

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592190

研究課題名(和文) 腫瘍脊椎骨全摘術後の骨欠損に対する自己脂肪由来幹細胞を用いた骨再生

研究課題名(英文) Bone healing with the adipose-derived regenerative cells in the large bone defect after total en bloc spondylectomy

研究代表者

出村 諭 (Demura, Satoru)

金沢大学・大学病院・講師

研究者番号：00348228

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)：脊椎腫瘍切除後の動物モデルで、脂肪由来幹細胞を脊椎骨欠損部での再建材料として用い、移植骨の骨形成への関わりを評価した。その結果、移植骨内に占める線維性結合組織面積、新生骨に占める層板骨の割合、骨形成速度の比較検討で、いずれも脂肪由来幹細胞群は対照群と比較して高値となった。移植骨の骨形成は線維性結合組織の増生に始まり、リモデリングを経て骨癒合に至るとされる。脂肪由来幹細胞群では対照群より早期の段階で層板骨が形成され、骨形成を促進させることができると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We investigated whether adipose derived regenerative cells (ADRCs) promote osteogenesis of the bone graft in total en bloc spondylectomy (TES) animal model. In control group, bone formation area was occupied by woven bone 2 weeks after surgery. In ADRCs group, lamellar bone was shown in a certain proportion 2 weeks after surgery, and the ratio of lamellar bone increased in both groups 4 weeks after surgery. The Number of osteoblasts lined up on the osteoid surface tended to be large in ADRCs group. Under fluorescent light, there was few deposition of calcein in control group, in the meanwhile, there were defuse deposition which showed immature lamellar structure in ADRCs group 2 weeks after surgery. The orderly label line was shown that meant mature lamellar structure in both groups 4 weeks after surgery. ADRCs used as materials of spinal reconstruction promoted osteogenesis of the bone graft in the early phase.

研究分野：医歯薬学

キーワード：脊椎腫瘍 腫瘍脊椎骨全摘術 自家骨移植 自己脂肪由来幹細胞 骨癒合 脊柱再建 生物学的固定 骨欠損

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 当科では原発性脊椎悪性腫瘍や脊椎転移癌に対し、脊髄機能を温存しつつ腫瘍の局所根治を目指した腫瘍脊椎骨全摘術を世界に先駆けて行ってきた。本術式は脊椎腫瘍に対して局所根治性の高い手術と考えられている<sup>1,2</sup>。一方、この手技は傍脊柱筋群、靭帯などの脊柱を支持する軟部組織を罹患椎体とともに脊椎から切り離すため、脊椎の連続性は完全に途絶され、脊柱は完全に不安定な状態となる。したがって再建には強固な初期固定と同時に生物学的な骨癒合を獲得する必要があり、腫瘍脊椎骨切除後の脊柱再建は本術式の非常に重要な要素となっている。

我々は現在まで、チタンケーシング内に大量の自家腸骨を充填し、これを前方の椎体再建に用いてきた。しかし大きな骨欠損を伴う脊椎腫瘍切除後の自家骨のみの脊柱再建は、骨癒合が必ずしも得られるわけではないこと、骨癒合に時間を要すること、自家骨移植では採取できる量に限界があること、採骨にかかわる出血や採骨部痛などの問題がある。このため、早期から生物学的な固定が得られ、かつ自家骨採取部位の犠牲が可能な限り少ない再建方法が求められている。

(2) 組織の再生医療は、近年あらゆる生体部位で試みられている。その中には、ES細胞やiPS細胞、骨髄間葉系幹細胞などがあげられる。しかし、体外でヒトの細胞を培養、分化させることには、操作上の問題や倫理的な問題が存在する。一方、脂肪組織の中には、未分化な多能性細胞が存在することが明らかになっている<sup>3</sup>。その一部に多方向に分化する幹細胞が確認され、脂肪由来幹細胞とよばれる。これは、脂肪、軟骨、骨、骨格筋、神経、血管などへ分化誘導できる可能性が示されている<sup>4</sup>。他のソースと比べ、大量かつ容易に採取が可能であり、再生医療で問題となる培養操作を行わなくても十分な移植細胞数が得られる。今までに、乳房再建や腸瘻に対する臨床応用が始まっているが<sup>5,6</sup>、巨大な骨欠損に対する脊柱再建材料として自己脂肪由来幹細胞を用いた骨再生に関する検討は国内外で存在しない。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、腫瘍脊椎骨全摘術後の動物モデルを作成し、自己脂肪由来幹細胞を用いた早期の生物学的な脊柱再建が可能となるのか、可能であるならば、どの時期にどのような機序で骨癒合が得られるのかを明らかにすることである。

