

令和 3 年 4 月 30 日

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 平成 31 年度

受付番号 201960718

氏名 丸山真博

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地（派遣先国名）用務地：スタンフォード（国名：米国）
2. 研究課題名（和文）※研究課題名は申請時のものと違わないように記載すること。
大腿骨頭壊死症に対する機能的足場と骨髄由来間葉系幹細胞を併用した治療効果
3. 派遣期間：平成 31 年 4 月 22 日 ~ 令和 3 年 3 月 31 日
4. 受入機関名及び部局名
受入機関名：スタンフォード大学
部局名：医学部 整形外科
5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 **書式任意 (A4 判相当 3 ページ以上、英語で記入も可)**
(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)
(注)「6. 研究発表」以降については様式 10-別紙 1~4 に記入の上、併せて提出すること。

1. 大腿骨頭壊死症に対する新規足場の開発

早期大腿骨頭壊死症に対し、足場治療を併用した大腿骨頭穿孔術 (CD) は骨壊死領域の修復を促進し、骨頭の強度を増強させ、骨頭の圧壊を防ぐ可能性がある治療法である。近年、大腿骨頭壊死に対する骨頭温存を目的として、足場治療や細胞治療を用いた再生医療の橋渡し研究が多く行われているが、CDの際に骨孔に挿入する最適な足場については未だ明らかではない。私たちの研究グループは、ポリカプロラクトン (PCL) とβリン酸三カルシウム (β-TCP) を材料に 3D プリンターを用いて、両端は骨皮質、中央は海綿骨の強度と多孔性を有する3区画構造からなる円柱状の機能的足場 (FGS) を作製した。そして、健常家兎や家兎ステロイド誘発性大腿骨頭壊死モデルを用いて、独自開発したFGSが骨再生能を有することを報告した。しかしながら、細胞治療を併用する際、以前のFGSでは足場自体に細胞を充填することができないこと、細胞を骨孔に投与した場合、骨孔から流出してしまうことなどの問題点があった。このため、これらの問題点を改善すべく、機能的足場の中央に孔を開け、細胞を充填できるよう新たなFGSを設計した。さらに、より骨再生を促進させる最適な気孔率について調査すべく、30%または60%の気孔率を有するFGSの2種類を作製した (Figure 1)。そして、家兎ステロイド誘発性大腿骨頭壊死モデルを用いて、これら気孔率が違う2つのFGSを併用した大腿骨頭穿孔術の治療効果について検討した。マイクロCTで分析した結果、CD単独と比べ、30%および60%の気孔率を有するFGSはいずれも骨孔内の骨形成 (bone ingrowth) が促進された (Figure 2)。強度試験では、30%の気孔率を有するFGSの方が60%の気孔率を有するFGSよりも強度が高かった (Figure 3)。H&E染色において、30%の気孔率を有するFGSの周囲には分厚い、成熟した骨梁形成が確認されたが、30%の気孔率を有するFGSの周囲には薄い未成熟な骨梁形成が確認された (Figure 4)。これらの知見より、30%の気孔率を有するFGSは骨再生を促進させ、骨孔内の強度を増加させることから、CDの治療成績

を向上させる可能性を示した。この研究成果は国際雑誌に報告し掲載された (M. Maruyama, et al. Effect of porosity of a functionally-graded scaffold for the treatment of corticosteroid-associated osteonecrosis of the femoral head in rabbits, J Orthop Translat 28(28) (2021) 90-99.)

