

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 8 月 19 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592198

研究課題名(和文)再生医療技術を応用した四肢の拘縮性偽関節の治療に関する研究

研究課題名(英文)Effectiveness of osteogenic cell sheet for contractured rat femur nonunion model

研究代表者

面川 庄平 (omokawa, shohei)

奈良県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70597103

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：我々は今回、ラット大腿骨偽関節モデルにおける骨髄由来間葉系幹(骨形成)細胞シートの『注入型骨移植』の有用性を検討するために、移植床の骨形成能が乏しく、偽関節となるような骨折モデルを作製し、骨形成細胞シートの注入実験を行った。本実験の結果から、骨折部に骨形成能を付加し、骨折部の最大曲げ荷重値を早期に回復させ、骨癒合させることが明らかとなった。周囲組織との癒着を予防する効果を認めなかった。骨形成細胞シートを用いた『注入型骨移植』による低侵襲な偽関節治療に対する有用性が示された。本研究を発展させることによって、長期療養を余儀なくされる偽関節患者の治療期間を短縮でき、早期の社会復帰が期待できる。

研究成果の概要(英文)：We evaluated whether a percutaneous injection of osteogenic cell sheet (OCSs) could enhance bone regeneration in a nonunion site without adhesions to surrounding structures. Nonunion models were created in the femora of rats using marrow ablation and periosteal removal. The rats were then randomly divided into 3 groups. Six hours after fracture, one group received an injection of OCSs (OCS group), the second, pre-differentiated BMSCs (BMSC group) and the third, PBS (control group). Radiological and histological evaluation demonstrated enhanced bone regeneration in the OCS group as compared with the other groups. Biomechanical testing revealed a significantly higher maximum bending load in the OCS group compared with the other groups. No prophylactic effects were observed in the OCS group for adhesion to surrounding structures. The present study demonstrated that the injection of entire OCSs can enhance bone regeneration, leading to successful bone union of fracture nonunion.

研究分野：医学

科研費の分科・細目：整形外科

キーワード：骨折 偽関節 再生医療 骨芽細胞 細胞シート 筋膜脂肪移植

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 偽関節は全骨折中の約 5 ~ 10% 程度の頻度で発生し、整形外科医が治療に難渋する疾患である。その中でも、骨折部の骨形成能が低下し骨癒合不全となった萎縮性偽関節は難治性であり、様々な治療法が試みられている。萎縮性偽関節においては、偽関節部に骨形成能を促す標的である骨芽細胞の存在に乏しく、満足すべき治療効果が得られないことが多い。

(2) 萎縮性偽関節に対しては、骨癒合獲得のために腸骨からの自家骨移植術がしばしば必要となるが、骨癒合が得られない場合は、高度な技術を要する血管柄付き骨移植術などが適応となる。しかし、これらの骨移植術は採取部の侵襲が大きく、採取部に発生する合併症や後遺障害が問題となる。さらに偽関節周囲の骨欠損および軟部組織損傷が高率に合併しており、周囲組織との癒着も問題となる。したがって、骨癒合を目指した手術に伴って、移植床へも大きな侵襲を加えることになることから、より低侵襲な偽関節治療が望まれる。

## 2. 研究の目的

(1) 近年、我々は骨髄由来間葉系幹細胞をデキサメサゾン (Dex)、アスコルビン酸 (Ascp) 添加標準培地で骨分化誘導を行い、scaffold free (担体なし) で細胞のみをシート状に移植する骨形成細胞シート移植の方法を考案した。この方法は、温度感受性培養皿を使用せず、得られた細胞シートをスクレーパーではがして採取するという簡便なものである。これまで、骨形成細胞シートが、scaffold free で皮下に移植した際にも骨組織が形成されることや、偽関節となるような骨折部位でも骨癒合を促すだけの高い骨形成能を有することなどを報告してきた。さらに、従来の培養人工骨では困難であった『注入』という新たな手技を用いて移植可能であることも報告している。

(2) 骨形成細胞シートを用いた『注入型骨移植』による偽関節治療が可能となれば、これまでの骨移植よりさらに低侵襲な治療が可能となるため、偽関節、骨壊死疾患において非常に低侵襲な新たな治療法を確立でき有用性が高いと考えられる。骨形成細胞シートを用いた『注入型骨移植』が、低侵襲な偽関節治療における有用性が示されることができれば、本法を臨床に応用することによって、偽関節で長期の治療を余儀なくされる患者の治療期間を短縮でき、早期の社会復帰が可能とすることが期待できると考えられる。

