

令和 3 年 5 月 19 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18456

研究課題名(和文)自家海綿骨と自家脂肪由来再生細胞の併用による骨癒合促進の試み

研究課題名(英文) Attempt to promote bone union by combining autologous cancellous bone and autologous adipose-derived regenerative cells.

研究代表者

濱田 知 (Hamada, Tomo)

金沢大学・医学系・協力研究員

研究者番号：20610413

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：長年技術の進歩が乏しかった自分の骨を移植して骨癒合を促進させる技術に対する研究を行いました。まずは、これまで存在しなかった自分の海綿骨を移植したラットのモデル(自家海綿骨移植ラットモデル)を作成し、そのモデルの確立のため安全性及び採取できる骨の量などをまとめ、現在英語論文として投稿中です。

続いて、自家海綿骨移植ラットモデルを使用してADRCsを併用した自家海綿骨を移植した群と自家海綿骨のみを移植した群を作成し、両群を比較検討しましたが、仮骨形成の個体差が大きく有意差を認めるまではいきませんでした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

学術的には、これまで多くの骨癒合促進技術が研究されていましたが、既存の自家海綿骨移植との比較ができていなかったものを今回のモデルの確立によりそれが可能となりました。それにより今後骨癒合促進技術の臨床応用がしやすくなるという効果が期待できます。

研究成果の概要(英文)：I conducted research on technology that promotes bone union by transplanting my own bone, which has had little technological progress for many years. First, we created an autologous cancellous bone graft model of rat, which did not exist until now, and summarized the safety and the amount of bone that can be collected in order to establish the model. It is being submitted as a paper.

Subsequently, using an autologous cancellous bone graft model of rat, a group transplanted with autologous adipose-derived regenerative cells and a group not transplanted were created, and the two groups were compared and examined. In result, they do not have significant difference.

研究分野：整形外科

キーワード：自家海綿骨移植 脂肪由来再生細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

「より確実でより早い骨癒合を目指す」。これはすべての整形外科医の望みであり、骨への血流阻害が少ない手術方法の確立や、より強固なインプラントの開発など、様々な領域において実際に臨床で使用できる技術は目まぐるしく進歩しています。これらは主に骨癒合の力が低下するのをいかに減らすかという試みです。対して骨癒合の力をより向上させる方法は、現在臨床で最も信頼され広く行われている行為として骨盤などから採取した海綿骨を移植する自家海綿骨移植があります。しかし、自家海綿骨移植が最初に報告されたのは 1880 年代と古く、臨床における骨癒合の力を向上させる方法は 130 年以上もの長い間進歩することなく現在に至っている状態でした。

2. 研究の目的

本研究は、自家海綿骨に脂肪由来再生細胞 (Adipose Derived Regenerative Cells: ADRCs) を付加することで従来の自家海綿骨単体よりも優れた骨癒合促進技術を確立させることを目的としています。

3. 研究の方法

オスの Sprague-Dawley ラット (350~400g) を使用し、以下の研究を計画しています。

・脂肪組織から ADRCs を採取する

下記の大腿骨骨切りモデルを作製する際の皮膚切開部から、ラットの単径部周囲にある十分な量の脂肪組織を採取できることは確認できており、ここから採取した脂肪をコラゲナーゼで分解後、遠心分離にかけ沈殿物質を回収することで ADRCs を採取する。採取した ADRCs の濃度を 1×10^6 個/ml に調整します。

・腸骨棘から自家海綿骨を採取し、成型する

両側の腸骨棘を採取し皮質骨と海綿骨に分け、さらに海綿骨を小さな骨片にします。海綿骨を円筒内に充填し圧縮することで、直径 3 mm 高さ 5 mm の円柱状の海綿骨ブロックを作製します。

・大腿骨骨欠損モデルのラットを作成する

1.6mm ハーフピンをラットの右大腿骨の遠位近位にそれぞれ 2 本挿入し、これに創外固定を設置します。近位と遠位の間で 2 か所骨切りを行い長さ 5 mm の骨欠損モデルを作製します。

大腿骨骨欠損部に対する自家海綿骨と ADRCs の併用による骨癒合促進効果を調べます。

骨欠損部に対して、何も充填しない群、海綿骨のみを充填する群、ADRCs のみを散布する群、ADRCs を浸潤させた海綿骨を充填する群、の 4 群を作成し (図 1)、モデル作成の 1、2、3、4、6、8、16 週後のタイミングで屠殺を行い骨癒合の経過を調べます。

これら 4 群の比較により、自家海綿骨移植と ADRCs を併用することによる骨欠損部における骨癒合促進効果の有無を調べることができます (57 匹 \times 4 群を予定)。

・各モデルの評価と統計方法

画像評価：当研究棟に設置してある動物用 CT で大腿骨骨欠損部を撮影し骨癒合の評価を行います。各々のラットを屠殺まで 1 週おきに撮影する予定です。

組織評価：モデル作製後、1、2、3、4、6、8、16 週において、それぞれ 1、2、3、4 週では 5 匹、6、8、16 週では 3 匹のラットから HE 染色、Safranin O 染色、Alcian blue 染色の病理標本を作製し、骨形成の状態を評価します。また、1、2、3、4 週では病理標本から免疫染色を行い間

葉系幹細胞の存在の有無や血管増生の程度、骨癒合における骨や軟骨の移行性の状態を確認します (CD31、CD34、CD90、コラーゲン、 、 を予定)。

力学的評価：4、6、8週の5匹のラットから大腿骨を採取し力学的試験を行います。3点曲げ試験、軸圧試験、ねじり試験を予定しています。

Real-time RT-PCRを用いた Paracrine 効果の検証：モデル作製後2、4週の5匹のラットから骨欠損部と周囲軟部組織を採取します。組織から RNA を抽出し、cDNA を作成します。標的 mRNA は、ADRCs から他の細胞への分化の程度をみる目的で、TGF- β 3、TGF- β 1、SMA、BMP-13、BMP-2、VEGFA、SDF-1、IL-6 を測定します。また、血管内皮細胞増殖因子や血管新生促進作用をみる目的で、VEGF、b-FGF を測定する。この実験により、移植した ADRCs の Paracrine 効果の有無が解明されます。

DiI 蛍光免疫染色による ADRCs の運命の検証：DiI を ADRCs に吸着させ、それを他のモデルと同様の方法で自己海綿骨に混ぜて移植を行います。モデル作製後4週のラットを5匹使用し、ADRCs の移動や分化の観察を行います。この実験により、移植した ADRCs の運命が解明されます。

統計方法：基本的には4群間で各々のラットの結果を1要因の分散分析(対応なし)にて有意差の有無を調べます ($p < 0.05$ を有意差ありとする)。

4. 研究成果

これまで存在しなかった自分の海綿骨を移植したラットのモデル(自家海綿骨移植ラットモデル)を作成し、そのモデルの確立のため安全性及び採取できる骨の量などをまとめ、現在英語論文として投稿中です。

この自家海綿骨移植ラットモデルを使用して ADRCs を併用した自家海綿骨を移植した群と自家海綿骨のみを移植した群を作成し、両群を比較検討しましたが、仮骨形成の個体差が大きく有意差を認めるまではいきませんでした。

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