

平成21年 4月30日現在

研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19591755
 研究課題名（和文） 骨組織再生を促進させる細胞治療技術の確立—培養骨髄細胞と多血小板血漿の移植—
 研究課題名（英文） The establishment of new cell therapy for bone regeneration by transplantation of culture expanded bone marrow cells and platelet rich plasma
 研究代表者
 鬼頭 浩史 (Kitoh Hiroshi)
 名古屋大学・医学部附属病院・講師
 研究者番号：40291174

研究成果の概要：培養骨髄細胞と多血小板血漿を用いた骨組織再生治療において、in vitro におけるアルカリフォスファターゼ活性が高い骨髄細胞と、血小板濃度が高い多血小板血漿の組み合わせが最も骨再生に適していることを明らかにした。この結果に基づき、培養骨髄細胞と多血小板血漿を用いた仮骨延長術の臨床研究を継続し、大腿骨延長における細胞治療効果を確認した。また、その治療効果は移植細胞数および骨芽細胞への分化度に関連していたが、血小板数との関連は認めなかった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：骨髄間葉系細胞、多血小板血漿、仮骨延長術、骨組織再生、細胞治療

1. 研究開始当初の背景

組織工学的手法を用いた骨・軟骨組織再生のための細胞治療は、次世代の整形外科的治療として期待されている。培養技術を駆使した細胞治療は、自家組織移植におけるドナー不足を解決する可能性があり有用性が高い。我々は仮骨延長術における仮骨形成を促進させ、治療期間を短縮させる目的で、培養骨髄細胞と多血小板血漿の移植を併用してきた。この細胞治療の治療効率をさらに向上させるためには、移植に用いる至適な培養骨髄細胞と培養条件の決定、およびPRPの至適な血小板濃度の決定が必要となる。

2. 研究の目的

(1) 骨組織再生を目指す細胞治療において、体内で最も強力に骨再生を促す骨髄細胞の培養法を確立する。
 (2) 骨髄細胞の増殖および分化を最も効率よく促進させる多血小板血漿の濃度を決定する。
 (3) 新しく確立した骨髄細胞培養法と多血小板血漿の作製法を用いて臨床研究を行い、仮骨延長術における骨再生能を促進させ、臨床成績をさらに向上させる。

3. 研究の方法

(1) 種々の条件下における培養骨髄細胞の骨芽細胞への分化

ラットおよびヒトより骨髄を採取し、付着性細胞を培養液の種類 (control medium および osteogenic medium) を組み合わせることにより様々な分化度を有する培養骨髄細胞を作製する。それぞれの群における増殖能と骨芽細胞への分化度を MTT アッセイ、骨形成マーカーの培養液中の濃度、Western blotting、Northern blotting、定量的 RT-PCR などタンパクレベルおよび mRNA レベルで詳細に評価する。

(2) 培養骨髄細胞のヌードマウスへの移植

(1) で作製したそれぞれの群の培養細胞をコラーゲンゲルに混濁したのち、diffusion chamber に封入しヌードマウスの背部皮下に移植する。Chamber 内に形成された新生骨組織を X 線学的、組織学的に各群で比較し、最も良好な骨形成能を示す細胞群を決定する。この in vivo での結果を (1) における in vitro での分化度と比較することにより、骨組織再生に至適な培養骨髄細胞の骨芽細胞への分化度が決定されることとなる。

(3) PRP の作製および細胞増殖因子、接着因子の測定

ラットおよびヒトより静脈血を採取し、上清となる血漿 (platelet poor plasma) の廃棄量を調整することにより、さまざまな血小板濃度の PRP を精製する。採取した静脈血および精製後の PRP における血小板濃度を測定し、血小板の濃縮率を測定する。次いで、血小板内に含まれる各種細胞増殖因子および細胞接着因子を測定し、それらの濃縮率も検討する。

(4) PRP ゲル内における細胞培養

(3) で作製したさまざまな血小板濃度の PRP に (1) で決定した至適な培養骨髄細胞を懸濁したのちゲル化させ、ゲル内で三次元培養を行い、増殖能および骨芽細胞への分化能を検討する。(3) および (4) により、骨髄細胞が最も効率よく骨芽細胞に分化、増殖し得る PRP の血小板濃度が決定される。

