

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K18019

研究課題名(和文)細胞治療の観点から行うペルテス病の新規治療法の開発

研究課題名(英文) Effects of bone marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation in piglet Legg-Calve-Perthes disease models

研究代表者

都丸 洋平 (Tomaru, Yohei)

筑波大学・医学医療系・客員研究員

研究者番号：80850453

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,900,000円

研究成果の概要(和文)：豚ペルテス病モデルに対して、ドリリングののちに間葉系幹細胞を移植した大腿骨頭と、ドリリングのみを行った大腿骨頭でその経過を比較した。ペルテス病モデル作成し、術後4週にドリリング後に骨髓血から分離培養した間葉系幹細胞移植を行った大腿骨頭と、ドリリングのみ行った大腿骨頭に関して放射線学的形態評価、病理学的精査、比較を行った。ドリリング後4週間毎にレントゲンで骨頭形態を評価した。間葉系幹細胞を移植した骨頭の圧潰を軽減することができた結果だった。14週間で安楽殺を行い骨頭を摘出した。病理学的、CTでの精査では、明らかな骨性架橋の生成はなく、安全性を確認することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ペルテス病の治療は、免荷による保存療法、もしくは大腿骨、骨盤骨切りによるcontainment療法(大腿骨を骨盤の寛骨臼で包み込むことで球形度を維持する療法)が本邦では行われている。免荷療法の治療期間は1年程度と長く、また、手術療法を行ったとしても重症例の治療成績は十分ではない。今回そこに、新しい選択肢として再生医療学的な治療を組み合わせることができる可能性を提言できたことは社会的意義がある。

研究成果の概要(英文)：We compared the progress between femoral heads that underwent drilling followed by transplantation of MSC, and femoral heads that underwent drilling alone in a porcine model of Perthes disease. After creating the Perthes disease model, we performed transplantation of MSC, which were cultured and separated, four weeks after drilling, in the femoral heads. Radiographic morphological evaluation and histopathological examination were conducted to compare the femoral heads that received MSC transplantation with those that underwent drilling alone. The femoral head morphology was assessed by X-ray at four-week intervals after drilling. The results showed a reduction in femoral head collapse in the group that received mesenchymal stem cell transplantation. Euthanasia was performed at 14 weeks, and the femoral heads were extracted. Histopathological and CT examinations confirmed the absence of physeal bar formation, indicating the safety of the procedure.

研究分野：整形外科

キーワード：ペルテス病 間葉系幹細胞 骨髓血 再生医療

## 1. 研究開始当初の背景

発育性股関節形成不全症は新生児の 1000 人に 1 人、大腿骨頭すべり症発は 10-14 歳の 10 万人あたり男児でおよそ 2.2 人発症し近年増加傾向にある。ペルテス病は 4 歳から 12 歳頃小児期に発症する、特発性の血流障害による大腿骨頭壊死で、年間 600 人程度が罹患している。小児期に骨頭壊死による機能障害が生じることは、時には松葉杖や車椅子の使用を余儀なくされ、残りの長い人生の日常生活の質を永続的に大きく低下させるものであり、小児のみならず青壮年期の将来展望にも大きく影響し、社会的にも大きな損失である。ペルテス病は、発症年齢が若年で、壊死範囲が小さい場合は適切な保存療法での改善が見込めるが、10 歳以上での重症なペルテス病や、骨頭すべり症、発育性股関節形成不全症後の重症な骨頭壊死では大腿骨骨きりなどの手術療法が選択されることが多いが股関節機能の予後は不良である。大腿骨骨きり術は侵襲の高い手術法であり術後も長期の免荷が必要となる。手術はあくまで環境を整えたとえで自然修復に期待する治療で、壊死部に対する根本的な治療とは言い難い。高齢者の大腿骨頭壊死では人工股関節全置換術がよい適応となるが、耐用年数、骨の成熟度の問題から小児期では人工関節は適応とならない。壊死部位を根治的に修復する最善の治療法は未だ確立していないのが現状である。

研究代表者のグループでは、壊死部の再生を目指した細胞治療として、成人大腿骨頭壊死症に対して我々が開発した骨髄血移植術による治療を行っており、自然経過群と比較して骨髄血移植を行った治療群で有意に骨頭圧潰を抑制した研究成果を報告している(Tomaru Y. BMC musculoskeletal disorders. 2017; Tomaru Y. BMC musculoskeletal disorders 2019; Tomaru Y. International Orthopaedics 2018. Tomaru Y. Cureus. 2022; Tomaru Y. J of Rural Medicine. 2021)。しかし、小児に対する治療経験はなく、小児骨頭壊死に対する骨髄血移植の治療効果は未知である。世界的に見ても骨髄血を用いた小児骨頭壊死病に対する細胞治療は行われた報告はなくこれまでにない新しい治療法になる可能性がある。骨髄血移植術は壊死部の骨再生を目指す根治的な新規性のある治療であり、かつ低侵襲な手術であり早期の社会復帰も可能な治療法である。