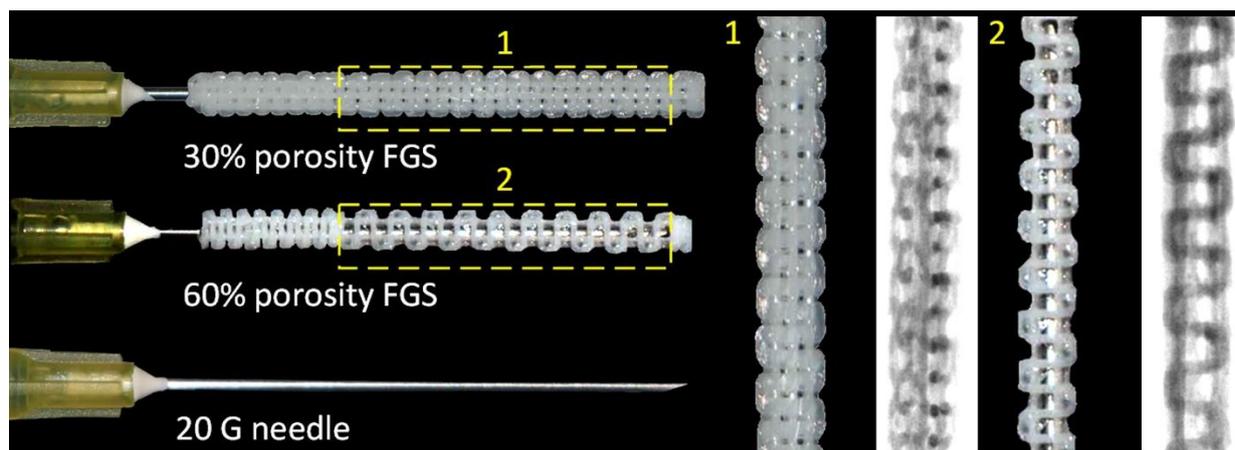


Figure 1. 30% and 60% porosity functional graded scaffold.

A functionally-graded scaffold (FGS) was made of 80% polycaprolactone and 20% β -tricalcium phosphate, created by our in-house-built 3D printer. The FGS was cylindrically shaped (3-mm diameter, 30-mm length) with 1-mm central hole, consisting of three segments of spatially graded porosity, including 1-mm length proximal segment of 0% porosity, 22-mm length middle segment of 30% or 60% porosity, and 7-mm distal segment of 15% porosity.

