

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25462351

研究課題名(和文)再生医療技術を応用した血管付き人工骨による四肢偽関節の治療に関する研究

研究課題名(英文)Treatment of Bone Nonunion Using Vascularized Tissue-Engineered Bone Graft

研究代表者

村田 景一(Murata, Keiichi)

奈良県立医科大学・医学部・研究員

研究者番号：10382318

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：人工骨の内部に血管を移植する血管付き人工骨移植の技術を考案した。ラットの大腿動静脈を円柱状 TCPの溝に移植した有茎血管柄付き人工骨モデルを作成し、4週間待機した後に血管茎の末梢側を切離して同部に再移植した。再移植後4週にて移植骨を採取し、骨形成・血管増生を評価した。ヒト骨髄細胞を用いた骨芽細胞シートを血管茎と人工骨の間に設置したモデルでは再移植時に移植骨をラッピングして周囲組織との血行や組織液の交通を遮断しておいても良好な骨形成・血管増生が観察された。この研究の成果により骨芽細胞シートを付加した有茎血管柄付き人工骨モデルは骨再建を要する難治性疾患における有用な手技になるものと考えられた。

研究成果の概要(英文)：We developed a novel vascularized tissue-engineered bone (VTEB). Using rat models, a vascular bundle of femoral artery and vein was passed through the groove of the tricalcium phosphate ceramics (TCP). Osteogenic matrix cell sheets (OMCS) wrapped around vascular bundles within TCP. Four weeks after the implantation of the vascular pedicle, the VTEB was elevated as a single vascular peddled VTEB, implanted to the same site wrapping with a silastic sheet to prevent blood supply from surrounding tissue. Additional 4 weeks after this manipulation, the VTEB was harvested to evaluate angiogenic and osteogenic potentials. As a results, the VTEB combined with OMCS maintained a high angiogenic and osteogenic potential even after elevation as a pedicled VTEB. From the results of this study, the vascularized TCP combined with OMCS is expected to be a powerful tool of bone reconstruction for the treatment of intractable nonunions with massive bone defects.

研究分野：整形外科 運動器再建外科

キーワード：再生医療 間葉系幹細胞 TCP 血管 骨新生 血管誘導

### 1. 研究開始当初の背景

臨床において重度の軟部組織損傷を伴う開放性骨折の治療は困難であり、特に軟部組織損傷や続発する感染症により骨折部周囲の血流が乏しくなった環境下では骨折部が骨萎縮性偽関節となり治療に難渋する。現在、骨萎縮性偽関節の治療に対しては「単なる骨移植」(遊離自家骨移植) では移植骨自体に血流がないため骨癒合が得られ難く、「生きた骨の移植」である血管柄付き骨移植が行われている。しかしながら血管柄付き骨移植は移植骨を採取できる部位に制限があるうえ、採取部となる健常部に变形、感染、神経麻痺などの合併症をきたし、患者に更なる障害を与える危険性がある。この問題を回避するために近年、再生医療技術を用いた様々な手法が試みられている。当教室でも以前から骨髄間葉系細胞を用いた硬組織の再生に関する研究を重ねてきた。特に最近ではラットの骨髄細胞をシート状に培養した骨芽細胞シート(osteogenic matrix sheet)を開発し、シート移植の実験モデルを確立し(J Tissue Eng Regen Med 2010, 2008)、骨芽細胞シートが偽関節治療、皮弁生着拡大に適用可能かを検証するため実験を継続している。

骨芽細胞シート(図 1-A)は厚さ約 1 mm と薄く、ゼラチン様の可塑性を有し、移植部に巻きつける、貼付する、あるいは注射器で注入するなど様々な方法で移植できる特徴をもつ。また担体 (Scaffold) を使用しないため、生体内に移植した場合に担体自体が血管新生、骨新生を阻害する事がなく、効率的に血管・骨新生を誘導できる利点を有する。すでに我々は人工骨へ血管束を移植したモデル(図 1-B)を用いて、人工骨と移植血管の境界面に骨芽細胞シートを介在させることにより、骨芽細胞シートを用いない場合と比較して、人工骨内部へのより旺盛な血管・骨新生を誘導させることに成功している(図 1-C)。

