

ラット難治性骨折モデルにおける脱分化脂肪細胞
移植と副甲状腺ホルモン投与による治療効果(要約)

日本大学大学院医学研究科博士課程
外科系整形外科学専攻

氏 名
木下 豪紀

修了年 2014 年

指導教員 長岡 正宏

【緒言】

骨折治療の甲斐なく全身的因子または局所的因子によって骨癒合不全が生じる場合がある。これは難治性骨折と呼ばれているが、全骨折のうちいまだに5-10%に生じると言われている¹。実際難治性骨折が生じると患者にとって長期の苦痛や機能障害を起し、結果として医療費の増大につながるといわれているため²、偽関節に対する治療法の確立は必要不可欠である。

難治性骨折の治療には、自家骨移植術が広く行われ、腸骨からの自家海綿骨移植が優れると言われ、難治性骨折部のデブリードマンと骨移植を併用した外科的処置は、諸家の報告によるとsuccess rateが70-90%と^{3,4}比較的高い。移植骨に含まれる骨髄間葉系細胞(MSC)から放出されるBMPなどの成長因子による骨誘導が考えられているが、骨髄の単核球成分のうち0.001~0.01%のみがMSCであると言われ、従来の自家骨移植術では偽関節部に十分量のMSCが導入されていない可能性がある。このため自家骨移植に代わる新しい偽関節治療法として、骨髄MSCを抽出後、増幅して導入する方法が注目されるようになった。その一方でMSCは、高齢者では骨髄採取が困難であること、雑多な細胞集団を付着培養するために他の細胞の混入が避けられないこと、幹細胞採取の際に神経障害や疼痛などの合併症を伴うといった問題点がある。

Matsumoto⁵らはこれらの問題を解決する新規再生医療用細胞ソースとして、成熟脂肪細胞に注目した。ヒトを含む哺乳類の脂肪細胞から単離した成熟脂肪細胞を天井培養という方法を用いて体外で脱分化培養すると線維芽細胞様の形態をした細胞群が生じ、この脱分化脂肪細胞 (DFAT)が高い増殖能とMSCと同等の多分化能を持っていることを明らかにした。

PTHは骨粗鬆症治療における骨同化作用のあるホルモンであるが、骨密度を増加させるだけでなく、近年骨形成に強力な促進作用を有することも明らかになってきたホルモンである。

【目的】

ラット骨欠損型偽関節モデルを作成し、 β -TCP/collagen複合体に播種したDFATをラットの骨欠損部に移植し、さらにPTH全身投与を併用することにより、骨形成能が促進されるかについて検討する。

【対象と方法】

まずラット脛骨偽関節モデルの作製をした。左下腿脛骨をマイクロソーで4 mm骨切りし、欠損部に β -TCP/collagen複合体を挿入し、22G針を4 mmの間隙を保つように挿入した。術後8週においてペントバルビタールを100 mg/kg腹腔内投与し、安楽死させ脛骨を摘出した後、 μ CTを撮影した。その結果、骨折部の両骨折端は離れて間隙を形成し、偽関節となっていることが確認された。

次にGFPトランスジェニックラットDFATがin vitroにおいて多分化能を示

すかについて検討した。その結果 DFAT は脂肪細胞、骨芽細胞、平滑筋様細胞に分化されることが確認された。

また、DFATを効率的に骨折部に移植するために β -TCP/collagen複合体に均一に細胞を播種する方法を検討した。実験には、GFPトランスジェニックラット由来のDFATを用い、①Pipetting法(マイクロピペットを用いて β -TCP/collagen複合体に圧をかけながら注入する方法)②Rotate法(マイクロチューブを用いて遠心分離する方法)③Press法(10mlシリンジ内で圧力をかける方法)で行った。切片作成後に蛍光顕微鏡にて観察を行った結果、②のRotate法が β -TCP/Collagen複体内で均一にDFATが播種される方法であることが確認された。

