

令和 2 年 9 月 3 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K10863

研究課題名(和文) レシピエントの生体内で血管柄付き同種骨を作成する試み-培養骨髄細胞の利用-

研究課題名(英文) Attempt to Prefabricate Vascularized Allogenic Bone in Recipient -Use of Cultured Bone Marrow Cells-

研究代表者

加地 良雄 (Kaji, Yoshio)

香川大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：30314917

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：研究開始当初、レシピエント由来の培養骨髄細胞を同種骨に移植する予定であったが、実用化には至らなかった。そこで同種骨を移植する際、髄腔内にサイトカイン(FGF, VEGF)を添加した人工骨を充填し、さらにレシピエントの血管束を導入することで、血管束から培養細胞の代わりとなる幹細胞を誘導し、サイトカインによる効果で血管形成、骨形成を誘導する方法に変更した。本法を用いることにより移植同種骨内で良好な血管形成および骨形成が誘導され、骨吸収は促進されないことを、遺伝子学的および組織学的に立証した。さらに、本法で作成した血管柄付き同種移植骨をレシピエントの大腿骨に骨接合する研究を遂行した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年国内においても同種骨を各医療機関で保存する環境(骨バンク)の整備が進んでおり、適切に運営するためのガイドラインも定められている。そのため、他の同種臓器移植に比べると容易に利用することができる。この恵まれた環境を生かし、血管柄付き自家骨移植の代替法を開発することがこの研究の最大の特色である。また、自家骨移植では採取が困難な大きな骨移植も、同種骨では利用が可能であるため、自家骨以上の臨床応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：At the beginning of the study, it was planned to transplant recipient-derived cultured bone marrow cells into allogeneic bone, but it was not practical. Therefore, when allogeneic bone is transplanted, artificial bone containing cytokines (FGF, VEGF) is filled in the medullary cavity, and by introducing the recipient's vascular bundle, stem cells that replace the cultured cells are obtained from the vascular bundle. Using this method, it was genetically and histologically proved that good angiogenesis and bone formation were induced in transplanted allogeneic bone, but bone resorption was not promoted. Furthermore, we performed a study to connect the vascularized allograft bone prepared by this method to the femur of the recipient.

研究分野：整形外科、マイクロサージャリー

キーワード：同種骨移植 骨欠損再建 マイクロサージャリー

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1.研究開始当初の背景

外傷や骨腫瘍の切除に伴い大きな骨欠損が生じた場合、血行のない自家骨や同種骨を移植したのでは骨癒合を得たり、移植骨内の血流を再構築させることは難しい。そのため栄養血管を付けた自家骨移植（血管柄付き自家骨移植）が通常行われるが、大きな移植骨を採取したり、主要な血管を採取するなど、健常組織の大きな犠牲が必要になる。

申請者らは血管柄付き自家骨移植の代替手段として近年その利用が容易となってきた同種骨を用いる方法を考案し、開発してきた。本法を臨床に応用していくためには移植骨内での血管新生と骨形成を促進し、骨吸収の促進を最小限にする必要がある。研究開始当初に考案していた具体的な方法以下のようなものであった。

- (1) あらかじめレシピエントの骨髄細胞を採取し、この細胞を血管新生および骨形成促進作用を持つサイトカイン（血管内皮増殖因子：VEGF、線維芽細胞増殖因子：bFGF-2 など）の存在下で培養し、同種移植骨に添加する。これにより、血管内皮細胞および骨芽細胞への分化を誘導された細胞を移植骨に添加できる。また、個々のサイトカインが持つ骨吸収促進作用の影響も最小限にできることが予測される。
- (2) 細胞の移植骨添加時は、細胞の担体としてスポンジ状人工骨（ハイドロキシアパタイト・コラーゲン複合体：リフィット®）を使用する。人工骨はその後の骨形成の足場としても有用である。

2.研究の目的

上記の背景およびこれまでの研究成果をもとに、本研究では研究期間内に以下のことを明らかにすることを目的とした。なお本研究ではドナーとしてメス SD ラットを、レシピエントとしてオス Wister ラットを使用し、解析を進めることとした。