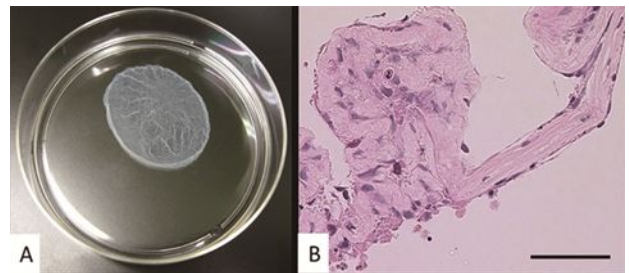
(3) 今回、ラット大腿骨偽関節モデルにおける『注入型骨移植』の有用性を検討するために、移植床の骨形成能が乏しく、偽関節と

なるような骨折モデルを作製した。骨形成細胞シートの注入を行い、骨形成細胞シートを用いた『注入型骨移植』が、低侵襲な偽関節治療における有用であるかを検討することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### 骨形成細胞シートの準備

7 週齢 Fischer 344 ラット雄の両大腿骨から骨髄細胞を採取し、初期培養を行った。2 週間後、培養骨髄由来間葉系幹細胞を細胞浮遊液として採取し、 $1 \times 10^4$  cell/cm<sup>2</sup> の細胞密度で 10cm 径培養皿に播種し二次培養を行った。二次培養は、標準培養液に Dex (10nM)、Ascp (82  $\mu$ g/ml) を添加し、骨分化誘導を行い、2 週間後に骨形成細胞シートを採取する (図 1)。



(図 1) 骨形成シートと組織像

### ラット大腿骨偽関節モデル作製

同系ラット (11~14 週齢) 雄の右大腿を、ボーンソーを用いて骨幹部を骨切りした後、大腿骨の転子部から顆部にかけて骨膜を広範囲に剝離し、大腿骨に進入する血管も同時に処置した。大腿骨の骨髄を搔爬したあと、Kirschner 鋼線 (径 0.8mm) を用いて、膝関節から逆行性に髄内釘固定を行い骨折部の固定を行った。

### 注入方法

ラット大腿骨偽関節モデル作製した 6 時間後に注入を行う。スクレーパーではがした骨形成細胞シート、培養骨髄由来間葉系幹細胞および PBS を 1ml シリンジで愛護的に吸引する。16G 注射針を用いて皮膚切開とは異なる部位から骨切り部に注入を行った。

以上の方法を用いて、骨形成細胞シートを注入した群をシート群、培養骨髄由来間葉系幹細胞を移植した群を細胞群、PBS を注入した群を対照群とし、4、8、12 週での X 線画像、 $\mu$ CT、組織像および力学試験 (三点曲げ) を用いて、骨癒合の評価を行った。力学試験は、術後 12 週での最大曲げ荷重値の対健側比を測定し検討した。また、周囲組織との癒着の有無を観察した。

### 新鮮凍結屍体を用いた研究

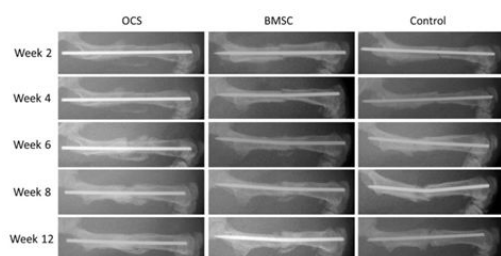
臨床的に腱癒着が問題となる手外科領域で、特に伸筋腱癒着防止法として、血管柄付組織移植が有用である可能性がある。今回の補助実験として、新鮮凍結屍体を用いて血管柄付

筋膜脂肪組織移植 (vascularized adipofascial flap transfer) の解剖学的検索を行った。新鮮凍結屍体 10 体を使用した。上腕動脈からシリコン樹脂を注入し、第 1-5 背側中手動脈を茎とする筋膜脂肪組織移植が指節部への移行可能かについて検索した。

#### 4. 研究成果

##### X 線画像評価

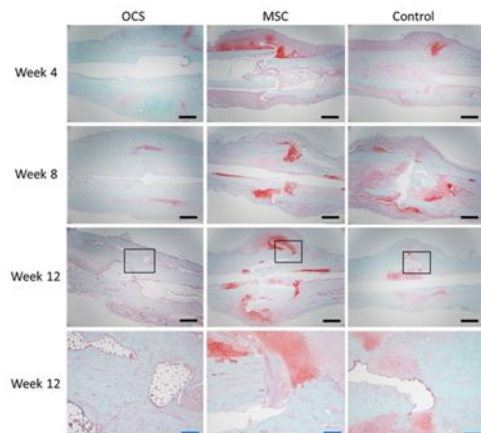
骨形成細胞シート群では、術後 4 週から骨切り部周囲に移植した骨芽細胞シートの石灰化が確認でき、経過とともに骨切り部周囲の新生骨の形成が促進し、術後 12 週で骨切り部の骨癒合を認めた。一方、細胞群では一部わずかな新生骨形成を認めたが、術後 12 週においても骨切り部の骨癒合を認めなかった。対照群でも同様に骨切り部の骨性架橋を認めなかった (図 2)。



