

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 5 日現在

機関番号：24601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893238

研究課題名(和文)骨腫瘍切除後の広範囲骨欠損に対する再生医療技術を用いた再建技術の開発

研究課題名(英文) Development of a technique for reconstructing bone defects after resection of malignant musculoskeletal tumors using tissue engineering.

研究代表者

内原 好信(Uchihara, Yoshinobu)

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：60736924

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は骨腫瘍切除術後の新たな骨欠損再建法を開発することである。殺細胞処理自家骨移植は骨欠損再建法の1つである。しかし、放射線処理や液体窒素処理により骨形成能が失われ、偽関節がしばしば起こる。我々はラットの大腿骨を用いて殺細胞処理骨移植モデルを作成し、骨形成細胞シートが殺細胞処理骨の骨形成能を改善するか評価した。骨形成細胞シートを移植骨周囲に組み合わせることで、術後早期に骨癒合が得られた。一方対照群では骨形成を認めなかった。

我々の研究により、骨形成細胞シート移植が殺細胞処理骨の骨形成能を促す可能性が示され、これは骨腫瘍切除術後の骨欠損再建における治療の新たな選択肢となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to create a new technique for reconstructing bone defects after resection of malignant musculoskeletal tumors. Extracorporeal autogenous devitalized bone grafting is a treatment option for bone reconstruction. However, nonunion often occurs because the osteogenic capacity is lost by irradiation or liquid nitrogen. We established a devitalized bone graft model in the rat femur to assess whether osteogenic matrix cell sheets improve osteogenesis of the devitalized bone. By combining the devitalized bone graft with an osteogenic matrix cell sheet, bone union was achieved shortly after the operation. In contrast the control group exhibited no bone formation.

Our study indicates that osteogenic matrix cell sheet transplantation might be a powerful method to facilitate osteogenesis in devitalized bones, which may become a treatment option for reconstruction of bone defects after resection of malignant musculoskeletal tumors.

研究分野：骨再生医療

キーワード：再生医療

1. 研究開始当初の背景

放射線照射や液体窒素による殺細胞処理は、骨腫瘍広範切除術として臨床で実施されている手技である。骨腫瘍をいったん切除・摘出し、体外で一括放射線照射(50～80Gy)あるいは液体窒素(凍結融解を繰り返し実施)による殺細胞処理によって腫瘍細胞を根絶させた上で元の部位に戻し患肢再建に利用する手技である。しかし、殺細胞処理に伴い骨形成能も喪失するため、術後早期の骨癒合が得られにくく骨癒合が遷延することが課題である。

一方、殺細胞処理自家骨移植の利点は多数報告されており、摘出した自家骨を使用するため形状を一致させやすい人工材料使用に伴うゆるみや摩耗の問題がない、健康部からの自家骨採取に伴う合併症が無い、同種骨移植に伴うリスク(ウイルス感染等)がない、筋腱附着部の温存が可能で機能的再建が出来る、金属製などのインプラントが利用できない部位でも再建可能、などが挙げられる。これら多くの利点を生かすために、課題となる早期骨癒合を得るための新たな技術開発が求められている。

2. 研究の目的

当教室では、骨髄間葉系細胞を用いて『骨形成細胞シート』(図1)を作製する方法を考案し、偽関節治療や骨壊死治療等の骨再生における有用性を報告してきた(Akahane M et al. JTERM 2008)。我々の細胞シート作製法は、骨髄から採取した骨髄間葉系幹細胞をデキサメサゾンとアスコルビン酸添加培地で2次培養し細胞自らがシート状になったものを、スクレーパーを使用して採取する手技である。デキサメサゾンとアスコルビン酸は骨芽細胞への分化誘導因子であり、トリプシン処理を行わないため、産生された細胞外基質も同時に移植できるメリットがある。

骨形成細胞シートはスキャフォールドフリーで移植可能なため複雑な形状をした部位へ容易に適合し、人工骨や骨の表面で新生骨を形成する特徴がある。ラット大腿骨偽関節モデルに移植すると早期に骨癒合が得られ偽関節に陥ることを防止することができた(Nakamura A et al. Bone 2010)。これまでに予備実験を実施し、放射線照射殺細胞処理骨に骨形成細胞シートを組み合わせ、ラットの皮下に移植すると殺細胞処理骨に骨形成能を付与することができた。