- (1) レシピエントから採取した骨髄細胞を VEGF、bFGF、BMP の存在下で培養し、これらサイトカインの添加により血管内皮細胞、骨芽細胞への分化促進作用が見られることを明らかにする。またいずれのサイトカインまたはその組み合わせが最も効果的かを検討する。
- (2) ドナーから採取した同種骨をレシピエント大腿部に移植する。この際、レシピエントの血管束と前述の培養細胞を添加した人工骨を骨髄内に充填する。これにより移植同種骨内での血管新生および骨形成が促進されることを組織学および遺伝子学的に評価する。また、骨吸収が促進されていないかも同時に評価する。
- (3) さらに移植後に PTH 等の間欠投与を行うことで、骨形成がより促進されるかを評価する。
- (4) (3) で作成した血管柄付き同種移植骨をレシピエントの大腿骨に移植し、良好な骨癒合が得られるかを評価する。

3.研究の方法

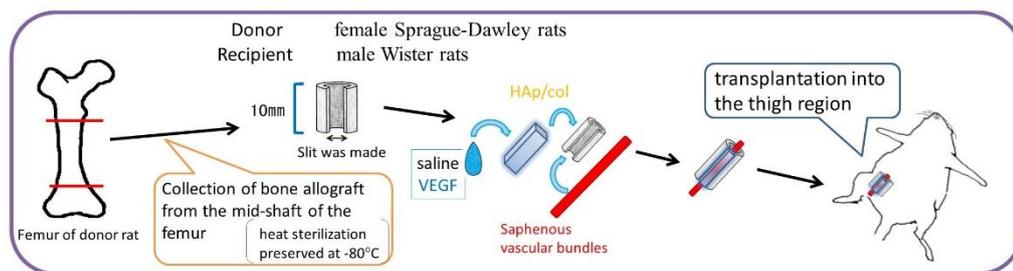
- (1) レシピエントであるオス Wister ラットの大腿骨から骨髄細胞を採取し、VEGF、bFGF、BMP の存在下で培養した。本実験を複数回繰り返したが、増殖細胞数の個体差が非常に大きく一定の結果を得ることが困難であり、実用化には至らないと判断された。そこで同種骨を移植する際、髄腔内にサイトカイン（FGF、VEGF）を添加した人工骨を充填し、さらにレシピエント

の血管束を導入することで、血管束から培養細胞の代わりとなる幹細胞を誘導し、サイトカインによる効果で血管形成、骨形成を誘導する方法に変更し、その後の研究を遂行した。

- (2) 9週齢メスSDラット（ドナー）50匹の大腿骨から10mmの骨柱を採取し、長軸方向のスリットを作成、加温滅菌、凍結保存の後、9週齢オスWistarラット（レシピエント）50匹の大腿内側に移植した。群分けはコントロール群（C群）、スリットに伏在動静脈（血管束）をflow throughで導入したもの（V群）、人工骨（Hydroxiapatite/Collagen composite:HAp/col）のみを髄腔内に充填したもの（HA群）、血管束とHAp/col充填したものを（V+HA群）、血管束と10 μ gのVEGFを添加したHAp/colを充填したものを（V+VEGF群）とした。カルセインで骨標識した後、移植後4週で移植骨を摘出した。採取した骨移植片における血管新生、骨形成、骨吸収を組織学および遺伝学的に評価した。

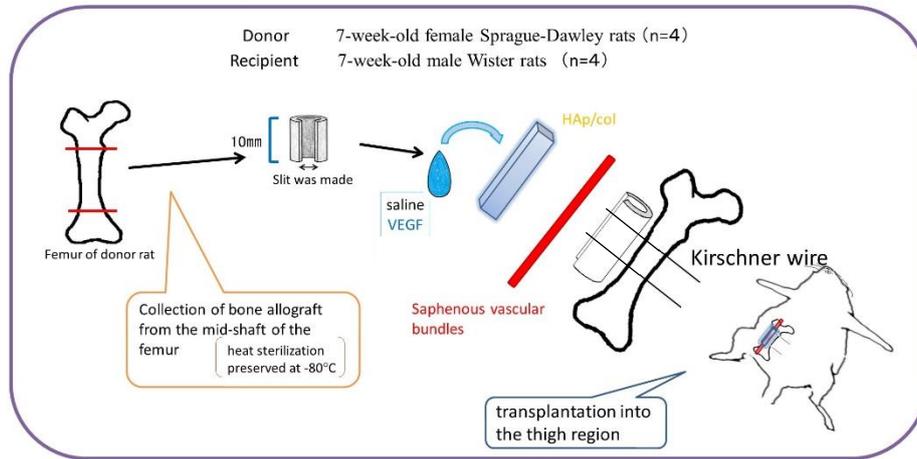
組織学的評価では非脱灰標本と脱灰標本を作製し、血管形成率（新生血管数/全骨表面積 \times 100：%Vas）、骨形成面率（全骨標識面/全骨表面 \times 100：%LS）、破骨細胞面率（全破骨細胞附着面/全骨表面 \times 100：%OcS）を計測した。

