

令和 6 年 6 月 24 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09285

研究課題名（和文）超多孔質リン酸Caセメント Spacer 再移植による新規 Masquelet 法の開発

研究課題名（英文）Novel finding of Masquelet technique in rat femoral critical sized bone model

研究代表者

奥田 貴俊（Okuda, Takatoshi）

順天堂大学・医学部・客員准教授

研究者番号：00348955

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000 円

研究成果の概要（和文）：巨大骨欠損治療に画期的進歩をもたらした Masquelet 法は、一期手術で欠損部位に Spacer を挿入しその周囲に線維膜を誘導させる。数週後に二期手術を行い、Spacer の抜去と自家骨移植を行う。本研究は一期手術で挿入する Spacer として独自に開発した超多孔質リン酸カルシウムセメントを挿入、周囲をテフロン膜で被覆する。二期手術で血管と細胞が侵入した多孔質 Spacer を抜去、粉碎し、自家骨と混合して再移植する。ラットの骨欠損モデルで本法を行ったところ、顕著な治癒促進効果が得られた。留置期間中に Spacer を機能的人工骨化し再移植することで、治癒の促進と必要な自家骨の移植量を少量化できることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Masquelet 法の二期手術において、骨欠損部位に充填する自家骨が不足する場合には、人工骨を添加するが、人工骨の添加が予後に及ぼす影響や最適な人工骨の種類に関する情報は皆無に近い。本研究では、独自に開発した超多孔質リン酸カルシウムセメントを Spacer としてラットの巨大骨欠損モデルに挿入、4週間の留置期間中に骨修復に不可欠な血管と間葉系幹細胞を多孔質材料中に侵入させる。それを抜去、粉碎、二期手術で自家骨と混合し再移植することで、治癒促進と二期手術に必要な自家骨量の少量化が可能となる。研究結果は良好で、本研究成果は実臨床への応用が十分可能であり、骨折治療の飛躍的進歩につながることを期待される。

研究成果の概要（英文）：Surgical treatment of large bone defect has been improved since application of induced membrane method (Masquelet method). In this two-step method, bone cement is inserted into the bone defect as a spacer and fibrous capsulation is induced around the wound. Several weeks after the primary treatment, the bone cement is removed, and implantation of bone autografts is performed. In this study, we developed a novel porous calcium phosphate cement and inserted into bone defects created in rats. The grafted portion was covered with polytetrafluoroethylene membrane. Four weeks after, the porous spacer including capillaries and mesenchymal stem cells in it was removed, comminuted and re-implanted with bone autografts. Restoration of the bone defects of this method was fine and acceleration of the healing is found. These results strongly suggest that this novel method is clinically applicable and improve the healing of large bone defects.

研究分野：整形外科

キーワード：Masquelet法 induced membrane 人工骨 巨大骨欠損 多核巨細胞 再移植

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Masquelet により提唱された Masquelet 法は、一期手術で骨欠損部位にスパーサーを挿入して周囲を線維膜で被包させ、二期手術で線維膜形成後にスパーサーを抜去して自家骨を移植するという全く新しい発想による二段階手術法である。その有用性は臨床的に明らかになり、我が国においても巨大骨欠損に限らず、感染など条件の悪い骨欠損に対する治療法として広く用いられているが、なぜ治療成績がよいかの理論的な裏付け研究は乏しく、不明な点が多い。この確立されつつある手術において現在抱える最も大きな問題は、移植する自家骨の量および質である。骨質が悪い高齢者の骨欠損、採骨を繰り返した骨髄炎や若年者の骨系統疾患等では、良質な自家骨を十分量採取できず、治療成績を下げる原因となる。自家骨が十分に採取できない場合は、人工骨と混合して移植することで治療を成功させる努力がなされている。一般に自家骨と人工骨の比率は、原則として自家骨が 50%以上必要とされているが、比率の根拠は経験的であり、どこまで自家骨の比率を下げられるか明らかになっていない。

