

令和 2 年 5 月 28 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10979

研究課題名(和文) 生体内誘導骨形成膜とハイブリッド人工骨の融合による新規骨再建法の開発

研究課題名(英文) Experimental study of new bone regeneration technique with combination of induced membrane and tissue-engineered bone

研究代表者

河村 健二 (Kawamura, Kenji)

奈良県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20445076

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ラット大腿骨骨欠損モデルを用いて生体内で誘導した骨形成膜と培養骨髄間葉系幹細胞を搭載した人工骨(ハイブリッド人工骨)を融合させることで骨再建が可能であるかどうかを検証した。ハイブリッド人工骨移植群では、レントゲン検査で移植後4週で旺盛な仮骨形成を認め、8週において骨癒合を80%に認めた。組織学的検査でも、8週において骨欠損部を架橋する骨再生が確認出来た。人工骨単独移植群では、8週において骨癒合は認めず、組織学的にも骨再生は確認出来なかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨欠損の新たな再建法として臨床で注目されているInduced membrane techniqueは、高度な技術を必要としない利点があるが、大量の自家海綿骨移植を必要とするのが欠点である。自家海面骨の代わりに、我々が研究を重ねてきた培養骨髄間葉系幹細胞と人工骨を組み合わせたハイブリッド人工骨を使用することで骨再建が可能かどうかを検証した。さらなる研究の継続が必要であるが、本法がよりドナー障害の少ない骨欠損の再建法と成り得ることが動物実験で示唆された。

研究成果の概要(英文)：We investigated bone regeneration of the rat femoral bone defects by hybrid artificial bone grafts which consists of cultured mesenchymal stem cells and artificial bone in the induced membrane technique. At 4 weeks after implantation, obvious callus formation was observed around the hybrid artificial bone grafts, but there was little callus formation in the artificial bone alone grafts. At 8 weeks after implantation, bridging callus formation between host bones resulted in bone union in the hybrid artificial bone grafts, but there was non-union in the artificial bone alone grafts. This study indicated that hybrid artificial bone grafts which consists of cultured mesenchymal stem cells and artificial bone might be used instead of cancellous bone grafts in the induced membrane technique.

研究分野：整形外科

キーワード：骨再生 人工骨 培養細胞

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

外傷、感染、腫瘍などが原因で生じる四肢の巨大骨欠損は、今なお難治性疾患であり新規治療法の開発が期待されている分野である。血管柄付き骨移植術は巨大骨欠損の治療法の1つとして1975年の報告以降、臨床で使用されてきたが、高度なマイクロサージャリー技術を要すること、採取量に限界があること、採取部の障害が避けられないことなどの多くの問題が存在する(文献)。2000年にフランスのMasquet博士らが報告したInduced membrane technique(通称Masquet法)が新たな巨大骨欠損の治療法として注目されている(文献)。本法は骨欠損部に充填したPoly Methyl Methacrylate (PMMA)の周囲に生体内で誘導される膜様組織の内部に二期的に自家海綿骨を移植して骨再生を誘導する方法である。Masquet法は血管柄付き骨移植のような高度な技術を必要としない利点があるため、近年になって臨床報告例が散見されるようになってきた。しかし、Masquet法は大量の自家海綿骨移植を必要とする欠点があり、自家骨採取部の骨折や慢性疼痛などの重篤な合併症も報告されており、さらなる研究が期待されている。

### 2. 研究の目的

人工骨は骨誘導能と骨伝導能を有するが、それ自体に骨形成能がないために、巨大骨欠損部に人工骨を単独で移植しても骨再生は得られない。近年注目されているMasquet法においても、人工骨単独移植では骨再生は困難であり、自家海面骨移植が不可欠である。研究代表者らは、骨形成能を有する人工骨の作製研究をこれまで行ってきた。その成果として、培養骨髄間葉系幹細胞と人工骨を組み合わせることで、異所性でも骨形成能を有する人工骨(ハイブリッド人工骨)が作製できることを証明してきた(文献)。Masquet法の最大の欠点は大量の自家海面骨移植が必要なことである。自家海綿骨の代わりに研究代表者らがこれまでに研究を重ねてきたハイブリッド人工骨を使用することで、Masquet法の欠点を克服できる可能性がある。本研究の目的は、生体内誘導骨形成膜とハイブリッド人工骨の融合による合併症の少ない新たな巨大骨欠損の治療法を開発することである。