5週齢のオスSDラット(n=44)に上記の方法で脛骨に骨欠損を作製し、以下の4群に分けた。① β -TCP/collagen複合体のみ移植する群(Control群, n=11)、②GFP-DFAT (1×10^6)を含有した β -TCP/collagen複合体を移植する群(DFAT群, n=11)、③ β -TCP/collagen複合体を移植後、PTH 30 μ g/kgを週3回、8週間皮下注射する群(PTH群, n=11)、④GFP-DFAT (1×10^6)を含有した β -TCP/collagen複合体を移植後、PTH 30 μ g/kgを週3回、8週間皮下注射する群(DFAT+PTH群, n=11)である。PTHはモデル作製1週間後より投与を開始した。 β -TCP/collagen複合体へのDFATの播種は、上記Rotate法を用いた。モデル作成8週間後、4%イソフルラン吸入麻酔下にペントバルビタール 100 mg/kgを腹腔内投与することにより安楽死させ、脛骨を摘出し、骨欠損部の性状をX線学的大体および組織学的に解析した。

μ CTによる評価は、 μ CTを用いて、骨欠損部中心に4 mmの領域を撮影した。欠損部の μ CTでの骨折治癒評価は臨床的骨欠損のX線評価基準(Radiographic score)⁶を用いて定量評価を行った。 μ CTによる骨構造解析は骨欠損部中央横断面でのスライスを用いて、欠損部新生骨面積比(% bone area)を欠損部脛骨面積に対する骨形成した面積を百分率で計算した。計測はImage J softwareを用いて行った。

組織学的所見として凍結ブロックを作成し、フィルム法で8 μ m薄切した切片をHE染色、Toluidine blue染色、von Kossa染色で処理し、作成した標本を顕微鏡下に観察した。免疫組織化学的検討としてGFP免疫染色を施行した。

【結果】

μ CTにおいて、Control群では骨折部に吸収されずに骨間隙を形成した β -TCP/Collagen複合体が残存し、骨折両端が肥厚性偽関節を形成していた。DFAT群では、骨癒合を示すとともに海綿骨の新生所見が認められる傾向にあった。PTH群では、皮質骨およびピン挿入部周囲の骨新生が著明であるが、海綿骨の新生はDFAT群ほど明瞭でない傾向を示した。また、DFAT+PTH群では、より高度な皮質と海綿骨の新生が認められる傾向にあった。

骨欠損部の新生骨面積比(% bone area)は、個体差は認めるものの、その平均値は Control 群(40.2±13.2%)、DFAT 群(53.1±14.2%)、PTH 群(56.2±13.9%)、DFAT+PTH(59.9±14.8%)群の順に高い傾向にあった(図 13)。統計学的解析を行った結果、骨欠損部の新生骨面積比は、Control 群に比べ DFAT+PTH 群で有意に高値を示した ($p<0.05$)。骨欠損部の骨密度(BM/TV)は、Control 群(172±32.6)、DFAT 群(208±29.5)、PTH 群(181±30.1)、DFAT+PTH 群(215±44.8)であった(図 14)。統計学的有意差は認められなかったが、DFAT+PTH 群は Control 群に比べ骨密度(BM/TV)が高い傾向にあった。

μ CT所見に基づく難治性骨折治癒のX線学的スコア(Radiographic score)をでは、Control群(2±1.1)、DFAT群(4±2.0)、PTH群(5±2.1)、DFAT+PTH群(5±2.0)の順に高い傾向にあった。統計学的解析を行った結果、Control群に比べ、PTH群およびDFAT+PTH群では、Radiographic scoreが有意に高値を示した($p<0.05$)。以上の結果より、DFAT移植、PTH間歇投与はいずれも骨癒合や皮質骨の新生を促進する傾向があり、特にDFAT移植とPTH間歇投与を併用した場合に、高い偽関節治療効果があることが明らかになった。

各群の代表的な組織像で Control 群では、HE 染色と von Kossa 染色において皮質骨の連続性が絶たれている像が認められた。DFAT 群では HE 染色と von Kossa 染色において欠損部における皮質骨の連続性が認められた。しかし形成された皮質骨は比較的薄く、欠損内部は石灰化に至らない結合組織成分で占められていた。PTH 群では DFAT 群と同様に欠損部における皮質骨の連続性を認め、新生した皮質骨はより厚い傾向にあった。また、欠損内部にも von Kossa 染色陽性の石灰化を認めた。DFAT+PTH 群では DFAT 群、PTH 群と同様に骨癒合を示す皮質骨の連続性を認め、新生された皮質骨は高度に肥厚している傾向が認められた。以上の結果より、組織学的にも DFAT 移植や PTH 投与により偽関節治癒効果があることが明らかになった。