## 2. 研究の目的

ブタペルテス病モデルにおける骨髄由来間葉系幹細胞移植の有効性と安全性を調査すること

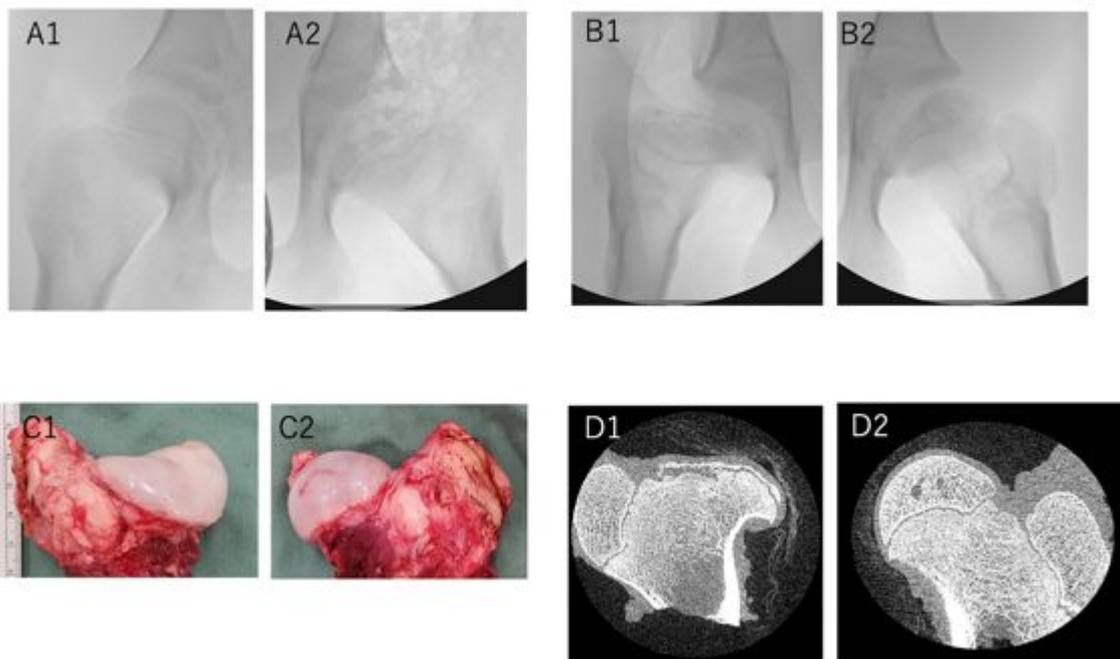
## 3. 研究の方法

ペルテス病モデルを 2 頭のランドレース豚(それぞれ 6 週齢、体重 12kg および 7 週齢、体重 17kg)で作成した。大腿骨頭の結紮を行いモデルを作成した。最初の仔ブタでは、Legg-Calve-Perthes 病の自然経過を観察した。2 番目の仔ブタでは、大腿骨頭の結紮から 4 週後に、両骨頭に穿孔術を行い、左の大腿骨頭に  $2.44 \times 10^7$  個の骨髄由来間葉系幹細胞を含む培養液を移植した。単純 X 線写真は 4 週ごとに撮影され、骨端の最大高を骨端の最大直径で割った epiphyseal quotient (EQ)を算出した。手術後 14 週で仔ブタは屠殺され、大腿骨頭は摘出され、外観的に、病理学的に、および CT 撮影を用いて評価した。移植された細胞の特性はフローサイトメトリーにより評価した。

## 4. 研究成果

最初の仔ブタの両方の大腿骨頭と、2 番目の仔ブタの右股関節で骨端の圧潰が生じた。2 番目の仔ブタの右大腿骨頭における手術直後および手術後 14 週の EQ はそれぞれ 0.40、0.14 であり、左大腿骨頭ではそれぞれ 0.30、0.42 で、2 頭目のブタの左の大腿骨頭の圧潰予防効果が観察された(図 1)。ヘマトキシリン・エオシン染色では、骨性架橋や腫瘍細胞の形成は観察されなかった。移植された細胞は CD44、CD105、CD29、および CD31 に対してそれぞれ 99.2%、65.9%、18.2%、および 0.16%の陽性だった。予備実験ではあるが、本研究においては骨髄由来間葉系幹細胞移植が骨頭圧潰を予防した可能性がある。

図1 2頭目のブタのレントゲン、肉眼写真、CT画像



A1: 第1回手術当日の右大腿骨頭 正面単純X線画像

A2: 第1回手術当日の左大腿骨頭 正面単純X線画像

B1: 第1回手術14週後の右大腿骨頭 正面単純X線画像

B2: 第1回手術14週後の左大腿骨頭 正面単純X線画像

C1: 第1回手術14週後の右大腿骨頭 肉眼画像

C2: 第1回手術14週後の左大腿骨頭 肉眼画像

D1: 第1回手術14週後の右大腿骨頭 CT画像

D2: 第1回手術14週後の左大腿骨頭 CT画像

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 0件）

1. 著者名 Yohei Tomaru	4. 巻 -
2. 論文標題 Effects of bone marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation in piglet Legg-Calve-Perthes disease models: A pilot study	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Pediatric Orthopaedics	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） なし	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 -

〔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
---------	---------