Masquelet 法においては、一期手術で挿入したセメント周囲に誘導される線維膜が成功の鍵となる。しかし、線維膜の細胞生物学的な意義については、各種増殖因子の供給源となっているとする多くの研究報告がある一方、単なる隔壁でも同様の成績を得ることができるとする報告もあり、意見の一致を見ない。このような状況で、我々はラットの Masquelet 法骨欠損治療モデルを確立し、人工骨移植のみでは骨修復が望めないこと、自家骨を人工骨に対して 50%の比率で移植したものでは骨形成が起こることを確認した。また、我々が開発した異物反応を起こしにくいセラミックを移植した場合と一般的なセラミックを移植した場合の骨修復に有意な差は見られないものの、スパーサーが挿入されていた骨内に移植したセラミックに対しては全く異物反応が起こらず(図1)従来法で移植したセラミックには異物反応が起こりやすく(図2 矢頭)骨外の軟組織中に移植したセラミックに対してはすべて異物反応となることを見出した。

2. 研究の目的

Masquelet 法が優れた治療成績を挙げることができる細胞生物学的な根拠は何なのか、また、人工骨の添加が予後にどのような影響を及ぼすのか、さらに、Masquelet 法に最適な人工骨はどのようなものであろうか。これを明らかにすることが本研究課題の核心をなす目的である。

我々はこれまでに、巨大骨欠損周囲に生じる線維組織の違いが異物反応を起こさず起こさないかを決定づけること、Masquelet法によって形成された線維膜の内側に生じる線維組織は異物反応を起こさず、線維膜の外側に生じる線維組織は異物反応を起こすことを明らかにした(鈴木他、骨折、2021)。この視点からMasquelet法の一期手術で、テフロン膜で隔離した骨欠損部位に独自に開発した超多孔質リン酸カルシウムセメントスパーサーを挿入し、異物反応を起こさない骨髄線維組織および血管内皮細胞を豊富に含むセラミックを形成させ、これを二期手術時に自家骨と混合して再移植する新たな治療法の開発を試みることを目的とした。

3. 研究の方法

イソフルランを用いて生後10週齢F344ラットに全身麻酔を施行後、左側大腿骨骨幹部を5mmの幅で切断し、critical sized bone defect を作成する。骨欠損部は(Stryker社: Variax Hand 1.7mm straight plate)を用いて、近位はスクリュー長6mm、幅1.7mmのロッキングスクリュー2本、遠位は3本で固定してモデルを作成した。

(1) 異物反応を起こさない線維組織と異物反応を起こす線維組織の違いを細胞生物学的に明ら

かにする。

我々が確立した F344 ラット骨欠損モデルを用いて Masquelet 法の二期手術でセラミック顆粒のみを欠損部位に移植したもの(M群)と、従来法の手術でセラミック顆粒のみを移植したもの(C群)さらに骨外筋組織内にスペーサーを挿入後に二期手術でセラミック顆粒を移植したものと、ラット骨外筋組織内に従来法でセラミック顆粒のみを移植したものの、計4群について比較した。移植4週後および8週後に移植部位を摘出し、周囲線維組織から RNA を抽出し、遺伝子発現マイクロアレイ解析を行い、各群の線維組織の遺伝子および蛋白産生の違いを比較した。その結果をもとに、M群とC群については4週後における炎症性巨細胞数、破骨細胞数、炎症性サイトカインの CXCL2,3,5 の PCR 解析と Western blot による蛋白発現解析で遺伝子発現と蛋白産生の違いを比較した。さらに蛋白産生の影響を明らかにするため、M群とC群のセラミックを移植4週後に取り出し、破骨細胞と骨芽細胞それぞれと共存培養を行った。

(2) 超多孔質カルシウムセメントスペーサー再移植法を検討する。

材料工学研究者と共同で開発中の新規超多孔質リン酸カルシウムセメントを Masquelet 法の一期手術でスペーサーとして挿入し、周囲をテフロン膜で覆う。二期手術時に摘出後、自家骨と50%ずつ混合して欠損部に再移植し、従来の Masquelet 法との治癒過程の差を検討した。

