

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 15 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861188

研究課題名(和文) 小児成長軟骨帯損傷における新規軟骨再生治療の確立

研究課題名(英文) Establishment of novel cartilage regeneration therapy for growth plate injury in children

研究代表者

吉田 清志 (Yoshida, Kiyoshi)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：50645570

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：小児期の成長軟骨帯損傷は四肢長管骨の変形や短縮をもたらすため、損傷軟骨の再生治療の開発が期待されている。本研究ではウサギ同種肋軟骨移植を用いた損傷成長軟骨帯の再生実験を行った。部分成長軟骨帯損傷モデルを作成し移植実験を行い、画像評価及び組織学的評価を行った。画像評価では肋軟骨移植群では対照群に比較して有意に下肢変形の改善を認めた。組織学的評価において肋軟骨移植群では骨性架橋部位の減少を認め、移植部位に柱状の層構造を有しサフランin0染色で濃染される軟骨基質を有した軟骨様細胞の再生を認めた。以上から成長軟骨帯損傷に対する肋軟骨移植が有効であることを証明することができた。

研究成果の概要(英文)：Growth plate injury in children bring about the deformity and shortening of limb and development of regeneration therapy for growth plate injury has been expected. In this study, the transplantation of rabbit costal cartilage for growth plate injury was performed. A partial growth plate injury model in rabbits was prepared and transplantation was performed. After surgery, image evaluation and histological evaluation was conducted. In the image evaluation, deformities of lower limb were significantly improved in the costal cartilage transplantation compared to the control group. In the histological evaluation, bony bridge at the injured site was decreased in the costal cartilage group and the regeneration of cartilage like cells having a columnar layer structure at the transplantation site was observed and these cells were deeply stained by Safranin O staining. There results showed that the costal cartilage transplantation could be useful for the growth plate injury.

研究分野：医歯薬学

キーワード：成長軟骨帯損傷 骨製架橋 肋軟骨 変形矯正

1. 研究開始当初の背景

小児期の成長軟骨帯は外傷などで一旦損傷を受けると軟骨組織が消失して骨組織に置換される。そのため損傷後は骨成長が障害され四肢長管骨の変形や短縮をもたらす。現在の治療方法は損傷部位に自家脂肪やボーンワックスなどの人工物を移植しているが、損傷軟骨の再生は困難であり変形や短縮を呈することも多い。細胞移植の研究もおこなわれているが小児に使用する際には事前の組織採取や培養時の血清使用などの問題があり早期の臨床応用は困難である。これらのことを踏まえて、損傷した成長軟骨を組織移植により1次修復可能ではないかと考え本研究をスタートした。

2. 研究の目的

損傷した成長軟骨帯を再生することを目的として以下のことを検討した。

- [1] 肋軟骨を用いた組織移植により損傷した成長軟骨が再生可能かを検討した。
- [2] 組織移植により成長軟骨帯損傷により生じる骨変形や短縮が改善するかを検討した。

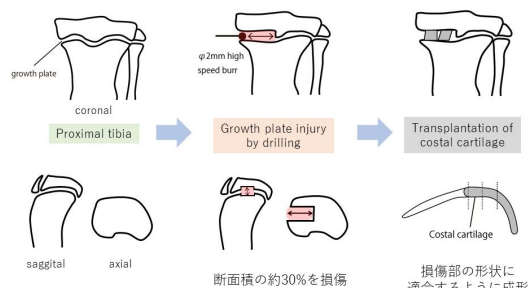
3. 研究の方法

幼若なウサギを用いて部分成長軟骨帯損傷モデルを作成した (Yoshida, et al. J Pediatr Orthop. 2012)。

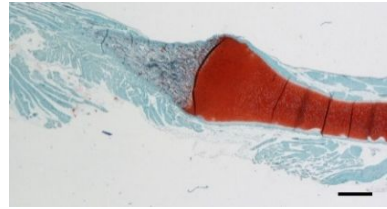
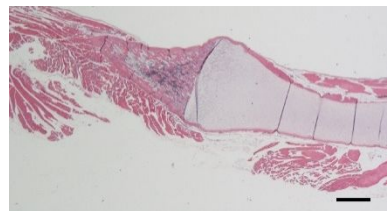
[1] New Zealand White Rabbit 6 週齢の脛骨近位内側成長軟骨帯を外科的に径 5mm、深さ 5mm の欠損を作成した。