## 3. 研究の方法

ビーグル犬（ナルクビーグル、三共ラボ、1歳、雌、10-12kg）12頭を以下の2つの群に分け検討した。

(A) チタンケーシング内に自家骨を移植した

群（対照群）。

(B) チタンケーシング内に自家骨および自己脂肪由来幹細胞 (adipose-derived regenerative cells: ADRCs) を移植した群（ADRCs群）。

本研究は「脊椎全摘術後の椎体再建に関する脂肪幹細胞を用いた実験的研究」として、金沢大学医学部動物実験倫理委員会の承認を受けた。

### (1) 脊椎全摘モデルの作成

ビーグル犬をメドトミジン (3 µg/kg) およびミダゾラム (3 mg/kg) で鎮静し、パンクロニウムを経静脈的に投与後、6.0 mmのカフ付きチューブを挿管し、人工呼吸器 (R-10, AIKA社製、東京) に接続して50/50%の酸素/笑気混合気で調節呼吸を行った。維持麻酔にはプロポフォール (10 mg/kg/hr) を用い、非動化にはパンクロニウムの静脈内投与を適宜行った。麻酔導入後、セフトリアキソン (ロセフィン®、中外製薬、東京) 1gを静脈注射した。動物を腹臥位とし、背側正中切開で第10胸椎から第3腰椎の椎弓を露出した。第11、12胸椎、第1、2腰椎椎体の横突起基部から対側の椎体側面に向けて直径5.0mmの椎弓根スクリュー (M8 pedicle screw®, Medtronic, USA) を各々挿入、直径5.5mmのロッドで脊柱を固定した。次に第12胸椎椎弓の尾側半椎弓、第13胸椎椎弓を切除し硬膜を露出した。第13胸髄神経根は両側とも結紮・切離した。腸腰筋と壁側胸膜を椎体から剥離した後、Thread wire saw (T-saw) (プロメディカル、金沢) を用いてT12/13、T13/L1椎間板を切離、第13胸椎を一塊として切除した。上下隣接椎体の軟骨終板を鋭匙を用いて完全に切除し、移植椎体に対して血流を有する母床を作成した。切除した椎体から鋭匙を用いて可能な限りの海綿骨を取り出し、不足分は皮質骨を粉碎して混ぜ、移植骨とした。直径12mm、高さ約15mmのチタンケーシング (Harmscage®, Depuy, USA) に移植材料を充填し、これを椎体欠損部に挿入した後、第12胸椎と第1腰椎椎体に挿入したスクリュー間を短縮、圧迫力を加えることで固定した (図1)。これにて欠損部をチタンケーシングにて再建できる第13胸椎全摘術モデルが完成した。

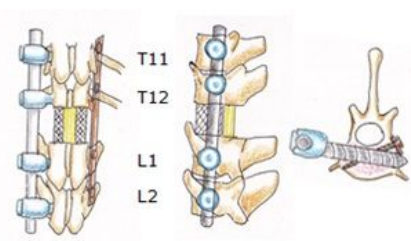


図1 脊椎全摘モデルの作成

## (2)自己脂肪由来幹細胞の抽出

脂肪由来幹細胞は背部より脂肪組織を約 10g 採取し、Zuk らの方法に基づき抽出した<sup>3</sup>。すなわち、0.12%コラゲナーゼ I 内で 45 分振盪し、FBS 入り DMEM で中和した後、フィルター（40 $\mu$ ）を通して遠心を行い、沈殿した stromal-vascular fraction を採取した。この中に脂肪由来幹細胞が含まれ、抽出液を椎体再建時に移植海綿骨と混合しチタンケージ内に充填した。

