

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：12602

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06188

研究課題名(和文) ヒト成熟骨芽細胞を用いた新規骨折治療法の開発

研究課題名(英文) Development of new strategy for fracture treatment by human mature osteoblast

研究代表者

藤田 浩二 (Fujita, Koji)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：80451970

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト成熟骨芽細胞を用いた新規骨折治療法開発のための基盤研究を行った。ヒト骨検体から成熟骨芽細胞を抽出するプロトコルにおいて、使用するコラゲナーゼの検討を行い、より効率の良い手技を確立した。さらに、ドナーの糖尿病が骨芽細胞に与える影響を、遺伝子発現解析で明らかにした。将来のヒトへの臨床応用に向けて、ラットへの移植実験を行っている。

研究成果の概要(英文)：The aim of our research is to develop a new strategy of fracture healing by using human mature osteoblast, and in this project we finished a couple of steps. First, we modified the protocol of osteoblast isolation by using new collagenase. With this, the efficacy of isolation increased 2-3 times. Second, we analyzed the effect of donors' disease on gene expression of osteoblast. As a result, we found diabetes changed the gene expression significantly. Finally, we started the experiments of transplant of human mature osteoblast to rat model to evaluate the bone formation ability.

研究分野：整形外科

キーワード：成熟骨芽細胞 骨粗鬆症

## 1. 研究開始当初の背景

高齢化の進行に伴い骨粗鬆症患者数は急増しており、特に骨粗鬆症による脆弱性骨折は寝たきりの原因の第2位になっている。骨代謝は骨芽細胞による骨形成と破骨細胞による骨吸収のバランスで成り立っているが、骨粗鬆症により骨代謝回転が吸収に偏った骨では、骨折部の癒合に時間がかかる。このため、既存の骨折治療法では癒合まで長期の骨折部安静を要し、この間に移動能力が低下し寝たきりを引き起こす。できるだけ早く骨癒合を得られる骨折治療法の開発は、寝たきりの予防効果が期待され、その社会的需要は大きい。

骨折部に細胞を移植し、骨癒合を促進する方法は広く研究されている。骨髄細胞 (Goelら *Injury* 2005) や自家末梢血由来幹細胞 (Matsumotoら *Am J Pathol.* 2006) の移植は一定の成果が報告されているが、その機序には不明な点も多い。また、iPS細胞による骨折治療法 (Hayashiら *Cell Transplant.* 2012) は、腫瘍化の危険性もあり実用には至っていない。

申請者は、骨代謝調節機構の解明に取り組んでいる (申請者ら *Nature Med.* 2012、福田、申請者ら *Nature* 2013)。ヒト成熟骨芽細胞は体内でまさに骨形成を行っているため、強い骨形成能を持つことは以前から知られていたが、骨表面に強く吸着し単離が困難であった。このため、未分化幹細胞を培養分化させて入手する方法が一般的であったが、培養操作は細胞形質を大きく変化させ、*in vitro* の細胞状態とは異なるとされていた。申請者らは「ヒト骨検体から成熟骨芽細胞だけを抽出する方法」を開発、報告した (*Osteoporosis Int.* 2014)。この方法では、約4時間で微小な骨検体から成熟骨芽細胞だけを培養を経ずに抽出可能である (図1)。本研究計画では、このヒト成熟骨芽細胞を骨折部に移植する新規骨折治療法開発のための基盤研究を行う。本

人の骨から採取した細胞を、培養を経ずにその日のうちに本人の骨折部に移植する治療法の開発であり、免疫反応や腫瘍化、培養操作に伴う細胞の変性を避けることができ、時間的、経済的にも優れる方法であると考える。

## 2. 研究の目的

ヒト成熟骨芽細胞は生体内でまさに骨形成を行っている状態であり、強い骨形成能を持つ。本研究では、この細胞を骨折部に移植し、従来の方法より早く、確実に、骨癒合が得られる新規骨折治療法の開発のための基盤研究を行う。

本研究では、申請者らの開発した手法で抽出したヒト成熟骨芽細胞が、骨折治療に十分な骨形成能を持つかをまず評価し、続いて、骨癒合を促進するかを、ラットを用いた実験で検討する。さらに、骨折部への細胞移植にあたり、骨癒合に最適な担体と細胞数、移植方法などの至適条件をラットにおいて検討し、研究期間内に明らかにする。

続いて、ラットの骨折モデルにおいて、ヒト成熟骨芽細胞を人工骨とともに至適条件で移植し、細胞を移植しない人工骨移植術、ヒト自家骨移植術といった従来治療法と比較し、骨癒合の速度について検討する。ヒト成熟骨芽細胞と人工骨を骨折部に移植することで従来治療法より早く、確実に骨癒合することを明らかにする。

## 3. 研究の方法

- (1) 一定のヒト骨検体から十分な量のヒト成熟骨芽細胞が採取できるかを検討する。
- (2) 採取した成熟骨芽細胞のダメージを計測し、骨折治療に用いることができるかを検討する。さらに、この遺伝子発現をリアルタイムPCR法とマイクロアレイ法により検討し、骨折治療に十分な骨形成能を持つかを検討する。

