

(報告書様式)

2017年 1 月 31 日

金沢大学先端科学・イノベーション推進機構協力会 御中

第1回 若手研究者奨励賞 研究実施報告書

所 属	金沢大学附属病院
職 名	助教

ふりがな	はやしかつひろ
氏 名	林 克洋

(1) 研究テーマ名

脂肪由来幹細胞シートを応用した骨軟部組織再生

(2) 研究の目的および要旨

本研究は、骨軟部組織欠損に対して、ADSC(脂肪由来幹細胞)をシート培養した上で再生医療を行うことを目標とする。これまで、脂肪由来幹細胞は、乳癌切除後の乳房再建などに対して使用され、良好な成績をおさめており、骨軟部領域への応用も期待される。しかし、移植した細胞の生着や再生能力には限界があるなどの問題点があった。我々は、幹細胞の培養液にアスコルビン酸を添加することで幹細胞シートを作成する方法を独自で開発した（特許出願中）。シート状の脂肪由来幹細胞は、非シート状の細胞にくらべ、骨分化能などに優れており、*in vivo*での移植も物理的に安定してとどまることが確認されている。シート状の幹細胞は、心筋シートや角膜シートなど臨床応用も進んでいるが、安全面や操作の煩雑さ、コスト面などから、現実的に使用されるまではまだハードルが多い。我々の使用する脂肪由来幹細胞をシート培養する方法は、複雑な装置を必要とせず、また細胞の入手も簡単である。

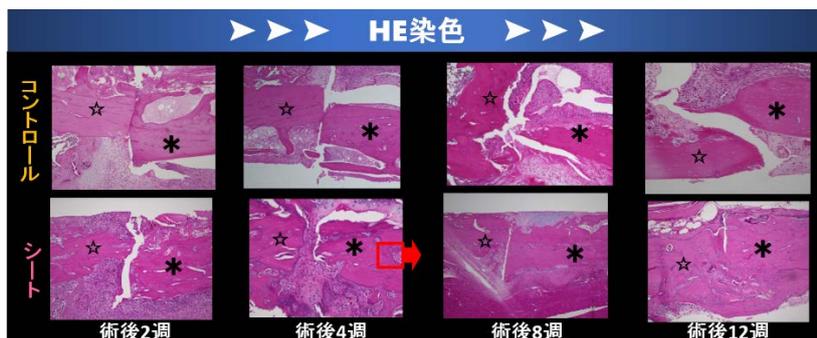
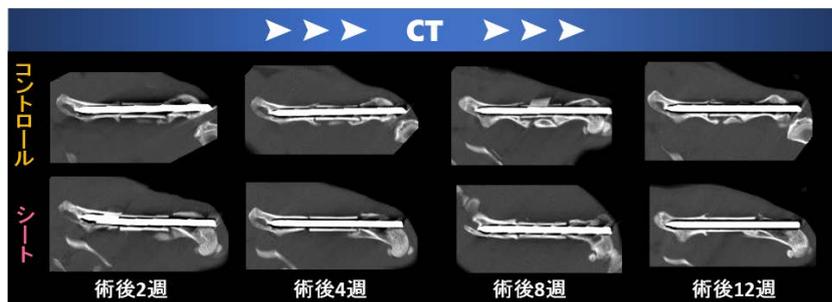
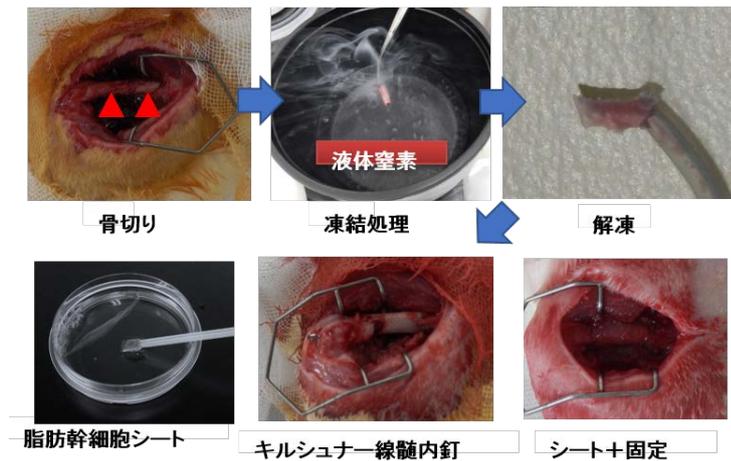
本研究では *in vitro*でのシート作成に関して最適なプロトコルの確立と、*in vivo*でのその再生能力の確認と臨床応用をめざす。