## (3)組織学的検討

各群それぞれ術後 2 週と 4 週に 3 頭ずつ屠殺した。屠殺の 9 日前および 2 日前にカルセインもしくはテトラサイクリンを蛍光標識剤として皮下投与した。

切除標本は 70%エタノールで 1 週間固定し、脊椎周囲の筋肉など軟部組織を取り除き、Villanueva bone stain 液に 7 日間浸透させた。その後エタノールによる脱水を行い、次いでアセトン、メチルメタクリレートモノマーの 1 対 2 の混合液を含んだメチルメタクリレートモノマー樹脂に浸透させ、非脱灰で重合した。チタンケージを含めた切除標本を作製するため、重合したブロックをボーンソーで 200 ミクロンの厚さに切断し、プラスチック製のスライドに貼り付け、研磨機を用いてさらに 50 ミクロンの厚さにまで研磨し、正中矢状断の非脱灰研磨切片を作製した。

完成した標本を光学蛍光偏光顕微鏡下に観察した。また、標本は巨大であり、全域に渡った骨形態計測が困難であると考えられたため、上下椎体に隣接した領域およびケージ中心部、脊髄側（背側）領域、腹側領域の 4 領域に分け、それぞれ 10 視野ずつを計測した（図 2）。

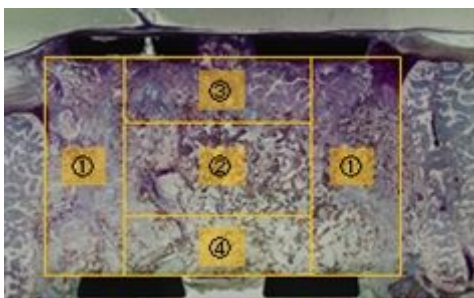


図 2 骨形態計測領域

上下椎体隣接領域 ケージ中心部  
背側領域 腹側領域

## 4. 研究成果

(1) 成犬に対し、全身麻酔下で脊髄神経を温存しつつ第 13 胸椎の切除を行い、欠損部をチタンケージにて再建できる脊椎骨全摘術モデルを確立した。

成犬の椎体はヒトの椎体より小さいことから、手術に用いる器具や手技に制約が生じた。しかし以下に述べる 2 点の改良により、同手術モデルの作成に成功した。

### 改良

成犬の椎弓根は細く、脊椎を固定するために椎弓根にスクリューを刺入することができない。このため椎体の再建時には第 11、12 胸椎および第 1、2 腰椎の椎体にヒト用の椎弓スクリューを刺入してロッドを用いて固定する。脊椎の固定に続いて椎体を摘出する際には切除椎体の上下端を T-saw を用いて切離する。ヒトの手術の場合、T-saw を椎体の前方に沿わせ、骨を切りながら後方脊髄方向へ引くが、本研究では、脊椎を固定したロッドを滑車の支点のごとく利用し、全周性に沿わせた T-saw で椎体を側方に切離する。これにより脊髄を傷つけることなく椎体の摘出が可能となった（図 3）。

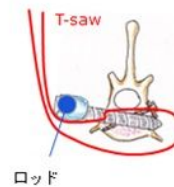


図 3 イヌ TES モデルにおける椎体の切除方法

### 改良

長期に渡って観察した場合、ロッド刺入側に圧迫力に伴う力学的不均衡が生じ、椎体骨折を生じやすいことがわかった。そこで金属プレートをロッドの反対側に固定することで不均衡を是正することができた（図 4）。この改良により安定した観察が可能となった。

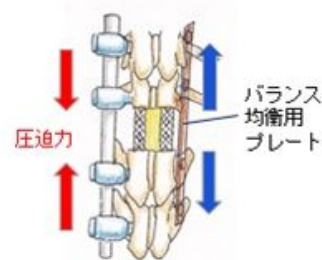


図 4 力学的不均衡の是正

## (2) 脊椎骨全摘術の巨大骨欠損部における移植骨形成過程の特徴を明らかにした。

脊椎骨全摘術における骨形成は、一般的な脊椎手術における海綿骨移植術と同様に隣接した骨との接触部位から進むことがわかった<sup>7,8</sup>。本術式に特徴的なのは、ケージの腹側からは骨形成を生じないが、ケージの背側では線維性組織の増生と破骨細胞による骨