### 3. 研究の方法

(1)生体内誘導骨形成膜とハイブリッド人工骨の融合により新規骨再生治療が可能かどうかを動物実験により検証した(図1)。実験動物としてFischer 344ラットを使用した。当施設での動物実験ガイドラインに従い全実験を通して、愛護的操作、除痛、感染予防を徹底した。全身麻酔下に10週齢Fischer 344ラットの右大腿骨に6mmの骨欠損を作製して1.6mm径の鋼線で髓内固定を行った後に、骨欠損部にはPMMAを充填し創部を閉鎖した(図2)。同時に6週齢の同系ラット大腿骨から骨髄細胞を採取して2週間の初期培養を行うことで骨髄間葉系幹細胞を増殖させた後に人工骨(コラーゲン/ハイドロキシアパタイト複合体)に播種し、骨形成因子を含む培地で2週間の二次培養を行うことでハイブリッド人工骨を作製した。ハイブリッド人工骨が骨形成能を持っていることの検証のために、アルカリフォスファターゼ染色およびアルカリフォスファターゼ活性の測定を行った。

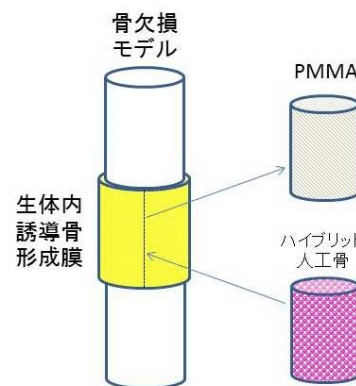


図1 実験モデルの概略図

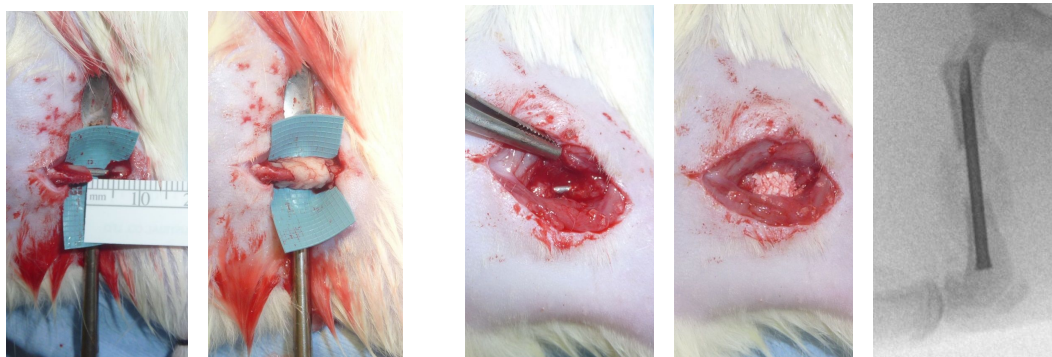


図2 骨欠損作製およびPMMA充填

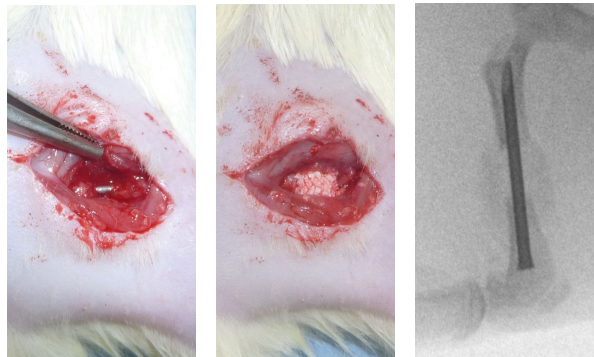


図3 生体内誘導膜内にハイブリッド人工骨移植

(2)Fischer 344ラットの骨欠損モデル作製から4週間後に、全身麻酔下に骨欠損部に充填したPMMA周囲に誘導された生体内骨形成膜を切開してPMMAを除去し、同部にハイブリッド人工骨を移植した(図3)。対照群には培養細胞を搭載していない人工骨単独の移植を行った。移植2週、4週、8週における経時的な骨形成をレントゲン撮影で評価した。ハイブリッド人工骨移

