

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462276

研究課題名(和文)骨形成細胞シートを併用した骨延長術の有用性に関する実験的研究

研究課題名(英文) Experimental study of bone reconstruction using osteogenic matrix cell sheet

研究代表者

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

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)：骨延長術により生じる骨欠損部の骨形成を促進するために、ラット骨髄から作成した凍結骨形成細胞シートを注入する小侵襲手技の有用性を実験的に調査した。異なる条件で凍結した骨形成細胞シートをラット背部皮下に移植し、移植後4週の骨形成能を計測した。ラット大腿骨欠損部に、急速凍結シートおよび緩速凍結シートをそれぞれ注入移植し、骨形成と骨強度を比較した。皮下移植において、凍結シートは新鮮シートと同等の骨形成能を有した。骨欠損部への移植において、いずれの凍結シートも仮骨形成を付与し、緩速シート注入群がより大きい骨強度を有した。骨延長術で生じる骨欠損の再建に対して、緩速凍結細胞シート移植の有用性が示された。

研究成果の概要(英文)：We investigated usefulness of cryopreserved osteogenic matrix sheet injection to enhance bone formation in rat femur defect model. Three groups of sheet injections (fresh, slowly/rapidly cryopreserved) into rat dorsum were compared in terms of cell viability, osteogenic potential. Cell viability in slowly-cryopreserved group decreased compared to fresh group. There was no significant difference regarding osteocalcin mRNA expressions 4 weeks after injection. The other three groups (sham as control, slowly/rapidly cryopreserved) injections into segmental bony defect were compared regarding histology and biomechanical property. Histological observations showed extensive bone formation in the cryopreservation groups. Maximum failure strength of femur in slowly-cryopreserved group demonstrated significantly higher than that in the sham group during 6 weeks after injection. Slowly cryopreserved/thawed osteogenic matrix sheet injection enhanced bone formation in rat femur bone defect model.

研究分野：整形外科、手の外科、再建外科

キーワード：細胞シート 骨欠損 骨形成能

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 整形外科領域における骨延長術は、延長により生じた骨欠損を骨移植することなしに再建できる優れた方法である。しかし、延長部の血行不良や骨形成能の低下により、延長部の骨再生が遷延する場合がある。

(2) 我々は、骨髄由来間葉系幹細胞を分化誘導し作製した「骨形成細胞シート」の有用性を実験的に証明してきた。骨形成細胞シートは高い骨形成能を有し、担体を要さない『注入型骨移植』として応用可能であり、冷凍保存も可能である。

(3) したがって、骨延長部に生じた骨欠損に凍結保存した細胞シートを注入することにより、骨延長部の骨再生を促進することが可能と考えられる。本技術は骨延長術の遷延癒合や再骨折などの合併症を解決できる可能性がある。

## 2. 研究の目的

骨延長術により生じる骨欠損に対して、骨形成を促進するために凍結骨形成細胞シートを注入する小侵襲手技の有用性を評価することである。

## 3. 研究の方法

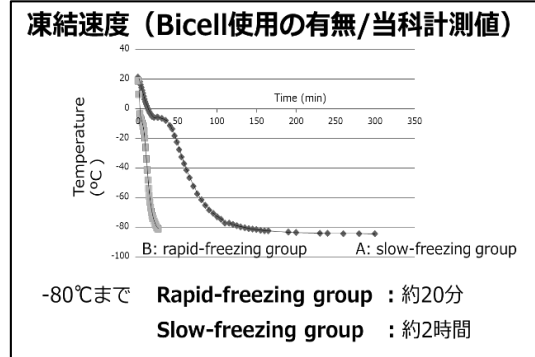
(1) 7週齢 F344 ラット大腿骨から骨髄細胞を採取し二週間の初期培養後、骨分化誘導培地で二週間の二次培養を行い、骨形成細胞シートを採取した。凍結処理容器を用いて急速凍結法および緩速凍結法で -85℃ に凍結処理し、24 時間液体窒素で保存した。

