

平成 29 年 5 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：2012～2016
 課題番号：24592240
 研究課題名(和文) 骨腫瘍に対する患肢温存を目的とした細胞活性を有した液体窒素処理骨移植法の開発

 研究課題名(英文) Study of bone graft by using a liquid-nitrogen in attempt to reconstruction in malignant bone tumors of the lower extremities

 研究代表者
 藤間 保晶 (Tohma, Yasuaki)

 奈良県立医科大学・医学部・研究員

 研究者番号：60448777

 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：広範囲骨腫瘍に対する患肢温存治療として手術により摘出した悪性骨腫瘍を体外にて腫瘍細胞殺処理を施行した後に再度患部に戻す処理骨移植法がある。しかし、殺細胞処理により腫瘍細胞のみならず、正常細胞までが死滅することで、骨修復・再生の極度な低下、移植骨の圧潰、感染の問題が生じる。それを解決すべく、液体窒素による殺細胞処理を行った骨組織に対し、細胞移植による処理骨の活性賦活化を検討した。自家骨髄より培養により間葉系細胞を増殖させ、移植骨に移植・搭載することで、骨再生能が賦活化されることが生化学的、組織学的に証明された。現在、薬剤の投与による賦活化の促進が見込まれ、その骨再生メカニズムを継続検証している。

研究成果の概要(英文)：As a surgical method of reconstruction following resecting large musculoskeletal tumors while considering the preservation of limbs, autogenous bone treated is selected. However, not only tumor cells but intact cells are killed in the treated bone. Therefore, the treated bone loses osteogenic ability. The aim of this study was to develop treated bone with osteogenic capability. We gained autologous bone marrow-derived mesenchymal cells (BMSCs) by using tissue-engineered technique and transferred these BMSCs to autologous bone treated with liquid nitrogen in an animal experimental model. The BMSCs-seeded treated bones were ectopically transplanted into subcutaneous rat sites. After that, their osteogenic capabilities were evaluated by biochemical and histological evaluations. These results indicated the suitability of tissue-engineered BMSCs to heighten osteogenic response. The autograft bone treated with liquid nitrogen was given osteogenic capability by using tissue-engineered BMSCs.

研究分野：四肢機能再建学

キーワード：移植・再生医療 再生医学 骨移植 骨形成

1. 研究開始当初の背景

整形外科領域における広範囲骨腫瘍や先天性骨欠損等の広範囲骨欠損患者に対し、近年種々の人工関節や人工骨が開発されている。これらの骨欠損および関節に至るような欠損に対する代替人工材料の機能性は飛躍的な向上を遂げているが、広範な病巣切除を要する症例では量的・質的に限界がある。欠損部を全て人工骨で充填すると、人工骨間隙部を含めた新生骨形成にも時間がかかり、力学的にも弱くなる。また、関節近傍、靭帯・筋腱附着部、有効な人工材料の開発がなされていない部位の手術では機能再建の点で困難を極める。この観点から、腫瘍骨を手術中に切除し、体外にて腫瘍細胞の殺処理を行った後に、再度元の位置に戻すという自家処理骨移植という手術法が行われる。自家処理骨移植は手術切除部位における形状適合性、靭帯・筋腱を含めた既存組織の温存性の点からも非常に有効である。

骨欠損の手術に対する再建手術治療として、欧米では同種骨移植は受け入れられており、現時点で人工材料では元々の生体組織と同一の再建が不可能な靭帯再建手術においても同種移植が行われている。しかし、本邦では同種運動器組織の移植の頻度はごく少数である。一因として、同種移植に対する民族的な思考の違いのみならず、医学的な諸問題、いわゆる免疫反応、同種移植骨の細胞活性の低下の問題が挙げられる。各種細胞活性の低下は骨修復・再生の長期化、リハビリの停滞、移植骨の骨折・圧潰も起こり得る。これらの諸問題を解決すべく、我々は幹細胞制御技術により、細胞活性の低下した同種骨に骨形成を付与することを考えた。

これまで、我々は、細胞致死化処理により細胞機能を不活化した自家骨に、再生医療技術により獲得した培養骨髄由来間葉系細胞の移植を行うことで、骨形成能を付加する手段の開発研究を行ってきた（獲得特許 第3951023号：細胞致死化処理骨に生細胞を搭載した骨補填システム）。現在、広範囲悪性骨腫瘍の臨床手術として液体窒素処理骨移植が行われているが、この細胞搭載の技術の開発および検討は種々の細胞活性の低下した骨移植に応用できると考えられた。