植群および人工骨単独移植群それぞれ 10 匹ずつの実験モデルを作製した。

(3)人工骨単独移植およびハイブリッド人工骨移植から 8 週でラットを安楽死させた後に大腿骨を摘出し、移植部の組織学的評価を行った。

#### 4. 研究成果

(1)6 週齢 Fischer 344 ラット大腿骨から骨髓細胞を採取し、標準培地 (15%FBS 含有 MEM) を用いて初期培養を行った。2 週間後にトリプシンを用いて細胞を培養皿から遊離させ、これを  $5 \times 10^6$  cells/ml の細胞濃度で人工骨 (コラーゲン/ハイドロキシアパタイト複合体) に二次培養を行った。二次培養は標準培地に 10nM デキサメタゾン、82  $\mu$ g/ml アスコルビン酸、10mM グリセロリン酸を添加することで骨芽細胞に分化させた (図 4)。この過程で作製したハイブリッド人工骨の骨形成能は、アルカリフォスファターゼ染色 (図 5) およびアルカリフォスファターゼ活性を測定 (n=5) して評価した。アルカリフォスファターゼは、骨芽細胞の細胞膜に存在し、骨芽細胞の活性に比例して高値となる。培養骨髓間葉系幹細胞を搭載した人工骨は細胞非搭載の人工骨単独に比して有意にアルカリフォスファターゼ活性が高値であった (図 6)。すなわち、培養骨髓間葉系幹細胞を搭載したハイブリッド人工骨は、生体内に移植する前の時点で骨形成能を有することが証明された。

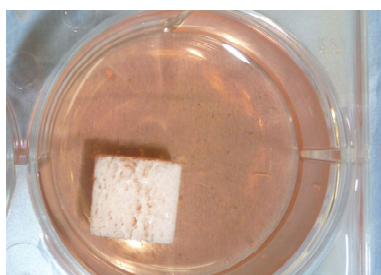


図 4 二次培養中の人工骨



図 5 アルカリフォスファターゼ染色

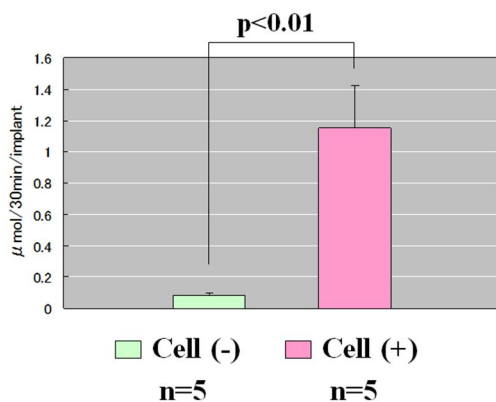


図 6 アルカリフォスファターゼ活性

(2) 移植 2 週、4 週、8 週における骨形成をレントゲンで評価した結果では、人工骨単独移植群では全ての個体で経時的な骨形成は乏しく、移植 8 週においても骨癒合は認めなかった (図 7)。一方、ハイブリッド人工骨移植群では経時的な骨形成の進行を認め、移植 8 週において n=8 の個体 (80%) で骨癒合を確認した (図 8)。すなわち、生体内誘導骨形成膜とハイブリッド人工骨の融合で骨欠損の再生が得られることが確認出来た。

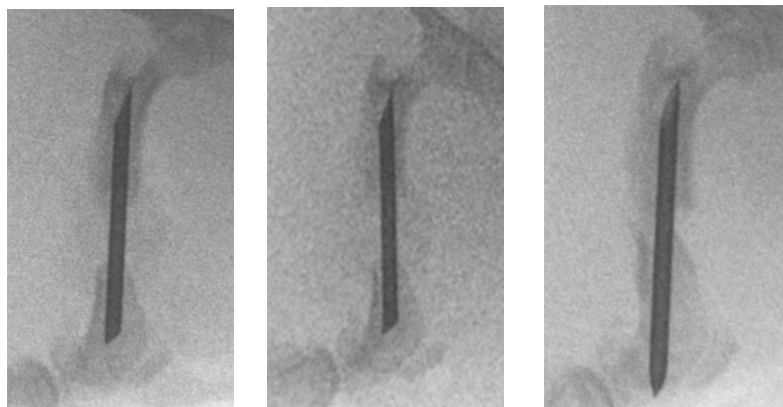


図 7 人工骨単独移植

移植 2 週 (左)  
移植 4 週 (中央)  
移植 8 週 (右)



