

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年3月31日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21591915

研究課題名（和文）培養骨髄細胞移植による骨再生技術の確立—ストレス刺激培養法の有用性の検討—

研究課題名（英文）Osteogenic differentiation of culture expanded bone marrow cells under tensile and compressive strains

研究代表者

鬼頭 浩史 (Hiroshi Kitoh)

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（和文）：dynamic stretch（DS群）およびdynamic compression（DC群）において、コントロールと比較して培養上清中の骨形成マーカーは有意に増加していた。HIF 1 $\alpha$ のmRNA発現はDC群で上昇しており、核内のHIF 1 $\alpha$ の蛋白量はDS群、DC群、SS群で上昇していた。DS群、DC群で培養した骨髄細胞を高濃度の多血小板血漿（platelet rich plasma：PRP）とともにラット骨延長モデルの延長部位に移植したところ、DS群においてコントロール群に比較して新生骨形成が良好な傾向があった。

研究成果の概要（英文）：Alkaline phosphatase activity within the culture media were significantly elevated in the dynamic stretch (DS) group and the dynamic compression (DC) group compared to the control group. The DC group showed significant elevated levels of mRNA expression of HIF 1 $\alpha$ . Western blotting analysis demonstrated increased amount of HIF 1 $\alpha$  protein within the nucleus in the DC, DS, and static stretch (SS) groups. Favorable new bone formation was observed when the bone marrow cells cultured under the dynamic stretch condition were implanted with PRP into the distraction gap of rat bone lengthening models.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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

キーワード：メカニカルストレス、骨髄細胞培養、骨組織再生、骨延長モデル、多血小板血漿、HIF 1 $\alpha$ 、三次元培養

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 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。われわれは骨延長術において、培養骨髄細胞と多血小板血漿の移植による細胞治療を行い良好な臨床成

績を報告してきた。また臨床研究と平行して、骨髄細胞の培養条件や多血小板血漿の精製法に関する基礎研究を継続してきた。その結果、この細胞治療の治療効率をさらに向上させるためには、骨形成能を有する大量の培養骨髄細胞を獲得し、かつ臨床応用可能な培養法

を確立することが重要であるという結論に至った。

(2) 低酸素下で活性化する hypoxia inducible factor 1 $\alpha$  (HIF 1 $\alpha$ ) が血管新生や骨新生に重要な役割を果たすことが報告されており、また細胞へのメカニカルストレスにより HIF 1 $\alpha$  の発現が上昇することが知られている。

## 2. 研究の目的

(1) 本研究は、骨髄細胞と多血小板血漿を用いた細胞治療において、より効率のよい臨床応用可能な培養方法を確立することを目的とする。具体的には、圧迫・伸張刺激や低酸素状態などのストレス条件下で培養した骨髄細胞の増殖能、および骨芽細胞への分化能を評価し、骨再生を目指した細胞治療における新しい培養技術を開発するとともに、HIF 1 $\alpha$  を介したストレスによる骨新生メカニズムを解明する。

## 3. 研究の方法

(1) ラットおよびヒト骨髄間葉系細胞を圧迫・伸張刺激 (static compression, dynamic compression, static elongation, dynamic elongation) および低酸素条件 (2% O<sub>2</sub>) にて一定期間三次元培養し、BrdU アッセイなどにより細胞増殖能を、BAP などの骨形成マーカーを指標として骨芽細胞への分化能を評価する。次いで、これら細胞を動物モデル (ラット骨延長モデル) に移植して、in vivo における骨形成能を X 線学的、組織学的に評価する。これにより、骨髄細胞の至適培養条件が決定され、移植に必要な充分な量と分化能を有する培養骨髄細胞を獲得する手法が確立される。

(2) さまざまな圧迫・伸張刺激、および低酸素刺激のもとで培養した骨髄細胞における HIF 1 $\alpha$  およびその target genes (VEGF, NO, iNOS, HO-1 など) の発現を mRNA レベル