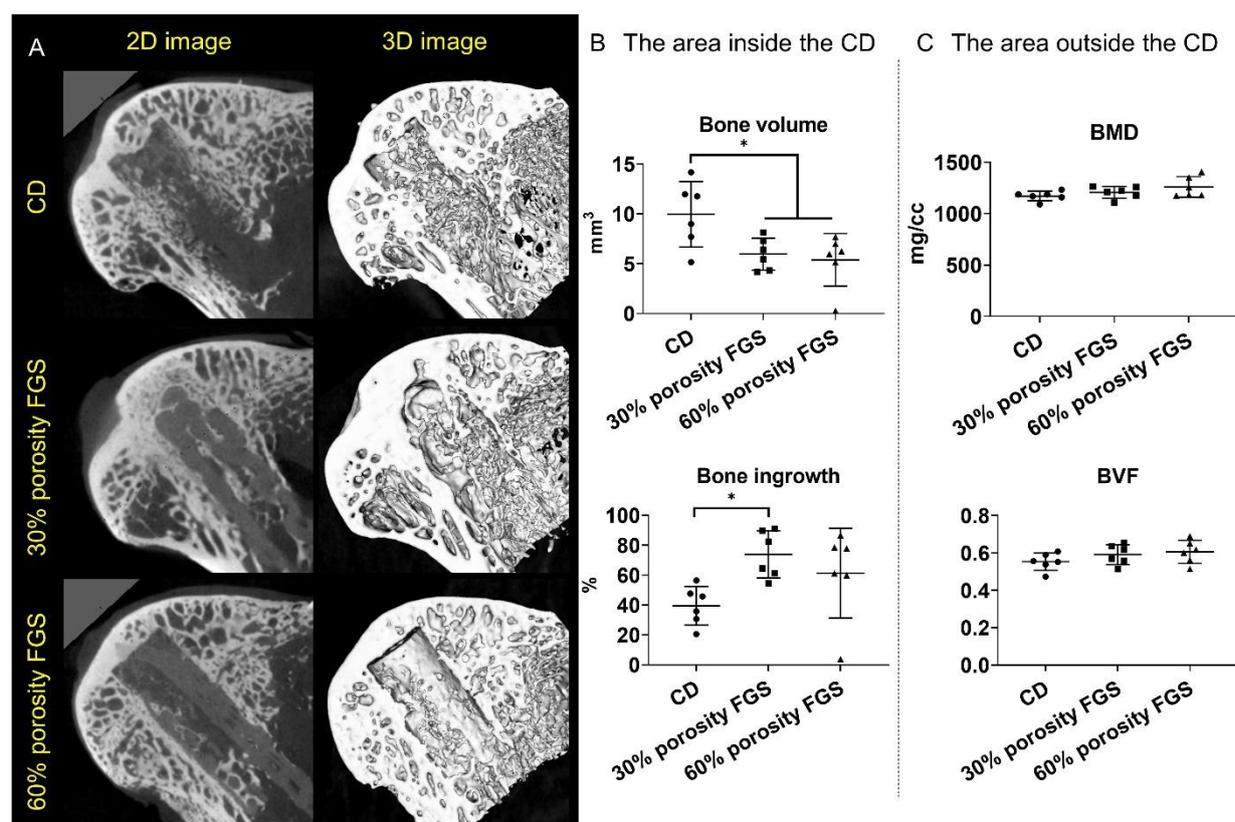


Figure 2. Representative microCT reconstructed images and analysis results.

(A) Mineralized tissue was noted in the CD group. In both the 30% and 60% porosity FGS groups, mineralized tissue was confirmed inside the FGS. (B) The area inside the CD. Bone volumes in the CD group were significantly higher than in both FGS groups. While bone ingrowth ratio in the 30% porosity FGS group was significantly higher than in the CD group (* $p < 0.05$ by Tukey's multiple comparisons test). (C) The area outside the CD. No differences in BMD and BVF were found among the three groups.

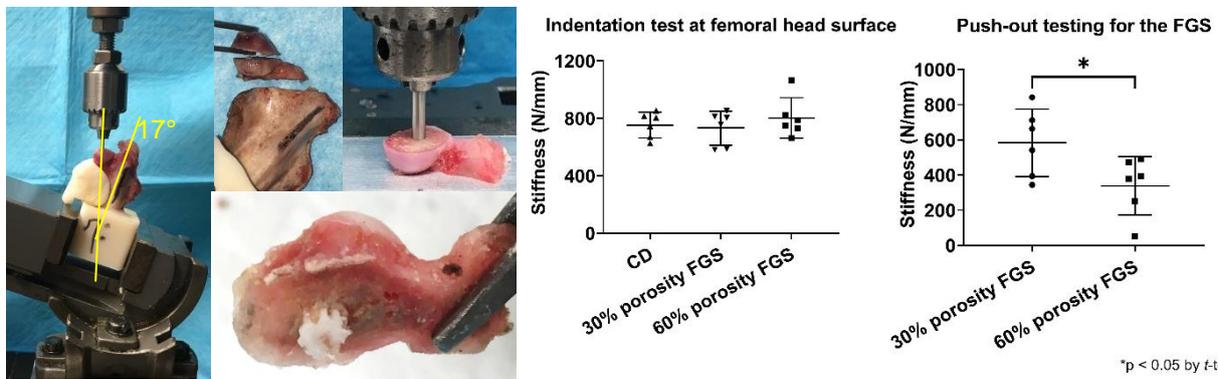


Figure 3. Mechanical testing results.

The indentation testing for the surface of the femoral head. No difference in stiffness was found among the three groups. The push-out testing for FGS in the middle segment. The stiffness in the 30% porosity FGS group was significantly higher compared to the 60% porosity FGS group (* $p < 0.05$ by Student's *t*-test).