また GFP に対する免疫組織染色を行い検討したところ、DFAT を移植した群では、骨欠損部において新生された皮質骨の内側に GFP 陽性細胞が集簇している所見がしばしば認められた。一方、Control 群および PTH 群では GFP 陽性細胞は検出されなかった。以上の結果より、 β -TCP/collagen 複合体に播種した DFAT は移植後 8 週間にわたりその一部は移植部位に生着していることが明らかになった。

【考察】

Control 群では大部分の例で骨癒合を認めず、肥厚性偽関節の像を呈していた。DFAT 群では、骨欠損部に皮質骨が形成され、また海綿骨の形成も認められる傾向があった。Kikuta らは、ウサギ骨欠損モデルに自家 DFAT/人工骨基質複合体を移植したところ、高い骨再生が認められることや、両側卵巣摘出による骨

粗鬆症モデルウサギの骨髄内に DFAT を移植すると、海面骨の骨密度が増加することを報告している。骨髄内に移植した DFAT の一部は osteocalcin 陽性の骨芽細胞に分化することが明らかになっている。また DFAT は骨髄 MSC と非常に類似したサイトカイン分泌プロファイルを示す^{7, 8}。その中には、骨芽細胞、破骨細胞、軟骨細胞に結合し、骨形成や骨吸収を制御する glycoprotein130 シグナルサイトカイン群や、破骨細胞抑制的サイトカインである Osteoprotegerin、VEGF、HGF、TGF- β などの血管新生因子が含まれる。DFAT はこのようなサイトカインの発現を介して、また一部は DFAT 自身が骨芽細胞へと分化することにより、骨折治癒促進作用を示したと考えられる。一方、 μ CT による定量解析において DFAT 群は、Control 群と統計学的有意差を認めなかった。この理由として、今回の実験系では、DFAT を Scaffold に播種後、骨分化誘導せずに移植したことに起因しているかもしれない。今後、前もって骨分化誘導を行い、骨芽細胞系列にコミットした状態で移植することにより高い骨再生効果が期待できる可能性があり、今後の検討課題である。

PTH 群では、骨欠損部に明らかな皮質骨新生がおこり、高頻度に骨癒合をきたす傾向にあった。また PTH 群では Control 群に比べ、Radiographic score が有意に高値を示した。PTH 群、DFAT+PTH 群の両群において μ CT 像で髄内ピン周囲の新生皮質骨形成を認めたが、この所見は、以前報告された所見に一致する⁹。PTH による皮質骨新生作用は、Komatsubara ら^{9, 10}が述べているように、PTH が woven bone から層板骨への置換を促進した結果と考えることができる。また Nakazawa ら¹¹は、PTH 間歇投与は軟骨性仮骨形成も促進させることを報告している。また PTH は、 β -TCP Scaffold の β -TCP 石灰化を増強することにより骨再生を促進することが報告されている¹²。

DFAT+PTH 群では DFAT 群や PTH 群よりさらに高い骨折治癒促進作用を示し、骨欠損部の新生骨面積比 (% bone area) および Radiographic score は Control 群に比べて有意に高値を示した。この作用は、上述したような DFAT 移植による作用と PTH 投与による作用の相加作用と考えることができる。またこれらの併用による作用として、PTH が移植した DFAT に作用し、細胞増殖や骨芽細胞への分化を促進した可能性も考えられる。前骨芽細胞には PTH のレセプターである PTH1 型受容体が発現しており、PTH が PTH1 型受容体を介して前骨髄芽球の増殖や骨芽細胞への分化を促進することが明らかになっている。また骨髄 MSC に対しても PTH は直接作用し、骨分化能を促進することが報告されている¹³。今後、DFAT における PTH 受容体の発現の有無や、PTH が DFAT の多分化能やサイトカイン発現にどのように影響するか in vitro の実験系などで明らかにする必要があると考えられた。

