

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 27 日現在

機関番号：13301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893097

研究課題名(和文) 脂肪由来幹細胞シートを使ったラット大腿骨骨欠損再建法の開発

研究課題名(英文) Development of the reconstruction in a rat femur defect using the sheet of adipose derived stem cells

研究代表者

吉田 泰久 (Yoshida, Yasuhisa)

金沢大学・大学病院・医員

研究者番号：50728722

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)：ラットの大腿骨における骨欠損部再建法として、当科で開発した脂肪由来幹細胞シートを用いて骨欠損を再建できるかどうかを検討した。研究の結果では、画像および組織学的評価において、脂肪幹細胞シート付加群では人工骨周辺に旺盛な新生骨がみられた。脂肪幹細胞をシート状にすることで、移植した細胞をその場に留まらせることができ、骨癒合を促進することができたと考える。今後はこのメカニズムの詳細について、また骨癒合促進効果をより増強するための研究が必要である。

研究成果の概要(英文)：We examined the reconstruction in a rat femur defect using the sheet of adipose derived stem cells. In result of the study, an excellent new bone formation was seen around an artificial bone in image and histological evaluation in the cell sheet addition group. We believed that bone union was promoted due to the presence of the cells we transplanted in sheet form. In the further study, we should examine this mechanism to enhance an effect of the cell sheets.

研究分野：整形外科

キーワード：脂肪由来幹細胞シート ラット大腿骨骨欠損 骨癒合促進効果

## 1. 研究開始当初の背景

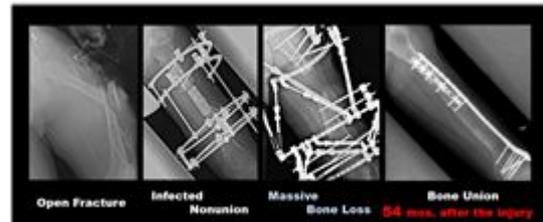
重度の骨折や骨腫瘍、骨感染症の切除後などに大きな骨欠損を生じ治療に難渋する症例がある。当科ではこれまで臨床において、骨延長術、液体窒素処理骨を用いた骨欠損の再建(骨腫瘍再建)の治療を行ってきた。しかしながら、これらの治療も長時間の時間を要したり、正常組織を犠牲にしたり、生物学的に元に戻るには長時間を要するといった欠点を有する。そこでこの欠損部に再生医療を用いて「より早く、より正常な」骨を再生させ、生物学的な欠損部の連続性を持たすことができないかと考えられ世界中で研究が行われている。

現在、再生医学の領域において骨を再生(新生)するためには 1.Scaffolds (コラーゲンなど足場となるもの)、2.Cells (細胞)、3.Signaling molecules (成長因子などのサイトカイン)の 3 つの要素が必要と考えられている。これら 3 つの要素は再生医学界では、「Triangular Concept」と呼ばれている。これまで骨欠損部に BMP-2, BMP-7, PRP などのサイトカインを投与し骨形成を促進させる実験は散見される。しかし幹細胞を投与する実験はあまりなく、その理由としてこれまで再生医学分野で主に使用されていた骨髄由来幹細胞の採取・増殖の煩雑さや、投与した細胞を留まらせることが困難であるためと考えられる。

一方で、2001 年に脂肪組織の中に多分化能をもつ細胞が同定され、脂肪由来幹細胞と命名された。その後、これまで 30 年あまりにわたって研究が行われてきた骨髄由来幹細胞よりも採取・増殖が容易であることから実験は飛躍的に世界ですすめられ、in vitro では脂肪のみでなく心筋、骨、軟骨、神経、肝臓などに分化する多能性を有していることが確認された。日本国内では乳房再建などで、その有用性は実証されているため整形分野での適応の検証は必須であると考え、当科でも骨形成の促進、神経再生の促進、半月板、腱の再生の実験を行ってきた。

