

**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：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861205

研究課題名(和文) 広範囲骨欠損に対する骨形成細胞シートと血管束移植を用いた新規骨再建法確立の試み

研究課題名(英文) Tissue-engineered vascularized bone grafts fabricated with osteogenic cell sheet for the reconstruction of segmental bone defect

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：血管柄付き人工骨を作製後、血管を結紮切離した後も、人工骨内の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。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人工骨が作製可能であることが証明された。本方法によりさまざまな形状や大きさの移植可能な血管束導入人工骨が作製可能となり、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ている。

研究成果の概要(英文)：The inclusion of vascular bundles can further enhance the bone-forming capability of bone substitutes by promoting tissue neovascularization. In this study, the authors developed a novel vascularized tissue-engineered bone scaffold composed of osteogenic matrix cell sheets wrapped around vascular bundles within  $\beta$ -tricalcium phosphate ceramics. Four weeks after subcutaneous transplantation in rats, making use of the femoral vascular bundle, vascularized tissue-engineered bone demonstrated more angiogenesis and higher osteogenic potential than the controls. After the elevation of vascularized tissue-engineered bone with ligating distal part of vascular bundle, the vascularized tissue-engineered bone can maintain their angiogenesis and higher osteogenic potential. This novel method for preparing vascularized tissue-engineered bone scaffolds may promote the regeneration of large bone defects, particularly where vascularization has been compromised.

研究分野：骨再生医療

キーワード：四肢機能再建学

### 1. 研究開始当初の背景

骨は再生能力に富んだ組織であるが、外傷、腫瘍切除などによって大きな骨欠損が生じるケースでは、自家再生力だけによる組織再生は難しい。骨欠損部を補填するために臨床では自家骨移植が主に行われているが、自家骨移植は患者の骨の一部を採取しなければならず、また採取骨の大きさや形状などに制限があるため、人工骨で骨欠損部を再建する方法が求められている。

移植する人工骨が大きい場合は、骨形成を担う骨芽細胞が人工骨内部にまで進入できないため、骨形成因子 (bone morphogenic protein; BMP) の導入、骨髄由来間葉系幹細胞 (bone marrow derived mesenchymal stem cell; BMSC) の付与など人工骨の骨形成能を高める試みがなされている。しかし、組織再生において近傍の血管から 200  $\mu$ m 以上離れると血流の供給は途絶し、移植細胞は生存できないと報告されており (Rouwkema J, et al. Trends Biotechnol 2008.)、再生医療の技術を用いて人工骨内に培養細胞を搭載した『培養人工骨』であっても例外ではない。骨組織再生において、骨形成細胞の分化と増殖を促進するために必要な血流を供給する『血管新生』は不可欠な存在であり、人工骨内部で生着した骨芽細胞に不可欠な、酸素や栄養源を供給する血管網を早期に構築する手技の開発が求められている。

当教室では、骨髄から骨髄間質細胞を採取培養し、シート状に採取する、『骨形成細胞シート』の移植法を報告してきた (Akahane M et al. JTERM 2008)。この『骨形成細胞シート』はスキヤフォールドを必要せず、自らが産生する細胞外基質によって細胞間のネットワークを維持し、偽関節をはじめとして骨再生医療において有用である (Nakamura A et al. Bone 2010)。『骨形成細胞シート』は、BMP や血管内皮細胞増殖因子 (vascular endothelial growth factor; VEGF) など様々な成長因子を有している上に、骨芽細胞をはじめとして血管新生に必要な間葉系細胞を含んでいるため、『骨新生』と『血管新生』を同時に促すことのできる理想的な存在であると考えられる。

この『骨形成細胞シート』によって、人工骨内部で血管束と人工骨を速やかに架橋し、移植早期に『3次元血管網構築』が可能になる。骨欠損部における早期の骨新生、血管新生が可能となり、広範囲骨欠損に対しても、早期に『生体骨機能の再生』が可能となる。

### 2. 研究の目的

本研究では、人工骨を用いた広範囲骨欠損部の再建において、再生医療の技術を用いて作製した『骨形成細胞シート』と、微小血管外科技術により作製した『血管束』を人工骨内に導入することで、移植後早期に人工骨内部

