

令和 2 年 5 月 11 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10983

研究課題名(和文) 成長因子固相化軟骨細胞シート・同種骨複合体による広範囲骨軟骨欠損修復法の確立

研究課題名(英文) Establishment of widespread osteochondral defect repair method using the growth factor binding chondrocyte cell-sheet / allogeneic bone complex

研究代表者

小沼 賢治 (Onuma, Kenji)

北里大学・医学部・講師

研究者番号：80348557

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：広範囲骨軟骨欠損の修復を目指し、家兎骨軟骨欠損モデルに対する同種骨移植と滑膜間葉系細胞移植を併用した骨軟骨再生法の有用性を検討することを目的とし研究を行った。過去の報告では、直径5mm、深さ3mmの家兎骨軟骨欠損モデルに対する滑膜間葉系細胞移植単独の良好な軟骨修復の結果が報告されている。本研究では、直径5mm、深さ10mmの、過去の報告と比較しより深い骨軟骨欠損モデルを作製し、同種骨移植と滑膜間葉系細胞移植を併用した骨軟骨欠損の修復を試みた。その結果、移植した同種骨の上に良好な軟骨組織の再生が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来の広範囲骨軟骨欠損に対する治療は、ドナーが豊富な米国では非生体ドナーから採取する同種骨軟骨移植が適応になり広く行われている。一方本邦では非生体ドナーが少なく、同種骨軟骨移植は行うことができない。本研究成果が臨床応用されれば、本邦でも入手可能な保存同種骨と人工膝関節手術時に採取した滑膜組織より採取し、培養した滑膜間葉系幹細胞を併用した、自己組織を犠牲にしない広範囲骨軟骨欠損の治療が可能となる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to establish repairing methods for a widespread osteochondral defects with allogeneic bone grafting and synovial mesenchymal cell transplantation using a rabbit osteochondral defect model. Previous reports have reported successful cartilage repair by synovial mesenchymal cell transplantation alone in a rabbit osteochondral defect model with a diameter of 5 mm and a depth of 3 mm. In this study, we created a deeper model of osteochondral defect with a diameter of 5 mm and a depth of 10 mm. We tried to repair the osteochondral defect with allogeneic bone grafting and allogeneic synovial mesenchymal cell transplantation. As a result, good regeneration of subchondral bone and cartilage tissue was observed. It was suggested that this method, which does not sacrifice autologous tissue, could be applied to the treatment of widespread osteochondral defects.

研究分野：整形外科

キーワード：広範囲骨軟骨欠損 同種骨移植 滑膜由来間葉系細胞移植

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

外傷、腫瘍、離断性骨軟骨炎に伴う関節機能の破綻は患者の日常生活動作、生活の質を著しく低下させる。これらに伴う軟骨欠損に対し自家骨軟骨組織移植、自家培養軟骨細胞移植は有用であるが、外傷などにより軟骨欠損に加え広範囲に骨欠損を伴う症例では、再建が困難である。一方、同種骨軟骨組織移植は広範囲骨軟骨欠損に有用であるが、低温保存中の軟骨細胞活性の低下が移植後成績向上の妨げとなっている。このような背景から、同種骨軟骨移植に代わる、本邦で実現可能な広範囲骨軟骨欠損の治療法について検討する必要がある。

### 2. 研究の目的

近年、軟骨再生医療の発展は目覚ましく、自己培養軟骨細胞移植や滑膜間葉系幹細胞移植による軟骨再生が臨床応用可能となった。一方、離断性骨軟骨炎の重症例や外傷による広範囲骨軟骨欠損に対しては、土台となる骨欠損が問題となるため、膝関節骨軟骨組織や肋骨軟骨による自己組織を使用した軟骨再生に頼らざるを得ない。今回、われわれは、広範囲骨軟骨欠損の修復を目指し、軟骨および骨組織を欠損した家兎骨軟骨欠損モデルを作成し、同種骨移植と滑膜間葉系幹細胞移植を併用した関節軟骨再生を試みたので報告する。

### 3. 研究の方法

日本白色家兎 (3.0-3.5 kg) 雄を使用した。ドナー家兎の膝関節から滑膜組織と円柱状の骨組織を採取した。骨組織は-30℃で保存し、滑膜組織はトリプシン処理後、滑膜間葉系細胞を2週間平面培養した。レシピエント家兎の両側大腿骨顆部関節軟骨に直径5mm、深さ10mmの円柱状の骨軟骨欠損を作成し、一方の骨軟骨欠損部には同種骨移植のみを行い(以下、B群)、もう一方の骨軟骨欠損部には同種骨移植と滑膜間葉系細胞を移植した(以下、BS群)。移植後、12週間で、大腿骨顆部を採取し移植部を評価した。肉眼的評価、 $\mu$ CTによる骨組織の評価後、パラフィン包埋した組織の薄切片を作成し、HE染色およびサフラニンO染色にて移植部を評価した。