本研究では、ラット脛骨の骨欠損型偽関節モデルを作成し、このモデルに対

し骨欠損部にDFAT を播種した β -TCP/Collagen複合体を移植したり、PTH間歇投与を併用することにより、偽関節治癒効果があるか検討した。 μ CTを用いた骨構造解析や、組織学的検討の結果、DFAT移植、PTH間歇投与はいずれも骨癒合や皮質骨の新生を促進する傾向があり、特にDFAT移植とPTH間歇投与を併用した場合に、高い偽関節治療効果が認められた。少量の脂肪組織から均質なMSC様細胞を大量に調製できるDFATと、骨形成促進効果を有するPTHを併用した治療法は、難治性骨折に対する新たな治療戦略になりうる可能性がある。

【引用文献】

1. Heppenstall RB. The present role of bone graft surgery in treating nonunion. *Orthop. Clin. North Am.* 1984;15:113-123
2. Heckman JD, Sarasohn-Kahn J. The economics of treating tibia fractures. The cost of delayed unions. *Bull. Hosp. Jt. Dis.* 1997;56:63-72
3. Cooney WP, 3rd, Dobyns JH, Linscheid RL. Nonunion of the scaphoid: Analysis of the results from bone grafting. *The Journal of hand surgery.* 1980;5:343-354
4. Healy WL, Jupiter JB, Kristiansen TK, White RR. Nonunion of the proximal humerus. A review of 25 cases. *J. Orthop. Trauma.* 1990;4:424-431
5. Matsumoto T, Kano K, Kondo D, Fukuda N, Iribe Y, Tanaka N, Matsubara Y, Sakuma T, Satomi A, Otaki M, Ryu J, Mugishima H. Mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells exhibit multilineage potential. *J. Cell. Physiol.* 2008;215:210-222
6. Lane JM, Sandhu HS. Current approaches to experimental bone grafting. *Orthop. Clin. North Am.* 1987;18:213-225
7. Kikuta S, Tanaka N, Kazama T, Kazama M, Kano K, Ryu J, Tokuehashi Y, Matsumoto T. Osteogenic effects of dedifferentiated fat cell transplantation in rabbit models of bone defect and ovariectomy-induced osteoporosis. *Tissue Engineering Part A.* 2013;19:1792-1802
8. Obinata D, Matsumoto T, Ikado Y, Sakuma T, Kano K, Fukuda N, Yamaguchi K, Mugishima H, Takahashi S. Transplantation of mature adipocyte-derived dedifferentiated fat (dfat) cells improves urethral sphincter contractility in a rat model. *Int. J. Urol.* 2011;18:827-834
9. Komatsubara S, Mori S, Mashiba T, Nonaka K, Seki A, Akiyama T, Miyamoto K, Cao Y, Manabe T, Norimatsu H. Human parathyroid hormone (1-34) accelerates the fracture healing process of woven to lamellar bone replacement and new cortical shell formation in rat femora. *Bone.* 2005;36:678-687
10. Schipper BM, Marra KG, Zhang W, Donnenberg AD, Rubin JP. Regional anatomic and age effects on cell function of human

- adipose-derived stem cells. *Ann. Plast. Surg.* 2008;60:538-544
11. Nakazawa T, Nakajima A, Shiomi K, Moriya H, Einhorn TA, Yamazaki M. Effects of low-dose, intermittent treatment with recombinant human parathyroid hormone (1-34) on chondrogenesis in a model of experimental fracture healing. *Bone.* 2005;37:711-719
 12. Jacobson JA, Yanoso-Scholl L, Reynolds DG, Dadali T, Bradica G, Bukata S, Puzas EJ, Zuscik MJ, Rosier R, O'Keefe RJ, Schwarz EM, Awad HA. Teriparatide therapy and beta-tricalcium phosphate enhance scaffold reconstruction of mouse femoral defects. *Tissue engineering. Part A.* 2011;17:389-398
 13. Yu B, Zhao X, Yang C, Crane J, Xian L, Lu W, Wan M, Cao X. Parathyroid hormone induces differentiation of mesenchymal stromal/stem cells by enhancing bone morphogenetic protein signaling. *J. Bone Miner. Res.* 2012;27:2001-2014