2. 研究の目的

自家処理骨移植では殺細胞処理により腫瘍細胞のみならず正常細胞も死滅する為に骨組織での細胞活性は低下し、力学的にも脆弱化した壊死骨に陥る。その結果、処理骨の

移植後の圧潰や癒合不全が起こり、未だ満足すべき成績が得られていない。その問題点を解決する手法を本研究では検討する。

臨床医学で行われる殺細胞処理法として、液体窒素処理、放射線照射処理、オートクレーブ処理、パズール処理等の各種熱処理が中心に行われる。これまで我々の培ってきた幹細胞技術を用い、液体窒素処理骨移植を対象に、培養自家骨髄由来間葉系細胞を液体窒素処理骨に移植することで、細胞活性を賦活化することを検討する。また、将来的な臨床応用を鑑みた際、患者負担の少ない方法として投薬による治療も検討する。そのひとつの手法として、薬剤投与による細胞活性低下骨組織の細胞活性の促進手段、賦活化手段を検討する。これらが可能になれば、同種骨移植を含めた骨移植の弱点の克服、移植側での早期骨形成を含めた機能回復につながり、運動器再建医学に寄与することが期待される。

3. 研究の方法

殺細胞処理により低下した骨組織の細胞活性の回復を本研究では再生医療技術に求めた。手法としては細胞活性の失った殺細胞処理骨を scaffold として、培養により増殖・獲得した自家骨髄由来間葉系細胞を処理骨に搭載させるというアイデアである。本手法が確立されれば、同種骨や人工骨にも応用できる可能性が予測される。

動物実験には Fischer 344 (F344) ラットを用いた。処理骨に搭載する骨髄間葉系細胞の培養（初期培養）は、6週齢ラット大腿骨より骨髄細胞を採取し、15%牛胎児血清（FBS）を含む α -MEM 培養液にて行った。約10日後、トリプシン溶液にて細胞を剥離し、細胞を MEM 培養液にて $1 \times 10^7/\text{ml}$ の濃度に調整して培養自家骨髄由来間葉系幹細胞の細胞含有液とした。Scaffold となる骨組織は同系ラット大腿骨より作成した。8週齢ラット大腿骨を採取し、骨鋸にて 5mm 長に裁断した。殺細胞処理方法としては、骨腫瘍への臨床応用、処理の均一性から液体窒素処理を選択した。処理骨に対する骨髄由来間葉系幹細胞の搭載は、液体窒素処理を行った処理骨に、獲得した骨髄間葉系細胞含有液を注射器にて注入し、30分間浸透させることで行った。実験群として培養細胞を搭載せず液体窒素処理のみを行った培養細胞非搭載処理骨群（Non-Bone marrow-derived mesenchymal cell: Non-BMSCs）、骨髄間葉系細胞含有液を浸透させた培養細胞搭載処理骨群（Bone marrow-derived mesenchymal cell: BMSCs）の2

群とした。細胞活性の評価はハイドロキシアパタイト等各種生体材料/培養骨髄由来間葉系幹細胞複合体の骨形成能の評価方法として既に確立されているラット皮下移植実験モデルを用いて行った。その手法に基づき、各群の骨片を7週齢同系ラットの背部皮下に移植した。測定項目として、移植2、4週後に摘出した移植骨のアルカリフォスファターゼ (ALP) 活性、ヘマトキシリンエオジン (HE) 染色による組織学的評価も行った。

培養骨髄由来間葉系細胞の処理骨への移植について、近年では細胞シートを用いた手法が移植細胞の局所維持の観点から有効性が高い。しかし、一般病院での治療を鑑みると、再生医療技術のみならず、薬剤を用いた修復改善方法も望まれる。そこで、移植細胞が効率的に移植骨に残存する手法を検討した。細胞接着の観点から、ファイブロネクチンを主とした接着蛋白を移植骨に予め投与することを検討した。定量評価において、検体に処理骨を用いると、処理骨作成の段階で質的・量的バイアスがかかることが懸念された為、本技術の検討には人工骨 (beta TCP 5mm 径 disc) を使用した。また、各種臓器再生で報告されているポリ ADP リボースポリメラーゼ阻害剤の投与による細胞活性の回復について pilot study を行った。骨髄由来間葉系細胞を搭載した人工骨をラット皮下に移植し、移植ラットにポリ ADP リボースポリメラーゼ阻害剤を腹腔内投与した。測定項目として、移植2、4週後に摘出した移植骨のアルカリフォスファターゼ (ALP) 活性、ヘマトキシリンエオジン (HE) 染色による組織学的評価を行った。