(Northern blotting、定量的 RT-PCR)、タンパクレベル (Western blotting) で評価し、骨形成マーカーの発現との関連を検討する。次に、細胞移植を行ったラット骨延長モデルにおける経時的な HIF 1 $\alpha$ 、およびその target genes の発現の推移を in situ hybridization と免疫染色にて評価し、in vivo における HIF 1 $\alpha$  の骨新生促進効果を検討する。この結果、ストレス刺激下で培養した骨髄細胞による細胞治療において、HIF 1 $\alpha$  を介した骨新生促進メカニズムが解明される。

## 4. 研究成果

(1) ラットの骨髄細胞をカラーゲルに包

埋して、メカニカルストレス下に三次元培養した。メカニカルストレスは 1 Hz の周期的伸展 (dynamic stretch : DS) と周期的圧縮 (dynamic compression : DC)、一定の静的伸展 (static stretch : SS) と静的圧縮 (static compression : SC) の 4 種類に分類した。培養上清中の ALP 活性は DS 群と DC 群でコントロールと比較して有意に増加していた。HIF 1 $\alpha$  の mRNA 発現は DC 群で上昇しており、核内の HIF 1 $\alpha$  の蛋白量は DS 群、DC 群、SS 群で上昇していた。したがって、DS 群および DC 群での骨髄細胞の培養が骨再生治療に有用であると考えた。

(2) DS 群、DC 群で培養した骨髄細胞を高濃度の多血小板血漿 (platelet rich plasma : PRP) とともにラット骨延長モデルの延長部位に移植した。骨延長モデルは術後 1 週間の待機期間ののち 1 日 0.75mm ずつ 10 日間延長するものとし、手術時、延長開始時、延長後 5 日、延長終了時に細胞を移植した。従来の方法で培養した細胞 (骨誘導培地で 3 週間単層培養) をコントロールとして、新生骨形成をレントゲンにて評価した。統計学的な有意差はなかったが、DS 群においてコントロール群と比較して新生骨形成が良好な傾向があった。また移植時期としては、延長終了時に移植したものよりは延長期間中に移植したもので、骨形成が促進される傾向にあった。延長終了後 2、4、6 週で延長部の組織を取り出し、組織学的に検討した。2 週後では DS 群、DC 群においてコントロールと比較して von Kossa 染色による骨新生が良好で、アルシアンブルー染色による軟骨形成も促進されていた。4、6 週ではいずれの群も、コントロールと明らかな差は認めなかった。

## 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 18 件)

- 1 Kaneko H, Kitoh H, Wasa J, Nishida Y, Ishiguro N. Chondroblastoma of the femoral neck as a cause of hip synovitis. J Pediatr Orthop (B) 21(2):179-182, 2012 査読有
- 2 Siwicka KA, Kitoh H, Kawasumi M, Ishiguro N. Spatial and temporal distribution of growth factors receptors in the callus: Implications for improvement of distraction osteogenesis. Nagoya J Med Sci 73(3-4):117-127, 2011 査読有
- 3 Le Goff C, Mahaut C, Wang LW, Allali S, Abhyankar A, Jensen S, Zilberberg L, Collod-Beroud G, Bonnet D, Alanay Y, Brady AF, Cordier MP, Devriendt K, Genevieve D, Kiper POS, Kitoh H, Krakow D, Lynch SA,