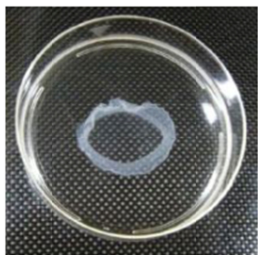


図 1-A: 骨芽細胞シートの肉眼写真

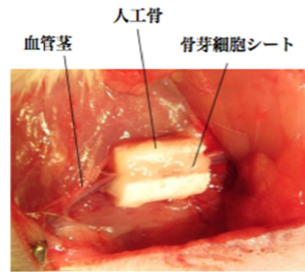


図 1-B: 血管付き骨芽細胞シート付加人工骨

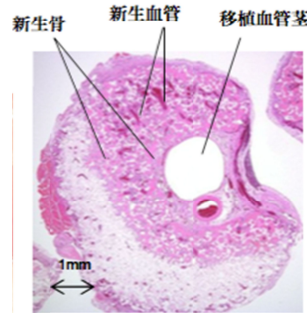


図 1-C: 人工骨内部への旺盛な血管・骨新生 (HE染色) (血管・細胞シート移植後4週)

### 2. 研究の目的

作製した血管付き骨芽細胞シート付加人工骨が移植床の血流が乏しい条件でも異所性に生着可能で、偽関節の治療に有効かを実験的に検証するとともに、血管付き人工骨モデルによる偽関節治療における骨芽細胞シートの骨・血管新生に対する寄与と機序を解明する事が目的である。

### 3. 研究の方法

【血管付き骨芽細胞シート付加人工骨モデルの作成および大腿骨偽関節部への移植】我々は血管付き骨芽細胞シート付加人工骨モデルをすでに完成し、その旺盛な人工骨内への血管・骨新生能を評価してきた。またラット大腿骨偽関節モデルもすでに確立している (Bone 2009)。本研究では作成した血管付き骨芽細胞シート付加人工骨内に血管新生および骨新生が誘導された時点で、人工骨内を通過している血管茎の末梢側を結紮切断して有茎血管柄付き骨移植として挙上して大腿骨に準備した周囲血流の乏しい偽関節モデルに異所性に移植し、偽関節の癒合が得られるか検証する。骨芽細胞シートの作成方法 (J Tissue Eng Regen Med. 2008, 2010) と血管付き骨芽細胞シート付加人工骨モデルの作成方法 (第 27 回日本整形外科学会基礎学術集会) についてはすでに論文あるいは学会で報告しているが、以下にラット大腿骨偽関節部への移植法と共に具体的な手技を記載する。

#### 骨芽細胞シートの作成

7 週齢 Fischer344 ラットの大腿骨から骨髄細胞を採取し、標準培地 (15% FBS 含有 MEM) を用いて初期培養を行う。2 週間後にトリプシンを用いて細胞を培養皿から遊離させ、これを  $1 \times 10^4$  cell/cm<sup>2</sup> の細胞密度で新たな培

養血に播種して二次培養を行う。この際に骨芽細胞への分化誘導因子であるデキサメサゾン（10nM）、アスコルビン酸（82 μg/ml）を添加し、細胞をシート状に培養し、骨芽細胞シートとして採取する。

（1）血管付き骨芽細胞シート付加工骨モデルの作成と再移植後の骨形成能の調査  
11週齢 F344 ラットの大腿動静脈を手術用顕微鏡下に挙上し、これらの血管束を円柱状 TCP（直径 6mm、厚み 10mm、気孔率 75%：PENTAX 社製 SUPERPORE）に作製した幅 2mm の側溝に人工骨と血管束の間に骨芽細胞シートを充填した後に設置する。血管束移植後 4 週後に人工骨を摘出採取したのものを control 群とし、4 週後に大腿動静脈末梢部を結紮切離して血管柄付き人工骨として挙上し、同部に再設置したものを sheet 群、挙上時に人工骨をラッパーでラッピングして周囲組織からの血行・組織液移行を阻害したうえで同部に再設置したものを wrapping 群とする。（各群 n=4）（図 2）。Sheets 群、wrapping 群では人工骨挙上後再設置の後、4 週で人工骨を摘出した。各群の摘出サンプルを用いて real time PCR でアルカリフォスファターゼ (ALP)、オステオカルシン (OC)、VEGF-A の mRNA 発現量を測定し比較検討を行う。

