

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659721

研究課題名(和文)細胞を用いた成長軟骨帯の再生

研究課題名(英文)Regeneration of growth plate using mesenchymal stem cells

研究代表者

吉川 秀樹 (Yoshikawa, Hideki)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：60191558

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：成長軟骨帯損傷は骨端と骨幹端が骨性に架橋されることにより、長軸方向への成長障害による短縮や変形を引き起こす。本研究では、骨組織にて置換された成長軟骨帯を再生する目的で、間葉系細胞の移植を行い、その再生が可能かどうかを検討した。我々は、滑膜由来の間葉系幹細胞から作成した3次元人工組織を成長軟骨帯に作成した損傷部位に移植することにより、成長軟骨帯様組織の再生に成功した。この組織は成長軟骨同様に細胞の柱状形態をとり、サフラニン染色にて濃染する軟骨組織からなっていた。また、成長軟骨帯様組織が再生していた長管骨は、3次元人工組織を移植しないコントロール群に比べて、骨長の回復と変形の矯正を認めた。

研究成果の概要(英文)：Growth plate injuries often cause bone shortening or angular deformities of affected bones because of total or partial bony bridging between epiphysis and metaphysis. In order to explore new method of the treatment of growth plate injuries, we investigated availability of 3-dimensional artificial tissue, which is made of synovium-derived mesenchymal stem cells, for the regeneration of injured growth plate. Our results demonstrated that physis-like cartilage tissue was reorganized by implantation of 3D tissue. Moreover, we confirmed that correction of bone shortening or angular deformities was followed after the regeneration of tissue regeneration.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：成長軟骨帯損傷 骨橋 間葉系細胞 3次元人工組織 変形矯正

1. 研究開始当初の背景

成長軟骨帯は内軟骨内骨化による骨の成長を司る重要な組織である。これが先天的あるいは後天的に問題が生じると、骨長に影響を及ぼしたり、骨の変形を来しうる。たとえば、先天的には **FGFR3** 遺伝子変異により長管骨短縮を来す軟骨無形成症が挙げられる。一方、後天的な例としては、骨折における成長軟骨帯損傷が挙げられる。この成長軟骨帯損傷では、この組織を含む骨折などの損傷によって、同部位の再生が成長軟骨帯でなされず、骨組織で置換されることで、さまざまな骨変形を来す。現在の整形外科的には、これらを1次的に治療することが困難で、成長軟骨帯損傷によって生じた変形や骨短縮に対して、2次的に損傷部位以外での変形矯正術や骨延長術などがなされている。これらのことを踏まえて、我々は、損傷した成長軟骨帯を再生できれば、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

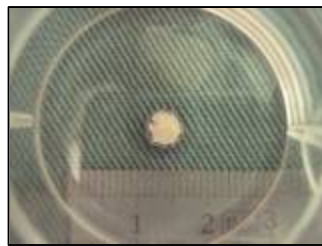
損傷した成長軟骨帯を再生することを目的として、以下の2つの点を検討した。第1に間葉系幹細胞を用いることで成長軟骨帯の再生が可能であるかどうか、第2にその場合に引き起こされた骨短縮や変形が改善可能であるかどうかである。