[2] 欠損部位に組織移植を行った。以下の3群に分けて検証した。

- 1. 対照群：移植なし
- 2. ボーンワックス群：欠損部に現在行われている治療であるボーンワックスを移植
- 3. 肋軟骨移植群：同種ウサギから採取した肋軟骨を移植 (下図)



ウサギ肋軟骨



ウサギ肋軟骨

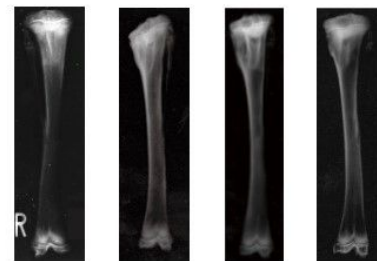
上段 HE 染色 下段サフラニン O 染色
豊富な軟骨基質を有した組織である

[3] 移植後 4 週及び 8 週時に画像評価及び組織学評価を行う。画像評価は単純 X 線、 μ CT 画像、組織学評価は組織染色 (HE 染色、サフラニン O 染色)、免疫染色 (2 型コラーゲン) を行った。

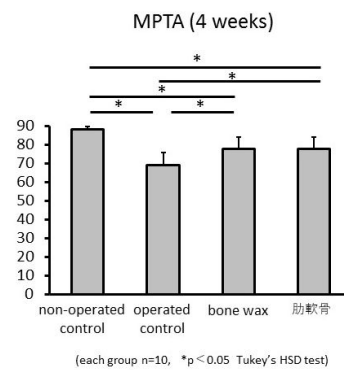
4. 研究成果

[1] 肋軟骨移植による変型矯正

3 群に分けて成長軟骨損傷部位に移植を行った。手術後 4 週でボーンワックス群、肋軟骨移植群において有意な変形改善を認め、手術後 8 週で肋軟骨移植群で他群と比較して著明に下肢変形の改善を認めた。

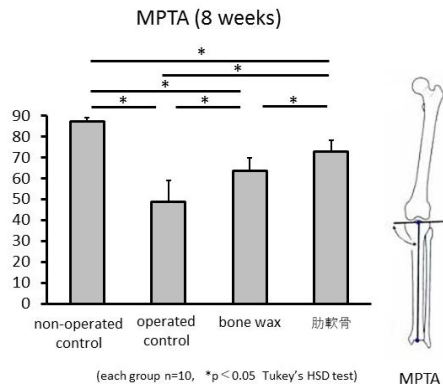
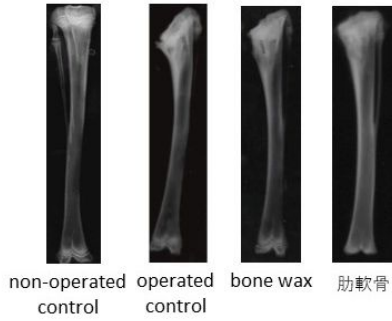