4. 研究成果

炎症性巨細胞数(n/mm²)はC群:60.3、M群:51.2で、破骨細胞数はC群:23.6、M群:36.6であった。定量PCRでは、C群と比較してM群は、CXCL2:4.4倍、CXCL3:10.2倍、CXCL5:2.1倍であった。骨芽細胞分化実験では、C群16.8mm²、M群23.3mm²であった。すべての実験でM群が優れており有意差を認めた。Masquelet法で形成された骨欠損部位の治癒過程の組織が、従来法の組織に対し共存培養で有意に高い骨芽細胞分化促進作用を示す(図3)ことが明らかとなった。

骨欠損部に我々が独自に開発した超多孔質リン酸カルシウムセメントスペーサーを骨欠損部に移植し、Polytetrafluoroethylene (PTFE) で被覆する。4週後にPTFEを外し、移植した超多孔質リン酸カルシウムセメントスペーサーを一度抜去後粉碎し、自家骨と50%ずつの割合となるように混合し再度移植したモデルをPA群とした。PTFEを外して8週において新生骨量を評価した。新生骨量(BV/TV%)は、C群:5%、M群:11%、PA群45%であった。超多孔質リン酸カルシウムセメントスペーサーを挿入し、内部に骨代謝環境をもたらす線維組織や血管を侵入させたものを抜去・粉碎後、二期手術で自家骨と混合し再移植することで顕著な治癒促進効果が得られる(図4)ことを明らかにした。この方法は、一期手術時に挿入されたスペーサーの留置期間を有効利用した再生医療とも言え、画期的な効果が期待される新たな術式となる可能性がある。これらの結果は、治療成績が移植する自家骨の質および量に依存するMasquelet法の限界を改善し治療成績を向上させる可能性がある極めて重要なものである。

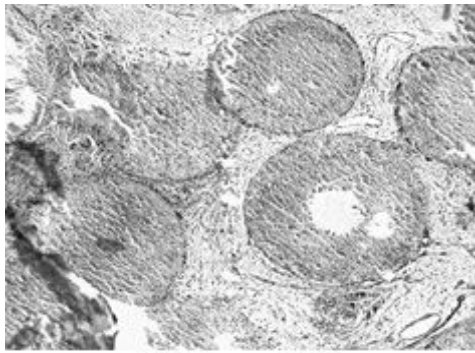


図1 Masquelet法
(セラミック周囲に異物反応なし)

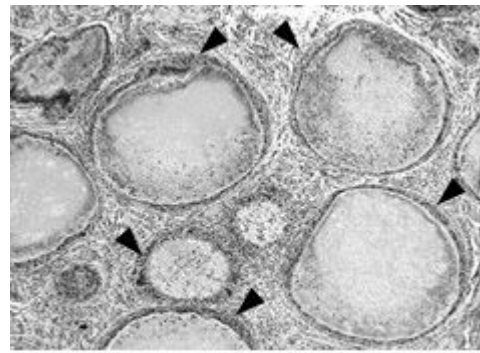
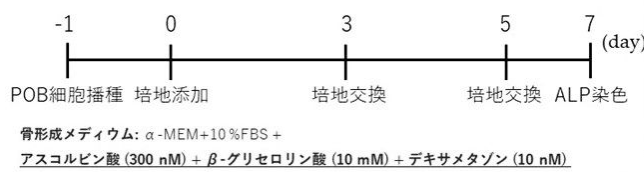


図2 従来法
(セラミック周囲に異物反応▲あり)



細胞: Primary Osteoblasts (POB; マウス頭蓋冠由来)
培地: α -MEM+10%FBS
細胞播種密度: 5×10^4 cells/well
ウェル内の培地量: 500 μ L/well, インターセル内の培地量: 200 μ L/well