4. 研究成果

結果 : 培養により獲得した骨髄間葉系細胞を搭載させることで、骨形成のマーカーとなる ALP 活性は移植後2週および4週ともに上昇していた。また、組織学的にも、移植後2週の組織像で BMSCs group に骨芽細胞の配列、新生骨の形成を認め、移植後4週の組織像では Non-BMSCs group では既存骨組織が全て壊死に陥る一方、BMSCs group では骨改変傾向を認めた (図1)。

結果 : 血清 coating を1時間浸漬させて風乾させたβTCP-disc にF344ラット培養骨髄間葉系細胞を搭載させることでdisc上に接着する細胞数は増加傾向を示した。また、培養細胞搭載人工骨の二次培養中の培地上清の骨形成蛋白であるオステオカルシン値(OC)を

測定すると、血清 coating による効果が認められた (図2)。この結果から血清 coating による接着効果あるいは血清に含まれる分化促進因子の効果が考えられた。レシピエントへのポリ ADP リボースポリメラーゼ阻害剤の投与による骨組織再生については、現在の段階ではn数も少なく、統計学的に比較可能な域には至っていないが、組織学的に新生血管の増多および骨新生が非投与群と比べ増加している印象を得ている。

これらの結果、再生医療技術により培養骨髄間葉系細胞を処理骨や人工骨に搭載することで、細胞活性の失われた移植骨に骨形成能を付加することが確認された。また、血清を用いた細胞接着あるいは分化促進効果による骨形成促進効果の可能性が見い出された。臨床の手術を想定した簡便な手法としての薬剤の使用、更には将来的な創薬の観点から現在も検討を継続している。

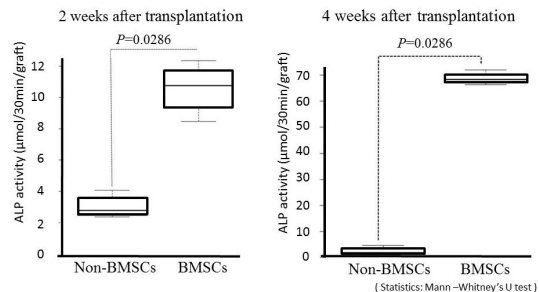


表1: ALP activity (μmol/30 min/graft)
Non-BMSCs group : 細胞非搭載群
BMSCs group : 細胞搭載群

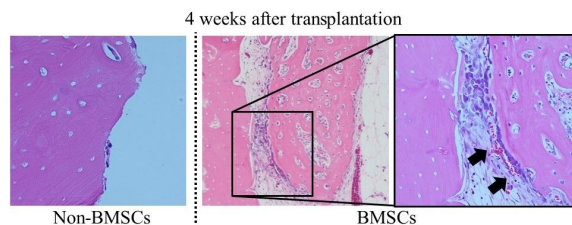


図1: 移植4週後の摘出標本組織像
左: 細胞非搭載群 (Non-BMSCs group)
右: 細胞搭載群 (BMSCs group)
(arrow; 骨芽細胞)

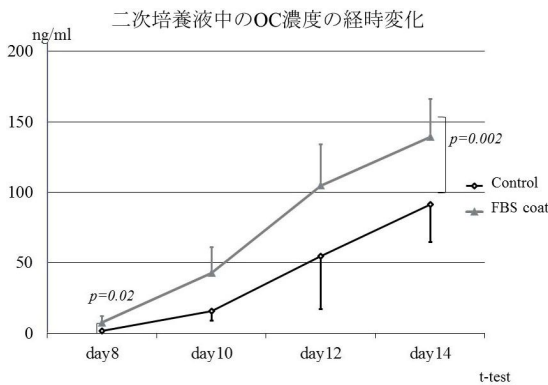
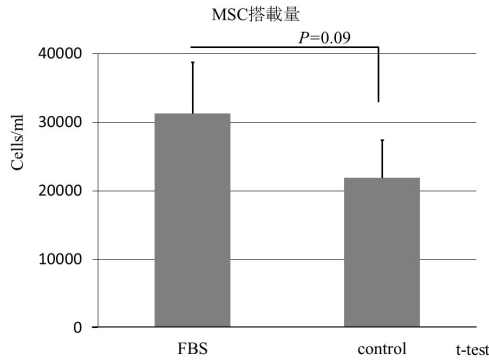


図 2

上段：disc に搭載された細胞数

下段：培地上清中の OC 濃度の経時変化

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔 雑誌論文 〕 (計 10 件)

Osteogenic activity of bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BMSCs) seeded on irradiated allogenic bone. Tohma Y, Dohi Y, Ohgushi H, Tadokoro M, Akahanae M, Tanaka Y Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine 6(2):96-102, 2012.