### 4. 研究成果

肉眼的評価ではB群、BS群ともに移植後12週間で表面はほぼ修復された(Fig.1)。 $\mu$ CT評価では移植した同種骨組織は骨癒合していた。また、B群、BS群はともに、同種骨を移植しなかったものに比較して、軟骨下骨の良好な形成が認められた(Fig.2)。組織学的組織評価(HE染色)はB群、BS群ともに軟骨下骨と軟骨の修復が認められた(Fig.3)。組織化学的評価(サフラニンO染色)では、移植後12週において、BS群はB群の組織と比較し、サフラニン染色性が良好な軟骨組織で修復された(Fig.4)。有益な結果が示されつつあるものの、修復状態に個体差があるため、さらなる検討を要する段階で有る。

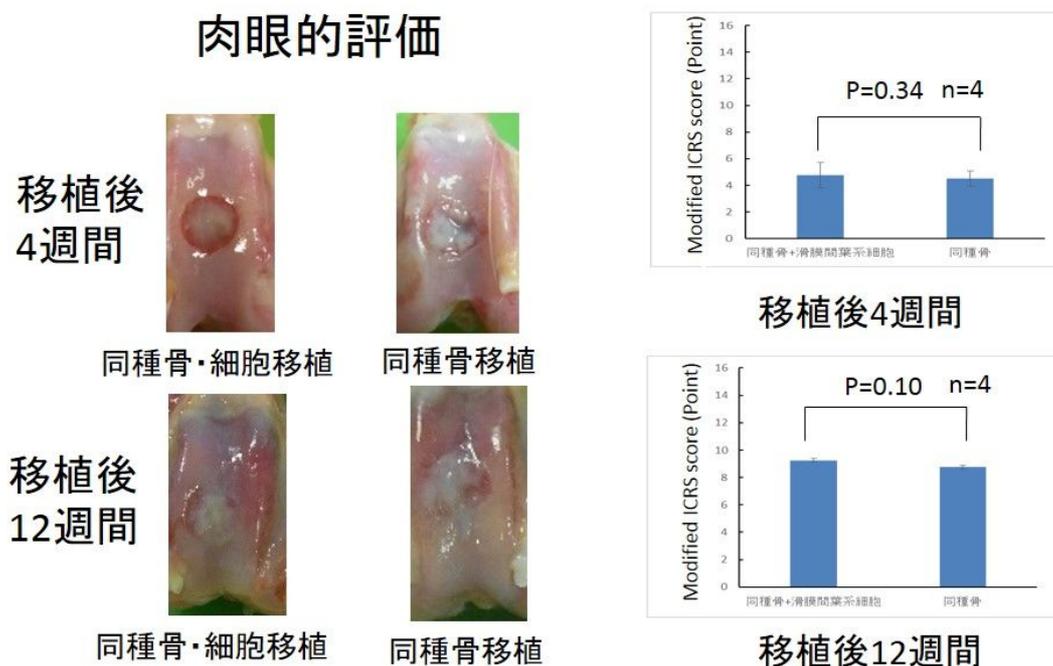


Fig. 1 移植後12週間の移植部の肉眼像。同種骨と滑膜間葉系細胞を移植した群と同種骨のみを移植した群ではともに移植後4週間に比較し12週間で修復が進行したことが示された。