の『3次元血管網構築』および『骨組織再生』を行い、広範囲骨欠損や骨壊死治療の新たな治療法を確立するための基礎的研究を行う。

広範囲骨欠損部の再建において、人工骨を用いた再建法では人工骨内部で十分な骨組織が再生できない。生体内で完全に骨癒合を獲得するためには『3次元血管網構築』が必要である。近年この問題に対して、人工骨の内部構造の改良や、骨形成因子の導入、骨髄由来間葉系幹細胞の付与など人工骨の骨形成能を高める試みがなされている。しかし組織再生においては、細胞のみならず、細胞への『血液供給』が重要な因子であり、組織内部に早期に『3次元血管網構築』することが重要である。

### 3. 研究の方法

7週齢 Fischer344 ラットの両側大腿骨から骨髄間質細胞を採取し T75 フラスコを用いて初期培養を行う。細胞培養は、MEM に 15% 牛胎血清 (FBS) と抗生剤を加えたものを標準培地として使用する。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 6cm 径の培養皿に播種する。デキサメサゾン (Dex; 10nM)、アスコルビン酸 (AscP; 82  $\mu$ g/ml) 添加標準培地で二次培養を行い、2週間後にスクレパーを用いて骨形成細胞シートを採取する。培養人工骨は二次培養の際に、細胞浮遊液を  $3.5 \times 10^6$  cell/ml に調整し、人工骨に組み合わせ Dex, AscP 添加標準培地で2週間培養を行った。

①人工骨と血管束、②培養人工骨と血管束、③人工骨と血管束に骨形成細胞シートの組み合わせの3群を作製し、③が骨再建法として優れた方法であることを検証する。

#### 実験 1: 血管束導入人工骨の骨形成能の比較

11週齢 Fischer344 ラットの大腿動静脈を剥離し、径 6mm、長さ 10mm、気孔率 75%の  $\beta$  TCP (Superpore®:PENTAX) に作製した側溝 (幅 2mm) に組み合わせた。人工骨と血管束の間に骨形成細胞シートを充填し、術後 2 週、4 週で、血管柄付き人工骨の骨形成能、血管新生能を real time PCR で ALP、OC、VEGF-A の mRNA 発現量を測定し、3群間での比較検討を行った (各群 n=4)。

#### 実験 2: 血管束と骨形成細胞シートを組み合わせた人工骨の、移植後の骨形成能

実験 1 では、③が最も骨形成能が高いことが証明されたため、③において、術後 4 週で大腿動静脈末梢部を結紮し血管柄付き人工骨を完全に挙上する。挙上した人工骨が、実際 living bone として骨欠損部に移植可能であるかの検討を行った。挙上した人工骨を再度大腿部に戻したものをシート群、挙上後、人工骨をラバーでラッピングし、周囲からの



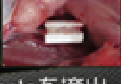
血管進入を防いだ状態で戻したものをラップ群とした。挙上後4週（術後8週）でサンプルを摘出し、real time PCRでALP、OC、VEGF-AのmRNA発現量を測定し、挙上前の状態をcontrol群（各群n=4）とした3群間での比較検討を行った。

#### 実験3：ヒト骨髄由来間葉系幹細胞での検証

さらに、同様の実験を、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞を免疫不全動物（ヌードラット；F344/N-rnu）に移植することを検証した。

**Materials and Methods** Department of orthopaedic surgery  
Nara Medical University

**移植群**

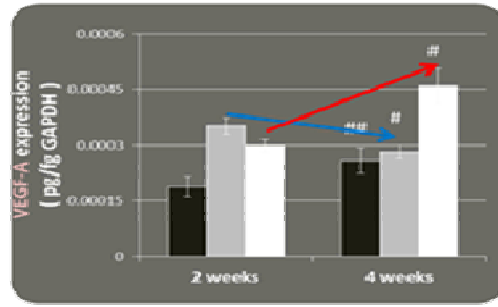
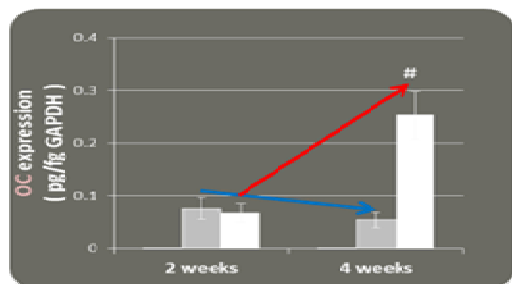
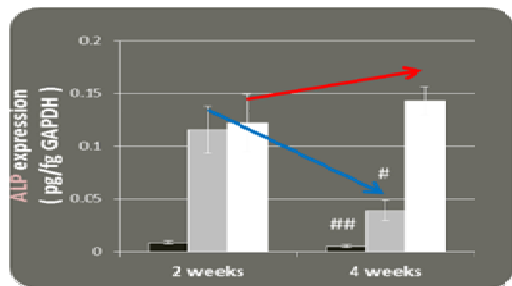
<b>Control群：</b>	βTCP +	
	血管束	
<b>Cell群：</b>	MSC搭載βTCP +	
	血管束	
<b>Sheet群：</b>	骨芽細胞シート +	
	血管束	