3. 研究の方法

成長軟骨帯損傷による骨変形を来すウサギモデルを作成、確立した後に、間葉系幹細胞由来の3次元人工組織を用いた成長軟骨帯損傷部位の再生を行った。

①日本白色家兎の膝関節より採取した滑膜をコラゲナーゼ処理し、間葉系幹細胞を採取、高密度培養を行い、3次元人工組織を作成は、Andoらの方法

(Biomaterials, 2007)に準じて行い、右図のような3次元人工組織を得た。



②日本白色家兎の脛骨近位内側成長軟骨帯に径5mm・深さ5mmの欠損を作り(左下図)、3週飼育。同骨の短縮および角状変形を作成・確認



③変形した脛骨の成長軟骨帯骨橋部分を切除し、移植なし、骨蠟移植、作成した3次元人工組織を移植

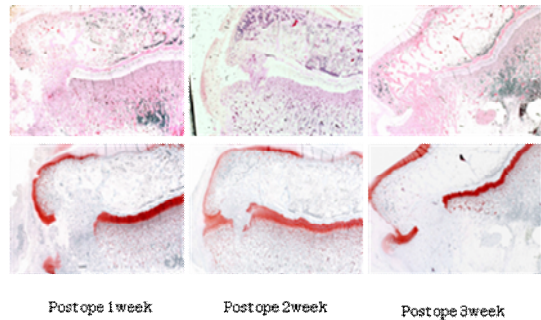
④移植術後5週時に画像評価および組織学評価を行う

評価を行う

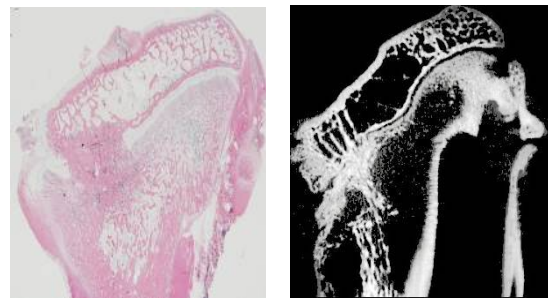
4. 研究成果

①ウサギ成長軟骨帯損傷モデル作成

ウサギ脛骨近位内側成長軟骨帯損傷モデルを作成し、経時変化をHE染色およびサフラニン0染色にて確認したところ、成長軟骨帯欠損手術4週にて骨性架橋ができていることを確認した。図1は術後3週までのHE染色とサフラニン0染色、図2は術後4週の脛骨X線画像を示し、組織学的および画像的に骨性架橋が出来ていることが確認できた。また、骨性架橋にて脛骨の変形をきたしていることもわかる。



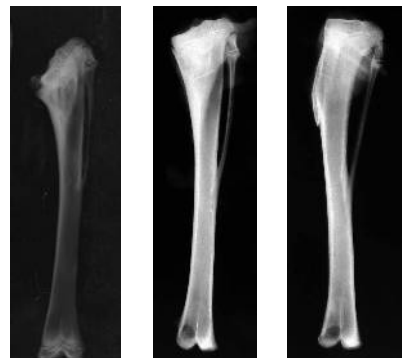
(図1)



(図2)

②3次元人工組織移植による変形矯正

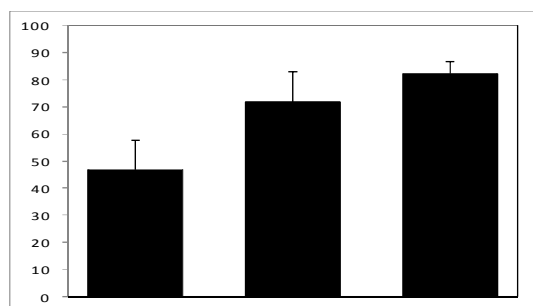
骨橋切除時に何も移植しない群、再度骨橋形成を防ぐために、骨蠟を移植した群、3次元人工組織を移植した群での移植後5週時点でのX線画像を評価したところ、3次元人工組織を移植した群において変形の著明な改善を認めた(図3)。



(図3)

骨橋切除および移植術後5週の画像
右から移植なし、骨蠟移植、3次元人工組織移植

さらに、変形の矯正度合いを、脛骨骨軸と脛骨近位関節面とのなす角 (MPA) で評価したところ、図4のように、3次元人工組織移植群において移植しなかった群に比べて有意に変形の改善を認めた。



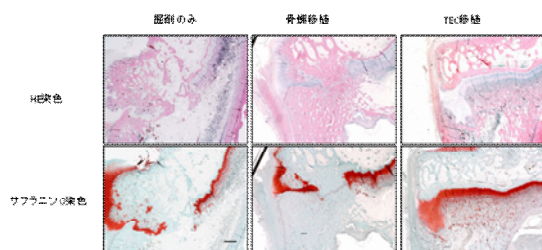
(図4)

左から移植しなかった群、骨蠟移植群、3次元人工組織移植群 (縦軸はMPA)

③ 3次元人工組織による成長軟骨帯様組織再生

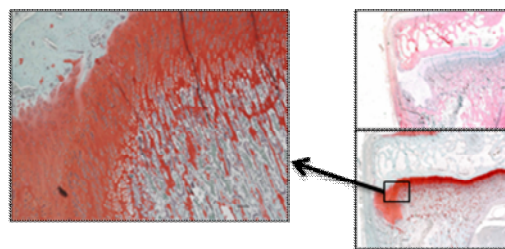
成長軟骨帯損傷後骨橋による脛骨角状変形が、3次元人工組織移植によって改善したことを画像的に確認後、成長軟骨帯損傷部 (3次元人工組織移植部) の組織学的評価を行った。移植しなかった群 (掘削のみ群) では、骨橋形成が再度認められ、骨橋による成長障害が角状変形の主要因であることが示唆された。

