

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 25 年 4 月 22 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：平成 22 年度 ～平成 24 年度

課題番号：22591670

研究課題名（和文）骨髄間葉系幹細胞を用いた血管柄付き自家骨置換型人工骨の開発

研究課題名（英文）Development of vascularized artificial bone with mesenchymal stem cells

研究代表者

村田 景一（MURATA KEIICHI）

奈良県立医科大学 整形外科学・講師

研究者番号：10382318

研究成果の概要（和文）：再生医療技術に基づき、ラットを用いた動物実験にて将来的に自家骨に置換し得る人工骨 beta-tricalcium phosphate (β TCP) を担体とする血管柄付き人工骨移植モデルを作成し、間葉系幹細胞 (MSCs) の添加により血管・骨形成が変化するかを検討した。ラット大腿動静脈を血管茎として移植した人工骨モデルにおいて血管茎と人工骨の境界部に MSCs を高濃度で含有した骨芽細胞シートを配置する事により移植血管束周囲から人工骨内に旺盛な血管新生および骨新生が獲得できた。本技術を臨床的に応用する事により難治性偽関節治療における有用な治療戦略となりえる事が示唆された。

研究成果の概要（英文）： Based on tissue engineering technology, a vascularized artificial bone grafting model using a beta-tricalcium phosphate (β TCP) which can replace to autogenous bone was designed. Using animals (rats), vascularization and new bone formation into the artificial bone by implantation of vascular bundle and mesenchymal stem cells (MSCs) were evaluated. By implantation of the femoral artery and vein to center of the artificial bone and the osteogenic matrix cell-sheet (OMCS) at boundary surface between the implanted vessels and the artificial bone, vigor new bone formation and angiogenesis in the artificial bone were observed. This technique will be applied clinically to treat intractable nonunion of fractures.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 22 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
平成 23 年度	800,000	240,000	1,040,000
平成 24 年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：外科系臨床医学

科研費の分科・細目：整形外科

キーワード：四肢機能再建学

1. 研究開始当初の背景

近年、難治性骨髄炎や広範囲骨欠損に対する治療としてマイクロサージャリーの技術を用いた血管柄付き骨移植術による再建が用いられ良好な成績が報告されている。しかし人体において血管茎の位置、採取骨の力学的形状・強度、採取後の合併症などの問題のため移植骨の採取部位は大きく制限される。この問題に対して人工骨の内部に血管を挿入することによる血管柄付き人工骨移植の技術を用いる事により、骨採取に伴う合併症や組織採取部位の制限が軽減できる可能性がある。しかしながら今まで行われてきた人工培養骨およびマイクロサージャリーを用いた血管柄付き人工骨移植の実験モデルでは人工骨としてハイドロキシアパタイト (HA) を使用したため人工骨内の空隙に骨新生は得られるものの自家骨に置換されることはなく、臨床に応用された場合、HA で置換された骨欠損部はバイオアクティブな組織ではないため将来的な再骨折の危険性や関節近傍などの軟骨仮骨部では骨弾性の相違のため将来的に関節症が惹起される危険性が考えられた。したがって使用する人工骨は理想的には自家骨の新生に伴い経時的に吸収され最終的には自家骨に置換される素材が好ましいと考えられる。したがって自家骨に置換される人工骨 beta-tricalcium phosphate (β TCP) を用いた血管柄付き人工骨移植の開発は整形外科ばかりでなく形成外科、口腔外科などの他科の領域においても再建を要する難治性疾患における有用な手段となるものと考えられる。

2. 研究の目的

組織培養の技術とマイクロサージャリーを用いた血管柄付き骨移植の技術の両方を併用し、さらに人工骨として将来的に自家骨へ置換される素材 beta-tricalcium phosphate (β TCP) を使用することにより早期の骨新生能を有する血管柄付き人工移植骨モデルを確立し、作成した移植骨における血管・骨新生能を評価する事で移植血管、培養細胞の役割、効果を判定する事である。