骨髄由来間葉系細胞搭載人工骨の骨形成能に対するポリ ADP リボースポリメラーゼ阻害剤の影響. 藤間保晶, 土肥祥子, 大串始, 谷掛洋平, 高澤伸, 赤羽学, 田中康仁. 日整会誌 (J.Jpn.Orthop.Assoc.) 86(8):1347,2012.

培養骨芽細胞シートを用いた放射線照射自家処理骨の骨形成. 内原好信, 赤羽学, 上羽智之, 清水隆昌, 倉知彦, 藤間保晶, 川手健次, 田中康仁. 日整会誌 (J.Jpn.Orthop.Assoc.) 86(8):1344,2012.

Fibronectin をコートした β TCP の骨形成能 谷掛洋平, 中島弘司, 林宏治, 加藤宣伸, 藤間保晶, 大串始, 土肥祥子, 赤羽学, 高澤伸, 川手健次, 田中康仁. 日整会誌 (J.Jpn.Orthop.Assoc.) 86(8):1351,2012.

培養骨芽細胞シートによる放射線照射自家処理骨の骨形成. 内原好信, 赤羽学, 森田有亮, 中崎真太郎, 上羽智之, 清水隆昌, 倉知彦, 藤間保晶, 川手健次, 田中康仁 日整会誌(J.Jpn.Orthop.Assoc.) 87(8): 1571, 2013.

骨髄間葉系幹細胞を用いた液体窒素処理自家骨の骨形成能再活性化の検討. 岩田栄一朗, 藤間保晶, 朴木寛弥, 谷掛洋平, 赤羽学, 川手健次, 田中康仁 日整会誌(J.Jpn.Orthop.Assoc.) 88(8): 1485, 2014.

ポリ ADP リボースポリメラーゼ阻害剤の骨形成に対する基礎的研究. 藤間保晶, 土肥祥子, 大串始, 谷掛洋平, 高澤伸, 赤羽学, 田中康仁. 日整会誌(J.Jpn.Orthop.Assoc.) 88(8): 1487, 2014.

Osteogenic Matrix Cell Sheets Facilitate Osteogenesis in Irradiated Rat Bone. Uchihara Y, Akahane M, Shimizu T, Ueha T, Morita Y, Nakasaki S, Kura T, Tohma Y, Kido A, Kawate K, Tanaka Y. Biomed Res Int. 2015;2015:629168. Epub 2015 May 12.

Fetal bovine serum(FBS)コーティング β TCP が骨髄間葉系細胞の骨分化に及ぼす影響. 谷掛洋平, 藤間保晶, 朴木寛弥, 岩田栄一朗, 倉知彦, 赤羽学, 川手健次, 田中康仁, 大串始. 日整会誌(J.Jpn.Orthop.Assoc.) 89(8): 1580, 2015.

骨髄間葉系細胞を用いた液体窒素処理自家骨の骨形成能再活性化. 岩田栄一朗. 整形外科 67; 338, 2016.

〔 学会発表 〕 (計 13 件)

骨髄由来間葉系細胞搭載人工骨の骨形成能に対するポリ ADP リボースポリメラーゼ阻害剤の影響. 藤間保晶, 土肥祥子, 大串始, 谷掛洋平, 高澤伸, 赤羽学, 田中康仁. 第 27 回日本整形外科学会基礎学術集会, 名古屋市. 2012 年 10 月 26-27 日

培養骨芽細胞シートを用いた放射線照射自家処理骨の骨形成. 内原好信, 赤羽学, 上羽智之, 清水隆昌, 倉知彦, 藤間保晶, 川手健次, 田中康仁. 第 27 回日本整形外科学会基礎学術集会, 名古屋市. 2012 年 10 月 26-27 日

