

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462331

研究課題名(和文) 難治性骨折に対するCD34陽性細胞移植術における有効な新規治療法の開発

研究課題名(英文) New Strategy for the Treatment of Fracture Nonunion with CD34-positive Cell Transplantation

研究代表者

松本 知之 (Matsumoto, Tomoyuki)

神戸大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50546588

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：マウス骨折モデルを作成し、Lnk siRNAを含有させたAteloGeneを局所に投与し、血管新生・骨新生の評価、X線、CT、組織、力学的に骨折治癒能を評価し、その有効性を確認した。EPC培養で確立されている成長因子(VEGF, SCF, IL-6, Flt-3lig, TPO)添加幹細胞用培地の骨芽細胞への効果を確認し、免疫不全ラット難治性骨折モデルに増幅させたヒト骨髄由来CD34陽性細胞を局所移植し、血管新生・骨新生の評価、X線、CT、組織、力学的に骨折治癒能を評価し、その有効性を確認した。

研究成果の概要(英文)：Phase 1/2 Clinical trial of CD34-positive cell transplantation for patients with fracture nonunion was successfully performed. However, more effective way should be explored. Therefore, we examined 2 new strategies for this treatment. The first results proved that transplantation of AteloGene with Lnk si RNA contributed to early healing of mouse fracture model. The second results proved that ex-vivo expanded CD34-positive cells with key growth factors improved the efficacy by in vitro expansion culture and in vivo xenotransplantation model (human cell-immunodeficient rat).

研究分野：整形外科

キーワード：CD34陽性細胞 偽関節

### 1. 研究開始当初の背景

一般的に骨折患者では、保存的治療（ギブス、シーネ等による外固定）や観血的骨接合術を行い、骨癒合が得られて治癒するが、骨癒合に至るまでの期間、また日常生活に復帰するまでの期間は決して短いとは言い難い。さらに、全体の骨折の約5%は治療後3ヶ月を経過しても骨癒合が得られずに偽関節に陥り、著しいQOLの低下を招く。その際は、二次的観血的骨接合術・骨移植術が行われるが、二次的手術を行っても骨癒合が得られない症例も多く、主に骨折部の血行不全が原因とされ、血管柄付き骨移植術を行う施設もある。この手術は術者の熟練を要し、侵襲も大きく、理想の治療とは言いがたいのが現状であり、新たな最小侵襲治療の確立が待たれている。

血管内皮前駆細胞(EPC)がヒト末梢血中のCD34陽性細胞として、申請者共同グループにより初めて同定されて以来<sup>1)</sup>、EPC移植による血管再生治療に関する研究が進み、同細胞移植による血管再生治療の基礎・前臨床研究を進展させてきた。その成果として申請者共同グループは2003年から慢性重症下肢虚血患者、2007年からは重症心筋虚血患者に対する同治療のI/II相臨床試験を開始し、試験治療の安全性・有効性を確認している。これらの背景に基づき、我々は末梢血CD34陽性細胞の骨折への応用を想定して基礎実験を集積し<sup>2-6)</sup>、平成20年度より文部省科学研究費（橋渡し研究）の補助も受けて「難治性骨折患者に対する自家末梢血CD34陽性細胞移植による骨・血管再生療法の第1/2相臨床試験」を行い、その安全性・有効性を確認した<sup>7)</sup>。この成果を受けて先進医療へ申請予定であるが、現行臨床試験ではCD34陽性細胞の有効細胞数を移植するためにG-CSFを投与して体内で増幅させた後に移植しているが、副作用の発現が危惧される。この課題を克服すべく新たなCD34陽性細胞数増幅法の確立

が必須となっている。

### 2. 研究の目的

我々は「偽関節患者に対する自家末梢血CD34陽性細胞移植による骨・血管再生療法に関する第1/2相臨床試験」を終了し7症例中7例に骨癒合を得たが、G-CSF使用によるCD34陽性細胞の体内での増幅により必要移植細胞数を獲得しているが、今後G-CSFの副作用が問題となる。この課題を克服すべく1)細胞内アダプター蛋白であるLnk抑制、2)新たな体外増幅法の確立、によるCD34陽性細胞数獲得の可能性を探索すべく前臨床試験的に実験を行う。

### 3. 研究の方法

#### 1. Lnk制御による骨折治癒促進法の確立

マウス骨折モデルを作成し、Lnk siRNAを含有させたAteloGene（アテロコラーゲンゲル）を局所に投与し、Lnkを抑制させ、血管新生・骨新生の評価ならびにX線、CT、組織、力学的に骨折治癒能を評価する。

#### 2. ヒト骨髄由来CD34陽性細胞の体外増幅法の確立およびその有効性評価

EPC培養で確立されている成長因子(VEGF,SCF,IL-6,Flt-3lig,TPO)添加幹細胞用培地の骨芽細胞への効果を確認し、免疫不全ラット難治性骨折モデルを作成し、増幅させたヒト骨髄由来CD34陽性細胞を局所移植し、増幅させない細胞移植と比較し、血管新生・骨新生の評価ならびにX線、CT、組織、力学的に骨折治癒能を評価する。