3. 研究の方法

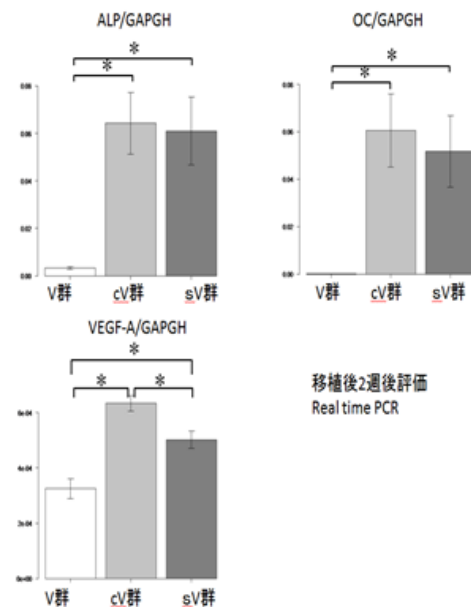
7週齢 F344 ラットの大腿骨骨髄から骨髄由来間葉系幹細胞 (MSCs) を採取し、10cm 径培養皿に播種した後、デキサメサゾン (Dex)、アスコルビン酸 (VC) 添加標準培地で二次培養を2週間行った。平行して、別の人工骨に MSCs を搭載し Dex, VC 添加標準培地で二次培養を2週間行った。マイクロスコープを用いて11週齢 F344 ラットの大腿動静脈を血管束

として挙上し、採取した骨芽細胞シートと共に β TCP (径 6mm、長さ 10mm、気孔率 75%) に作製した側溝 (幅 2mm) に組み合わせた sheet+vascular bundle 群 (sV 群)、また、培養細胞播種 β TCP と血管束を組み合わせた cell suspension 群 (cV 群)、人工骨に血管束のみを組み合わせた vascular bundle 群 (V 群) を作製した (各群 n=8)。

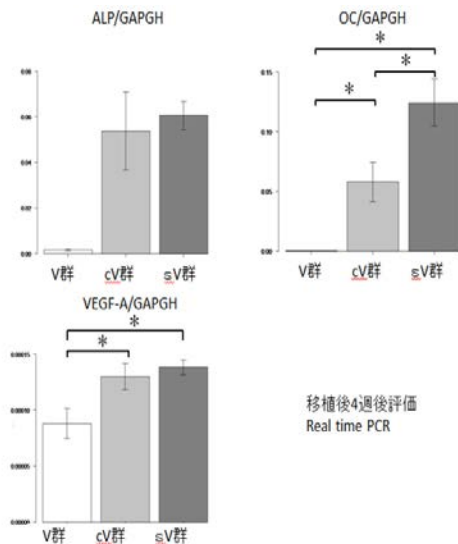
術後4週でサンプルを摘出し、組織像および real time RT-PCR によりオステオカルシン (OC)、アルカリフォスファターゼ (ALP)、血管内皮増殖因子 (VEGF-A) の mRNA 発現量を測定し新生骨および新生血管の評価を各群間で比較検討した。

4. 研究成果

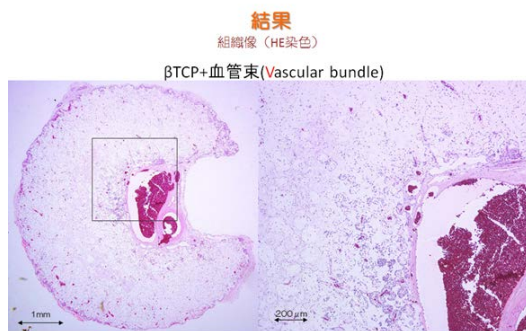
術後2週における OC、ALP の mRNA 発現量は cV 群、sV 群ともに V 群と比較して高値を示し ($p < 0.01$)、cV 群と sV 群の間では有意差を認めなかったが、VEGF-A の mRNA 発現量は sV 群が V 群より高く ($p < 0.01$)、cV 群が sV 群、V 群よりも高い値を示した ($p < 0.01$)。



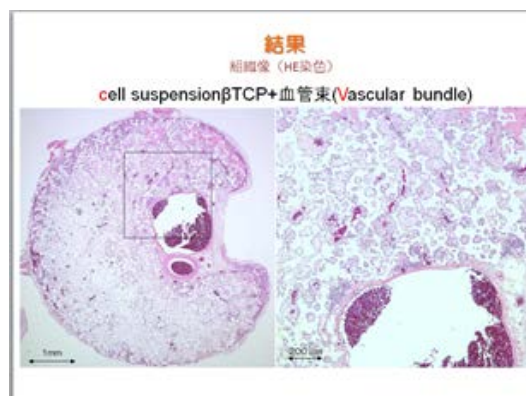
術後4週では、ALP の mRNA 発現量は cV 群、sV 群ともに V 群と比較して高値を示したが有意差を認めなかった。OC の mRNA 発現量は sV 群が V 群、cV 群よりも高い値を示し ($p < 0.01$)、cV 群は V 群より高い値を示した ($p < 0.01$)。VEGF-A では cV 群、sV 群ともに V 群と比較して高値を示し ($p < 0.01$)、cV 群と sV 群の間では有意差を認めなかった。