(5) 脚延長モデルへの骨髄細胞および多血小板血漿の移植

(1) および (2) で決定した至適条件下で培養された骨髄細胞、(3) および (4) で決定した至適な血小板濃度の PRP を組み合わせて、既に確立しているラット脚延長モデルへの移植を行う。効果的な移植時期を決定するために手術時、延長開始時、延長後 5 日 (延長中)、延長終了時、延長終了 2 週後にそれぞれ細胞移植を行い、新生骨形成を比較する。

(6) 仮骨延長術における細胞治療の臨床研究

(1) - (4) で決定した至適条件の培養骨髄細胞や PRP を、(5) で決定した最も効果的な時期に移植して仮骨形成の促進および治療期間の短縮を図る。臨床成績は延長量、Healing Index、合併症など指標として評価し、細胞治療を行わなかった症例、およびこれまでの方法で細胞治療を行った症例と比較する。

4. 研究成果

(1) 培養骨髄細胞に関しては、in vitro でのアルカリフォスファターゼ活性が in vivo での骨形成能を最もよく反映していた。したがって、アルカリフォスファターゼ活性の高い培養細胞を移植に用いることが効果的である。

(2) 多血小板血漿ゲル内の培養では、in vitro での骨髄細胞の増殖は血小板濃度依存性に促進されたが、骨芽細胞への分化能は血小板濃度には依存しなかった。一方、in vivo での骨形成は血小板濃度依存性に促進された。つまり、細胞移植には高濃度の血小板を有する多血小板血漿が有効である。

(3) 脚長不等、低身長 of the 症例に対し、骨髄細胞と多血小板血漿の細胞治療を併用した仮骨延長術を施行し、細胞治療により仮骨形成が促進し、治療期間が短縮することを確認した。また、細胞治療は下腿骨よりも軟部組織に富む大腿骨においてより効果的であることが明らかとなった。さらに、大腿骨延長における治療効果は、移植する骨髄細胞の数とアルカリフォスファターゼ活性に依存することを示した。

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 16 件)

- 1 Kitoh H, Kawasumi M, Kaneko H, Ishiguro N. Differential effects of culture expanded bone marrow cells transplantation on the regeneration of bone between the femoral and the tibial lengthenings. J Pediatr Orthop (accepted) 2009 査読有
- 2 Kitoh H, Kawasumi M, Ishiguro N. Predictive factors for unsuccessful treatment of developmental dysplasia of the hip by the Pavlik harness. J Pediatr Orthop (accepted) 2009 査読有
- 3 Miyazaki O, Nishimura G, Okamoto R, Masaki H, Kumagai M, Shioda Y, Nozawa

