

令和 3 年 6 月 22 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K10981

研究課題名(和文)細胞外マトリックス(ECM)シートを用いた難治性偽関節の低侵襲治療法の開発

研究課題名(英文)Osteogenic extracellular matrix sheet implantation for long bone nonunion

研究代表者

面川 庄平 (omokawa, shohei)

奈良県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：70597103

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)：骨髄由来間葉系幹細胞を骨分化誘導した骨形成細胞(OCS)シートを、液体窒素処理により殺細胞化した細胞外マトリックス(ECM)シートを作成した。

ECMシートの細胞の生存率は0.2%であり、シート内のタンパク質は、BMP-2：99%、bFGF：75%、VEGF：67%であった。ECMシート同系移植群は86%で骨癒合した。平均最大強度は非移植群で $10 \pm 10\text{N}$ 、ECMシート移植群： $45 \pm 24\text{N}$ で、シート移植群が有意に高値を示した。同種移植群の骨癒合率は同系移植群より劣った。力学試験ではECMシート同種移植群の平均最大強度が $58 \pm 53\text{N}$ であり、非移植群と比較して高値であるが有意差を認めなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

整形外科領域における材料工学や手術方法の進歩によって、四肢長管骨骨折の治療は骨癒合と機能回復が可能になった。しかし、約5-10%に遷延治癒や偽関節に至る成績不良例が存在する。また、基礎疾患を抱える高齢者に生じる下肢の骨折は、生命予後に影響するため治療に難渋することも多い。

今回開発したECMシートは、骨形成細胞シートを液体窒素処理することによって作成可能であり、細胞は完全に死滅するが、成長因子を含む細胞外基質は保たれる。本法の臨床応用によって、高齢者の難治性偽関節に対しても、低侵襲治療で偽関節部の骨癒合が期待できる。

研究成果の概要(英文)：We developed osteogenic extracellular matrix (ECM) sheet using experimental rat model. This sheet contains extracellular matrix including BMP, FGF, and VEGF, and there is no cell components, which induce no immune rejection when applied for allogeneic transplantation. Based on the current results, autograft of ECM sheets in the rat nonunion model revealed successful union with sufficient strength. However, allogeneic ECM sheet graft had inconsistent strength during 8 weeks after sheet implantation.

研究分野：整形外科学

キーワード：偽関節 細胞シート 骨形成基質シート 同系移植 同種移植

1. 研究開始当初の背景

整形外科領域における材料工学や手術方法の進歩によって、四肢長管骨骨折の治療は骨癒合と機能回復が可能になった。しかし、約 5-10%に遷延治癒や偽関節に至る成績不良例が存在する。また、基礎疾患を抱える高齢者に生じる下肢の骨折は、生命予後に影響するため治療に難渋することも多い。このような生物学的活性が低下した症例の骨折は難治性であり、早期骨癒合を可能にする新しい治療に関する研究が必要である。現在の臨床では新鮮自家骨移植が行われているが、自家移植は採取部の手術侵襲をとめない、同部の变形や感染などの合併症が存在する。人工骨や同種骨移植は骨癒合に必要な骨形成能を有しておらず、同種骨には抗原性や感染の問題が存在する。

我々は、骨髄から間葉系幹細胞を培養しシート状に採取する骨形成細胞シート移植の有用性を報告してきた。本細胞シートは間葉系間質細胞や骨形成蛋白を含むため、高い骨形成能を有する。ゼラチン様の可塑性があり、担体を必要とせずに移植できる。これまでに骨壊死再生や偽関節癒合を可能にする再生医療のツールとなりうることを検証してきた。しかし、シートの作成に 2 - 4 週間を要するので緊急手術では使用できない。また、高齢者では幹細胞数が減少し骨形成能が低いことが予想され、その臨床応用は困難である。そこで、シート工学を用いた再生医療を広く臨床応用するために、若年者から作成する骨形成因子や型コラーゲンを含有する細胞外マトリックス (ECM) シートを考案した。

ECM シートは、骨形成細胞シートを液体窒素処理することによって作成可能である。液体窒素処理により腫瘍細胞は完全に死滅するが、成長因子を含む細胞外基質は保たれる。本シートはゼラチン様の可塑性が保たれ、冷凍保存が可能なることから必要時に使用できる。さらに、細胞抗原性を除去するため、免疫抑制剤を使用せずに同種移植が可能と考えられる。本法の臨床応用によって、軟部組織損傷をとまなう重度骨折に対する緊急手術にも使用できる可能性がある。また、高齢者の難治性偽関節に対しても、低侵襲治療で偽関節部の骨癒合が期待できる。ECM シートの応用は、全く新しい同種移植が可能なるシート工学技術を利用した低侵襲の再生医療の発展に寄与することが期待される。