本研究では、これまでの実験結果を踏まえ、液体窒素処理骨も含め、臨床に則した殺細胞処理骨移植モデルをラットおよび犬で作製し、骨腫瘍切除後再建における殺細胞処理自家骨移植に骨形成細胞シート移植を併用し、早期に骨癒合を得る新たな治療法を開発する。

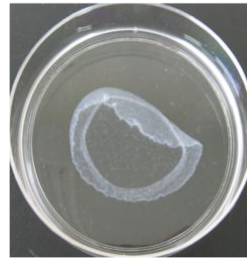


図1 骨形成細胞シート

3. 研究の方法

ラットの大腿骨を用いて自家殺細胞処理骨移植モデルを作製する。大腿骨の一部を切除し、切除部に殺細胞処理骨を移植する実験モデルを作製する。処理骨移植時に骨形成細胞シート移植も併用し、処理骨と移植床との骨癒合を促進させる研究を実施する。既存の手技との比較のため、次の3群で実験を行う。処理骨に骨形成細胞シート移植を併用した群、処理骨に細胞浮遊液を組み合わせた群、処理骨移植のみの群。骨形成の評価は、レントゲン評価、micro-CT、組織学的評価、骨形成マーカーの遺伝子発現評価、力学試験(3点曲げ試験)による評価を行う。殺細胞処理は、放射線照射および液体窒素による処理で行う。

[処理骨作製]

1)放射線照射による殺細胞処理骨作製

Tohmaらの方法に準じて(J Tissue Eng Regen Med. 2008)、Fischer344ラット(オス)の大腿骨骨幹部から10mm長の骨を切除し、放射線照射(60Gy)を行い、殺細胞処理骨を製する。

2)液体窒素による殺細胞処理骨作製

Tsuchiyaらの方法に準じて(J Bone Joint Surg (Br) 2005)、Fischer344ラット(オス)の大腿骨骨幹部から10mm長の骨を切除し、液体窒素に浸し殺細胞処理する。液体に浸す時間は20分とし、溶解は室温で15分、その後30°Cの蒸留水で10分間浸し、ゆっくり溶解させる。

[骨形成細胞シートの作製]

7週齢のFischer344ラット(オス)の大腿骨から骨髄細胞を採取し、T75フラスコを使用して初期培養を行う。15%ウシ胎児血清と抗生剤を加えたminimal essential medium(MEM)を標準培養液とし、5%CO₂の培養器を使用して37°Cで細胞培養を行う。2週間後、トリプシンEDT Aで処理し、骨髄間葉系幹細胞を細胞浮遊液として採取し、1×10⁴ cell/cm²の細胞密度で10cm培養皿に播種し、標準培養液に10nMデキサメサゾン、82 μg/mlアスコルビン酸を添加した培地で二次培養を行い、コンフルエントに達した後スクレーパーで骨形成細胞シートとして

採取する（図2）。

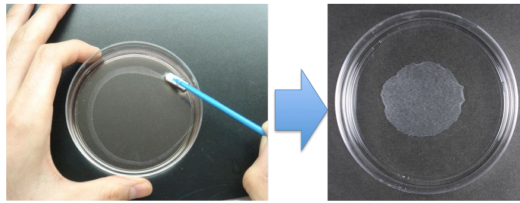


図2 骨形成細胞シートの作成

【実験モデルの作製と評価】

1) 骨形成細胞シート移植による骨形成能付与（図3）

殺細胞処理骨に対し、骨形成細胞シート移植の併用で骨形成能を付与することができるかを皮下移植モデルで検証する。皮下移植実験モデルとして、以下の3群で実験を行う。処理骨移植に骨形成細胞シート移植を併用した群、処理骨に細胞浮遊液を組み合わせ移植した群、処理骨移植のみの群。これらをラットの皮下に移植し4週後に摘出し、レントゲン、組織像、リアルタイムPCRでALPとオステオカルシンのmRNA発現量を定量評価する。これによって、細胞シート移植併用の効果を細胞浮遊液組み合わせ群と比較できるだけでなく、殺細胞処理骨の骨形成能が完全になくなっていることを確認できる。