移植後2週および4週でSampleを摘出

#### 4. 研究成果

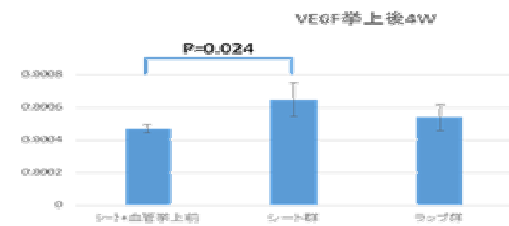
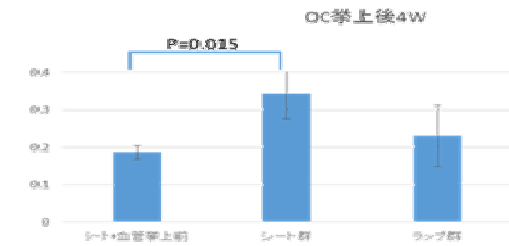
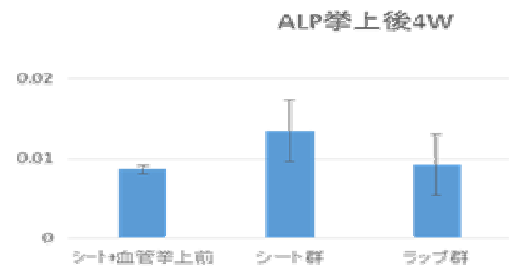
##### 実験1の結果と考察

術後2週では②、③において有意差を認めなかった。人工骨単独と比較して、浮遊細胞を投入した培養人工骨、骨形成細胞シートを組み合わせた人工骨ともに高い骨形成能、血管新生能を認めた。しかし、術後4週では、骨形成細胞シートで作成した血管束導入人工骨が、浮遊細胞で作成した血管束導入人工骨よりも優れた骨形成能を認めた。浮遊細胞で作成した血管束導入人工骨は、術後2週から4週にかけて骨形成能、血管新生能が増加しないことが分かった。



##### 実験2の結果と考察

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はシート群およびラップ群でcontrol群と比較し高値を示した(p=0.015, p=0.024)。

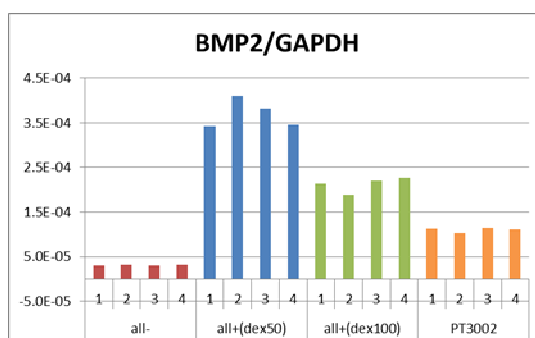
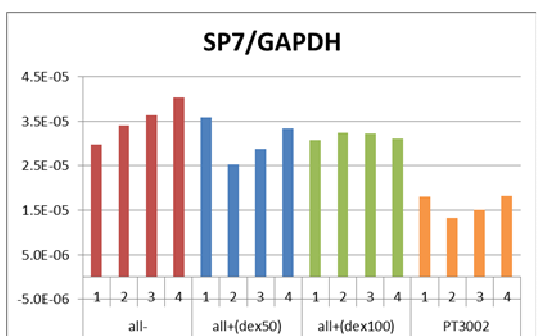
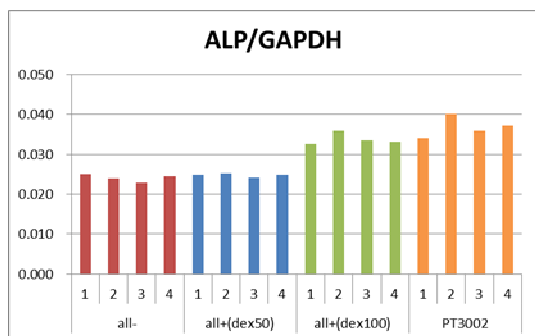
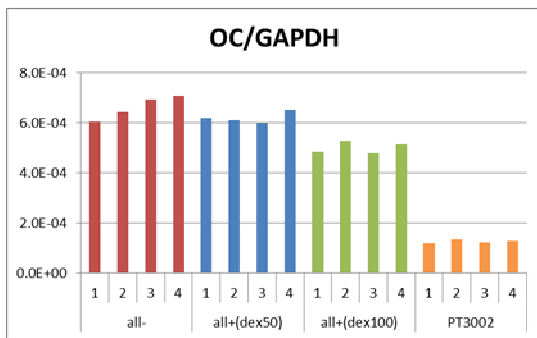