遺伝学的評価では摘出した移植骨よりtotal RNAを採取しRT-qPCRでmRNAの発現量を評価した。評価項目は血管新生の評価としてVEGFを、骨形成能の評価としてBMP、BAP、type-1 collagenを、骨吸能の評価としてRANKL、TNF- α を使用した。



- (3) 移植後のPTH観血的投与などは、②の実験で十分な血管新生および骨形成の促進が確認されたため、行わなかった。
- (4) 本法により作成された血管柄付き同種移植骨の骨欠損再建における有用性を評価するため、以下の方法によりレシピエントの骨に対する骨癒合能を評価した。

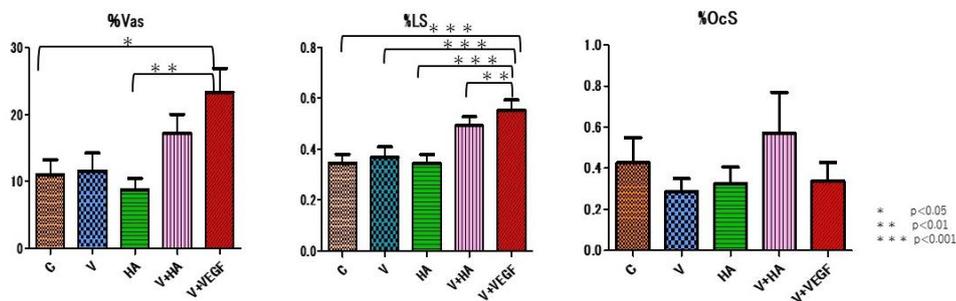
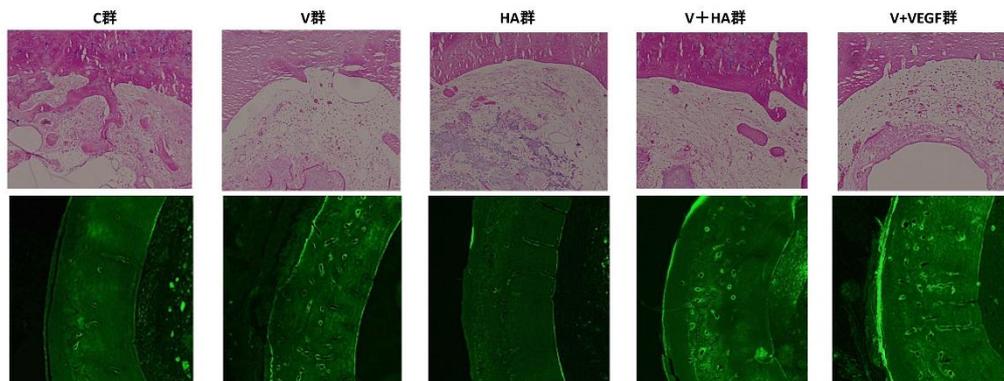
メスSDラットをドナーに、オスWistarラットをレシピエントに用いた（n=20）。②と同様に血管柄付き同種移植骨を作成し、これをレシピエントの大腿骨骨幹部に移植し、キルシュナー鋼線を用いて固定した。群分けは②と同様とした。4週後にレシピエントの大腿骨と移植骨を一塊にして採取し、組織学的に評価を行った。評価項目は骨癒合率および移植骨内での血管形成率（新生血管数/全骨表面積 \times 100：%Vas）、骨形成面率（全骨標識面/全骨表面 \times 100：%LS）、破骨細胞面率（全破骨細胞附着面/全骨表面 \times 100：%OcS）とした。



