

令和 5 年 5 月 10 日現在

機関番号：34401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2022

課題番号：18K17007

研究課題名(和文) 脂肪由来幹細胞とW9ペプチドを用いた新たな骨再生治療の開発

研究課題名(英文) Development of a novel bone regeneration therapy using adipose-derived stem cells and W9 peptide

研究代表者

大槻 祐喜(Yuki, Otsuki)

大阪医科薬科大学・医学部・講師

研究者番号：70631969

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：In vitro：コントロール群では石灰化による結晶はアリザリンレッド染色で確認できなかったが、W9(骨分化誘導ペプチド)による骨分化誘導群で石灰化による結晶成分が見られた。しかし400-450nmでの吸光度測定では統計学的に有意差はなかった。

In vivo：

ネガティブコントロール：動物実験用CTにて肉芽組織の増生所見がみられた。1μg W9 ペプチド(投与+脂肪幹細胞移植：動物実験用CTにて軟部組織の肥大はみられたが、石灰化はきたさなかった。1μg W9ペプチド(WP9QY：骨分化誘導ペプチド)+10μg BMP-2移植：対側と比較して皮下組織の増生を認めるが、石灰化は認めなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

in vitroの実験でアリザリンレッド染色にて石灰化沈着を認めたが、in vivoの実験では各群脂肪幹細胞を移植した部位に皮下組織の増生などが見られるもののW9ペプチドによって石灰化沈着などの骨分化誘導を引き起こさなかった。これはW9の骨分化誘導が単純な皮下組織内の環境で骨分化作用を誘導できるほどの安定的なペプチドではなく、安定的に働くための周囲の環境(足場の工夫)が必要であり、臨床の現場で脂肪幹細胞とW9ペプチドを用いた血管柄付き骨皮弁を作成するためにはよりW9を有効に働かせるための足場の工夫が必要であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In vitro: In the control group, no crystallization by calcification was observed by Alizarin Red staining, but crystallization due to osteogenic induction by W9 peptides (osteogenic induction peptides) was observed. However, there was no statistically significant difference in absorbance measurement at 400-450nm.

In vivo: Negative control: Histologically, an increase in granulation tissue was observed in the CT. Administration of 1 μg of W9 peptides + adipose-derived stem cell transplantation: Histologically, soft tissue hypertrophy was observed in the CT, but no calcification was observed. Administration of 1 μg of W9 peptides + transplantation of 10 μg of BMP-2: Histologically, an increase in subcutaneous tissue proliferation was observed compared to the contralateral side, but no calcification was observed.

研究分野：形成外科

キーワード：骨分化誘導 W9ペプチド BMP-2 ラット 再生医療

1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍の切除後、外傷後、先天異常など、何らかの原因によって生じた骨欠損に対する治療オプションとして、近年再生医療が注目されている。骨欠損に対する治療として、現在臨床現場で最も標準的な術式は自家骨移植であるが、採取した部位の疼痛や小児の場合は成長障害をきたす可能性がある等解決すべき問題点がある。その採取部位は腸骨、肋骨、頭蓋骨、脛骨、腓骨、肩甲骨など様々な部位が挙げられるが、どの部位においてもドナーの犠牲の問題は残る。近年組織工学的手法を用いた骨再生の研究が試みられている。これは骨移植のドナーの犠牲を軽減するため、骨に分化する可能性を持つ間葉系幹細胞を採取・培養・分化させ、骨欠損部へ移植する方法であるため、実際の骨を採取することがなくドナーの問題を最小限に抑えることができる。骨分化能を有する最も認知度の高い細胞として骨髄系幹細胞が挙げられるが、骨分化への信頼性は高い反面、幹脂肪を採取するには骨を犠牲にしなければならないという問題点が残る。一方で近年骨再生に用いる他の幹細胞として脂肪由来幹細胞(Zuk ら 2001 年)が挙げられる。脂肪由来幹細胞は骨髄系幹細胞と比較して採取する際のドナーの犠牲が少く、また骨髄系幹細胞と比較して、一度に採取できる量が多いことも有利な点であると指摘される(Liao ら World J Stem Cell 2014)。そのため今回我々の実験では、骨再生に対する幹細胞として、この脂肪由来幹細胞を用いることとした。また一方で骨分化を促す薬剤として、どの骨分化誘導シグナルを用いるかも重要となってくる。Bone morphogenetic protein 2 (BMP2)は最も重要な骨分化誘導シグナルであり、現在 FDA に認可されている唯一の臨床使用可能な薬剤であるが、臨床症例での合併症(Robin ら Spine 2010)も報告されており、使用には慎重を要する。そのため BMP2 と同等以上に臨床効果の見込める他の薬剤の出現も望まれる状況である。