術後4週の組織像で、V群では人工骨内の新生骨は認めず、人工骨内の移植血管周囲にわずかな血管新生を認めた。



cV群では人工骨周囲の骨形成と人工骨内の移植血管周囲にわずかな血管新生を認めた。



sV群では血管束を中心として人工骨内に放射状に旺盛な骨形成および血管新生を認めた。



(結果のまとめ)

(1) 培養細胞を搭載した cV 群では人工骨全体に血管・骨が新生し、sV 群では人工骨中心部に血管・骨が新生していることから、血管・骨新生には培養細胞及び血行が重要な役割を担っている事が考えられた。

(2) 人工骨の中心部に細胞密度の高い骨芽細胞シートと血管束を移植することで移植血管から放射状に旺盛な血管新生および骨形成が獲得でき、自家骨に置換しうる素材(β TCP)を用いた血管柄付き人工骨が作製可能であった。

(3) real time PCR で VEGF-A、OC および ALP の mRNA 発現量が高値を示したことから in vivo において骨芽細胞シートの血管誘導能および骨形成能が移植血管と人工骨の境界部分で維持されることが証明され、この事が中心血管から人工骨内へ旺盛な血管・骨新生が進展するのに重要な役割を担っていると考えられた。

これまでに骨髄由来間葉系幹細胞を搭載した人工骨に血管束を導入する研究が行われており、血流の乏しい環境下に移植された場合でも人工骨内への骨新生が得られることが確認されている。しかしながら本研究において人工骨に培養細胞を付加し人工骨中心部へ血管を移植した場合でも、人工骨表面に薄く培養骨芽細胞を播種した場合は中心血管周囲からではなく人工骨周囲から血管・骨新生が起こっている所見が得られた。それと比較して人工骨と移植血管の境界面に細胞密度の高い骨芽細胞シートを介在させた場合、移植後の主な血流の供給源である中心血管を中心として放射状に人工骨内部に旺盛な血管・骨新生が獲得された事は注目すべき点である。我々は in vitro において骨芽細胞シートの持つ血管誘導能および骨形成能について報告してきたが、今回の実験においても骨芽細胞シートが周囲血流の良好な条件下で旺盛な血管・骨新生能を維持しうる事が確認され、血管柄付き人工骨作製における骨芽細胞シートの有用性が証明され

た。今後、本実験モデルを応用して周囲の血流の乏しい環境下での血管・骨新生の評価や動物偽関節モデルにおける治療効果を検証してゆく予定である。

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)

[学会発表] (計3件)

①中野健一、村田景一、清水隆昌、赤羽学、藤間保晶、小島康宣、仲西康顕、面川庄平、川手健次、田中康仁、骨芽細胞シート移植を併用した血管柄付き人工骨作製、第27回日本整形外科学会基礎学術集会、平成24年10月26、27日(愛知県名古屋市、名古屋国際会議場)

②中野健一、村田景一、清水隆昌、赤羽学、藤間保晶、小島康宣、仲西康顕、面川庄平、川手健次、田中康仁、骨芽細胞シート移植を併用した血管柄付き人工骨作製、第32回整形外科バイオマテリアル研究会、平成24年12月1日(東京都港区、東京慈恵医科大学)

③中野健一、村田景一、清水隆昌、赤羽学、小島康宣、仲西康顕、面川庄平、川手健次、田中康仁、骨芽細胞シート移植を併用した血管柄付き人工骨作製、第39回日本マイクロサージャリー学会学術集会、平成24年12月6、7日(福岡県北九州市、北九州国際会議場)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村田 景一 (MURATA KEIICHI)
奈良県立医科大学 整形外科・講師
研究者番号：10382318

(2) 連携研究者

赤羽 学 (AKAHANE MANABU)
奈良県立医科大学 健康政策医学・准教授
研究者番号：00418873