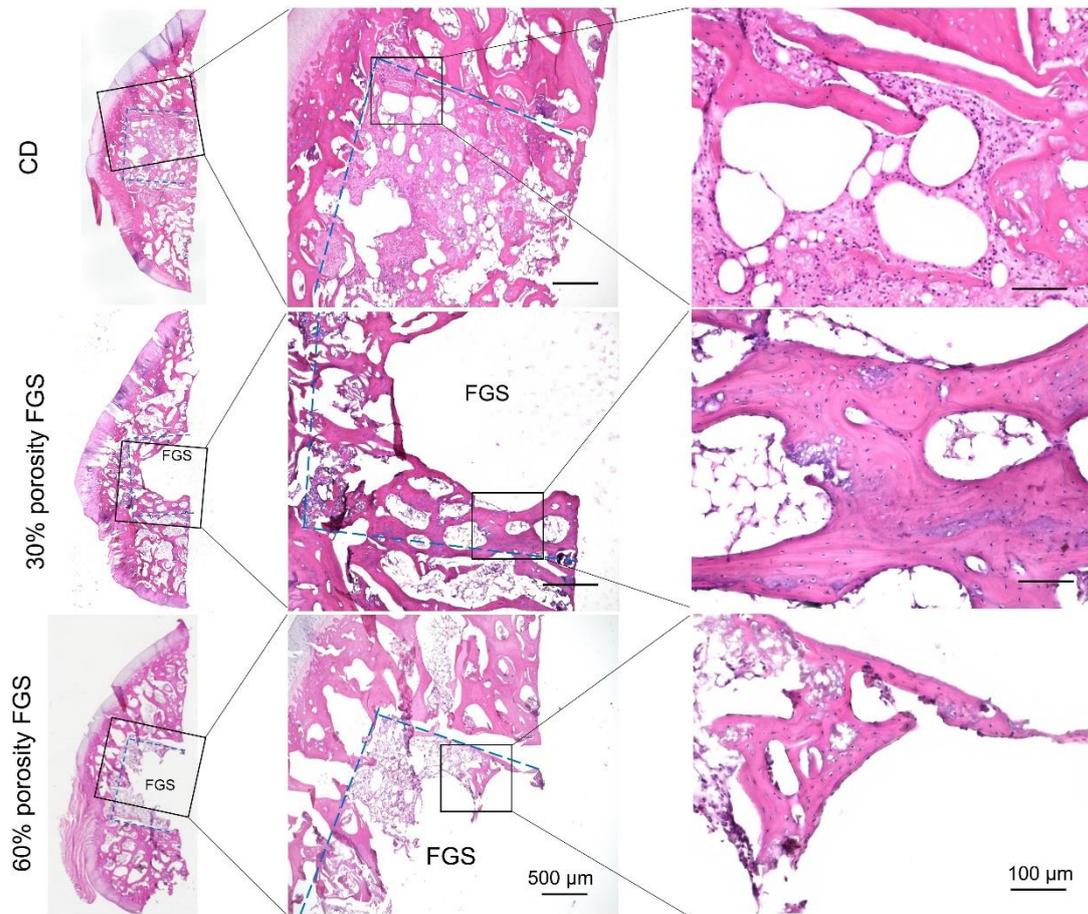


Figure 4. Representative H&E staining photomicrographs of the femoral head.

H&E staining (Magnification: 40x and 200x) showed that trabecular bones in the area inside CD were seen in the CD group. In the 30% porosity FGS group, thick trabecular bones were noted around the porous FGS. In contrast, in the 60% porosity FGS group, trabecular bones around the porous FGS were thin, and newly immature bones were confirmed. The empty spaces inside the bone tunnel in the FGS groups are artifacts left behind by scaffold struts detached during the staining process. Blue dash line: the area inside the CD.

2. 家兎骨壊死モデルに対するプレコンディショニングした間葉系幹細胞または遺伝子改変したIL4過剰産生間葉系幹細胞の効果

近年、免疫制御による骨再生の促進が報告されている。その1つの方法として、目的用途前に間葉系幹細胞 (MSC) を炎症性サイトカインに暴露させMSCの免疫制御能を向上させるプレコンディショニングがある。また、抗炎症性サイトカインであるIL4を遺伝子改変により過剰産生するMSC (IL4-MSC) を使用することにより、炎症を制御する方法がある。しかし、これらの方法による早期大腿骨頭壊死 (ONFH) に対する治療効果については明らかではない。本報告の目的は、プレ

コンディショニングしたMSC (pMSC) またはIL4-MSCを併用した骨頭減圧術 (CD) の治療効果について家兔ステロイド誘発性大腿骨頭壊死モデルを用いて調査した。