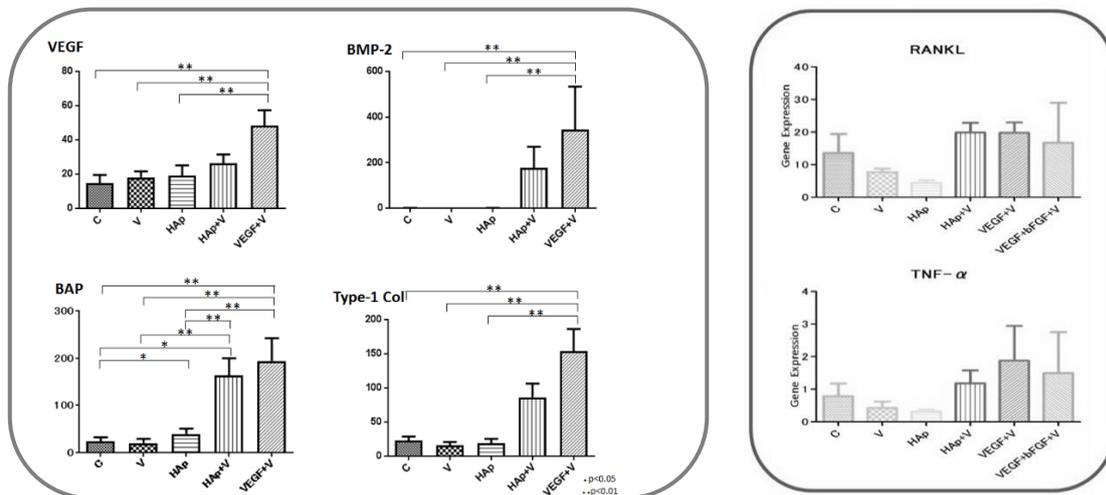
4. 研究成果

- (1) 前述のように大腿骨の骨髓細胞培養において各個体ごとの細胞増殖能にばらつきがあり、一定の結果を導くことは困難であった。
- (2) 組織学的評価では%Vas はC群に対し、V+HA群で増加傾向を認め、V+VEGF群で有意に増加した。%LS はC群に対しV+HA群で増加傾向を、V+VEGF群で有意な増加を認めた。TRAP染色における%OcSの評価では各群間で有意差を認めなかった。

結果



遺伝子学的評価では VEGF、BAP、Type-I collagen の発現は C 群、V 群、HA p 群に対し、V 群、VEGF+V 群、VEGF+bFGF+V 群で有意に増加していた。RANKL、TNF- α の発現は群間で有意差は認めなかった。



本実験結果から同種骨を移植する際に血管新生促進作用を持つ VEGF を添加した人工骨を骨髄内に充填し、さらにレシピエントの血管束を移行することで移植骨内での血管新生の促進（再血行化）と骨形成の促進（骨再生）が認められ、骨吸収の促進は認められないことが明らかとなった。

このことから本法を用いて作成された血管柄付き同種骨は、大きな骨欠損を再建する際に非常に理想的な移植骨になり得ることが期待された。

(3) 前述のように PTH 等の間欠投与は行わなかった。

(4) 骨癒合能を評価する本実験ではラットの骨は非常に小さく、安定した骨接合を行うことは容易ではなく、群間で骨癒合能の差異を明らかにすることは困難であった。骨接合時の移植骨内における血管新生、骨形成、骨吸収に関しては②の実験と同様の結果が得られた。現在、小さな骨でも安定した骨接合を行える手技に関してさらなる改良を行っている。

上記の研究成果は主に整形外科、マイクロサージャリー分野の学会で報告をした。研究の前半部分に関しては現在英文誌に投稿中である。

(得られた成果の国内外における位置づけとインパクト)

米国などではすでに同種骨の利用が容易になっており、国内でも同種骨バンクが広く整備されてきている。本研究の成果をもとにさらに実用化に近づけることができれば、大きな骨欠損の再建治療に自家骨を用いる必要がなくなり、健全組織の犠牲を回避できる可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 飛梅祥子, 加地良雄, 他
2. 発表標題 血管柄付き同種移植骨に対するVEGF添加ハイドロキシアパタイトの血管新生および骨形成促進作用の評価
3. 学会等名 第45回日本マイクロサージャリー学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Sachiko Tobiume, Yoshio Kaji, et al.
2. 発表標題 Effects of Vascular Endothelial Growth Factor on Prefabricated Vascularized Bone Allografts in Recipient Rats at the bone fixation site.
3. 学会等名 ORS2019 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tobiume S, Kaji Y, et al.
2. 発表標題 The Effects of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) on the Prefabricated Vascularized Bone Allografts in Recipient Rats.
3. 学会等名 ORS2018Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 飛梅祥子, 加地良雄, 他
2. 発表標題 レシピエントの生体内でprefabricateした血管柄付き同種移植骨に対するVEGF添加人工骨の骨形成促進作用
3. 学会等名 第32回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2017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	飛梅 祥子 (Tobiume Sachiko) (20771223)	香川大学・医学部附属病院・医員 (16201)	
研究分担者	中村 修 (Nakamura Osamu) (40532685)	香川大学・医学部・助教 (16201)	
研究分担者	山本 哲司 (Yamamoto Tetsuji) (80220482)	香川大学・医学部・教授 (16201)	