吸収像を認め、同部位からも骨形成が生じると考えられた点である。硬膜側から線維性組織が増生していた理由として硬膜外の豊富な血管の存在が考えられた。

### (3) 自己脂肪由来幹細胞の骨形成促進効果を確認した。

上下椎体に隣接した領域の内、骨形成を主体とする部位には、自然光強拡大像で対照群と ADRCs 群で明確な差異を認めた。対照群 2 週では幼若な線維骨が目立ったが、ADRCs 群は 2 週から層板骨を認めた。両群ともに 4 週では層板骨を多く形成していたが、ADRCs 群 4 週の層板骨内にはさらに吸収像が存在し、よりリモデリングの進んでいると考えられた。(図 5)

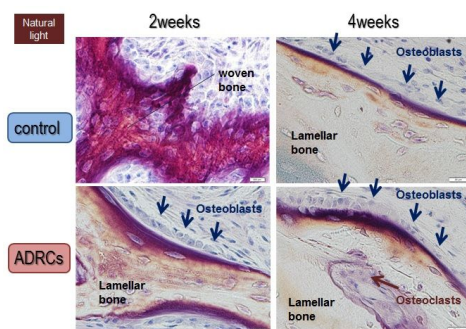


図 5 各群に認められる新生骨の特徴

この領域に骨形態計測を行ったところ、類骨面に並ぶ骨芽細胞数が各週 ADRCs 群で多く、2 週モデルより 4 週モデルで多い傾向を示した。これは層板骨を形成するために必要な配列を反映する数値で、ADRCs 群で層板構造を形成しやすい傾向があると考えられた(図 6)

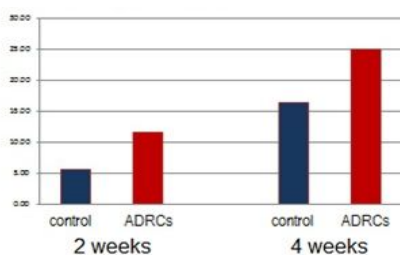


図 6 類骨面に並ぶ骨芽細胞数 (骨芽細胞数 (cell) / 類骨面の長さ (mm))

また、新生骨量に占める層板骨の割合では、2 週の時点でコントロール群ではほとんど認められなかったのに対し、ADRCs 群では 21.6% の層板骨が形成されていた。(図 7)

### 新生骨量に占める層板骨の割合

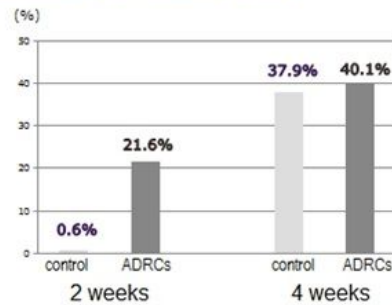


図 7 新生骨に占める層板骨の割合

蛍光下では、層板骨を形成する際に取り込まれる骨標識剤を観察できる。ADRCs 群 2 週で形成された層板骨では骨標識剤がややびまん性に沈着した、未熟な層板構造が多く認められた。4 週では、2 群ともに骨標識のきれいなラインを認め、成熟した層板構造であることが裏付けられた。特に ADRCs 群 4 週では、骨標識の 2 重線を多く認め、早期から層板構造を形成していたことがわかった。(図 8)