- K, Kitoh H. Induction of systemic bone changes by preconditioning total body irradiation for bone marrow transplantation. *Pediatr Radiol* 39:23-29, 2009 査読有
- 4 Siwicka KA, Kitoh H., Nishiyama M, Ishiguro N. A case of mesomelic dysplasia Kantaputra type -new findings and a new diagnostic approach. *J Pediatr Orthop (B)* 17:271-276, 2008 査読有
- 5 Kawasumi M., Kitoh H., Siwicka KA, Ishiguro N. The effect of the platelet concentration in platelet-rich plasma gel on the regeneration of bone. *J Bone Joint Surg* 90-B:966-972, 2008 査読有
- 6 Kitoh H., Kitakoji T, Kawasumi M., Ishiguro N. A histological and ultrastructural study of the iliac crest apophysis in Legg-Calve-Perthes disease. *J Pediatr Orthop* 28:435-439, 2008 査読有
- 7 Takamine Y, Kitoh H., Ito H, Yazaki S, Oki T. Patellar dislocation in achondroplasia. *J Pediatr Orthop (B)* 17:47-49, 2008 査読有
- 8 Nii E, Urawa M, Nishimura T, Kitoh H., Ikegawa S, Shimizu S, Taneda H, Uchida A, Niikawa N. Acrodysostosis with unusual iridal color changing with age. *Am J Med Genet* 144B:824-825, 2007 査読有
- 9 Kitoh H., Kitakoji T, Katoh M, Ishiguro N. Sagittal spinal alignment in patients with Legg-Calve-Perthes disease. *Pediatr Int* 49:612-617, 2007 査読有
- 10 Kitoh H., Kitakoji T, Tsuchiya H, Katoh M, Ishiguro N. Distraction osteogenesis of the lower extremity in patients with achondroplasia/hypochondroplasia treated with transplantation of culture expanded bone marrow cells and platelet rich plasma. *J Pediatr Orthop* 27:629-634, 2007 査読有
- 11 Ishikawa H, Kitoh H., Sugiura F, Ishiguro N. The effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2 on osteogenic potential of rat mesenchymal stem cells after several passages. *Acta Orthop* 78:285-292, 2007 査読有
- 12 Miyamoto Y, Matsuda T, Kitoh H., Haga N, Ohashi H, Nishimura G, Ikegawa S. A recurrent mutation in type II collagen gene causes Legg-Calve-Perthes disease in a Japanese family. *Hum Genet* 121:625-629, 2007 査読有
- 13 Nishimura A, Sakai H, Ikegawa S, Kitoh H., Haga N, Ishikiriyama S, Nagai T, Takeda F, Ohata T, Tanaka F, Kamasaki H, Saitsu H, Mizuguchi T, Matsumoto N. FBN2, FBN1, TGFBR1, and TGFBR2 analysis in congenital contractural arachnodactyly. *Am J Med Genet (A)* 143: 694-698, 2007 査読有
- 14 Kitoh H., Kitakoji T, Tsuchiya H, Katoh M, Ishiguro N. Transplantation of culture expanded bone marrow cells and platelet rich plasma in distraction osteogenesis of the long bones. *Bone* 40:522-528, 2007 査読有
- 15 鬼頭浩史 石黒直樹. 軟骨細胞分化の分子機構 *Clin Calcium* 17(4):493-498, 2007 査読有
- 16 鬼頭浩史 石黒直樹. 骨の再生(長管骨) *The Bone* 21(4):441-445, 2007 査読有
- [学会発表] (計 18 件)
- 1 川澄本明 鬼頭浩史 石黒直樹 近藤峰生 西村玄. 錐体ジストロフィーを合併した脊椎骨幹端異形成症の 1 例. 第 20 回日本整形外科学会骨系統疾患研究会 2008.12.12 (東京)
- 2 鬼頭浩史 川澄本明 石黒直樹. 先天性股関節脱臼に対するリーメンビュージェル法の治療成績 整復後の臼蓋形成に関連する因子の検討. 第 19 回日本小児整形外科学会 2008.12.11 (東京)
- 3 馬淵晃好 鈴木伸治 井上真郷 鬼頭浩史 川澄本明 永谷元基 林尊弘 松本芳樹. 内旋歩行に対する固有受容器足底板の効果について 第 11 回東海足と靴の研究会 2008.10.25 (名古屋)
- 4 鬼頭浩史 川澄本明 石黒直樹. ペルテス病における腸骨稜軟骨の組織形態学的検討. 第 23 回日本整形外科基礎学会 2008.10.23-24 (京都)
- 5 川澄本明 鬼頭浩史 加藤光康 石黒直樹. 大腿骨頭すべり症に対する創外固定器を使用した矯正骨切り術の 3 例. 第 47 回日本小児股関節研究会 2008.6.27-28 (名古屋)
- 6 鬼頭浩史 川澄本明 石黒直樹. 先天性股関節脱臼に対するリーメンビュージェル法の治療成績に関連する因子の検討. 第 47 回日本小児股関節研究会 2008.6.27-28 (名古屋)