## μCTによる評価

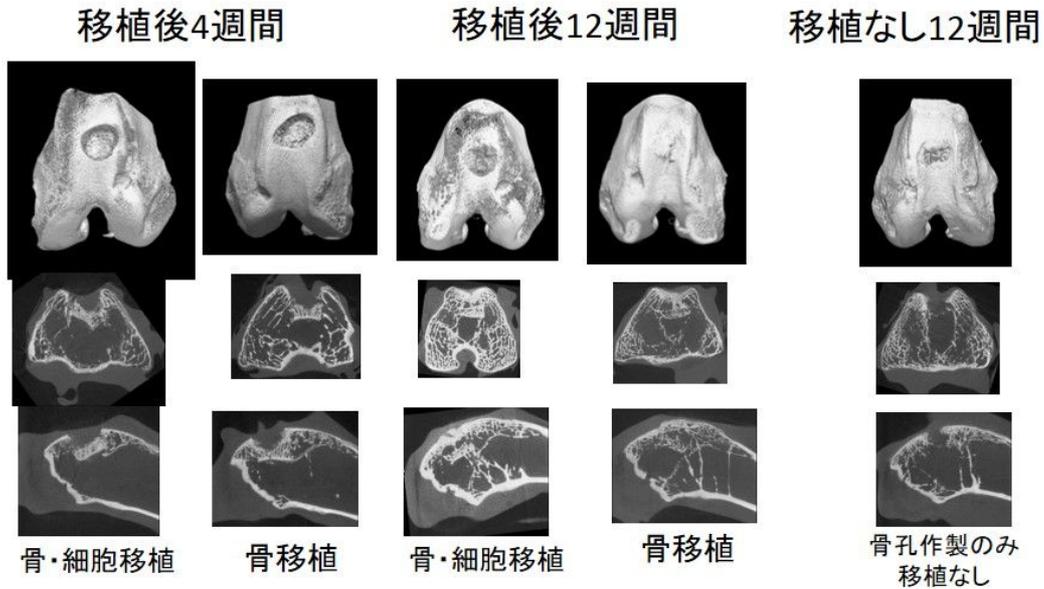


Fig.2 μCTによる評価。移植後4週間では骨皮質、軟骨下骨の形成は両群ともに認められないが移植後12週間では、両群ともに移植骨の上に骨皮質、軟骨下骨形成が認められた。骨孔のみ作成した群では12週間において軟骨下骨の形成は認められなかった。

## 組織学的評価(HE染色)



Fig3. 移植後12週間の組織像(HE染色)。同種骨と滑膜間葉系細胞移植を行った個体と、同種骨移植のみを行った個体はともに軟骨下骨と軟骨組織形成を認めた。同種骨移植を行わなかった個体では、軟骨下骨の形成が不良であり、軟骨組織の周囲組織との連続性もなかった。