一方、再生医療における幹細胞移植の問題点としては、移植細胞を目的とする場所に留まらせることが難しく、幹細胞を目的とする組織に分化させることが困難であるといったことが挙げられる。多くの幹細胞移植の実験は、その細胞の一時的な paracrine 効果を期待しての実験であり、ここに再生医療における幹細胞単独移植の限界がある。これらを解決すべく細胞を様々な担体と混ぜて投与したり、コラーゲンシートの上で培養を行い投与したりといった研究が進められている。我々もこの問題を解決すべく脂肪由来幹細胞シートを開発した。このシートは、脂肪由来幹細胞をアスコルビン酸入りの培地で培養するだけという、非常に単純な方法である。これまでの商業用のシートに比べ不純物が少なく、安価で単純に作成可能である。こ

のシートは、骨分化培地において骨に分化することも証明されており、まさに「人工骨膜」といえる。骨膜は、その名のとおりの骨の周りの膜であり、骨への血流を供給し、骨折治療(骨形成)には必要不可欠なものである。これまで幹細胞を用いて骨膜を作成した研究はない。そこで、この脂肪由来幹細胞シートをもちいて、当科でのこれまでの基礎・臨床における骨欠損部の再建技術をさらに発展させることができないかと考え本実験の着想に至った。



## 2. 研究の目的

本研究では、外傷や感染、腫瘍など様々な病態によって生じうる広範な骨欠損部の再建法として自己脂肪由来幹細胞シートを用いた再生治療を行い、骨成熟の促進効果・メカニズムを調査し脂肪由来幹細胞シートを利用した骨成熟促進治療を臨床応用へ展開する為の基盤となる研究を行う。

当科で開発した脂肪由来幹細胞のシート移植によるラットの骨欠損部での骨形成促進効果を検討する。

## 3. 研究の方法

脂肪由来幹細胞の採取：オスのラット週齢 10-13 週を使用する。ラットの単径部から脂肪組織を 2g 採取し、裁断し 12% コラゲナーゼ 20ml 内で 45 分振盪する。FBS 入り DMEM 20ml で中和後、セルストレイナー (40 μm) を使用しフィルタリングする。次いで 1300 回転で 6 分間遠心を行い、沈殿した stromal-vascular fraction を採取する。

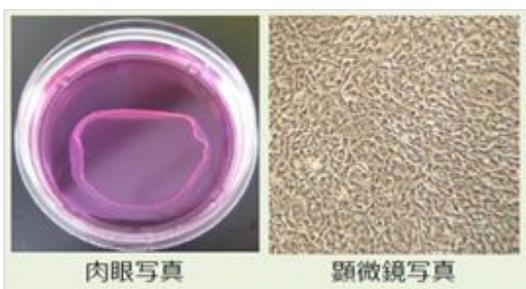
脂肪由来幹細胞シートの作成：ラットの単径部脂肪組織から得られた stromal-vascular fraction を通常培地で培養し、100mm<sup>2</sup> ディッシュあたり 1×10<sup>6</sup> になるようにカウントし、通常培地で培養する。細胞が confluent となったところで、アスコルビン酸を加えた培地で培養を行い脂肪由来幹細胞シートを作成する。

ラットの骨欠損モデル・人工骨膜移植モデルの作成：メスのラット週齢 10-13 週を使用した。手術は大腿部外側中央に 4cm の皮切を行い、大腿骨を展開し、骨膜を周囲の筋膜につけて全周性に剥離する。直径 1.5mm のハーフピンを骨軸に対して垂直に 4 本刺入し創外固定器を装着し、骨軸と垂直に骨切りを行

った。骨欠損の長さは、そのままでは骨癒合が起らないと言われている 5mm とし (critical bone defect)、以下の 3 群を製作した。

対照群：追加処置を行わず閉創した。  
人工骨群：高さ 5mm の円柱状に加工した人工骨 (気孔率 65%,  $\beta$  型リン酸カルシウム) を欠損部に挿入し閉創した。  
人工骨+脂肪幹細胞シート付加群：の人工骨を充填し、その上にシートを全周性に巻きつけ閉創した。

評価は、各群、術後 2、4、8、12 週時で CT による画像評価、各時点での HE 染色による組織学的評価で行った。



$\beta$ -TCP ceramics (Superpore; cylinders: 5 mm in length, and 65-71% porosity) provided by HOYA(Tokyo, Japan).