末梢で大腿動脈を結紮後4週経過しても、骨形成細胞シートを組み合わせた血管束導入人工骨は、骨形成能、血管新生能を有していた。周囲の血流が期待できないような移植床への移植を想定したラップ群であっても、骨形成能、血管新生能を失うことはなく、広範囲の骨欠損を再建するのに有用な骨形成能、血管新生能を維持されることが分かった。

##### 実験3の結果と考察

Lonza社のヒト骨髄由来間葉系幹細胞を用いて、ラットと同様の条件で、骨分化誘導を行った。LONZA社の標準培地および骨分化誘導培地

(PT3002) で骨分化誘導を行った。



様々な条件で行うも、一定した骨分化が得られなかった。LONZA のヒト細胞を用いた骨分化の実験では、骨分化誘導をかけると、骨分化をかけない細胞と比較して、リアルタイム PCR で ALP が有意差をもって高い値であるのに対して、OC は有意差がない。BMP は高い値を示すが、実際に移植した人工骨においても、骨形成はラットと比較して良好とはいえなかった。新たに MSC 用無血清培地 STK を用いて、同様の培養条件（初期培養 2 週間、二

次培養 2 週間；骨分化誘導（DEX、AscP、β GP 添加）で行った。2 回骨分化誘導の実験を行うも、我々の実験系では MSC 用無血清培地 STK は、骨分化誘導に抑制的に働くことから、ラットと同様の良好な骨形成能を有する骨分化誘導の条件を同定できなかった。デキサメサゾンの濃度を 50nM、100nM に分けて骨分化誘導を行った。リアルタイム PCR の結果、ALP、OC、SP7、BMP2 では有意差を認めなかった。

今回の我々のヒト骨髄間葉系幹細胞を用いた実験では、二次培養を行う際の細胞数を  $1.0 \times 10^4 / \text{cm}^2$  で行っていた。福岡県工業技術センターの研究報告（骨代謝関連細胞の機能評価系の確立 古賀 慎太郎 生物食品研究所）によると、 $1.24 \times 10^4 / \text{cm}^2$  で良好な骨形成を認めたとのことより、 $0.62 \times 10^4 / \text{cm}^2$ 、 $1.24 \times 10^4 / \text{cm}^2$ 、 $1.86 \times 10^4 / \text{cm}^2$  とし、骨分化誘導を行った。結果は  $1.86 \times 10^4 / \text{cm}^2$  が ALP 染色、アリザリンレッド染色で最も骨形成が認められた。したがって、細胞数が多いほうが骨分化には有利である可能性が示唆された。

ヒト骨髄間葉系幹細胞骨分化に有用な最適な細胞数については、さらに細胞数を増やした条件を比較して求める必要がある。

以上の結果から、血管柄付き人工骨を作製後、血管を結紮切離した後も、人工骨内の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。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人工骨が作製可能であることが証明された。本方法によりさまざまな形状や大きさの移植可能な血管束導入人工骨が作製可能となり、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ている。

## 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）

〔雑誌論文〕（計 0 件）

〔学会発表〕（計 0 件）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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