- Le Merrer M, Mégarbane A, Mortier G, Odent S, Polak M, Rohrbach M, Sillence D, Stolte-Dijkstra I, Superti-Furga A, Rimoin DL, Topouchian V, Unger S, Zabel B, Bole-Feysot C, Nischke P, Handford P, Casanova JL, Boileau C, Apte SA, Munnich A, Cormier-Daire V. Mutations in the TGFβ binding protein-like domain 5 of FBN1 are responsible for acromioclavicular and spondyloepiphyseal dysplasias. *Am J Hum Genet* 89(1):7-14, 2011 査読有
- 4 Kaneko H, Kitoh H, Matsuura T, Masuda A, Ito M, Mottes M, Rauch F, Ishiguro N, Ohno K. Hyperuricemia cosegregating with osteogenesis imperfecta is associated with a mutation in *GPATCH8*. *Hum Genet* 130(5):671-683, 2011 査読有
- 5 Mishima K, Kitoh H, Katagiri T, Kaneko H, Ishiguro N. Early clinical and radiographic characteristics in fibrodysplasia ossificans progressiva: A report of two cases. *J Bone Joint Surg* 93-A:e52:1-5, 2011 査読有
- 6 Imagama S, Wakao N, Kitoh H, Matsuyama Y, Ishiguro N. Factors related to surgical outcome after posterior decompression and fusion for craniocervical junction lesions associated with osteogenesis imperfecta. *Eur Spine J Suppl* 2:S320-325, 2011 査読有
- 7 Ohte S, Shin M, Sasanuma H, Yoneyama K, Akita M, Ikebuchi K, Jimi E, Maruki Y, Matsuoka M, Miyazono K, Nanba A, Tomoda H, Okazaki Y, Ohtake A, Oda H, Owan I, Yoda T, Furuya H, Kamizono J, Kitoh H, Nakashima Y, Susami T, Haga N, Komori T, Katagiri T. A novel mutation of *ALK2*, L196P, found in the most benign case of fibrodysplasia ossificans progressiva activates BMP-specific intracellular signaling equivalent to a typical mutation, R206H. *Biochem Biophys Res Commun* 407(1):213-8, 2011 査読有
- 8 Kitoh H, Kaneko H, Kondo M, Yamamoto T, Ishiguro N, Nishimura G. Spondylometaphyseal dysplasia with cone-rod dystrophy. *Am J Med Genet* 155A:845-849, 2011 査読有
- 9 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 東海足と靴の研究会誌 4:13-14, 2011 査読有
- 10 鬼頭浩史、北小路隆彦、金子浩史、馬淵晃好、三島健一、石黒直樹 Ponseti法による先天性内反足の治療成績—全身性疾患や合併奇形の有無による成績の比較— 日小整誌 20(2):353-356, 2011 査読有
- 11 Nakashima Y, Haga N, Kitoh H, Kamizono J, Tozawa K, Katagiri T, Susami T, Fukushi J, Iwamoto Y. Deformity of the great toe in fibrodysplasia ossificans progressiva. *J Orthop Sci* 15(6):804-809, 2010 査読有
- 12 Dai J, Kim OH, Cho TJ, Schmidt-Rimpler M, Tonoki H, Takikawa K, Haga N, Miyoshi K, Kitoh H, Yoo WJ, Choi IH, Song HR, Jin DK, Kim HT, Kamasaki H, Bianchi P, Grigelioniene G, Nampoothiri S, Minagawa M, Miyagawa S, Fukao T, Marcelis C, Jansweijer MCE, Hennekam RCM, Bedeschi F, Mustonen A, Jiang Q, Ohashi H, Furuichi T, Unger S, Zabel B, Lausch E, Superti-Furga A, Nishimura N, Ikegawa S. Novel and recurrent *TRPV4* mutations and their association with distinct phenotypes within the *TRPV4* dysplasia family. *J Med Genet* 47(10):704-709, 2010 査読有
- 13 Nishimura G, Dai J, Lausch E, Unger S, Megarbané A, Kitoh H, OH Kim, Cho TJ, Bedeschi F, Benedicenti F, Mendoza-Londono R, Silengo M, Schmidt-Rimpler M, Spranger J, Zabel B, Ikegawa S, Superti-Furga A. Spondylo-epiphyseal dysplasia, Maroteaux type (pseudo-Morquio syndrome type 2) and parastremmatic dysplasia are caused by *TRPV4* mutations. *Am J Med Genet* 152A(6):1443-1449 2010 査読有
- 14 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
- 15 Kitoh H, Kawasumi M, Ishiguro N. Predictive factors for unsuccessful treatment of developmental dysplasia of the hip by the Pavlik harness. *J Pediatr Orthop* 29(6):552-557, 2009 査読有
- 16 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* 29(6):643-649, 2009 査読有
- 17 Kitoh H, Kaneko H, Ishiguro N. Radiographic analysis of movements of the acetabulum and the femoral head after Salter innominate osteotomy. *J Pediatr Orthop* 29(8):879-884, 2009 査読有
- 18 鬼頭浩史 小児疾患診療のための病態生理 2 筋・骨・運動器疾患 軟骨無形成症 小児内科 41(増刊号):989-992, 2009 査読有

[学会発表] (計 14 件)