(図 2) 各週令での 3 群におけるレントゲン像を示す。シート群の旺盛な骨形成を示す。

##### 組織学的評価

骨形成細胞シートを注入移植した骨切り部は、術後 4 週から線維性骨が偽関節部を周囲から取り巻くように存在し、骨性架橋が進む様子が観察された。繊維性骨内部には、ところどころに軟骨が散在し、内軟骨性骨化とは異なった像を示していた。術後 8 週、12 週と経過するうちに繊維骨の厚みが減少し、骨癒合が進行していた。一方、細胞群および対照群では、骨切り部周囲に一部仮骨の形成を認めるものの、架橋仮骨の形成を認めず、術後 12 週の時点で、短縮した骨切り部の間に軟部組織が介在し、皮質骨は一部萎縮を認め骨癒合が得られていなかった。骨形成細胞シートを注入移植した骨切り部で周囲組織との癒着を予防する効果を認めなかった (図 3)。

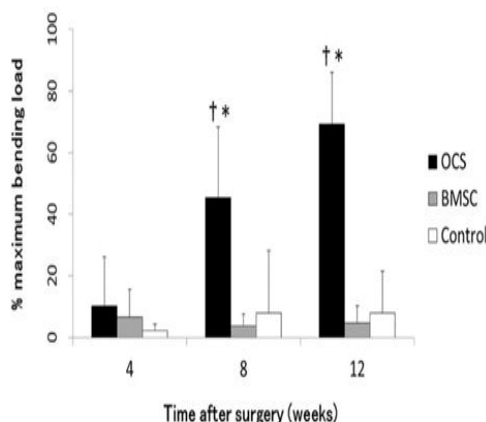


(図 3) 各週令での 3 群における組織像を示す。シート群の旺盛な骨性架橋と繊維性骨形成を示す。

##### 三点曲げによる力学試験の評価

三点曲げによる破断試験を行い、最大荷重値を測定しそれぞれ対健側比として算出した。骨癒合が得られず、曲げ破壊が生じなかったサンプルにおいては、曲げ破壊が生じたサンプル全体の曲げ破壊時の平均押し込み量である 1.2mm を押し込んだ時の荷重値を『最大荷重値』として定義した。

骨形成細胞シート群、細胞群、対照群を対健側比で表したものが図 4 である。術後 12 週における大腿骨最大曲げ荷重値の対健側比は、シート群と細胞群、シート群と対照群の間で有意差を認めた ( $p < 0.05$ ) (図 4)。



(図 4) 各群の力学試験結果を表で示す。シート群 (OCS) の破断強度が他の群と比較して、有意に上昇していた。

##### 新鮮凍結屍体を用いた研究結果

背側中手動静脈を血管柄とする筋膜脂肪組織は、全例で近位指節骨末梢まで到達可能であった。穿通枝は平均 2.4 本存在し、穿通枝の径は平均 0.2 mm であった。筋膜は全例、背側骨間筋膜を使用することができた。臨床的に最も問題となる指節骨骨折偽関節と伸筋腱の癒着を予防できる可能性がある。

#### 5. 主な発表論文等

- 1) 清水隆昌、面川庄平、赤羽学、田中康仁：大腿骨偽関節に対する細胞シートによる治療に関する実験的研究。第 28 回日本整形外科学会基礎学術集会、2013 年 10 月 17 日か 18 日、千葉市
- 2) 清水隆昌、面川庄平、赤羽学、田中康仁：注入型骨移植を用いた偽関節治療。第

28 回第 38 回日本臨床バイオメカニクス学会、  
2011 年 11 月 19 日、神戸市

3 ) Takamasa Shimizu, Manabu Akahane, Omokawa S, Keiichi Murata, Yusuke Morita, Yasuhito Tanaka: A Minimally Invasive Treatment with Injection of the Osteogenic Matrix Cell-sheet for a Rat Non-union Model. The 67th annual meeting of American Society for Surgery of the Hand. September 6-8 2012, Chicago USA.

#### 6 . 研究組織

##### (1)研究代表者

面川庄平 (OMOKAWA Shohei )  
奈良県立医科大学 整形外科 准教授  
研究者番号 : 70597103

##### (2)研究分担者

田中康仁 (TANAKA Yasuhito )  
奈良県立医科大学 整形外科 教授  
研究者番号 : 30316070

和田卓郎 (WADA Takuro )  
札幌医科大学 整形外科 教授  
研究者番号 : 00244369

赤羽学 (AKAHANE Manabu )  
奈良県立医科大学 健康政策医学 准教授  
研究者番号 : 00418873

清水隆昌 (SHIMIZU Takamasa )  
奈良県立医科大学 整形外科 研究員  
研究者番号 : 70464667