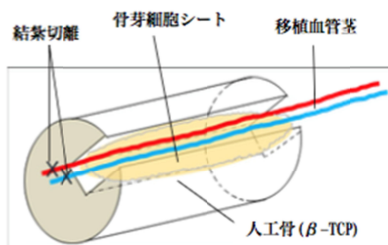


図 2：有茎血管柄付き人工骨モデル

（2）大腿骨偽関節部への血管柄付き人工骨移植の実験】有茎血管付き人工骨挙上時に同側大腿骨に準備した偽関節部にそれらを移植し髓内釘固定する（図 3）。偽関節モデルは大腿骨骨折を作成し髓内と外骨膜を搔爬切除、髓内釘でルーズに固定する事で作成する。コントロール群として偽関節部に人工骨のみを移植する群（n=14）を追加し前述の 2 群と合わせて合計 3 群について経時的（移植後 4 週、8 週）に骨癒合を X 線写真にて評価する。  
また移植後 4 週、8 週で骨移植部の組織標本を摘出し、組織像、アルカリホスファターゼ（ALP）、オステオカルシン（OC）、血管内皮増殖因子（VEGF）の mRNA 量（リアルタイム PCR）を測定し、血管・骨形成能の評価を行う。さらに力学評価は 8 週で採取した大腿骨をマイクロ CT にて撮影した上で有限要素法にて行う（ラトックシステムエンジニアリング株式会社に依頼）。

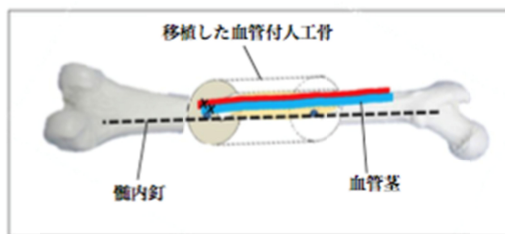


図 3：偽関節部に有茎血管付人工骨を移植し髓内釘固定

#### 4. 研究成果

（1）血管付き骨芽細胞シート付加工骨モデルの作成と再移植後の骨形成能の調査

mRNA 発現量は ALP では各群間に有意差を認めなかった。OC および VEGF-A は sheet 群および wrapping 群で control 群と比較し高値を示した (p=0.015, p=0.024)。血管柄付き人工骨挙上後 4 週において骨形成能と血管誘導能は促進されており、さらに人工骨周囲の血行を遮断した状態でも骨形成能および血管誘導能は維持されていた (図 3)。以上より、血管束とともに骨形成細胞シートを移植することで移植可能な血管柄付き人工骨 (VTEB) が作製可能であることが証明され、さらに移植可能な VTEB 作製における骨形成細胞シートの有用性が確認できた。本方法によりさまざまな形状や大きさの移植可能な VTEB が作製可能となり、骨欠損治療に対する有用な治療法となることが期待できると考えられた。

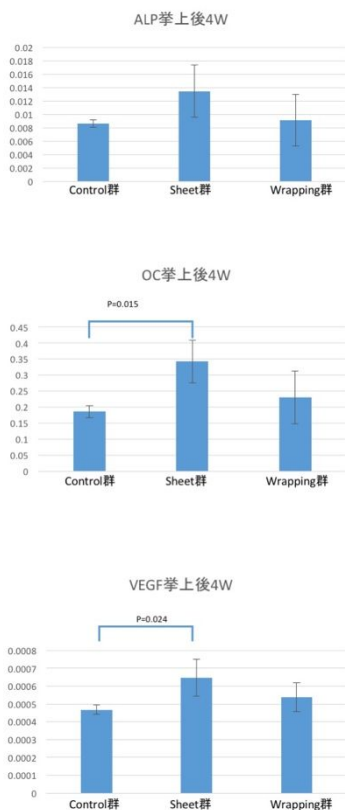


図3

## (2) 大腿骨偽関節部への血管柄付き人工骨移植の実験

パイロットモデルでの検証にてラット大腿骨に作成した偽関節モデルにおける安定した移植骨固定方法が確立できなかったため、まずはこの固定方法の確立が課題となった。偽関節部の固定方法として 1.1mm キルシュナー鋼線による髄内釘固定モデルおよび手指骨用の創外固定による外固定による VTEB 移植部の安定化を評価した。ラット大腿部に作成した長さ 10mm の骨欠損部を TCP で置換し、この人工骨の中央に作成した骨孔に鋼線を通して大腿骨の髄内に鋼線を留置する事により人工骨を安定化させた（髄内釘モデル）また安定化を向上させる目的で上記の髄内釘固定に創外固定を偽関節部を跨ぐように追加設置したモデルを作成した（創外固定モデル）。髄内釘モデルを 10 例、創外固定モデルを 4 例作成し、2 週後、4 週後に単純 X 線写真による固定性の評価を行った。また 4 週の時点で手術的に展開して人工骨移植部の形態を確認した。髄内釘モデルでは術後 4 週の X 線写真にて 10 例中 4 例で鋼線の破損、移動ともなう移植人工骨の大腿骨からの脱転が確認され、手術による直視所見では移植人工骨と大腿骨の連続性は絶たれた状態であった。創外固定モデルでは 4 例中 3 例で