- 7 川澄本明 鬼頭浩史 石黒直樹 北小路隆彦 加藤光康. 先天性内反足に Ponseti 法を施行した短期治療成績. 第 81 回日本整形外科学会 2008. 5. 22-25 (札幌)
- 8 鬼頭浩史 川澄本明 石黒直樹. 培養骨髄細胞と多血小板血漿の移植を併用した下肢骨延長術 臨床成績に関連する因子の検討 第 81 回日本整形外科学会 2008. 5. 22-25 (札幌)
- 9 鬼頭浩史 川澄本明 石黒直樹. 培養骨髄細胞と多血小板血漿の移植を併用した下肢骨延長術の臨床成績. 第 7 回日本再生医療学会 2008. 3. 13-14 (名古屋)
- 10 Motoaki Kawasumi, Hiroshi Kitoh, Karolina A Siwicka, Naoki Ishiguro. The effect of platelet concentration in platelet-rich plasma gel on bone regeneration. 53rd annual meeting of Orthopaedic Research Society 2008. 3. 2-5 (San Francisco)
- 11 Hiroshi Kitoh, Motoaki Kawasumi, Naoki Ishiguro. Distraction osteogenesis of the lower limbs with transplantation of culture expanded bone marrow cells and platelet rich plasma. 53rd annual meeting of Orthopaedic Research Society 2008. 3. 2-5 (San Francisco)
- 12 鬼頭浩史 川澄本明, 石黒直樹. 先天性股関節脱臼に対するリーメンビュール法の治療成績. 第 23 回東海小児整形外科懇話会 2008. 2. 9 (名古屋)
- 13 川澄本明 鬼頭浩史 吉橋裕治 石黒直樹. Melnick-Needles 骨異形成症の 1 例. 第 23 回東海小児整形外科懇話会 2008. 2. 9 (名古屋)
- 14 Karolina Anna Siwicka 鬼頭浩史 川澄本明 西山正紀 石黒直樹. Mesomelic dysplasia Kantaputra type の 1 例. 第 23 回東海小児整形外科懇話会 2008. 2. 9 (名古屋)
- 15 鬼頭浩史 北小路隆彦 加藤光康 川澄本明, 石黒直樹. ペルテス病患児における腸骨稜軟骨の組織形態学的検討 第 18 回日本小児整形外科学会 2007. 11. 2-3 (神戸)
- 16 芳賀信彦 川端秀彦 鬼頭浩史 中島康晴. 進行性骨化性線維異形成症 (FOP) に関する臨床研究プロジェクト 第 18 回日本小児整形外科学会 2007. 11. 2-3 (神戸)
- 17 鬼頭浩史 西田佳弘 川澄本明 石黒直樹. 進行性骨化性線維異形成症における足部変形について 第 11 回東海足と靴の研究会 2007. 10. 20 (名古屋)
- 18 Hiroshi Kitoh, Naoki Ishiguro. Transplantation of culture expanded bone marrow cells and platelet rich plasma during distraction osteogenesis. clinical and experimental study 15th triennial congress of Asia Pacific Orthopaedic Association 2007. 9. 9-13 (Seoul)
- [図書] (計 7 件)
- 1 鬼頭浩史. Stickler 症候群 最新整形外科体系 骨系統疾患、代謝性骨疾患 (中山書店) 63-65, 2007
- 2 北小路隆彦 鬼頭浩史. 先端異骨症 最新整形外科体系 骨系統疾患、代謝性骨疾患 (中山書店) 117-118, 2007
- 3 鬼頭浩史. 遅発性脊椎骨端異形成症 最新整形外科体系 骨系統疾患、代謝性骨疾患 (中山書店) 78-81, 2007
- 4 鬼頭浩史. 偽性軟骨無形成症 最新整形外科体系 骨系統疾患、代謝性骨疾患 (中山書店) 120-123, 2007
- 5 鬼頭浩史. 軟骨無形成症 骨系統疾患マニュアル 2 版 (南江堂) 22-23, 2007
- 6 鬼頭浩史. 軟骨低形成症 骨系統疾患マニュアル 2 版 (南江堂) 24-25, 2007
- 7 鬼頭浩史. 屈曲肢異形成症 骨系統疾患マニュアル 2 版 (南江堂) 82-83, 2007
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
鬼頭 浩史 (Kitoh Hiroshi)
名古屋大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：40291174
- (2) 研究分担者
川澄 本明 (Kawasumi Motoaki)
名古屋大学・医学部附属病院・医員
研究者番号：00467309