In vitro研究

家兔MSCを購入し、レンチウイルスを用いてIL4-MSCを作製した。リポポリサッカライド (LPS) とTNF α を添加した培地でMSCおよびIL4-MSCを3日間培養しプレコンディショニングを行いpMSCおよびIL4-pMSCを作製した。MSC, pMSC, IL4-MSC, およびIL4-pMSCの4つの細胞増殖率, IL4発現量, 骨分化能を評価した (Figure 5)。細胞増殖能はIL4-pMSCが他の3つと比べ最も高かった。一方、プレコンディショニングをしたpMSCおよびIL4-pMSCはそれぞれMSCおよびIL4-MSCと比べ細胞増殖能が低下した。IL4-pMSCのIL4発現量はIL4-MSCに比べ低く、プレコンディショニング後にIL4の発現量が低下した。骨分化能はpMSCがもっとも高く、IL4-MSC, IL4-pMSCいずれも骨分化能力は低かった。

In vitro研究

家兔にメチルプレドニゾロン筋注4週後、手術を行い6群を作製した。1) CD群: 左側の大腿骨頭に対しCDを実施, 2) ハイドロゲル (HG) 群: CD+骨孔内にHGを充填, 3) MSC群: 家兔MSCをHGに混ぜ骨孔内に投与, 4) pMSC群: MSCをLPS+TNF α を添加した培地で3日間プレコンディショニング後に投与, 5) IL4-MSC群: レンチウイルスを用いて作成したIL4-MSCを使用。6) IL4-pMSC群: IL4-pMSCを投与。術後8週に大腿骨を摘出し、マイクロCT, 強度試験, および病理組織学的評価を行った。その結果, pMSC群は大腿骨頭の骨密度や骨量体積率がCD群よりも有意に高かった ($p < 0.05$, Figure 6)。一方, IL4-MSC群は骨孔内の骨密度や骨量体積率が低かった ($p < 0.05$)。組織学的評価において, pMSC群はCD31染色陽性血管が多く観察された。一方, IL4-MSC群はempty lacunae率が他の群よりも有意に低値であった ($p < 0.05$, Figure 7)。強度試験では6群間で有意な差がなかった。

これらin vitro およびin vivo研究の結果より, pMSCは骨分化能を促進し, pMSCを併用したCDは大腿骨頭内の血管新生および骨再生が促進した。一方, IL4-MSCは細胞増殖を促進し, IL4-MSCを併用したCDは大腿骨頭内の骨壊死領域を減少させた。したがって, pMSCおよびIL4-MSCを併用したCDは早期ONFHの治療成績を向上させる可能性が示された。この研究成果は国際雑誌に報告し掲載予定である (M. Maruyama, et al. The efficacy of lapine preconditioned or genetically modified IL4 over-expressing bone marrow-derived mesenchymal stromal cells in corticosteroid-associated osteonecrosis of the femoral head in rabbits, Biomaterials 2021. In press)