### 4. 研究成果

本研究は前臨床試験である「偽関節患者に対する自家末梢血CD34陽性細胞移植による骨・血管再生療法に関する第1/2相臨床試験」における課題を克服すべく、1)細胞内アダプター蛋白であるLnk抑制、2)新たな体外増幅法の確立、によるCD34陽性細胞数

獲得の可能性を探索すべく前臨床試験的に実験を行うことを目的としていた。

まず、1)に関しては、マウス骨折モデルを作成し、Lnk siRNA を含有させた AteloGene(アテロコラーゲンゲル)を局所に投与し、Lnk を抑制させ、血管新生・骨新生の評価ならびに X 線、CT、組織、力学的に骨折治癒能を評価し、当初の予定よりも早くその成果を発表することができた。

2)に関しては、EPC 培養で確立されている成長因子(VEGF,SCF,IL-6,Flt-3lig,TPO)添加幹細胞用培地の骨芽細胞への効果を確認し、約 20 倍の増幅率および CD34 陽性率も 60%を維持していることが症例数を重ねることで再確認できた。また、免疫不全ラット難治性骨折モデルを作成し、増幅させたヒト骨髄由来 CD34 陽性細胞を局所移植し、増幅させない細胞移植と比較し、血管新生・骨新生の評価ならびに X 線、CT、組織、力学的に骨折治癒能を評価し、その有効性を確認した。

さらに最終年度には、SDF-1/CXCR4 pathway を介した血管内皮前駆細胞の骨折治癒への貢献を示唆する知見、ヒト単核球細胞に比較した CD34 陽性細胞移植の有用性をラット偽関節モデルにて証明した。これらの成果をもとに最終年度においては、現在開始目前である「偽関節患者を対象とした自家末梢血 CD34 陽性細胞による骨・血管再生療法の多施設医師主導治験」のプロトコル作成に貢献した。

## 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 10 件)

1. 松本知之，新倉隆宏、川上洋平，福井友章，美舩泰，李相亮、川本篤彦，黒坂昌弘，浅原孝之 黒田良祐 .自家末梢血 CD34 陽性細胞を用いた骨・血管再生療法に関

する第 1 報 . 相臨床試験 . 日本整形外科学会誌 89 (1): 26-32, 2015

2. 松本知之，新倉隆宏、黒坂昌弘，黒田良祐 . 自家末梢血 CD34 陽性細胞による偽関節治療 . 臨床整形外科 50(1): 32-35, 2015
3. Kawakami Y, Ii M, Matsumoto T, Kuroda R, Kuroda T, Kwon SM, Kawamoto A, Akimaru H, Mifune Y, Shoji T, Fukui T, Kurosaka M, Asahara T. SDF-1/CXCR4 in Tie2-lineage Cells Inducing Endothelial Progenitor Cells Contribute to Bone Fracture Healing. *J Bone Miner Res* 30(1):95-105, 2015
4. Fukui T, Mifune Y, Matsumoto T, Shoji T, Kawakami Y, Kawamoto A, Ii M, Akimaru H, Kuroda T, Horii M, Yokoyama A, Alev C, Kuroda R, Kurosaka M, Asahara T. Superior Potential of CD34-positive Cells Compared to Total Mononuclear Cells for healing of Nonunion Following Bone Fracture. *Cell Transplant* 23(7): 1379-93, 2015
5. Kuroda R, Matsumoto T, Kawakami Y, Fukui T, Mifune Y, Kurosaka M. Clinical Impact of Circulating CD34-positive Cells on Bone Regeneration and Healing. *Tissue Eng Part B Rev* 20(3):190-9, 2014 (the first two authors, equally contribution)
6. Matsumoto T, Asahara T. Endothelial progenitor cells, Lnk and bone fracture healing. *Stem Cells and Bone Tissue* Rajkumar Rajendram (Ed), Science Publishers CRC Press, 180-99, 2013 (Book chapter)
7. Kawakami Y, Ii M, Matsumoto T, Kawamoto A, Kuroda R, Akimaru H, Mifune Y, Shoji T, Fukui T, Asahi M, Kurosaka M, Asahara T. A Small Interfering RNA Targeting Lnk Accelerates Bone Fracture Healing with Early Neovascularization. *Lab*