シートは破れずに巻くことが可能



②人工骨群



③人工骨+ADSCsシート付加群



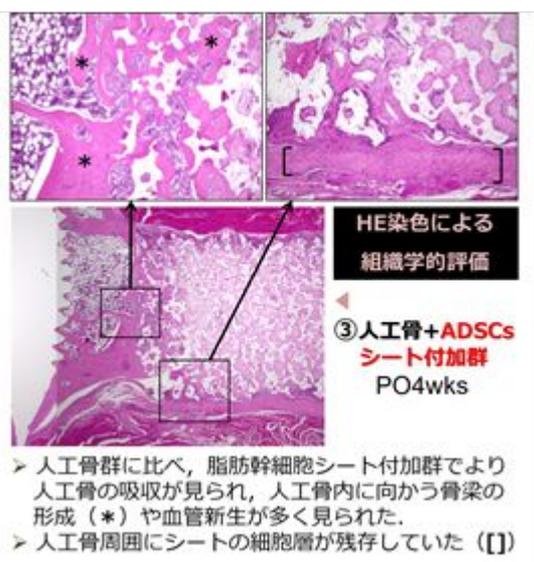
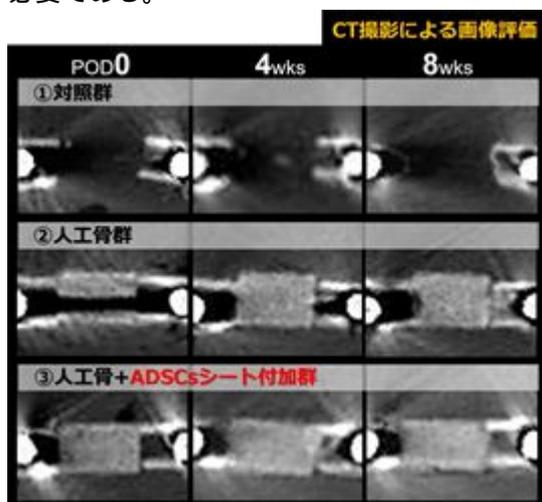
創外固定器を装着

#### 4. 研究成果

画像評価において、対照群では術後 12 週まで骨癒合が起らなかった。また人工骨群に比べ、脂肪幹細胞シート付加群では人工骨周辺に旺盛な新生骨がみられた。組織学的評価では、人工骨群に比べ、脂肪幹細胞シート付加群でより人工骨の吸収が見られ、また人工骨内に細胞や血管がより多く見られた。

脂肪幹細胞をシート状にすることで、移植した細胞をその場に留まらせることができ、骨癒合を促進することができたと考えられる。今後はこのメカニズムの詳細について、また骨癒合促進効果をより増強するための研究が

必要である。



#### <引用文献>

Zuk PA, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: Implications for cell-based therapies. Tissue Eng 7: 211-28, 2001

Fang X, et al. A novel method to apply osteogenic potential of adipose derived stem cells in orthopaedic surgery. PLOS One 19: e88874, 2014

Nomura I, et al. Uncultured autogenous adipose-derived regenerative cells promote bone formation during distraction osteogenesis in rats. Clin Orthop Relat Res 472: 3798-806, 2014

Ueha T, et al. Utility of tricalcium phosphate and osteogenic matrix cell sheet constructs for bone defect reconstruction. World J Stem Cells 26: 873-82, 2015

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0件)

[学会発表](計1件)

吉田泰久、松原秀憲、野村一世、相川敬男、方向、林克洋、土屋弘行  
脂肪由来幹細胞シートを使ったラット大腿骨骨欠損再建法の開発  
第30回日本整形外科学会基礎学術集会  
2015年10月22日  
富山市民プラザ(富山県・富山市)

[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：  
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  
吉田 泰久(YOSHIDA, Yasuhisa)  
金沢大学・附属病院・医員  
研究者番号：50728722

(2)研究分担者 ( )

研究者番号：

(3)連携研究者 ( )

研究者番号：