Fibronectin をコートした β TCP の骨形成能. 谷掛洋平, 中島弘司, 林宏治, 加藤宣伸, 藤間保晶, 大串始, 土肥祥子, 赤羽学, 高澤伸, 川手健次, 田中康仁. 第 27 回日本整形外科学会基礎学術集会, 名古屋市. 2012 年 10 月 26-27 日

冷凍保存骨髄間葉系幹細胞由来細胞シートによる骨形成能の評価. 倉知彦, 赤羽学, 清水隆昌, 上羽智之, 内原好信, 藤間保晶, 川手健次, 田中康仁. 第 19 回横浜・京都・奈良バイオメカニクスカンファレンス, 橿原市. 2012 年 12 月 22 日

再生医療技術による組織構築～薬剤を用いた骨移植法の基礎的研究～. 藤間保晶, 大串始, 土肥祥子, 谷掛洋平, 岩田栄一郎, 高澤伸, 赤羽学, 田中康仁. 第 19 回横浜・京都・奈良バイオメカニクスカンファレンス, 橿原市. 2012 年 12 月 22 日

運動器再建をめざした私の幹細胞研究
藤間保晶. 第 5 回奈良医療センター医学会, 奈良市, 2013 年 3 月 1 日

培養骨芽細胞シートによる放射線照射自家処理骨の骨形成. 内原好信, 赤羽学, 森田有亮, 中崎真太郎, 上羽智之, 清水隆昌, 倉知彦, 藤間保晶, 川手健次, 田中康仁. 第 28 回日本整形外科学会基礎学術集会, 千葉市. 2013 年 10 月 17-18 日

凍結保存骨髄間葉系幹細胞由来細胞シートの注入移植による骨形成能の評価. 倉知彦, 赤羽学, 清水隆昌, 加藤優喜, 森田有亮, 上羽智之, 内原好信, 藤間保晶, 川手健次, 田中康仁. 第 28 回日本整形外科学会基礎学術集会, 千葉市. 2013 年 10 月 17-18 日

Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells (BMSCs) Revitalize Autograft Bone Sterilized by Liquid Nitrogen with Augmented Osteogenic Property in Rat Model. Iwata E, Tohma Y, Honoki K, Tanikake Y, Kura T, Tsukamoto S, Akahane M, Tanaka T. International society for stem cell research 12th Annual Meeting,

Vancouver, Canada
2014 年 6 月 18-21 日

ポリ ADP リボースポリメラーゼ阻害剤の骨形成に対する基礎的研究. 藤間保晶, 土肥祥子, 大串始, 谷掛洋平, 高澤伸, 赤羽学, 田中康仁. 第 29 回日本整形外科学会基礎学術集会, 鹿児島市. 2014 年 10 月 9-10 日

骨髄間葉系幹細胞を用いた液体窒素処理自家骨の骨形成能再活性化の検討. 岩田栄一郎, 藤間保晶, 朴木寛弥, 谷掛洋平, 赤羽学, 川手健次, 田中康仁. 第 29 回日本整形外科学会基礎学術集会, 鹿児島市. 2014 年 10 月 9-10 日

ポリ ADP リボースポリメラーゼ阻害剤の骨形成に関する研究. 藤間保晶, 土肥祥子, 高沢伸, 大串始, 武田麻衣子, 大林千穂, 谷掛洋平, 赤羽学, 田中康仁. 第 21 回奈良・横浜・京都バイオメカニクスカンファレンス, 橿原市. 2014 年 12 月 20 日

Fetal bovine serum(FBS)コーティング β TCP が骨髄間葉系細胞の骨分化に及ぼす影響. 谷掛洋平, 藤間保晶, 朴木寛弥, 岩田栄一郎, 倉知彦, 赤羽学, 川手健次, 田中康仁, 大串始. 第 30 回日本整形外科学会基礎学術集会, 富山市. 2015 年 10 月 22-23 日

〔図書〕(計 1 件)
再生医療におけるアログラフト
藤間保晶, 大串始, 田中康仁. 再生医療における臨床研究と製品開発: 109-115, 2013 年 9 月.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)
○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤間保晶 (TOHMA YASUAKI)
奈良県立医科大学・医学部・研究員
研究者番号: 60448777

(2) 研究分担者

朴木寛弥 (HONOKI KANYA)
奈良県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号： 40336863

田中康仁 (TANAKA YASUHITO)
奈良県立医科大学・医学部・教授
研究者番号： 30316070

(3)連携研究者
なし

(4)研究協力者
なし