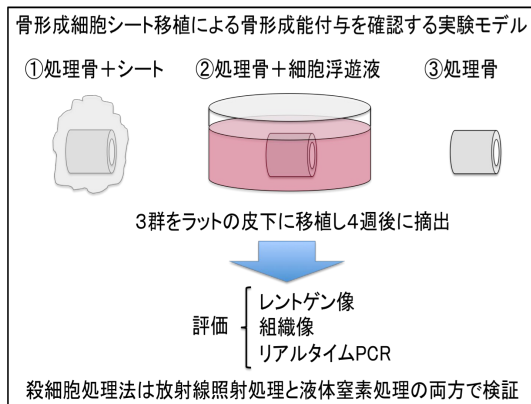


図3 骨形成細胞シート移植による骨形成能付与

2) 大腿骨自家処理骨移植モデルの作製と評価（図4）

レシピエントラット(12週齢オスFischer344ラット)の大腿骨を10mm長切除し、殺細胞処理した後に再度移植する。これを大腿骨自家処理骨移植モデルとする。放射線照射処理と、液体窒素処理の両方の方法で殺細胞処理を行い、両モデルを作製する。移植骨は1.2mmキルシュナー鋼線を用いてレシピエントの骨切除部位に髓内釘固定する。切除した骨片は、一度周囲組織から完全に切り離しているため血流が途絶しており、さらに殺細胞処理を行っているため、骨形成能は完全に消失している。

大腿骨自家処理骨移植モデルに対して、処理骨移植に骨形成細胞シート移植を併用した群、処理骨に細胞浮遊液を組み合わせ移植した群、処理骨移植のみの群、の3群を作製し移植骨周囲の骨形成を評価する。評価は移植後4,8,12週でのレントゲン撮影、移植後12週での組織学的評価、micro-CT撮影、力学試験(3点曲げ試験)により行う。

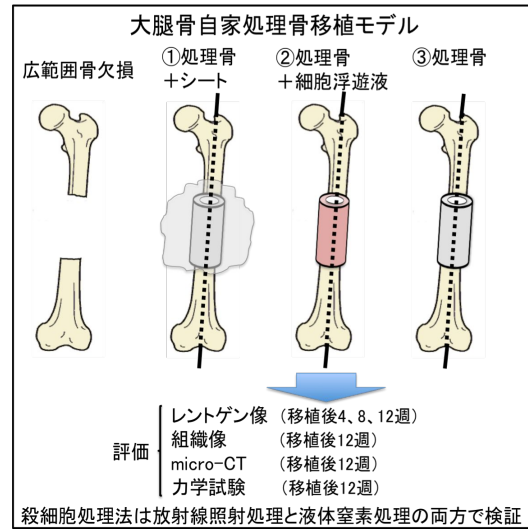


図4 大腿骨自家処理骨移植モデルの作成と評価

4. 研究成果

1) 骨形成細胞シート移植による骨形成能付与

処理骨移植に骨形成細胞シート移植を併用した群はレントゲン、組織像で明らかに新生骨形成を認めた。また、処理骨に細胞浮遊液を組み合わせ移植した群、処理骨移植のみの群と比較し、リアルタイムPCRでALPとオステオカルシンのmRNA発現量が高かった。

2) 大腿骨自家処理骨移植モデルの作製と評価

処理骨移植に骨形成細胞シート移植を併用した群は移植後4,8,12週でのレントゲン撮影、移植後12週での組織学的評価、micro-CT撮影(図5)で明らかに移植床周囲に骨性架橋を認めた。一方、処理骨に細胞浮遊液を組み合わせ移植した群、処理骨移植のみの群、の2群とは偽関節となった。力学試験(3点曲げ試験)では群は群と比較し有意に強度が高い結果となった。

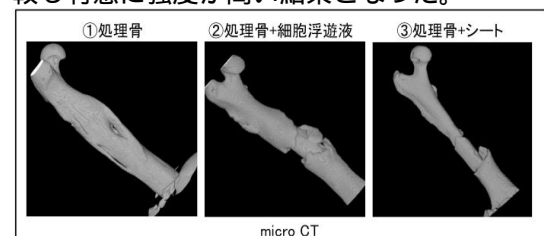


図5 microCT

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Y. Uchihara, M. Akahane, T. Shimizu, T. Ueha, Y. Morita, S. Nakasaki, T. Kura, Y. Tohma, A. Kido, K. Kawate, and Y. Tanaka: "Osteogenic Matrix Cell Sheets Facilitate Osteogenesis in Irradiated Rat Bone." *Biomed Res. Int.* vol. 2015, pp. 629168, 2015.

6 . 研究組織

研究代表者

内原好信 (UCHIHARA Yoshinobu)

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号： 60736924