一方、3次元人工組織には劣るが、各状変形の矯正を認めた骨蠟移植群では、骨橋が一部形成されるも、骨蠟の存在で骨橋形成が少なく、成長障害が起きにくかったと考えられた。これらに比べて、3次元人工組織移植群では、骨橋形成がほとんどみられず、正常の成長軟骨帯に連続するようにサフラニン染色で染まる軟骨組織を認めた (図5)



(図5)

さらに、3次元人工組織移植部を強拡大で観察すると、正常成長軟骨帯ほど整列した状態ではないが、軟骨基質内に細胞が柱状構造をなして配列しており、成長軟骨帯様の組織が再生していることが確認された (図6)。



柱状構造が認められ、成長軟骨帯の形態に類似

(図6)

これらの結果は、ウサギの成長軟骨帯損傷後骨橋形成モデルにおいて、間葉系幹細胞由来3次元人工組織を移植することで、変形矯正が可能であるばかりでなく、成長軟骨帯様組織の再生が可能であることを示唆していた。これまで、関節軟骨損傷に対する細胞を使用した関節軟骨再生の報告は多数あるが、成長軟骨帯再生に関する研究はほとんどない。したがって、本研究を発展させることで、成長軟骨帯再生に対する有用な治療法となることが示唆された。

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)

① Treatment of partial growth arrest using an in vitro-generated scaffold-free tissue-engineered construct derived from rabbit synovial mesenchymal stem cells. Yoshida K, Higuchi C, Nakura A, Nakamura N, Yoshikawa H.

J Pediatr Orthop. 査読有 2012

Apr-May;32(3):314-21. doi:

10.1097/BPO.0b013e31824afee3.

② Hip joint pigmented villonodular synovitis in a young girl: a case report. Higuchi C, Ohno I, Yoshikawa H.

J Pediatr Orthop B. 査読有 2012

Jul;21(4):335-8. doi:

10.1097/BPB.0b013e3283524bdf.

[学会発表] (計6件)

① 樋口周久、吉田清志、吉川秀樹

片側肥大症による脚長差に対しスクリューを用いた経皮的成長抑制術を施行した1例、第117回中部日本整形外科災害外科学会、2011年10月28日、宇部市

② 樋口周久、吉田清志、吉川秀樹

Percutaneous Epiphysiodesis Using Transphyseal Screw (PETS) を用いて変形矯正した片肢性骨端異形成症の1例、第26回日本小児整形外科学会、2011年12月8日、京都市

③ 吉田清志、樋口周久、村瀬剛、吉川秀樹、

Correction of severe knee deformity following physeal arrest with the aid of a three-dimensional computer system and external fixator.、2nd World Congress on External Fixation and Bone Reconstruction、2012年9月6-8日サルバドール・ブラジル

④樋口周久、吉田清志、村瀬剛、吉川秀樹、Correction of knee deformity following physeal arrest with the aid of a three-dimensional computer system.、9th Asia Pacific Orthopaedic Association Paediatric Section、2013年8月29-31日、クチン・マレーシア

⑤樋口周久、吉田清志、中村憲正、吉川秀樹、間葉系幹細胞由来三次元人工組織(TEC)による成長軟骨修復、第24回日本小児整形外科学会、2013年11月8日、横浜市

⑥吉田清志、樋口周久、中村憲正、吉川秀樹、Treatment of growth arrest using an in vitro generated scaffold-free tissue engineered construct(TEC) derived from synovial mesenchymal stem cells.、International Society of Limb Salvage 17th General Meeting、2013年9月11-13日ボローニャ・イタリア

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉川 秀樹 (YOSHIKAWA HIDEKI)
大阪大学大学院・医学系研究科・教授
研究者番号：6191558

(2) 研究分担者

樋口 周久 (HIGUCHI CHIKAHISA)
大阪大学・保健センター・助教
研究者番号：40432421