W9 peptide(W9)は、従来は Receptor Activator of Nuclear factor- κ B Ligand (RANKL)を阻害することにより破骨細胞の分化を抑制させる物質として知られていた(Aoki ら J. Clin. Invest 2006)。しかしその後、骨髄系幹細胞に対して W9 は直接的に非常に強い骨分化誘導作用があることが報告(Furuya J Biol Chem 2013)されており、今回我々は間葉系幹細胞を骨分化させるシグナルとしてこの薬剤に注目した。

2. 研究の目的

以上を背景として、今回我々は前述の脂肪由来幹細胞、W9 ペプチドを用いてドナーの犠牲を最小限とした骨の再生治療を考案する。

3. 研究の方法

In vitro:

ラット皮下脂肪由来間葉系幹細胞(コスモバイオ社)に対してネガティブコントロール群(DMEM-F12 のみ)、500ng/ml BMP-2 による骨分化誘導群、100 μ g W9 による骨分化誘導群の 3 群に分けて骨分化誘導について評価を行った。

評価としてはアリザリンレッド染色による石灰化の程度を吸光度を用いて評価を行った。

In vivo:

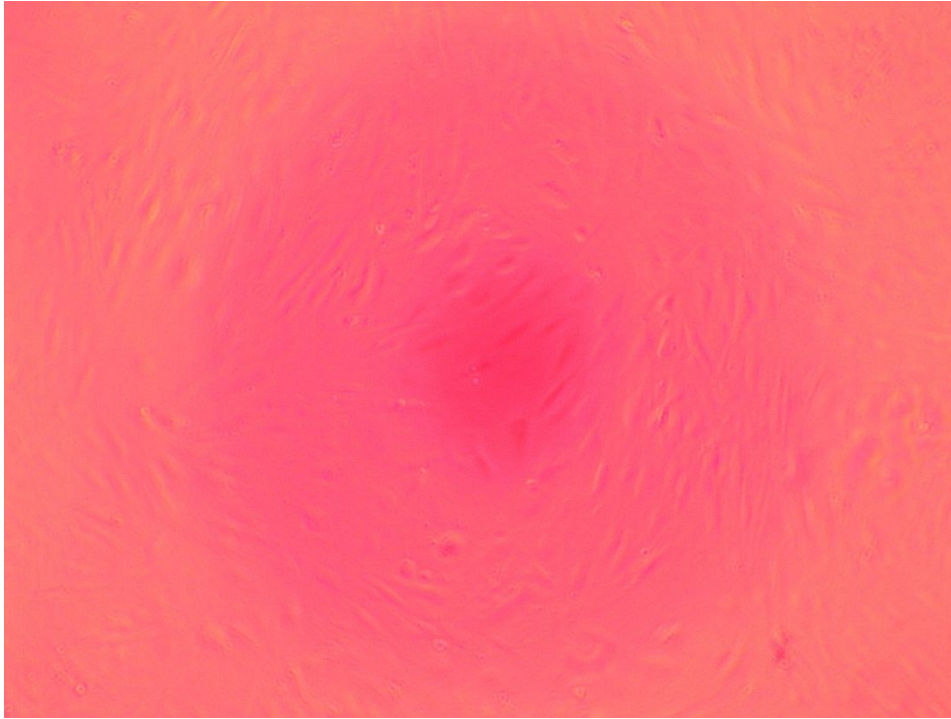
ラット皮下脂肪由来間葉系幹細胞(コスモバイオ社)に対してラット(F344/N ラット)の浅大腿動静脈にラット皮下脂肪由来間葉系幹細胞(コスモバイオ社)を移植し、骨分化誘導を行い、人工骨皮弁を作成する実験を行った。ラット(F344/N ラット)を筋肉注射麻酔(三種混合麻酔:ドミトール 0.15mg/kg、ベトルファール 2.5mg/kg、アルファキサン 4mg/kg)した。大腿部を剃毛した後、皮膚切開を加え、浅大腿動静脈を露出・剥離し、浅大腿動静脈を血管茎とした動脈皮弁を挙上した。挙上した皮弁の皮下脂肪内にコラーゲンスポンジ 35mm ディッシュ用(KOKEN 社)に 1×10^6 の P1 ラット皮下脂肪由来間葉系幹細胞を混入させて移植した(ネガティブコントロール群)。次に同様に挙上した皮弁の皮下脂肪内にコラーゲンスポンジ 35mm ディッシュ用(KOKEN 社)に 1×10^6 の P1 ラット皮下脂肪由来間葉系幹細胞を混入させ 1 μ g W9 ペプチド(WP9QY:骨分化誘導ペプチド)をしみこませたもの(W9 骨分化誘導群)を移植した。5 日後に動物実験用 CT で移植した部位の評価を行った。次に同様に挙上した皮弁の皮下脂肪内にコラーゲンスポンジ 35mm ディッシュ用(KOKEN 社)に 1×10^6 の P1 ラット皮下脂肪由来間葉系幹細胞を混入させ 1 μ g W9 ペプチド(WP9QY:骨分化誘導ペプチド)と 10 μ g BMP-2 を混入したものを移植し、さらに POD1,2,3 日目に W9 ペプチド(WP9QY:骨分化誘導ペプチド)1mg を移植した部位の皮下に追加注射を行い、骨分化を促した。術後 7 日目で動物実験用 CT で同部位を評価した。

