

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K09438

研究課題名（和文）骨形成細胞シートと生体内誘導骨形成膜の融合による新規骨再生研究

研究課題名（英文）Bone regeneration with combination of osteogenic matrix cell sheet and induced membrane technique

研究代表者

河村 健二（Kawamura, Kenji）

奈良県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20445076

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：骨形成細胞シートと生体内誘導骨形成膜を融合させることで、骨欠損に対して効果的な骨再生が可能であるかどうかを、ラット大腿骨骨欠損モデルを用いて検証した。骨形成細胞シート移植群では非移植群と比較して、レントゲンで経時的に良好な骨再生を認めた。実験から12週間後の時点において、骨形成細胞シート移植群で偽関節を生じた個体はなかったが、非移植群では偽関節になり大腿骨固定プレートの破損を生じる個体を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨欠損の新たな再建法として臨床で注目されているInduced membrane techniqueは、高度な技術を必要としない利点があるが、大量の自家海綿骨移植を必要とするのが欠点である。Induced membrane（生体内誘導骨形成膜）に骨形成細胞シートを付加することで、骨再生能力を増強出来れば、移植に必要な海綿骨を減量させるが可能となる。本法がよりドナー障害の少ない骨欠損の再建法と成り得ることが動物実験で示唆された。

研究成果の概要（英文）：Bone regeneration of the rat femoral bone defects by osteogenic matrix cell sheet combined with induced membrane technique was investigated. The 10 mm bone defect was made at rat femoral bone and fixed with a locking plate. Poly Methyl Methacrylate (PMMA) was filled in the bone defect at the first surgery. Osteogenic matrix cell sheet was made from cultured mesenchymal stem cells. The osteogenic matrix cell sheet was implanted around the PMMA. At the second surgery, the TCP was implanted in the bone defect after removal of the PMMA. Compared to the non-transplanted group, the osteogenic matrix cell sheet transplantation group showed better bone regeneration over time by x-ray. At 12 weeks after surgery, none of the osteogenic matrix cell sheet transplantation group developed pseudoarthrosis, whereas some individuals in the non-transplanted group developed pseudoarthrosis.

研究分野：整形外科

キーワード：骨再生 骨欠損 細胞シート

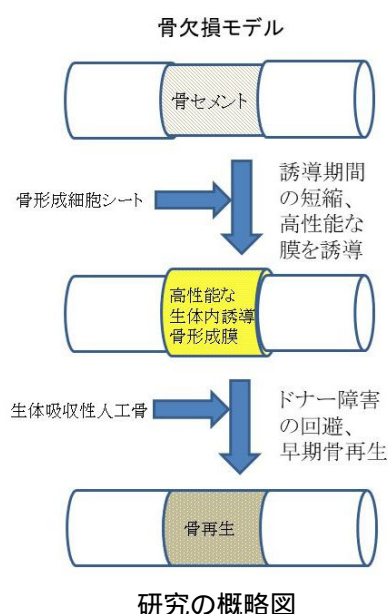
様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

外傷、感染、腫瘍などが原因で生じる四肢の巨大骨欠損は、今なお難治性疾患であり新規治療法の開発が期待されている分野である。血管柄付き骨移植術は巨大骨欠損の治療法の1つとして1975年の報告以降、臨床で使用されてきたが、高度なマイクロサージャリー技術を要すること、採取量に限界があること、採取部の障害が避けられないことなどの多くの問題が存在する(文献)。また、創外固定器を用いた仮骨延長法も、治療期間の長さ、創外固定ピン刺入部の感染、隣接関節の可動域制限など多くの問題が存在する。2000年にフランスのMasquet博士らが報告したInduced membrane technique(通称Masquet法)が新たな巨大骨欠損の治療法として注目されている(文献)。本法は骨欠損部に充填したPoly Methyl Methacrylate(PMMA)の周囲に生体内で誘導される膜様組織の内部に、二次的に自家海綿骨を移植して骨再生を誘導する方法である。Masquet法は血管柄付き骨移植のような高度な技術を必要としない利点があるため、近年になって臨床報告例が散見されるようになってきた。しかし、Masquet法は大量の自家海綿骨移植を必要とする欠点があり、自家骨採取部の骨折や慢性疼痛などの重篤な合併症も報告されており、さらなる研究が期待されている。