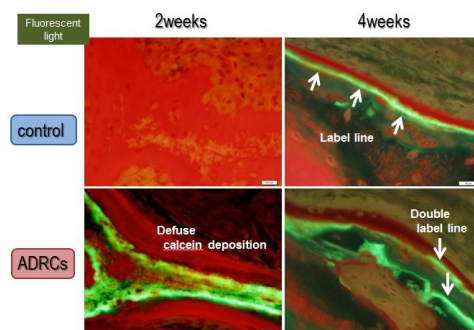


図 8 蛍光標識下での各群の比較

### 考察

一般に、脊椎手術では骨欠損部や骨癒合を期待する部位に骨移植を行う。脊椎領域における移植骨の癒合に関する研究は散見されるものの、そのほとんどが後側方固定術 (Posterolateral fusion; PLF) や後方椎体間固定術 (Posterior lumbar interbody fusion; PLIF) などの比較的小さな範囲を対象としており<sup>9,10</sup>、TES のような巨大骨欠損を生じる術式で骨癒合過程が検討された基礎研究は、茂住ら<sup>11</sup>と本研究以外には報告がない。

茂住らは、ビーグル犬を用いた TES モデルにおいて、通常の移植骨が 8 週で癒合途中であったものが、16 週では完全に骨癒合すると報告した。その中で移植骨は両端の上下椎体に接した部位からケージの中心に向かって骨癒合すると述べている。さらに、移植骨に

BMP-2 を混ぜることで 8 週という短期で骨癒合が完成することも報告されている。しかし、BMP-2 はアメリカでは臨床応用が進んでいるものの、本邦では認可されていないことから、臨床の現場で用いることができない。

動物を用いた実験における骨癒合評価は、単純レントゲンでの骨硬化像や透亮像の消失、仮骨形成、あるいは CT 再構成像での骨連続性や骨密度など臨床でも行える画像評価と、臨床では確認できない組織学的評価の両面から行われることが多い。しかし、本研究の術式のように、粉碎した海綿骨を金属ケージ内に充填して再建した部位の骨癒合を評価しようとしても、単純レントゲンでは金属ケージ内を透視することができず、CT でもアーチファクトの強い影響で精密な評価が困難と言える。したがって、金属ケージ内の骨癒合は組織学的評価に頼らざるを得ない。また、通常骨癒合を評価する際には、長期を経て形成された骨を対象とすることが多いが、本研究では、骨癒合が完成する時期よりも骨癒合が開始されるタイミングの方が脂肪幹細胞の作用を確認しやすいと考えられた。そこで、術後 2 週、4 週という比較的短期モデルで評価を行うこととした。

しかし、術後短期には骨癒合は完成しておらず、軟部組織と粉碎骨を主体とする組織であったため、固定性に乏しく金属ケージごと組織標本作製する必要性が生じた。金属ケージを含んだ検体を薄い切片にすることは技術的に困難であり、本研究では薄切標本ではなく研磨標本が適していると考えられた。さらに、骨癒合の結果ではなくその過程を観察しようとした場合、石灰化する様を観察することが不可欠であり、脱灰せずに標本作製することが求められた。本研究は、これらの条件を満たした標本作製が実現したことで成し得たものである。

骨折後の骨癒合過程では、骨折直後の炎症期に仮骨形成が認められる。本研究の対照群 2 週の骨形成領域において認められた、層板構造を持たない幼若な線維骨は、仮骨に相当するものであった。この線維骨が破骨細胞に吸収され、続いて骨表面に列をなした骨芽細胞が骨を形成した際に層板構造が生まれ、強固な層板骨となる。この吸収と形成を含む一連の反応をリモデリングという。したがって、図 5、図 6 の結果は、ADRCs 群が対照群に比して強固な層板骨を多く形成していたということのみならず、対照群では線維骨形成が主であった 2 週の段階で、ADRCs 群では既にリモデリングが行われていたことを示す。これは、骨形成の過程が ADRCs 群で進んでいることを示すと考えられた。

また、新生骨に占める層板骨の割合の結果からは、両群ともに術後 2 週から 4 週にかけてリモデリングが進み、層板骨の割合が高ま

ることがわかる。その中で、層板構造の質に着目すると、ADRCs 群 2 週で石灰沈着の指標となる骨標識がややびまん性に認められていたものが、両群 4 週ではきれいな線状を呈しており、層板骨として成熟していることもわかる。特に多くの二重線を認めた ADRCs 群 4 週では検体回収の約 1 週前の時点（術後 3 週）から成熟した層板骨を形成していたと言える。ゆえに、ADRCs 群ではより早期から成熟した層板構造を形成すると考えられた。

