

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791529

研究課題名(和文)自己脂肪由来幹細胞移植による骨再生促進とそのメカニズムの解析

研究課題名(英文)Uncultured Autogenous Adipose-derived Regenerative Cells Promote Bone Formation During Distraction Osteogenesis

研究代表者

渡邊 孝治(Watanabe, Koji)

金沢大学・医学系・協力研究員

研究者番号：90584839

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円、(間接経費) 600,000円

研究成果の概要(和文)：自家脂肪組織から容易に作成可能である脂肪由来再生細胞を延長仮骨に移植することで、仮骨延長法での骨成熟の促進が可能であるかを検討した。60匹のラットを3群に分け、骨延長終了時に生理食塩水を投与したコントロール群、コラーゲンゲルのみを投与したコラーゲンゲル群、脂肪由来再生細胞とコラーゲンゲルを投与したADRC群を作成した。

移植後6週のADRC群の延長仮骨骨密度は、コントロール群と比較し46%上昇し、骨折強度は66%上昇した。ADRC群の延長仮骨内では、BMP-2、VEGF、SDF-1のRNA量が増加していた。細胞ラベリングでは移植したADRCの骨組織への分化が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The question of this study was whether uncultured adipose-derived regenerative cells(ADRCs), which can easily be isolated from autologous adipose tissue and contain several types of stem and regenerative cells, promote bone formation in distraction osteogenesis. Sixty rats were randomly assigned to 3 groups. Physiological saline (control group), Type I collagen gel, or a mixture of ADRC and Type I collagen gel (ADRC group) was injected into the distracted callus immediately after distraction termination.

The bone density of the distracted callus in the ADRC group increased by 46% compared with the control group at 6 weeks after injection. The fracture strength in the ADRC group increased by 66% compared with the control group at 6 weeks after injection. Real-time PCR of the distracted callus from the ADRC group had higher levels of BMP-2, VEGF A, and SDF-1. Cell labeling in the newly formed bone showed the ADRCs differentiated into osseous tissue at 3 weeks after injection.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：自己脂肪由来幹細胞 体性幹細胞 骨再生 骨延長 骨成熟促進

1. 研究開始当初の背景

(1) 整形外科領域における悪性骨腫瘍手術は、過去の切断術から現在は患肢温存手術が標準術式となっている。患肢温存手術でも、骨肉腫などの悪性骨腫瘍の発症が青少年期に多いことと鑑みると、子供の高い活動性に耐える再建方法が望まれ、人工関節よりむしろ生物学的に活性のある自己の骨を利用した再建が望まれる。このような命題に対し我々の研究室では、骨腫瘍切除の骨欠損に対し、骨延長術を利用した再建術を主に青少年期の悪性骨腫瘍患者に行い、良好な機能再建を獲得してきた。しかし、この再建方法の最大の欠点は骨の成熟のために治療期間が非常に長くなり、その期間は患児に嵩張る創外固定器を装着させる必要があり、肉体的・精神的に大きな負担をかけることである。

(2) 脂肪組織の中には、未分化な多能性細胞が存在することが明らかになっている。これは、脂肪、軟骨、骨、骨格筋、心筋、腱、神経、血管などへ分化誘導できる可能性が示されている。他の骨髄間葉系幹細胞などくらべると、採取が容易でかつ大量にとることができるため、再生医療でネックとなる培養操作を行わなくても十分な移植細胞数が得られる。世界では臨床試験がすでに始められているが、整形外科分野での応用は少なく、その作用機序も未知な部分が多い。

2. 研究の目的

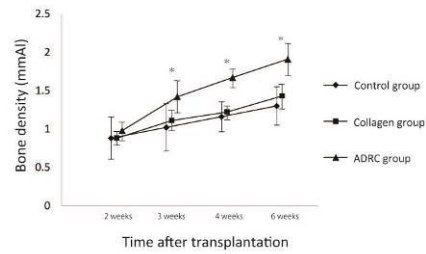
本研究の目的は、骨延長部に脂肪由来幹細胞を移植することで、骨成熟を促進し、治療期間を劇的に短縮することが可能か否かを検証することにある。

3. 研究の方法

実験動物としてはメスの Wister 系ラット週齢 9~11 週を使用する。この動物の大腿骨に創外固定器を装着し、骨切り部での骨延長を行う。これらを延長終了後に何もしないコントロール群、延長部にコラーゲンのみを投与するコラーゲン単独投与群、延長部にコラーゲンと自己由来脂肪幹細胞を投与する脂肪幹細胞投与群の 3 群に分け、画像検査・組織検査・力学検査・蛍光染色法・RT-PCR を行い比較検討する。

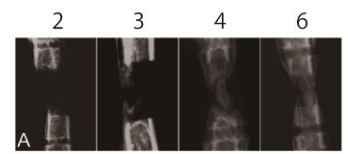
4. 研究成果

(1) 仮骨延長部の骨形成は、脂肪由来再生細胞移植群で促進していた。脂肪由来再生細胞移植群の延長部平均骨塩量は、移植後 3, 4, 6 週で他群と比較し有意に高値であった ($p < 0.05$)。

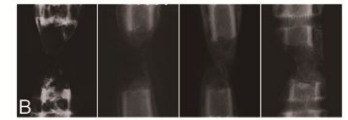


Posoperative and Change(Weeks)