non-operated operated bone wax 肋軟骨

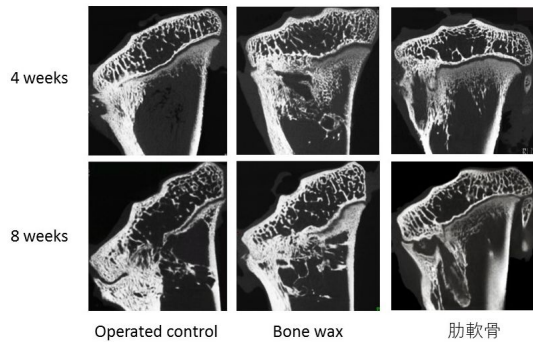


MPTA

手術後 4 週での下肢変形



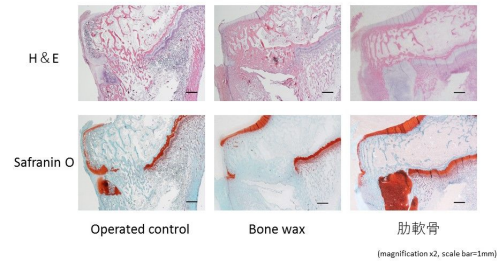
手術後 8 週での下肢変形



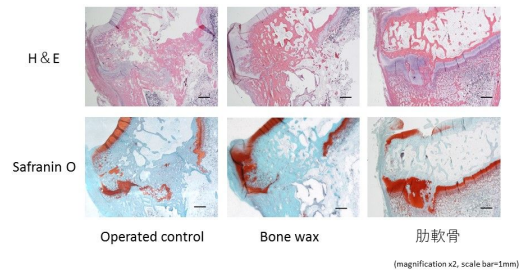
μCT で肋軟骨移植群では骨性架橋の減少を認めた。

[2] 肋軟骨移植による成長軟骨帯様組織再生
 組織学評価において対照群は損傷部位が骨組織に置換され骨性架橋を生じていたが、ボーンワックス群、肋軟骨移植群では骨性架橋の減少を認めた。さらに肋軟骨移植群では移植した肋軟骨は手術後 8 週経過でもサフランin 0 染色で濃染される軟骨基質を維持しており、周囲には成長軟骨帯の特徴である柱状の層構造を有する軟骨様細胞を認め、部分的に成長軟骨の再生を認めた。また手術 8 週での免疫染色で移植肋軟骨及び周囲の再生組織は 2 型コラーゲンで染色され軟骨特性を有していると考えられた。

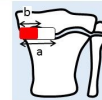
組織所見 (4 weeks)



組織所見 (8 weeks)

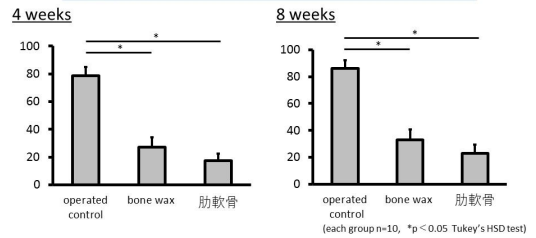


Bony bridge formation rate



a : 成長軟骨損傷幅 b : 骨性架橋形成幅

$$\text{Bony bridge formation rate} = \frac{b}{a} \times 100 (\%)$$



肋軟骨群

手術 8 週での免疫染色 (2 型コラーゲン)

これらの結果はウサギの部分成長軟骨帯損傷モデルにおいて肋軟骨移植が変形改善だけでなく、成長軟骨帯様組織の再生が可能性であることを示唆していた。肋軟骨を関節軟

骨再生に用いる報告は存在するが、成長軟骨再生に用いた研究はほとんど存在しない。そのため本研究を進展させることで成長軟骨帯損傷に対する新たな有効な治療となりうることを示唆された。

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2件)

Costal cartilage transplantation for treatment of growth plate injury in arabbit model.

Otsuki D, Yoshida K, Kobayashi M, Hamano D, Higuchi C, Yoshikawa H

J Child Orthop. 査読有 2017

Feb;11(1):20-27. doi:

10.1302/1863-2548-11-160209

Is hip dysplasia a common deformity in skeletally mature patients with hereditary multiple exostoses ?

Higuchi C, Sugano N, Yoshida K, Yoshikawa H.

J Orthop Sci. 査読有 2016

May;21(3):323-6. doi:

10.1016/j.jos.2016.02.005.

[学会発表](計6件)

吉田清志、樋口周久、村瀬剛、吉川秀樹、小児骨端線損傷後の下肢変形に対してカスタムメイド手術ガイドを用いた3次元矯正骨切り術と創外固定器を併用手術、第28回日本創外固定・骨延長学会、2015年3月21日、六本木アカデミーヒルズ(東京都、港区)

大槻大、樋口周久、吉田清志、吉川秀樹、骨芽細胞分化にあたるMEK1とMEK2の影響の違い、第30回日本整形外科学会基礎学術集会、2015年10月22日、富山国際会議場(富山県、富山市)

浜野大輔、吉田清志、大槻大、菅本一臣、吉川秀樹、乳児寛骨臼形成不全患者における軟骨性臼蓋の形態評価、第26回日本小児整形外科学術総会、2015年12月4日、長良川国際会議場(岐阜県、岐阜市)

浜野大輔、吉田清志、大槻大、菅本一臣、吉川秀樹、乳児寛骨臼の三次元骨モデルを用いた単純X、第26回日本小児整形外科学術総会、2015年12月4日、長良川国際会議場(岐阜県、岐阜市)

大槻大、吉田清志、浜野大輔、菅本一臣、吉川秀樹、MRIを用いた先天性内反足におけるPonseti法治療後の足根骨3次元解析、第26回日本小児整形外科学術総会、2015年12月4日、長良川国際会議場(岐阜県、岐阜市)

大槻大、樋口周久、吉田清志、吉川秀樹、MEK1とMEK2の骨外細胞分化における役割の違い、第34回日本骨代謝学会学術集会、2016年7月20日、大阪国際会議場(大阪府、大阪市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

吉田 清志(YOSHIDA, KIYOSHI)

大阪大学大学院・医学系研究科・助教

研究者番号:50645570