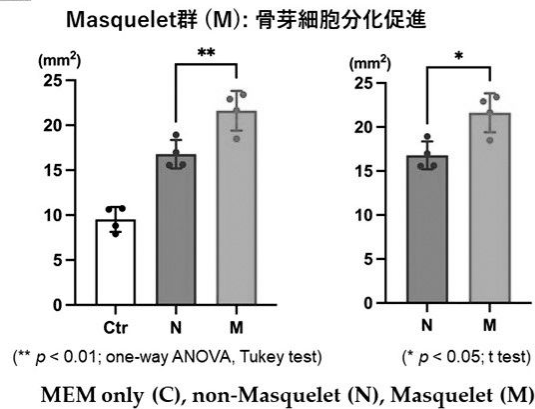
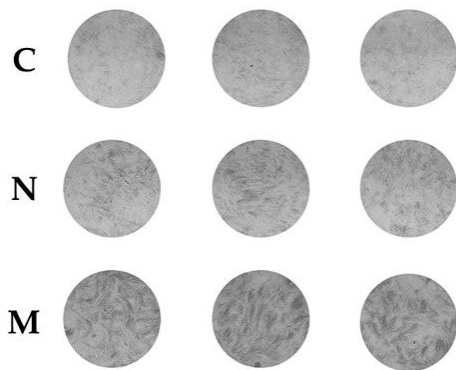


図3 Masquelet法の治療過程の骨髄組織は骨芽細胞分化を促進する

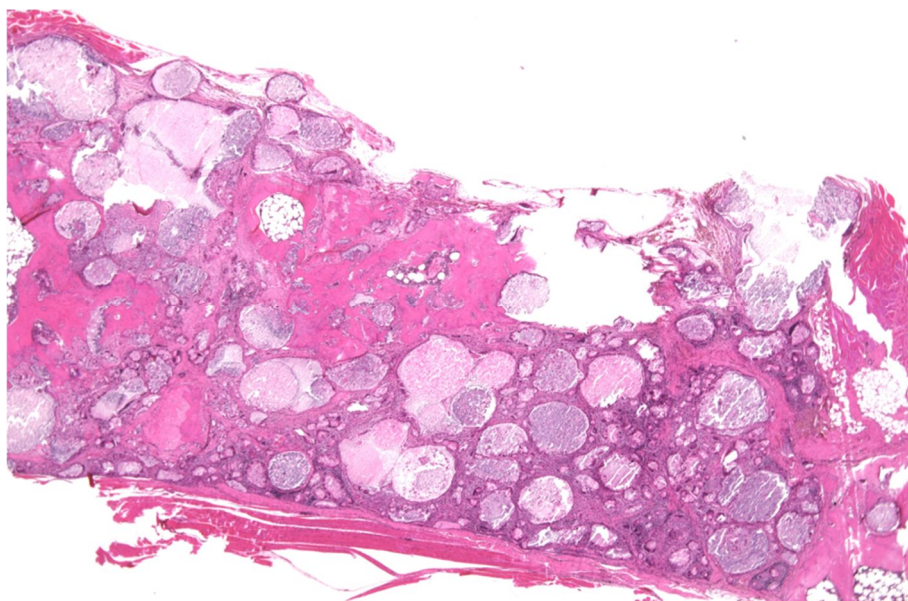


図4 超多孔質リン酸Caセメントスパーサー再移植による新規Masquelet法は有効であった

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鈴木雅生、奥田貴俊
2. 発表標題 ラット大腿骨巨大骨欠損モデルにおける Masquelet 法の新知見と課題
3. 学会等名 第48回日本骨折治療学会
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 鈴木雅生、奥田貴俊
2. 発表標題 ラット大腿骨巨大骨欠損モデルにおけるMasquelet法の新知見
3. 学会等名 第37回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 鈴木雅生、奥田貴俊
2. 発表標題 ラット巨大骨欠損モデルにおけるMasquelet法の新知見
3. 学会等名 第47回骨折治療学会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 鈴木雅生、奥田貴俊
2. 発表標題 基礎研究におけるラット大腿骨巨大骨欠損モデル（Masquelet法）の新知見
3. 学会等名 第49回日本骨折治療学会
4. 発表年 2023年～2024年

1. 発表者名 鈴木雅生、奥田貴俊
2. 発表標題 Masquelet法を用いたラット大腿骨骨欠損モデルの骨代謝環境の解明
3. 学会等名 第38回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2023年～2024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	池田 通 (Ikeda Tohru) (00211029)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授 (12602)	
研究分担者	上高原 理暢 (Kamitakahara Masanobu) (80362854)	東北大学・環境科学研究科・教授 (11301)	

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
---------	---------