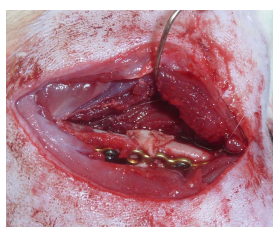
2. 研究の目的

我々は骨髄間葉系幹細胞をシート状に培養した骨形成細胞シート(Osteogenic matrix sheet)を開発し(特願2014-244084)その骨形成能の高さを証明してきた(文献)。本シートはゼラチン様の可塑性を有し、Scaffoldなしで骨形成能を有する骨関節領域で有望なcell sheet engineeringの一技法である(文献)。本研究では我々が開発した骨形成細胞シートと生体内誘導骨形成膜を融合させることで、骨欠損に対する新しい効果的な骨再生治療法を開発することが目的である。骨形成細胞シートと生体内誘導骨形成膜の融合は、本研究が初の試みであるが、Scaffoldなしで旺盛な骨形成能を有する骨形成細胞シートをMasquet法の第一段階(骨欠損部に骨セメントを充填)で骨セメント周囲に移植することで、従来法よりも早期に骨形成の高い生体内誘導骨形成膜が作製されると考えている。高性能の生体内誘導骨形成膜を作製することで、Masquet法の第二段階(骨セメントを自家海綿骨に置換)において移植する自家骨の量を減らしたり、人工骨で代用したりすることで、ドナー障害を最小とし、早期に確実な骨再生が期待出来ると考えている。すなわち、本研究によってMasquet法の欠点である生体内骨形成膜の誘導に要する期間やドナー障害、期待する骨形成が得られないなどの諸問題を解決し、難治性骨欠損や偽関節の治療の発展に大きく貢献出来ると考えている。



3. 研究の方法

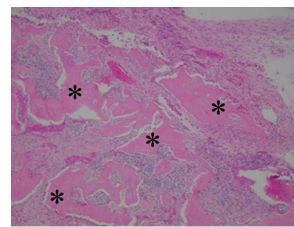
10週齢Fischer344ラットの右大腿骨に10mmの骨欠損を作製し、ロッキングプレートで大腿骨を架橋固定した後に、骨欠損部にPMMAを充填した(図1)。あらかじめ同系7週齢ラットの骨髄間葉系幹細胞から作製しておいた骨形成細胞シート(図2a,b)をPMMA周囲に移植した(移植群)。コントロール群は骨形成細胞シートを移植しない従来のMasquet法とした。各群20匹ずつ作製した。4週間後にPMMA周囲に形成された生体内誘導骨形成膜を切開して、PMMAを生体吸収性人工骨(TCP)に置換した。生体吸収性人工骨移植後、2週、4週、8週における経時的な骨再生能をレントゲンおよび組織学的に評価した。最終的に12週の時点での各群の骨癒合の獲得の有無と、組織学的な評価を行った。



(図1) 実験モデル



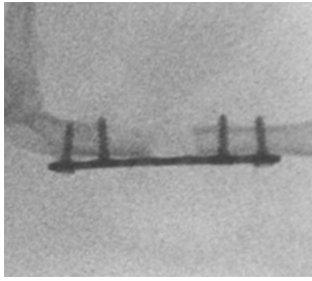
(図2a) 骨形成細胞シート



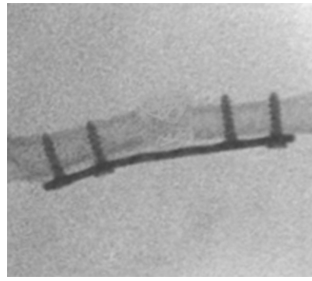
(図2b) 骨形成能(HA染色)

4. 研究成果

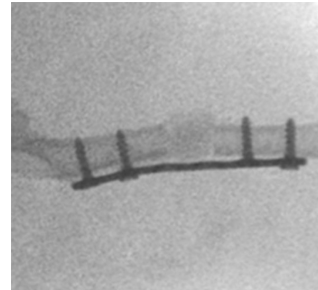
生体吸収性人工骨移植後の2週、4週、8週における骨再生をレントゲンで計測した結果、骨形成細胞シート移植群では、骨欠損部に経時的な骨再生を認めた(図3)が、コントロール群では骨再生は乏しかった(図4)。