移植骨は、血管を内包した結合組織の増生、骨吸収、骨新生、石灰化の過程を経て骨癒合に至るとされる<sup>7</sup>。本研究の結果からは、およびの過程において ADRCs 群で促進されていると考えることができる。したがって、移植骨の癒合過程において、脂肪幹細胞には初期段階の骨形成を促進する効果があると考えられた。

本研究では、脂肪幹細胞群が骨癒合の早期における骨癒合促進効果を有することが示された。しかし、骨癒合を促進する因子が脂肪幹細胞そのものの増殖によるものか、あるいは何らかの液性因子によるものか解明できておらず、また、早期における骨癒合促進効果が最終的に骨量や骨質に変化をもたらすのかもわかっていない。本来であれば、RT-PCR による液性因子の解析や免疫染色による脂肪幹細胞の viability の確認、長期モデルにおける骨形態計測などを行うことが望ましいが、本術式に用いるケージの大きさの制限から大型動物を用いる必要があり、さらに 1 検体からようやく 1 枚の非脱灰研磨標本作製することができるという制約があったため、多角的に評価することができなかった。今後、より多様な観点から脂肪幹細胞の骨癒合促進効果を検証することが望まれる。

## 結論

脂肪幹細胞を含ませることで成熟した骨構造である層板骨を早期から形成させ、骨形成を促進させることができると考えられた。

## 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 0 件)

[学会発表](計 4 件)

Kei Inoue, Hideki Murakami, Satoru Demura, Satoshi Kato, Katsuhito Yoshioka, Hiroyuki Hayashi, Takashi Ota, Kazuya Shinmura, Hiroyuki Tsuchiya.

Osteogenic promoting effect of adipose derived regenerative cells in canine total spondylectomy model, 2015 American Academy of Orthopedic Surgery Annual Meeting (Las Vegas, USA), 2015.3.24-28

井上啓、村上英樹、出村諭、加藤仁志、吉岡克人、太田敬、新村和也、横川文彬、方向、土屋弘行

脊椎骨全摘術の巨大骨欠損部における脂肪由来幹細胞の骨形成促進効果、第43回日本脊椎脊髄病学会学術集会、2014年4月18日、国立京都国際会館（京都市）

井上啓、村上英樹、出村諭、加藤仁志、吉岡克人、太田敬、新村和也、横川文彬、方向、土屋弘行

脊椎巨大骨欠損部に埋入した脂肪由来幹細胞が及ぼす移植骨の骨組織形態学的な変化 - イヌ脊椎全摘モデルを用いて -、第28回日本整形外科学会基礎学術集会、2013年10月17日、幕張メッセ（千葉県美浜区）

井上啓、村上英樹、出村諭、加藤仁志、吉岡克人、太田敬、新村和也、横川文彬、方向、土屋弘行

巨大骨欠損部における自家骨移植後の骨組織形態学的な変化 - イヌ脊椎全摘モデルを用いて -、第28回日本整形外科学会基礎学術集会、2013年10月17日、幕張メッセ（千葉県美浜区）

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 件)  
名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等  
[http://ortho.w3.kanazawa-u.ac.jp/intro/pages/spn\\_group.php](http://ortho.w3.kanazawa-u.ac.jp/intro/pages/spn_group.php)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

出村 諭 (DEMURA, SATORU)  
金沢大学・大学病院・講師  
研究者番号：00348228

### (2) 研究分担者

( )  
研究者番号：

### (3) 連携研究者

井上 啓 (INOUE KEI)  
金沢大学・大学病院・医員  
研究者番号：00622862

林 克洋 (HAYASHI, KATSUHIRO)  
金沢大学・大学病院・助教  
研究者番号：80507054

村上 英樹 (MURAKAMI, HIDEKI)  
金沢大学・医学系・准教授  
研究者番号：70334779

土屋 弘行 (TSUCHIYA, HIROYUKI)  
金沢大学・医学系・教授  
研究者番号：40227434