コントロール群



コラーゲングル群

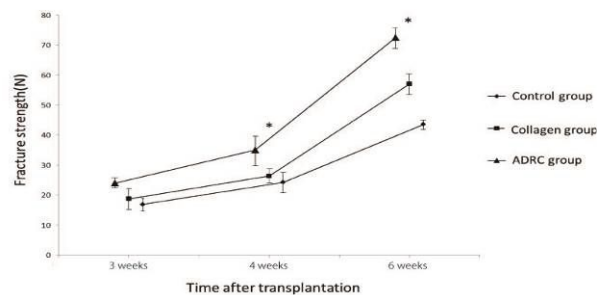


脂肪再生細胞群

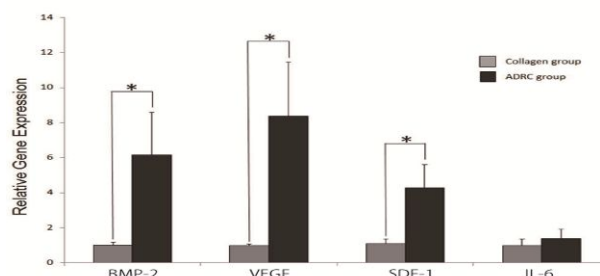


(2) 組織学的には脂肪由来再生細胞移植群で延長部骨梁形成が促進した。コントロール群では仮骨延長部に線維芽細胞様細胞が多く見られたが、脂肪由来再生細胞移植群では成熟した骨梁形成を認めた。

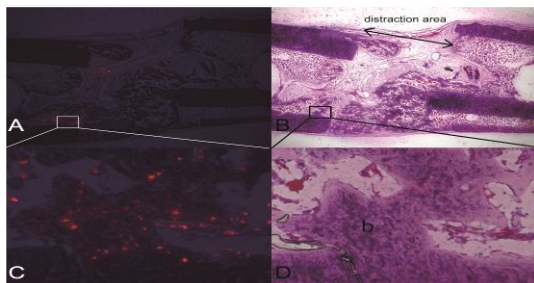
(3) 3点曲げ試験では、移植後 4, 6 週で移植群で有意に高い最大点応力が得られた。



(4) 脂肪由来再生細胞群の延長仮骨は BMP-2, VEGFA, SDF-1 の mRNA の発現が有意に高値であった ($p < 0.05$)。



(5) DiI で蛍光標識した脂肪由来再生細胞は移植後2週で新生骨に生着しており、骨組織への分化が示唆された。



以上の結果から、脂肪由来再生細胞移植は延長仮骨の成熟を促進した。組織学的には、仮骨延長部の血管新生が促進したことにより骨梁の成熟が促進したと考察した。脂肪由来再生細胞は骨髄由来間質細胞と比較し、細胞の採取が簡便かつ大量に可能である。移植に際し培養せず十分に細胞移植が可能であり、感染や免疫反応の危険が低く安全性が高い。自家脂肪由来再生細胞の分離はすでに手技的に確立されており、倫理的な問題が小さいため早期の臨床応用が可能であると考える。

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)

[雑誌論文](計 1 件)

I. Nomura, K. Watanabe, H. Matsubara, K. Hayashi, H. Tsuchiya. Uncultured Autogenous Adipose-derived Regenerative Cells Promote Bone Formation During Distraction Osteogenesis in Rats. Clin Orthop Relat Res. 2014. In press (査読あり)

[学会発表](計 9 件)

I. Nomura, K. Watanabe, H. Matsubara, K. Hayashi, H. Tsuchiya. Adipose-derived regenerative cells promote bone formation on distraction osteogenesis in rats. Annual Meeting of the American Academy of Orthopaedic Surgeons. March 24 2014. USA.

野村一世 林克洋 渡邊孝治 松原秀憲 土屋弘行. ラット脂肪由来再生細胞移植は延長仮骨の成熟を促進する. 日本創外

固定・骨延長学会. 2014年3月7日, 大阪

野村一世 林克洋 渡邊孝治 松原秀憲 土屋弘行. ラット脂肪由来間葉系細胞移植による骨延長部骨形成促進法の開発. 日本整形外科学会基礎学術集会. 2013年10月19日. 東京.

野村一世 林克洋 渡邊孝治 松原秀憲 土屋弘行. ラット脂肪由来再生細胞移植は延長仮骨の成熟を促進する. 第32回日本運動器移植・再生医学研究会. 2013年9月28日. 神戸

I. Nomura, K. Watanabe, H. Matsubara, K. Hayashi, H. Tsuchiya. Autogenous adipose-derived regenerative cells promote bone formation on distraction osteogenesis in rats. Twenty-third Annual Scientific Meeting. Limb Lengthening and Reconstruction Society: ASAMI-North America. July 19 2013. USA

野村一世 林克洋 渡邊孝治 松原秀憲 土屋弘行. ラット脂肪由来再生細胞移植は延長仮骨の成熟を促進する. 第120回中部日本整形外科災害外科学会・学術集会 2013年4月5日. 和歌山.

野村一世 林克洋 渡邊孝治 松原秀憲 土屋弘行. ラット脂肪由来再生細胞移植は延長仮骨の成熟を促進する. 日本生体電気・物理刺激研究会 2013年3月8日. 京都

I. Nomura, K. Watanabe, H. Matsubara, K. Hayashi, H. Tsuchiya. Adipose-derived regenerative cells promote bone formation following distraction osteogenesis in rats. 7th International ASAMI and Bone Reconstruction Meeting. May 23 2012. Greece.

野村一世 林克洋 渡邊孝治 松原秀憲 土屋弘行. ラット脂肪由来間葉系幹細胞移植による仮骨延長部骨形成の促進. 日

本創外固定・骨延長学会 .2012 年 1 月 13
日 . 東京

6 . 研究組織

(1)研究代表者

渡邊 孝治 (Watanabe, Koji)
金沢大学・医学系・協力研究員
研究者番号 : 90584839

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

松原 秀憲 (Matsubara, Hidenori)
金沢大学・医学系・助教
研究者番号 : 10507057