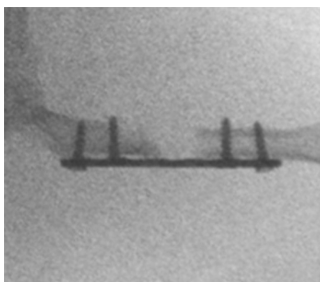
(図3) シート移植 2w



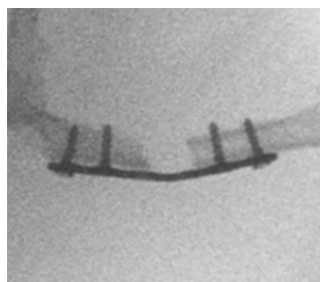
シート移植 4w



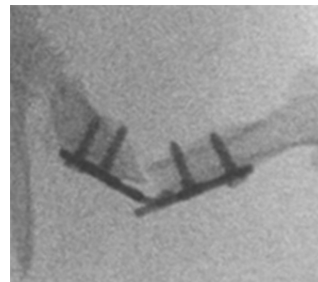
シート移植 8w



(図4) コントロール 2w



コントロール 4w

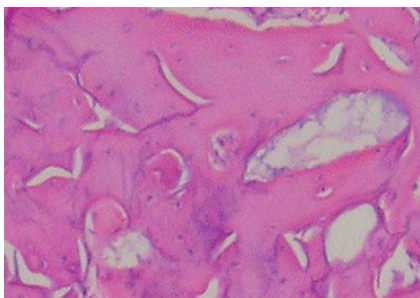


コントロール 8w

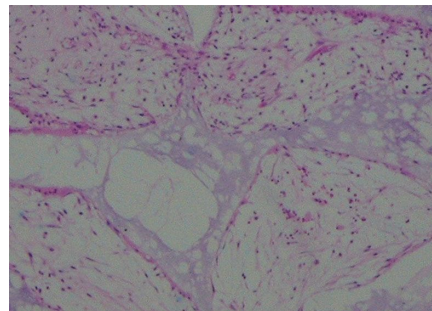
最終的に12週の時点において、骨形成細胞シート移植群では20匹中15匹(75%)でレントゲン評価では骨癒合が得られていたが、コントロール群では全例で骨癒合が得られておらず、8例においてプレートの破損を認めていた。

骨形成細胞シート移植群における新生骨部の組織学的評価では、成熟した骨組織を認めていたが(図5)、コントロール群における偽関節部の組織学的評価は、繊維芽細胞を含む癒痕組織を認めていた(図6)。

以上の結果から、Masquelet法の第一段階において骨形成細胞シートをPMMA周囲に移植することで、骨形成能の高い生体内骨形成膜を誘導できることが示唆された。



(図5) シート移植 (HA染色)



(図6) コントロール (HA染色)

<引用文献>

Taylor GI, Miller GD, Ham FJ. The free vascularized bone graft. A Clinical extension of microvascular techniques. *Plast Reconstr Surg.* 1975;55(5):533-544.

Masquelet AC, Fitoussi F, Begue T, Muller GP. Reconstruction des os longs par membrane induite et autogreffe spongieuse. *Ann Chir Plast Esthet.* 2000;45(3):346-353.

Akahane M, Nakamura A, Ohgushi H, Shigematsu H, Dohi Y, Takakura Y. Osteogenic matrix sheet-cell transplantation using osteoblastic cell sheet resulted in bone formation without scaffold at an ectopic site. *J Tissue Eng Regen Med.* 2008;2(4):196-201.

Onishi T, Shimizu T, Akahane M, Omokawa S, Okuda A, Kira T, Inagak Y, Tanaka Y. Osteogenic extracellular matrix sheet for bone tissue regeneration. *Eur Cell Mater.* 2018;36:68-80.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kenji Kawamura
2. 発表標題 Pedicle vascularized bone grafts in upper limb reconstruction
3. 学会等名 14th International Conference of the Egyptian Society for Surgery of the Hand & Microsurgery (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kenji Kawamura
2. 発表標題 Microsurgical reconstruction for mangled hand injury
3. 学会等名 15th Congress of the European Federation of Societies for Microsurgery
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kenji Kawamura
2. 発表標題 Functional reconstruction of severely damaged hand using microsurgery
3. 学会等名 12th World Congress of the World Society for Reconstructive Microsurgery
4. 発表年 2023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	清水 隆昌 (Shimizu Takamasa) (70464667)	奈良県立医科大学・医学部・学内講師 (24601)	

6. 研究組織（つづき）

	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	面川 庄平 (Omokawa Shohei) (70597103)	奈良県立医科大学・医学部・教授 (24601)	

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