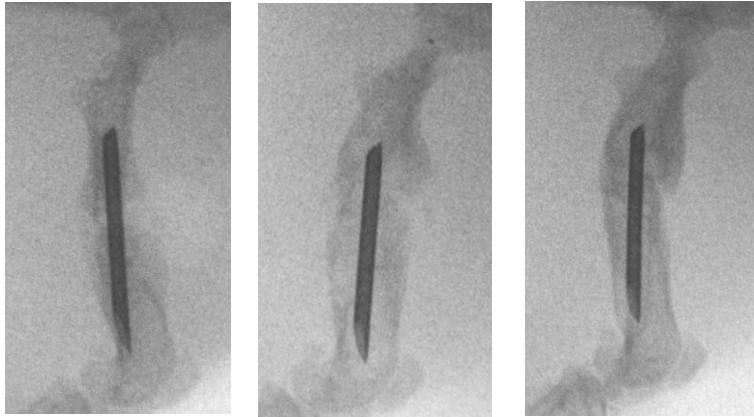


図8 ハイブリッド人工骨移植

移植2週(左)  
移植4週(中央)  
移植8週(右)

(3)人工骨単独移植およびハイブリッド人工骨移植から8週間後の大腿骨の骨欠損部の組織学的検査では、人工骨単独移植ではコラーゲン/ハイドロキシアパタイト複合体のコラーゲン部に線維芽細胞の増殖を認めるが、骨形成は認めなかった(図9)。一方、ハイブリッド人工骨移植では、コラーゲンおよびハイドロキシアパタイト部に旺盛な骨形成を認めていた(図10)。

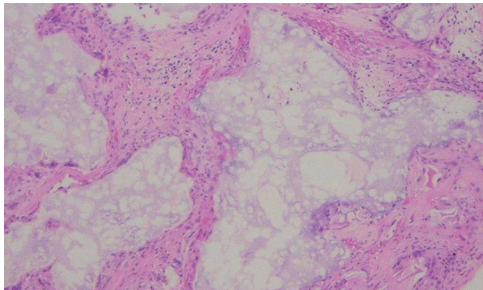


図9 人工骨単独移植(H&E X 40)

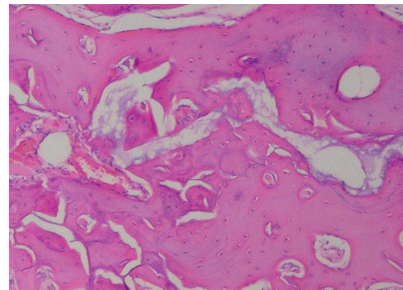


図10 ハイブリッド人工骨移植(H&E X 40)

<引用文献>

Taylor GI, Miller GD, Ham FJ. The free vascularized bone graft. A Clinical extension of microvascular techniques. *Plast Reconstr Surg.* 1975;55(5):533-44.

Masquelet AC, Fitoussi F, Begue T, Muller GP. Reconstruction des os longs par membrane induite et autogreffe spongieuse. *Ann Chir Plast Esthet.* 2000;45(3):346-53.

Kawamura K, Yajima H, Ohgushi H, Tomita Y, Kobata Y, Shigematsu K, Takakura. Experimental study of vascularized tissue-engineered bone graft. *Plast Reconstr Surg.* 2006;117(5):1471-9.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kenji Kawamura
2. 発表標題 Preliminary experimental study of bone regeneration with induced membrane technique combined with cultured mesenchymal stem cells
3. 学会等名 10th Congress of World Society for Reconstructive Microsurgery (国際学会)
4. 発表年 2019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	清水 隆昌  (Shimizu Takamasa)  (70464667)	奈良県立医科大学・医学部・助教    (24601)	
研究分担者	面川 庄平  (Omokawa Shohei)  (70597103)	奈良県立医科大学・医学部・教授    (24601)	