(2) 凍結処理を行わない新鮮シート (Fresh 群) 急速凍結シート (Rapid 群) および緩速凍結シート (Slow 群) を 37℃ 恒温槽で急速解凍し、細胞活性を Cell Counting Kit8 用いて評価した。同系ラットの背部皮下に 3 群の細胞シートを注入移植し、移植後 4 週で摘出した硬組織について X 線学的、組織学的 (HE/Sirius Red 染色) および生化学的 (オステオカルシン mRNA の発現量) に評価し 3 群間で比較した (n=5)。

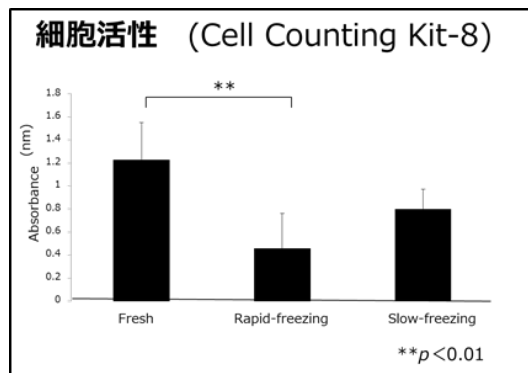
(3) ラットの大腿骨骨欠損モデルを作製し、骨欠損部に Rapid 群および Slow 群の細胞シートを移植し、Control として非移植群を用いた。移植後 3 週および 6 週で摘出した大腿骨を X 線学的および組織学的 (HE 染色) に評価し、移植後 6 週の大腿骨について力学的強度を評価し 3 群間で比較した (各群 n=5)。

## 4. 研究成果

(1) 細胞シートは Rapid 群で約 20 分、Slow 群で約 2 時間の凍結時間を要した。それぞれの群の細胞活性は、Fresh 群と比較して Rapid 群で有意に低下していた (図 1 - 2)。

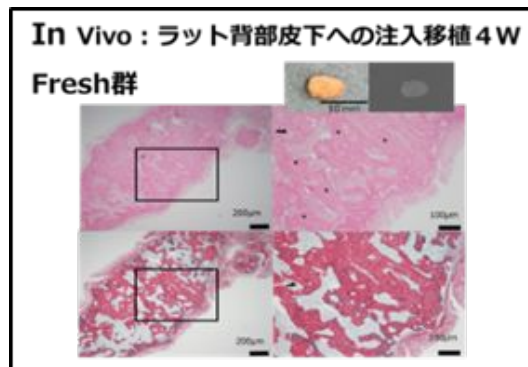


(図 1)

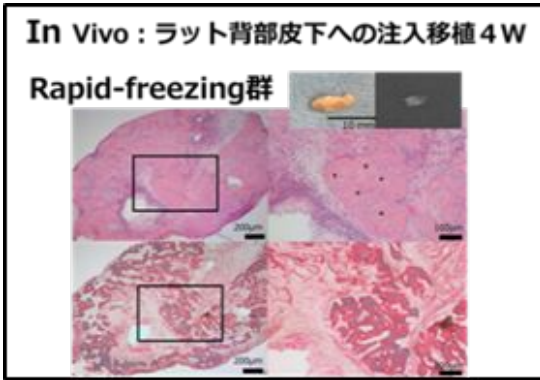


(図 2)

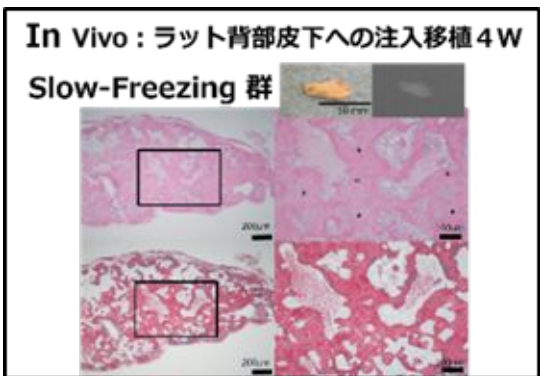
(2) 細胞シートの背部皮下注入移植では移植後 4 週において X 線学的および組織学的にすべての群で骨形成を認めた (図 3 - 5)。