2. 研究の目的

本研究の目的は、細胞外マトリックス (ECM) シートを用いて、難治性偽関節の治療が可能か否かを実験的に検証することである。ラット大腿骨の偽関節モデルを高週齢ラットに作製し、同系および異系の低週齢ラットから作成した ECM シートを移植することにより、偽関節の骨癒合が可能か否かを検証する。

3. 研究の方法

骨髄由来間葉系幹細胞 (MSCs) を骨分化誘導し作製した骨形成細胞 (OCS) シートを、液体窒素処理により殺細胞化した細胞外マトリックス (ECM) シートを作成した。

予備実験として、液体窒素処理後の ECM シート構造を組織学的に観察した。さらに、ECM シートを添加した人工骨を同系 Fischer344 ラットの背部に皮下移植し、人工骨内の新生骨形成の程度を組織学的に観察した。

第一段階の検証として ECM シートの細胞の生存率を定量した。さらに OCS および ECM シートについて、基質分析を行った。m-PER とプロテアーゼ阻害剤を用いて細胞融解とタンパク質抽出を行い、ELISA 法により BMP-2, VEGF, bFGF を定量した (n=6/群)。

第二段階の検証として、ラットの偽関節モデルを作成し、同系ラットの ECM シート移植群と非移植群を比較した。

最終年度 (第三段階) の研究として、12 週齢 ACI ラットを使用し、異系移植を行った。同系移植群と同様の手技で偽関節モデルを作成、ECM シート 2 枚を偽関節部に全周性に巻くように移植した。シートを移植しない偽関節群と ECM シート同種移植群の 2 群で単純 X 線、組織像 (V. Goldner 染色)、力学試験を比較した。

4. 研究成果

予備実験の結果として、液体窒素処理後の ECM シートには、型コラーゲンの免疫染色検査で線維構造が破壊されずに染色されることを示した。ラットの背部皮下に移植した ECM シート添加人工骨内の新生骨形成については、ECM シートを移植しない人工骨単体と比較して、V. Goldner 染色で未分化骨や石灰化骨が人工骨内に多く生成していた。

第一段階の検証結果として、ECM シートの細胞の生存率は 0.2% であること、Real time PCR 法では、シート内のオステオカルシンとアルカリフォスファターゼの含有量は同程度であった。液体窒素処理後シート内のタンパク質は、BMP-2 : 99% (1 シートあたりの平均含有量 OCS: 31.2pg, ECM: 30.8pg)、bFGF : 75% (OCS: 288pg, ECM: 217pg)、VEGF : 67% (OCS: 2797pg, ECM: 1869pg) 残存していた。

第二段階の検証結果として、シートを移植しない偽関節群は 0%、ECM シート同系移植群は 86% で骨癒合した。組織学的には偽関節群では 8 週で骨折部の癒合形成と骨皮質の萎縮を認め、ECM シート同系移植群ではシート内の旺盛な石灰化と 8 週で骨性架橋を認めた。力学的評価では平均最大強度は偽関節群で $10 \pm 10N$ 、ECM シート移植群: $45 \pm 24N$ で、ECM シート同系移

植群が偽関節群と比較して有意に高値を示した。

第三段階の検証結果として、最終観察時(移植後 8 週)では偽関節モデルでは 0%、ECM 同種移植群は 57%の骨癒合率を認めた。同種移植群の骨癒合率は同系移植群より劣った。組織像ではシート内に石灰化が同種移植群においても 5 週で確認された。8 週で骨性架橋を認めた。力学試験では ECM シート同種移植群の平均最大強度が $58 \pm 53\text{N}$ であった。同系移植群と比較して平均値は高いもののデータはばらついており、偽関節群と比較して高値であるが有意差を認めなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Onishi T, Shimizu T, Akahane M, Omokawa S, Okuda A, Kira	4. 巻 36
2. 論文標題 OSTEOGENIC EXTRACELLULAR MATRIX SHEET FOR BONE TISSUE REGENERATION	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 European Cells and Materials	6. 最初と最後の頁 69-80
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.22203/eCM.v036a06	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大西正展
2. 発表標題 骨形成細胞由来細胞外マトリックスシートのラット大腿骨偽関節モデルにおける骨形成促進効果
3. 学会等名 中部日本整形災害外科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大西正展
2. 発表標題 殺細胞処理骨形成細胞シートに残存する細胞外マトリックスの評価とラット偽関節モデルへの同種移植における骨癒合促進効果
3. 学会等名 日本手外科学会学術集会
4. 発表年 2018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	田中 康仁 (Tanaka Yasuhito) (30316070)	奈良県立医科大学・医学部・教授 (24601)	

6. 研究組織（つづき）

	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	赤羽 学 (Akahane Manabu) (40326327)	奈良県立医科大学・医学部・准教授 (24601)	
研究分担者	河村 健二 (Kawamura Kenji) (20445076)	奈良県立医科大学・医学部・准教授 (24601)	
研究分担者	清水 隆昌 (Shimizu Takamasa) (70464667)	奈良県立医科大学・医学部・学内講師 (24601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関