- 1 鬼頭浩史、金子浩史、馬淵晃好、三島健一、

- 松下雅樹、石黒直樹、北小路隆彦、服部義。重度大腿骨頭すべり症に対する創外固定法による骨切り術。第 22 回日本小児整形外科学会 2011.12.8-9 (京都)
- 2 鬼頭浩史、金子浩史、北小路隆彦、服部義、石黒直樹。ペルテス病の治療成績に関連する因子の検討。第 50 回小児股関節研究会 2011.6.24-25 (諏訪)
- 3 鬼頭浩史、三島健一、金子浩史、石黒直樹。進行性骨化性線維異形成症における早期(骨化発症前)の臨床的、X 線学的特徴。第 84 回日本整形外科学会。2011.5-12-15 (横浜)
- 4 鬼頭浩史、金子浩史、馬淵晃好、三島健一、石黒直樹。軟骨無(低)形成症の身体的特徴。第 26 回東海小児整形外科懇話会 2011.2.19 (名古屋)
- 5 Hiroshi Kaneko, Hiroshi Kitoh, Ryuichiro Yamamoto, Naoki Ishiguro, Kinji Ohno. Drug screening for transcriptional activation of SOX9. 57th annual meeting of Orthopaedic Research Society 2011.1.13-16 (Long Beach)
- 6 鬼頭浩史、金子浩史、北小路隆彦、石黒直樹。Ponseti 法による先天性内反足の治療成績—全身性疾患や合併奇形の有無による成績の比較—。第 21 回日本小児整形外科学会 2010.11.26-27 (徳島)
- 7 鬼頭浩史、金子浩史、石黒直樹。骨系統疾患に対する培養骨髄細胞移植を併用した骨延長術。第 83 回日本整形外科学会 2010.5.26-30 (東京)
- 8 Hiroshi Kaneko, Hiroshi Kitoh, Toru Matsuura, Akio Masuda, Ito Mikako, Monica Mottes, Frank Rauch, Naoki Ishiguro, Kinji Ohno. Phenotypic variability of osteogenesis imperfecta is not accounted for by disruption of splicing *cis*-elements. 56th annual meeting of Orthopaedic Research Society 2010.3.6-9 (New Orleans)
- 9 Hiroshi Kitoh, Hiroshi Kaneko, Naoki Ishiguro. Limb lengthening and correction of deformities treated with culture expanded bone marrow cells and platelet rich plasma in skeletal dysplasias. 56th annual meeting of Orthopaedic Research Society 2010.3.6-9 (New Orleans)
- 10 鬼頭浩史、山本隆一郎、片桐岳信、大野欽司、石黒直樹。進行性骨化性線維異形成症における骨化予防薬の検討。第 21 回日本整形外科学会骨系統疾患研究会 2009.12.5 (松山)
- 11 鬼頭浩史、金子浩史、石黒直樹。ソルター骨盤骨切り術における臼蓋と大腿骨頭中心の移動について。第 20 回日本小児整形外

科学会 2009.12.4-5 (松山)

- 12 鬼頭浩史、川澄本明、石黒直樹。培養骨髄細胞移植による仮骨形成促進効果の移植部位による相違-大腿骨延長と脛骨延長との比較-。第 82 回日本整形外科学会 2009.5.22-25 (福岡)

[図書] (計 3 件)

- 1 鬼頭浩史 骨系統疾患児の治療と支援—整形外科から— 骨系統疾患 出生前診断と周産期管理(メディカルビュー) 225-232, 2011
- 2 鬼頭浩史 弯曲骨異形成症 今日の整形外科治療指針 6 版(医学書院) 257-258, 2010
- 3 鬼頭浩史 遠位中間肢異形成症 今日の整形外科治療指針 6 版(医学書院) 256, 2010

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 骨形成促進剤及びその用途

発明者: 大野欽司、石黒直樹、鬼頭浩史、三島健一

権利者: 名古屋大学

種類: 特願

番号: 2011-185306

出願年月日: 2011.8.26

国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

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

金子浩史 (Kaneko Hiroshi)

名古屋大学・大学院医学系研究科・寄附講座助教

座助教

研究者番号: 60566975

(3) 連携研究者

なし