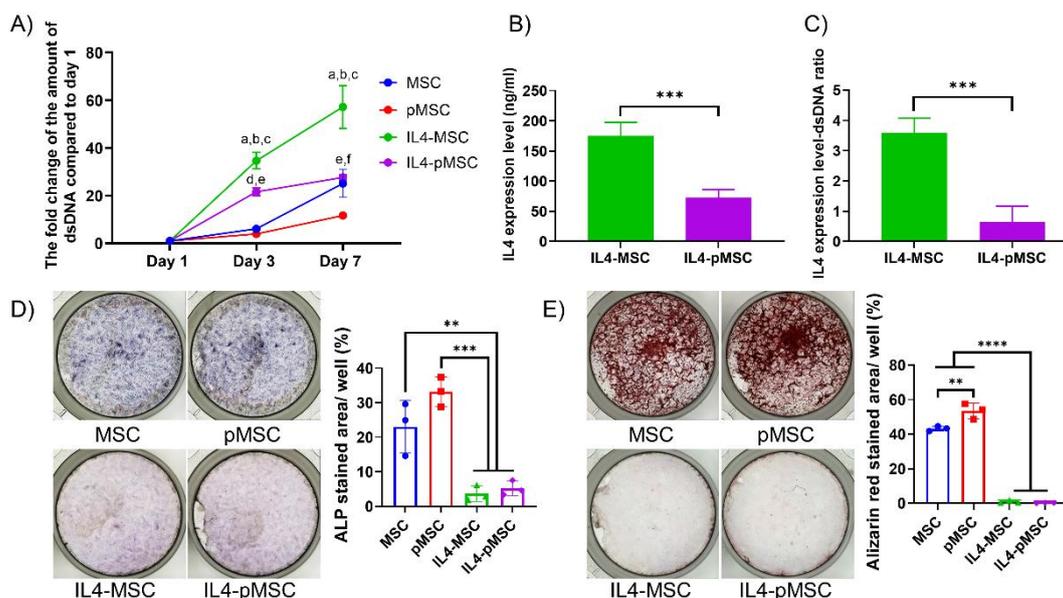


Figure 5. Results of in vitro studies.

(A) Cellular proliferation was measured by PicoGreen dsDNA quantitation assay. Cell proliferation of the IL4-MSC group was significantly higher than all other groups at days 3 and 7 ($p < 0.005$, in each). In addition, cell proliferation of the IL4-pMSC group was significantly greater than the MSC and pMSC groups at day 3 ($p < 0.005$, in each) and was greater than the pMSC group at day 7 ($p < 0.05$). Moreover, cell proliferation of the MSC group was significantly higher than the pMSC group at day 7 ($p < 0.05$). a: the IL4-MSC group vs the

MSC group, $p < 0.005$, b: the IL4-MSC group vs the pMSC group, $p < 0.005$, c: the IL4-MSC group vs the IL4-pMSC group, $p < 0.005$, d: the IL4-pMSC group vs the MSC group, $p < 0.005$, e: the IL4-pMSC group vs the pMSC group, $p < 0.005$, f: the MSC group vs the pMSC group, $p < 0.05$ (B) IL4 expression level at day 3 in the IL4-MSC group was significantly higher than IL4-pMSC group ($p < 0.005$). (C) IL4 expression levels/DNA ratio at day 3 in IL4-MSC group was significantly higher than IL4-pMSC group ($p < 0.005$). (D, E) ALP staining demonstrated that the percentage of stained area in both the MSC and pMSC groups was higher compared to both the IL4-MSC and IL4-pMSC groups ($p < 0.01$). Similarly, both the MSC and pMSC groups showed higher percentage of Alizarin Red staining area compared to both the IL4-MSC and IL4-pMSC groups ($p < 0.01$). Furthermore, the pMSC group demonstrated higher percentage of Alizarin Red staining area than the MSC group ($p < 0.01$).