4 . 研究成果

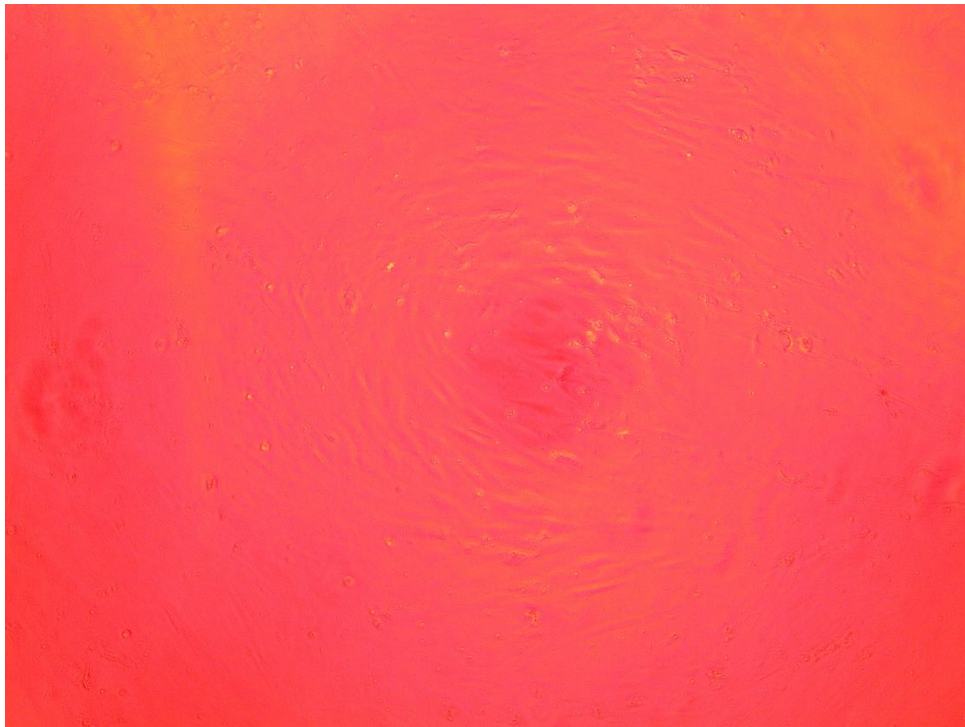
In vitro :