4 週の時点での X 線評価にて移植人工骨は大腿骨移植部に安定していたが、1 例で創外固定用のピン刺入部で新たな骨折を生じた。手術による直視所見では移植人工骨と大腿骨の連続性は保たれていた。結果的に今回の研究ではラット大腿骨偽関節モデルにおける安定した固定法を確立することはできず、新たな固定法の探求が必要と考えられた。ラット大腿骨における偽関節に対する骨移植モデルが確立できなかったために予定していた偽関節部での VTEB の骨形成能、血管形成能の評価については実施できなかった。

## 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 1 件)

Kenichi Nakano, Keiichi Murata, Shohei Omokawa, Manabu Akahane, Takamasa Shimizu, Kenji Kawamura, Kenji Kawate, Yasuhito Tanaka. Promotion of Osteogenesis and Angiogenesis in Vascularized Tissue-Engineered Bone Using Osteogenic Matrix Cell Sheets. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 査読あり. 137(5), 2016, 1476-1484. DOI: 10.1097/ PRS. 0000000000002079

〔学会発表〕(計 7 件)

中野健一, 村田景一, 赤羽 学, 面川庄平, 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 56 回日本手外科学会学術集会, 2013 年 4 月 18、19 日, 神戸国際会議場（神戸市）.

中野健一, 村田景一, 清水隆昌, 吉良 務, 面川庄平, 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の試み. 第 39 回日本骨折治療学会学術集会, 2013 年 6 月 28 日- 29 日, 石橋文化センター（久留米市）.

中野健一, 村田景一, 清水隆昌, 赤羽 学, 小島康宣, 仲西康顕, 吉良 務, 大西正展, 面川庄平, 田中康仁. 血管柄付き人工骨作成における骨芽細胞シートの有用性. 第 40 回日本マイクロサージャリー学会学術集会, 2013 年 9 月 25 日-28 日, 盛岡市民文化ホール（盛岡市）.

中野健一, 村田景一, 清水隆昌, 上羽智之, 吉良 務, 赤羽 学, 面川庄平, 川手健次, 田中康仁. 血管柄付き人工骨作成における骨芽細胞シートの有用性. 第 28 回日本整形外科基礎学術集会, 2013 年 10 月 17-18 日, 幕張メッセ（千葉市）



Kenichi Nakano, Keiichi Murata, Takamasa Shimizu, Manabu Akahane, Shohei Omokawa, Yasuhito Tanaka. Osteogenesis of vascularized tissue-engineered bone scaffold constructs. 68<sup>th</sup> Annual Meeting of American Society for Surgery of the Hand. 2013. 10. 03- 10. 05. San Francisco, CA, USA.

中野健一, 村田景一, 清水隆昌, 上羽智之, 吉良 務, 赤羽 学, 面川庄平, 川手健次, 田中康仁. 血管柄付き人工骨への血管誘導能および骨形成能の付与-骨芽細胞シートを用いて-. 作成における骨芽細胞シートの有用性. 第 33 回整形外科バイオマテリアル研究会, 2013 年 12 月 7 日, 奈良ホテル (奈良市).

Kenichi Nakano, Keiichi Murata, Takamasa Shimizu, Manabu Akahane, Tomoyuki Ueha, Shohei Omokawa, Kenji Kawate, Yasuhito Tanaka. Promotion of Osteogenesis and Angiogenesis in Vascularized Tissue-Engineered Bone Using Osteogenic Cell Sheets. 2014 Annual Meeting of Orthopaedic Research Society. 2014. 03. 15- 18. New Orleans, LA, USA.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕該当なし

〔その他〕

ホームページ等 該当なし

## 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・医学部・研究員  
研究者番号：10382318

### (2)研究分担者

赤羽 学 (AKAHANE, Manabu)  
奈良県立医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：00418873

田中 康仁 (TANAKA, Yasuhito)  
奈良県立医科大学・医学部・教授  
研究者番号：30316070

清水 隆昌 (SHIMIZU, Takamasa)  
奈良県立医科大学・医学部・助教  
研究者番号：70464667

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

(3)連携研究者：該当なし

(4)研究協力者：該当なし