## 組織化学的評価（Safranin-O染色）

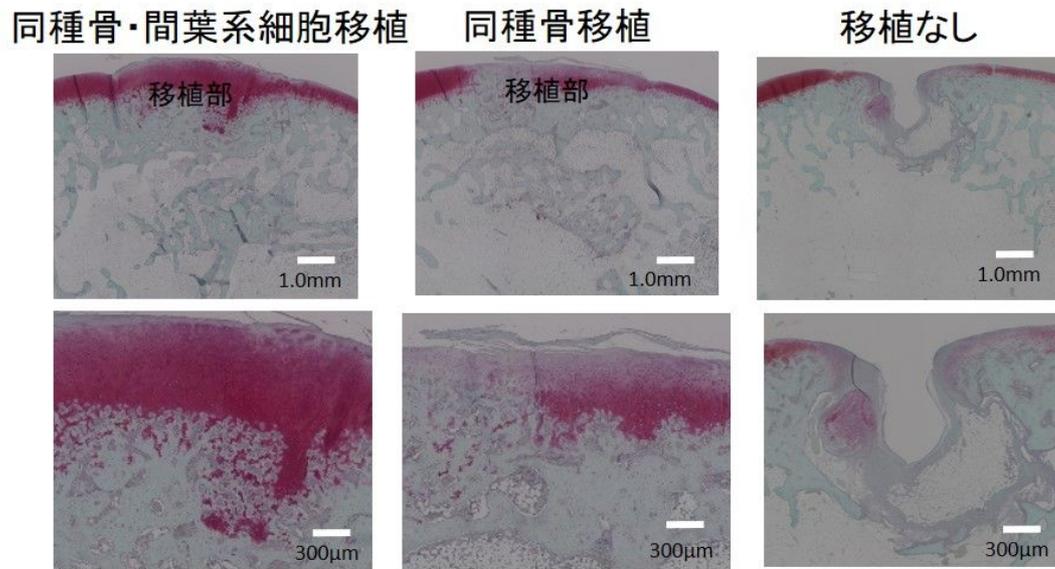


Fig.4 移植後12週間のSafranin-O染色像。同種骨移植のみを行った個体では同種骨と滑膜間葉系幹細胞を移植した個体に比較し軟骨組織のサフランin染色性が低下していた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Sukegawa Koji, Kuniyoshi Kazuki, Suzuki Takane, Matsuura Yusuke, Onuma Kenji, Kenmoku Tomonori, Takaso Masashi	4. 巻 23
2. 論文標題 Effects of the Elbow Flexion Angle on the Radial Nerve Location around the Humerus: A Cadaver Study for Safe Installation of a Hinged External Fixator	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Hand Surgery (Asian-Pacific Volume)	6. 最初と最後の頁 388 ~ 394
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1142/S242483551850042X	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nagura Naoshige, Kenmoku Tomonori, Onuma Kenji, Fukushima Kensuke, Fujimaki Hisako, Takahira Naonobu, Takaso Masashi	4. 巻 5
2. 論文標題 Three-dimensional full-scale bone modeling for preoperative simulation of surgery in patients with elbow contractures due to bone deformities	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Clinical Case Reports	6. 最初と最後の頁 1401 ~ 1406
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ccr3.1003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Takano Shotaro, Uchida Kentaro, Inoue Gen, Minatani Atsushi, Miyagi Masayuki, Aikawa Jun, Iwase Dai, Onuma Kenji, Mukai Manabu, Takaso Masashi	4. 巻 10
2. 論文標題 Increase and regulation of synovial calcitonin gene-related peptide expression in patients with painful knee osteoarthritis	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Pain Res	6. 最初と最後の頁 1099 ~ 1104
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2147/JPR.S135939	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Saito Wataru, Mizuno Kosuke, Inoue Gen, Imura Takayuki, Nakazawa Toshiyuki, Miyagi Masayuki, Shirasawa Eiki, Uchida Kentaro, Takaso Masashi	4. 巻 11
2. 論文標題 Perioperative Evaluation of Respiratory Muscle Strength after Scoliosis Correction in Patients with Duchenne Muscular Dystrophy	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Asian Spine	6. 最初と最後の頁 787 ~ 787
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4184/asj.2017.11.5.787	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Saito Wataru, Namba Takanori, Inoue Gen, Imura Takayuki, Miyagi Masayuki, Nakazawa Toshiyuki, Shirasawa Eiki, Uchida Kentaro, Takaso Masashi	4. 巻 22
2. 論文標題 Spinal correction in patients with Fukuyama congenital muscular dystrophy	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Orthop Sci	6. 最初と最後の頁 658 ~ 664
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jos.2017.02.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Uchida Kentaro, Inoue Gen, Matsushita Osamu, Horikawa Kyosuke, Sekiguchi Hiroyuki, Saito Wataru, Takano Shotaro, Fujimaki Hisako, Miyagi Masayuki, Takaso Masashi	4. 巻 2017
2. 論文標題 Basic Fibroblast Growth Factor-Anchored Multilayered Mesenchymal Cell Sheets Accelerate Periosteal Bone Formation	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 BioMed Research International	6. 最初と最後の頁 1 ~ 8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2017/4371460	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 平川紀子 成瀬康治 占部憲
2. 発表標題 大腿骨内側顆開放骨折によって生じた広範囲骨軟骨欠損に対して同種骨移植術と自家培養軟骨細胞移植術を併用した1例
3. 学会等名 第5回日本関節鏡・膝・スポーツ整形外科学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中脇 充章, 内田 健太郎, 小沼 賢治, 助川 浩士, 見目 智紀, 名倉 直重, 田澤 諒, 高野 昇太郎, 関口 裕之, 相川 淳, 大貫 裕子, 井上 玄, 高相 晶士
2. 発表標題 手根管症候群の滑膜下結合組織においてtransforming growth factor- はcyclooxygenase-2とnerve growth factorの発現を制御する
3. 学会等名 日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 名倉 直重, 見目 智紀, 内田 健太郎, 藤巻 寿子, 中脇 充章, 大貫 裕子, 宮城 正行, 井上 玄, 助川 浩士, 小沼 賢治, 高相 晶士
2. 発表標題 慢性疼痛発症のメカニズムと治療 腱板断裂における夜間痛と疼痛関連物質の関連性
3. 学会等名 日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2017年

〔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
研究分担者	内田 健太郎  (Uchida Kentaro)  (50547578)	北里大学・医学部・講師   (32607)	
研究分担者	齋藤 亘  (Saito Wataru)  (60439099)	北里大学・医学部・講師   (32607)	
研究分担者	助川 浩士  (Sukegawa Koji)  (60458809)	北里大学・医学部・助教   (32607)	
研究分担者	占部 憲  (Urabe Ken)  (90284489)	北里大学・北里大学メディカルセンター・教授   (32607)	