

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K17992

研究課題名（和文）独自開発したシート状脂肪幹細胞を用いた特発性大腿骨頭壊死症に対する治療法の開発

研究課題名（英文）Development of a treatment for idiopathic osteonecrosis of the femoral head using sheet adipose stem cells

研究代表者

上岡 顕（Ueoka, Ken）

金沢大学・医学系・協力研究員

研究者番号：60823010

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）：脂肪組織由来体性幹細胞（ADSC）の培養、シート作成に関しては、再現性の高いものとなった。白色家兎を使用した大腿骨頭壊死モデルの作成も可能であったが、壊死範囲にはばらつきが生じていた。ADSCとADSCシートを用いた群間では、壊死の再生程度において統計学的に有意といえる差までは認めなかった。壊死モデル作成において、壊死領域にもばらつきが生じやすく、その点も結果のばらつきにつながったと考えられた。モデルのばらつきが小さくなると考えて、白色家兎を用いた変形性関節症モデルを作成し、軟骨欠損の再生過程について調査した。ADSCシートが軟骨再生に寄与するのではないかと示唆される結果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

特発性大腿骨頭壊死症は大腿骨頭が壊死し、関節が変形・破壊する疾患であり、強度な股関節痛ならびに著しい歩行困難を呈する。厚生労働省の特定疾患に指定され、明らかな原因は不明、治療に難渋する疾患である。関節を温存する根本的な治療法はなく、従来法である培養脂肪幹細胞を用いた治療成績は、満足がいくものではない。本研究では統計学的な有意差を認めるまでの結果は得られなかったが、ADSCシートによる治療効果の向上を示唆する所見はあり、手技の一定化や工夫でより良い結果を得られる可能性がある。なによりも、新たな治療法の開発に向けた取り組みには一定の意義があったと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Adipose tissue-derived somatic stem cell (ADSC) culture and sheet preparation were possible. The use of white rabbits to create a necrotic femoral head model was also possible, but the extent of necrosis varied, and there was no statistically significant difference in the degree of necrosis regeneration between the groups using ADSCs and ADSC sheets. The variability of the necrosis area in the necrosis modeling process may also have contributed to the variability of the results. We investigated the regeneration process of cartilage defects in a white rabbit osteoarthritis model, which we thought would reduce the variability of the model, and obtained results suggesting that the ADSC sheet may contribute to cartilage regeneration.

研究分野：関節疾患

キーワード：大腿骨頭壊死 脂肪幹細胞 白色家兎

1. 研究開始当初の背景

特発性大腿骨頭壊死症は大腿骨頭が壊死し、関節が変形・破壊する疾患であり、強度な股関節痛ならびに著しい歩行困難を呈する。厚生労働省の特定疾患に指定されており、関連因子(ステロイド、アルコール多飲など)は報告されているものの、明らかな原因は不明であり、治療に難渋する疾患である。関節を温存する根本的な治療法はなく、従来法である培養脂肪幹細胞を用いた治療成績は、満足がいくものではない。主な要因として、壊死部に脂肪幹細胞が生着できないことが挙げられる。

2. 研究の目的

本研究では、我々が開発したシート状脂肪幹細胞を用い、より効率的、かつ根治的な関節温存治療法を開発することを目的とした。脂肪幹細胞をシート状にすることで、壊死部に留まり続けることを可能し、その結果、より良好な壊死部の修復を促すことを期待して実施した。

3. 研究の方法

(1) ADSCs の培養

皮下脂肪組織の採取：本研究では動物種として日本白色家兔を用いるため、肩甲間部から採取する(右図)。

採取は容易かつ大量に可能である。

ADSCs の抽出：採取した脂肪組織をハサミで細分化した後、コラゲナーゼを使用し分解、遠心すると、ADSCs を含んだペレットが得られるため、これを培養する。



(2) ADSCs シートの作成

シートの作成：第3継代目のADSCsをさらに1週間培養し、over confluent 状態にする。Ascorbate-2-phosphate (アスコルビン酸)を添加し、さらに1週間培養することでADSCsのコラーゲン分泌が増強され、ADSCシートが出来る。

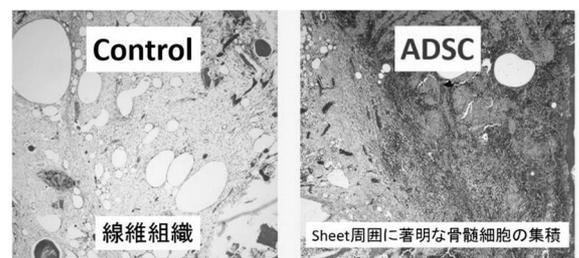
シートの利用：完成したシートはスクレイパーでシャーレより容易に剥離可能で(右図)、PBSで洗浄した後、各種移植に利用できる。



シートの効果：シートは1型コラーゲンからなるbiological scaffoldを持つことで、細胞同士の接着を保ち、細胞外基質を損傷することなく移植することが可能となる。つまり、シート化技術を用いることで細胞の生存率が上がり、大量の細胞を移植することができ、幹細胞性や分化能を維持することが可能と考えられる。

(3) 壊死モデルの作成から幹細胞移植

家兔の大腿骨顆間部を展開する。顆間部にドリルで髄腔内に向けて骨孔を作成する。作成した骨孔内に液体窒素を噴射して、骨を凍結させる。この手法により、骨壊死が作成されることは事前に確認されている。凍結した骨を、常温に戻した後に骨孔から、事前に作成してあるゲル状化した脂肪幹細胞もしくは骨分化細胞を移植する。移植後4週、8週時点での、骨孔部の病理組織



ならびに CT 画像から、骨頭壊死モデルの修復程度を確認、評価する。連続 6 羽の家兎による検討を予定している。

4 . 研究成果

脂肪組織由来体性幹細胞 (ADSC) の培養手技に関しては問題なく可能であった。白色家兎は脂肪採取するのに十分な大きさがあり、特段の不都合なく採取が可能であった。ADSC シートの作成に関しては、手技の一定化が進行し、再現性の高いものとなった。

白色家兎を使用した大腿骨頭壊死モデルの作成も可能であったが、壊死範囲にはどうしてもばらつきが生じていた。臨床的には、骨頭の壊死部は荷重部に起こることが多いが、作成した骨孔から液体窒素を注入する過程において意図しない部位での壊死を認めたりするほか、骨孔に沿うように壊死領域ができてしまうなど、臨床とは異なる壊死領域となることも散見された。壊死組織の修復過程の評価には、 μ -CT 画像と病理切片での評価を行い、ADSC シート群において ADSC 群よりも良好な修復過程を認めるモデルもあった。ただし、連続した症例での検討においては統計学的な有意差を認めることはできなかった。大腿骨頭壊死モデルの作成手順には再考の余地があると考えられた。

モデルのばらつきが小さくなると考えて、白色家兎を用いた変形性関節症モデル(両膝の前十字靭帯を切離することで作成する)にて、軟骨欠損の再生過程についても調査した。過去の報告より、前十字靭帯切離後 4 週で変形性膝関節症モデルが完成し、修復過程を調整するべく、1 週おきに ADSC、ならびに ADSC シートを関節内に注入した。肉眼的評価ではシート群で軟骨変性をより抑制している所見を得た。組織学的検討、免疫組織化学的検討も今後、追加していく方針である。

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