コントロール群では石灰化による結晶はアリザリンレッド染色で確認できなかったが、W9 による骨分化誘導群で石灰化による結晶成分が見られた。しかし 400-450nm での吸光度測定では統計学的に有意差はなかった。

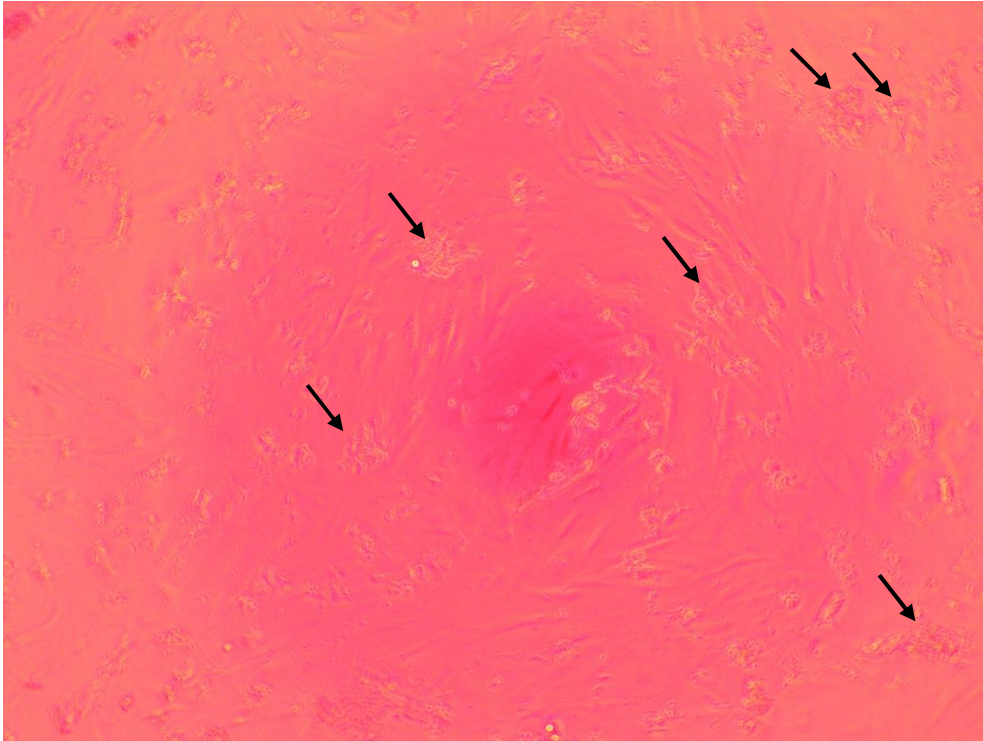
ネガティブコントロール群



BMP-2 骨分化誘導群



100 μ g W9 による骨分化誘導を行ったラット皮下脂肪由来間葉系幹細胞をアリザリンレッド染色した像。(黒矢印：石灰化沈着部)



石灰化の結晶を確認できる。

In vivo :

ネガティブコントロール群：動物実験用 CT を撮影し、肉芽組織の造成に伴う皮下組織の肥大所見はみられた。

1 μ g W9 ペプチド (WP9QY : 骨分化誘導ペプチド) 投与群：動物実験用 CT を撮影し肉芽形成に伴う軟部腫瘍の肥大まではみられたが、骨分化を示す石灰化はきたしていなかった。

1 μ g W9 ペプチド (WP9QY : 骨分化誘導ペプチド) 投与群：皮下に肉芽の増生はみられるが、石灰化はみられず。



1 μ g W9 ペプチド (WP9QY : 骨分化誘導ペプチド) + 10 μ g BMP-2 投与群 : 対側の皮下組織と比較して皮下組織の増生を認めるが、石灰化は認めない

1 μ g W9 ペプチド (WP9QY : 骨分化誘導ペプチド) + 10 μ g BMP-2 投与群 : 対側の皮下組織と比較して皮下組織の造増生を認めるが、石灰化は認めない。



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 (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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------