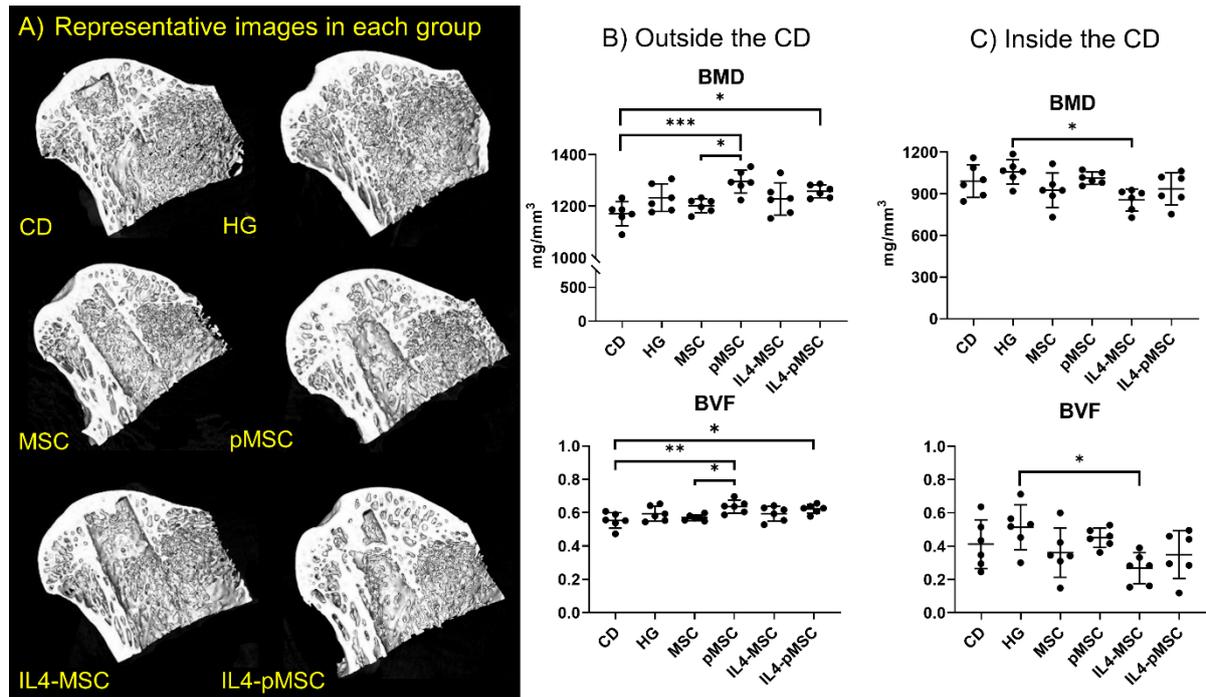


Figure 6. Representative images of MicroCT and data analysis

For the area outside the CD, bone marrow density (BMD) and bone volume fraction (BVF) in the pMSC group were significantly higher than in the CD and MSC groups ($p < 0.05$). Furthermore, BMD and BVF in the IL4-pMSC group were significantly higher than in the CD group ($p < 0.05$). Interestingly, for the area inside the CD, BMD and BVF in the IL4-MSC group were significantly lower than in the HG group ($p < 0.05$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$.

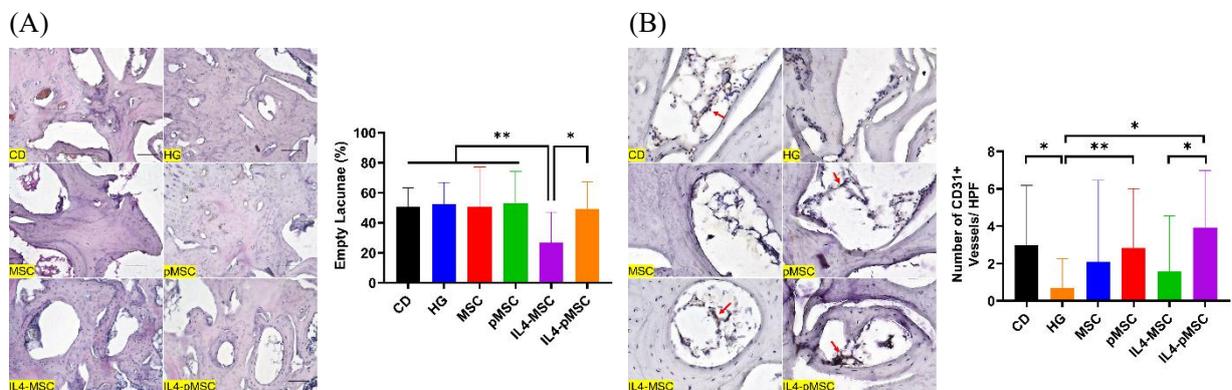


Figure 7. Representative images of H&E and CD31 staining of the femoral head and the data analysis

(A) H&E staining. Empty lacunae and pyknotic osteocytes were seen within the subchondral bone area in all groups. However, the IL4-MSC group showed that normal osteocytes were widely distributed in the trabecular bone, and empty lacunae were less. In contrast, all the other groups demonstrated that empty lacunae

widespread in the trabecular bone. The percentage of empty lacunae was significantly less in the IL4-MSC group ($p < 0.05$). (B) The CD, pMSC, and IL4-pMSC groups had a greater number of CD31 positive stained microvessels than the HG group ($p < 0.05$). The IL4-MSC group had a lower number of CD31 positive stained microvessels than the IL4-pMSC group ($p < 0.05$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$