欠損に対して、より効果的に骨欠損を再建、促進することを目的とする。

重度の骨折や骨腫瘍、骨感染症の切除後など大きな骨欠損を生じ治療に難渋する症例がある。当科ではこれまで臨床において、骨延長術、液体窒素処理骨を用いた骨欠損の再建(骨腫瘍再建)の治療を行ってきた。その技術は独創性、症例数において世界屈指であると自負する(Tsuchiya H, J Ortho Sci, 2003)。しかしながら、これらの治療は正常組織を犠牲にすることや、生物学的に元に戻るには長時間を要するといった欠点を有する。また、現在の社会的要求として早期退院、早期社会復帰が求められており、本実験は、この社会背景を考慮した実験である。

2. 研究の目的

本研究の目的は骨欠損部に対して、脂肪幹細胞シートを用いた再生医療で「より早く、より正常な」骨を再生させ、生物学的な欠損部の連続性を持たすことを目的とする。

本研究の特色であり、独創的な点は、以下の二つがあげられる。細胞投与による再生治療において、これまで細胞を移植部にとどまらせることが困難であった欠点を、簡易な方法でシート状にすることにより、その場に留めることを可能にした点と、骨形成に必須と考えられている骨膜を人工的に幹細胞から骨、血管内皮、軟骨に分化誘導させることにより、それぞれに特化した骨膜として骨癒合促進作用が期待できる点の2点である。ラットにおいて本技術が確立されたあかつきには、すぐにでも臨床試験がおこなえる。なぜなら、脂肪由来幹細胞の技術はすでに乳房再建などで臨床試験が行われており、ヒトに対しての安全性が確立されている技術であるからである。そのため、効果が認められれば、早期に『自己由来脂肪幹細胞シートを用いた骨欠損部の骨形成促進』の臨床試験が行えると考える。最終的に、これまでシートなしでは治癒しなかった症例を治癒させ、シートを用いることで治療期間を大幅に短縮可能になると期待される。この技術が一般化したならば、難治性骨欠損の治療に革命をもたらし、患者に帰する大いなる福音となる。また本研究計画によって、脂肪由来幹細胞シートを利用した骨形成促進治療を臨床応用に展開する為の基盤を確立できると考える。

3. 研究の方法

脂肪由来幹細胞(ADSC)と骨形成誘発 ADSC シートの両方がラット遠位大腿骨幹端骨欠損モデルで骨治癒を促進できるかどうかを調査した。12週齢のラットの各遠位大腿骨に、直径1mmの貫通穴の欠損を開けた。45匹のラットを無作為に3つのグループに割り当てた。(1)対照グループ、(2)ADSCシートグループ、(3)骨形成誘発性ADSCシート群。手術後の毎週のコンピューター断層撮影スキャンの分析、組織学的分析、およびDiIラベリング(移植後の細胞追跡のための膜染色法)により、各グループを評価した。

4. 研究成果

放射線学的および組織学的評価は、穴の一部が手術後4週間でコントロールグループに継続したことを示しましたが、穴は両方のシートグループの新しい骨形成によってほぼ完全に復元されました。骨欠損領域の骨密度の平均値(ハウズフィールド単位)は、術後4週間で、両方のシート群で対照群($p=0.05$)よりも有意に高かった。特に骨形成誘発性ADSCシート群では、骨欠損部に多数のオステオカルシン陽性骨芽細胞が観察されました。新たに形成された骨のDiI標識は、各シートが手術後4週間で骨組織に分化したことを示した。ADSCおよび骨形成誘発性ADSCシートは、骨欠損部で骨の治癒を大幅に促進した。

さらに、骨形成誘発性ADSCシートがADSCシートよりも効果的に骨の治癒を促進するかどうかをさらに検討した。組織学的検査では、骨形成誘発ADSCシート群で骨構造のリモデリングが大幅に進行していることが観察され、オステオカルシン免疫染色により、骨形成誘発ADSCシートのオステオカルシン陽性骨芽細胞の含有量が有意に高かった。ただし、X線撮影の評価では、シートのCT画像での外観に大きな違いはなかった。また、骨欠損部の骨密度の平均値は、骨形成性のADSCシート群の方がADSCシート群よりも高くなる傾向があったが、シート群間に有意差はなかった。骨形成分化BMSCシートを使用してラットの骨欠損モデルを修復した研究では良好な結果が報告されているが、これらの研究では骨形成分化BMSCシートと非骨形成BMSCシートの比較は行われていなかった。軟骨形成分化したBMSCは、大規模なラット大腿骨欠損における軟骨内骨化の促進に有益であるとも報告されている。さらにADSCは骨形成誘発性ADSCと比較して原始幹細胞であり、組織修復を改善するためにより多くのサイトカインを分泌する可能性があるため、骨形成分化以外の要因が骨の治癒を促進する可能性がある。これらのプロセスの詳細を調査するには、さらなる実験系が必要だろう。

本研究にはいくつかの制限があった。最初に、骨の修復を行うためのシートの最適な量を確認しなかった。たとえば、過剰に移植された細胞シートは骨のリモデリングを妨げる可能性があるが、少なすぎるとデッドスペースを残したり、他の問題を引き起こす可能性がある。第二に、骨折モデルよりも骨折の症例が多く発生するために、骨折モデルで ADSC または骨形成誘発性 ADSC シートの能力を検証しなかった。第三に、より大きな動物またはより大きな骨欠損モデルでのシートの有効性を実証していない。

以上より、私たちの研究は、自家 ADSC と骨形成誘発性 ADSC シートが *in vivo* で骨欠損の骨治癒を促進することを示した。各自家移植方法の有効性のため、差し迫った臨床応用のためにこれらの新しい細胞ベースの研究を開発し続けたいと考えている。その後の研究では、分泌されたサイトカインと ADSC および骨形成誘発性 ADSC シートとの関係を調査する予定である。ADSC および骨形成誘発性 ADSC シートを使用した骨欠損修復プロセスも、サイトカイン分子レベルで理解する必要がある。さらに、手術部位の生体力学的状態も将来の研究で評価する必要がある。現在の調査結果は、人間の骨の外傷または腫瘍切除後の骨形成を最終的に促進するための基盤となるだろう。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 吉田泰久, 松原秀憲, 宇賀治修平, 濱田知, 土屋弘行
2. 発表標題 脂肪由来幹細胞シートによるラット大腿骨骨孔モデルの骨修復促進効果
3. 学会等名 日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2018年～2019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
--	---------------------------	-----------------------	----