(3) ドナーの既存疾患のうち、特に 型糖尿病病が、成熟骨芽細胞の遺伝子発現に影響するかを、リアルタイム PCR 法とマイクロアレイ法で検討する。

(4) 市販の人工骨にヒト成熟骨芽細胞を吸着させる方法を検討し、骨折治療に最適な条件を決定する。

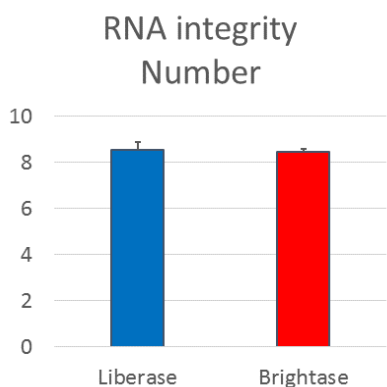
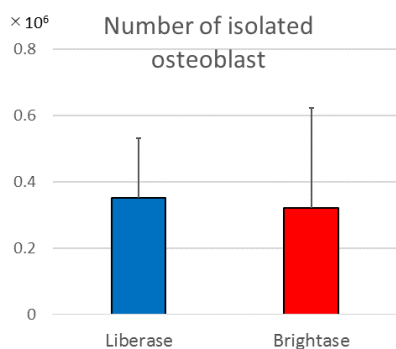
(5) ニードラット骨折モデルを用いて、ヒト成熟骨芽細胞と担体を移植する条件を最適化する。

(6) ニードラット骨折モデルを用いて、骨癒合速度をヒト自家骨移植術と比較検討する

#### 4 . 研究成果

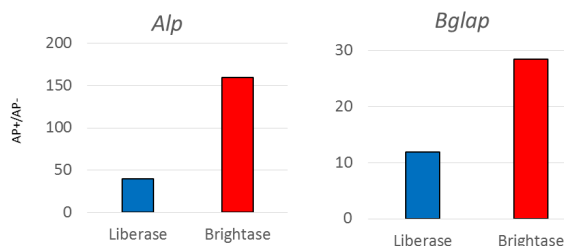
(1) 40 のヒト骨検体から成熟骨芽細胞を採取した。ヒト骨検体は平均 500 mg で、ヒト成熟骨芽細胞は平均  $0.8 \times 10^6$  個であった。

(2) 成熟骨芽細胞抽出に使用するコラゲナーゼを Liberase と Brightase の 2 種とし、同一人サンプルを等分し、同時に抽出を行って、その効率と細胞へのダメージを検討した。



その結果、いずれのコラゲナーゼでもほぼ同数の成熟骨芽細胞採取が可能であり、また RNA integrity number で計測した細胞へのダメージもほぼ同等であった。

続いて、この 2 種のコラゲナーゼにより抽出した細胞の遺伝子発現をリアルタイム PCR 法で検討した。



その結果、いずれの細胞も骨形成関連遺伝子を強く発現していたが、Brightase®で抽出した場合の方が、より発現が増強していたことがわかった。

(3) 型糖尿病も持つ骨検体と持たない骨検体から成熟骨芽細胞を採取し、その遺伝子発現をリアルタイム PCR 法とマイクロアレイ法で比較した。その結果、骨形成と糖代謝の両方にかかわるいくつかの遺伝子の発現が

型糖尿病も持つ骨検体で上昇していた。今後、これらの遺伝子が糖尿病による骨代謝異常や骨質低下の原因となるかを検討し、糖尿病患者の骨折治療へ応用する予定である。

(4) 市販の人工骨のうち、リフィット 1g にヒト成熟骨芽細胞 ( $1 \times 10^6$  個) を吸着させ、ラットの皮下組織内に移植、骨形成を検討している。今後、骨形成に最適な移植条件を決定する予定である。

(5)(6) ニードラット骨折モデルを用いた検討を現在開始しており、今後、その有効性を検討する予定である。

#### 5 . 主な発表論文等

( 研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線 )

〔学会発表〕(計 4 件)

藤田浩二 ローヤルゼリーのヒト成熟骨芽に対する効果の検討 第8回山田養蜂場みつばち研究助成基金成果発表会 2017年3月3日 ホテルメルパルク岡山 (岡山県・岡山市)

藤田浩二、鍋木秀俊、若林良明、加藤龍一、大川淳 Distal Radius Fracture Patients Show Declined Ability of Dynamic Body Balancing 第71回米国手外科学会 2016年9月30日 (Austin, USA)

藤田浩二、鍋木秀俊、若林良明、大川淳 Distal radius fracture patients show declined ability of dynamic body balancing. International Federation of Societies for Surgery of the Hand 2016年10月26日 (Buenos Aires, Argentina)

鍋木秀俊、藤田浩二、大川淳 Distal radius fracture patients show declined ability of dynamic body balancing. ASBMR 2016 2016年9月10日 (Denver, USA)

〔その他〕

ホームページ等

東京医科歯科大学整形外科

<http://tmdu-orth.jp/clinical/hand/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤田 浩二 (FUJITA, Koji)

東京医科歯科大学大学院・医歯学総合研究科・整形外科学分野・助教

研究者番号：80451970