(図 3)

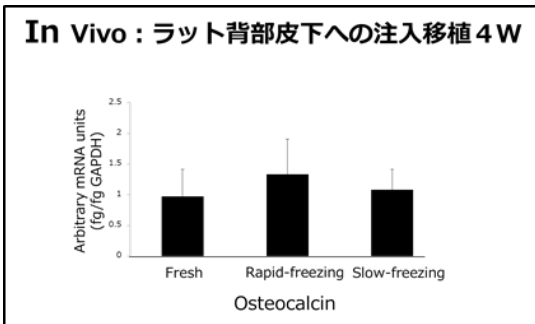


( 図 4 )



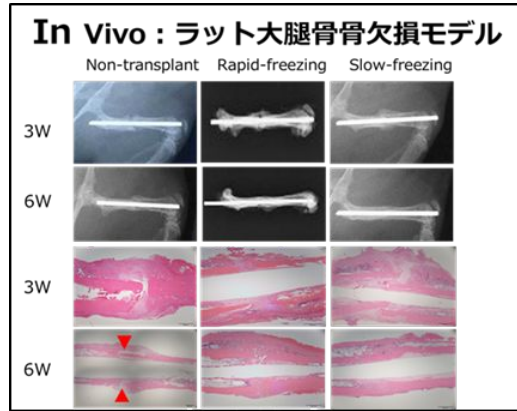
( 図 5 )

(3) リアルタイム PCR におけるオステオカルシンの mRNA の発現量は各群間で有意差を認めなかった ( 図 6 )。

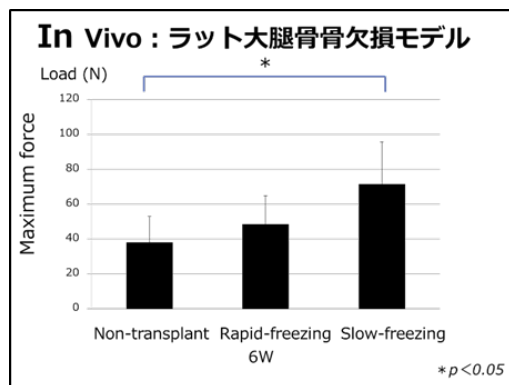


( 図 6 )

(4) 骨欠損部への細胞シート移植では、力学試験において非移植群と比較して Slow 群で有意に最大荷重値が高く有意差を認めた ( 図 7 8 )。



( 図 7 )



( 図 8 )

(5) 以上の結果から、ラット皮下注入移植において、緩徐凍結細胞シートは新鮮シートと同等の骨形成能を有していることが確認された。ラット大腿骨骨欠損部への凍結細胞シート移植により、仮骨形成が付加された。さらに、緩速凍結細胞シートの骨形成能がより促進され骨強度を有していた。骨延長術で生じる骨欠損の再建に対して、緩速凍結細胞シート移植の有用性が示された。

## 5. 主な発表論文等

学会発表 ( 計 1 件 )

中野 健一 倉和彦 清水隆昌 前川尚宣  
 小島康宣 面川庄平 田中康仁  
 ラット骨再建における凍結骨細胞シートの有用性 日本創外固定・骨延長学会  
 2017 年 3 月 3 - 4 日 久留米市

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

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

### (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

中野 健一 (NAKANO, Kenichi)  
奈良県立医科大学・医学部・研究員  
研究者番号：20597108

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

大西 正展 (ONISHI Tadanobu)  
奈良県立医科大学・医学部附属病院・研究員  
研究者番号：30722772