(3)採択されてからの研究の進捗状況

ADSC(脂肪由来幹細胞)をアスコルビン酸添加培地にてシート培養し、*in vivo*応用を行った。壊死骨の再生を確認するため、ラットを使用した実験を行った。麻酔下でラット大腿骨骨幹部を切除し、体外で液体窒素処理し壊死骨として再び体内にもどし、金属で固定を行った。幹細胞シート群では脂肪由来幹細胞シートを壊死骨に巻きつけて移植し、コントロール群はそのままもどした。処理後、2週、4週、8週、12週で屠殺、移植骨を摘出し、CT撮影及び、組織学的評価（H-E染色）を行い、骨再生を評価した。

また、兎をもちいて、同様に壊死骨モデルで幹細胞シートを用いた実験を行った。

(4) 研究の成果



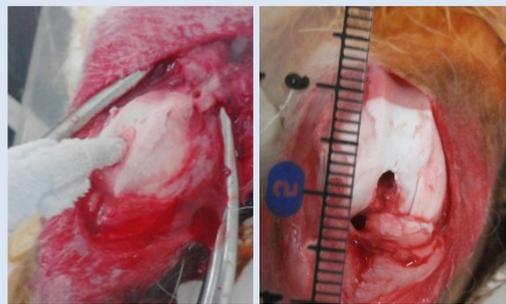
画像評価ではコントロール群では、時間の経過とともに、処理骨周囲に仮骨を形成するも、連続性に乏しかった。シート群では、時間の経過とともに、処理骨と host bone の境界部で連続性が見られた。

組織評価ではコントロール群では、処理骨周囲に host bone からの仮骨形成を認めるものの、処理骨との連続性に乏しかった。シート群では、処理骨に向かう host bone からの新生骨形成を認め、骨癒合の確認が得られた。

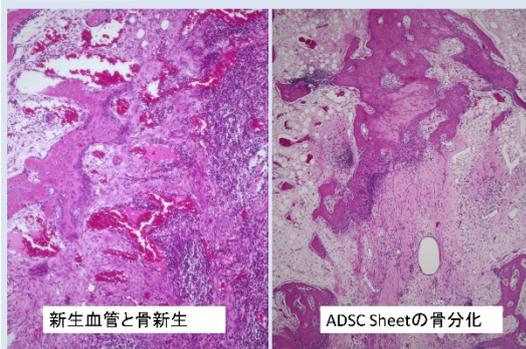
総合的に骨再生の促進はみられる傾向があったが、モデルのためか、旺盛な再生まではみられない印象であり、他の壊死モデルでの検討も行った。

兎の壊死骨モデルでは、膝関節を展開し、大腿骨遠位に骨孔をあけ、液体窒素を注入して壊死骨とした。そこに幹細胞シートを移植し、骨再生をみた。コントロール群に比較し、幹細胞シート移植群で骨再生が進んでいることが確認されている。

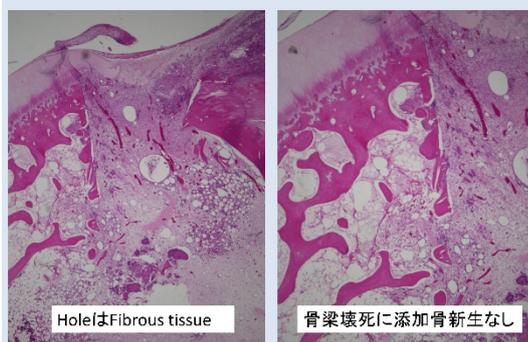
液体窒素による骨壊死作成



ADSC 4W



Control 4W



脂肪由来幹細胞シートは骨再生促進作用が確認され、臨床応用や、さらなる再生能力の向上が今後期待される。

(5) 今後の研究の推進方策

骨壊死以外の疾患、変形性関節症などにも幹細胞シート移植による再生実験を計画している。また、シート 1 層では薄いため、重層化するなどの改良が必要であるが、これに関しては、スフェロイド培養を応用したシート作成を企業とコラボで進めていく方向となり、予備実験を開始した。

(6) 研究発表（平成 27 年度、28 年度）

2016/7/24 北國新聞地方欄掲載

2017/3/14 アメリカ整形外科学会（AAOS）サンディエゴ Scientific Exhibit に採択、発表
San Diego Convention Center, Academy Hall, Sails Pavilion

From Fat to Bone: Making Adipose Derived Stem Cell Sheets and Osteogenesis of Adipose
Derived Stem Cell Sheets Xiang Fang MD, Katsuhiro Hayashi MD, Hideki Murakami MD,
Hiroyuki Tsuchiya MD.

(7) その他顕著な成果

北陸の企業とのコラボレーション研究を 2016/8/31 より開始している。