Invest 93(9): 1036-53, 2013

8. 松本知之、新倉隆宏、黒田良祐 . 末梢血 CD34 陽性細胞移植による難治性骨折治療 . Pharma Medica 31 (4):9-13, 2013
9. 新倉隆宏、黒田良祐、松本知之、李相亮、川上洋平、黒坂昌弘 . 偽関節患者を対象とした自家末梢血 CD34 陽性細胞移植による骨・血管再生療法 臨床試験の報告 . 骨折 35(2): 465-468, 2013
10. 黒田良祐、新倉隆宏、松本知之、李相亮、黒坂昌弘 . 自家末梢血幹細胞 (CD34 陽性細胞) による難治性骨折 (偽関節) への応用 . 整形・災害外科 56(5): 553-557, 2013

[学会発表](計 9件)

1. 松本知之、新倉隆宏、川上洋平、福井友章、美舩泰、李相亮、川本篤彦、黒坂昌弘、浅原孝之、黒田良祐 . 偽関節患者を対象とした、自家末梢血 CD34 陽性細胞を用いた骨・血管再生療法 . 第 13 回日本再生医療学会 (2014. 3.4-6) (シンポジウム)(国立京都国際会館、京都府)
2. Kawakami Y, Ii M, Matsumoto T, Kawamoto A, Mifune Y, Kuroda R, Asahara T, Kurosaka M. September 12-15, 2014: SDF-1-CXCR4 axis in endothelial progenitor cells regulates both vasculogenesis and osteogenesis for bone fracture healing. 2014 American Society for Bone and Mineral Research(ヒューストン、アメリカ)
3. 松本知之、新倉隆宏、川上洋平、福井友章、美舩泰、李相亮、川本篤彦、黒坂昌弘、浅原孝之、黒田良祐 . 偽関節患者を対象とした、自家末梢血 CD34 陽性細胞を用いた骨・血管再生療法に関する第 相臨床試験 . 第 28 回日本整形外科学会基礎学術集会 (2013.10.17-18) (シンポジウム)(幕張メッセ国際会議場、千葉県)

4. 川上洋平、伊井正明、松本知之、川本篤彦、美舩泰、庄司太郎、福井友章、秋丸裕司、黒田良祐、黒坂昌弘、浅原孝之 . 細胞内アダプター蛋白 Lnk の局所制御による早期の血管新生を通じた骨折治癒促進の可能性 . 第 86 回日本整形外科学会学術集会 (2013. 5.23-5.26)(広島グリーンアリーナ・リーガロイヤルホテル広島、広島県)
5. 川上洋平、伊井正明、松本知之、川本篤彦、庄司太郎、美舩泰、福井友章、黒田良祐、浅原孝之、黒坂昌弘 . 体外培養増幅ヒト骨髄由来 CD34 陽性細胞を用いた難治性骨折に対する新規治療法の開発 . 第 86 回日本整形外科学会学術集会 (2013. 5.23-5.26) (広島グリーンアリーナ・リーガロイヤルホテル広島、広島県)
6. Kawakami Y, Matsumoto T, Kuroda R, Ii M, Kawamoto A, Mifune Y, Fukui T, Kurosaka M, Asahara T. March 18-24, 2013: A small interfering RNA targeting Lnk is effective in treatment of bone fracture via early neovascularization. at Annual Meeting of the American Academy of Orthopaedic Surgeons 2013 (シカゴ、アメリカ)
7. Kawakami Y, Ii M, Matsumoto T, Kawamoto A, Mifune Y, Fukui T, Kuroda R, Kurosaka M, Asahara T. March 18-24, 2013: The new strategy for fractures healing by ex-vivo expanded bone marrow CD34 positive progenitor cells. at Annual Meeting of the American Academy of Orthopaedic Surgeons 2013 (シカゴ、アメリカ)
8. Kawakami Y, Matsumoto T, Ii M, Kawamoto A, Mifune Y, Shoji T, Fukui T, Kuroda R, Kurosaka M, Asahara T. January 26-29, 2013: A Small Interfering RNA Targeting Lnk Using Atelocollagen as a Scaffold Accelerates Bone fracture healing via Neovascularization. at 59th Annual

Meeting of the Orthopedic Research Society  
(サンアントニオ、アメリカ)

9. Kawakami Y, Ii M, Kawamoto A, Matsumoto T, Shoji T, mifune Y, Fukui T, Kuroda R, Kurosaka M, Asahara T. January 26-29, 2013: The New Starategy for Non-union Fracture healing by Ex-vivo Expanded Bone Marrow CD34 Positive Progenitor Cells Using Bioscaffold. at 59th Annual Meeting of the Orthopedic Research Society (サンアントニオ、アメリカ)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松本 知之 (MATSUMOTO Tomoyuki)

神戸大学・医学部付属病院・助教

研究者番号： 50546588

### (2) 研究分担者

松下 雄彦 (MATSUSHITA Takehiko)

神戸大学・医学部付属病院・助教

研究者番号： 40467650

### (3) 研究分担者

黒田 良祐 (KURODA Ryosuke)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・  
准教授

研究者番号： 80379362

### (4) 研究分担者

黒坂 昌弘 (KUROSAKA Masahiro)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・  
教授

研究者番号： 70170115