

28. Jarrahy R, Kawamoto HK, Keagle J, et al. Three tenets for staged correction of Kleeblattschadel or cloverleaf skull deformity. *Plast Reconstr Surg* 2009;123:310-318

29. Wong GB, Kakulis EG, Mulliken JB. Analysis of fronto-orbital advancement for Apert, Crouzon, Pfeiffer, and Saethre-Chotzen syndromes. *Plast Reconstr Surg* 2000;105:2314-2323

30. Williams JK, Cohen SR, Burstein FD, et al. A longitudinal, statistical study of reoperation rates in craniosynostosis. *Plast Reconstr Surg* 1997;100:305-310

31. Whitaker LA, Bartlett SP, Schut L, et al. Craniosynostosis: an analysis of the timing, treatment, and complications in 164 consecutive patients. *Plast Reconstr Surg* 1987;80:195-212

32. Wall SA, Goldin JH, Hockley AD, et al. Fronto-orbital re-operation in craniosynostosis. *Br J Plast Surg* 1994;47:180-184

33. Marchac D, Renier D, Broumand S. Timing of treatment for craniosynostosis and facio-craniosynostosis: a 20-year experience. *Br J Plast Surg* 1994;47:211-222

34. Kreiborg S. Crouzon Syndrome. A clinical and roentgencephalometric study. *Scand J Plast Reconstr Surg Suppl* 1981;18:1-198

添付写真・図説明

資料 2-1 目的を示す。

資料 2-2 側面頭部 X 線規格写真上での理想の移動距離・方向を示す。

資料 2-3 我々が新しく考案した顔面骨延長システムを示す。創内型延長装置は角度可変式であり、創外型骨延長装置の Surgical wire により延長方向が制御される。創内型延長装置は、延長距離が伸びるにしたがって、側頭骨の固定位置より $-5^{\circ} \sim 15^{\circ}$ まで角度を変えることができる。

資料 2-4 新延長システムの図面を本体装置。

資料 2-5 6 歳の男児 クルーゾン症候群。重度の反対咬合を呈していた。

資料 2-6 延長中。耳介後上方の創内型延長装置のシャフト部分からドライバにより延長される

資料 2-7.8 手術 6 か月後。顔面は前方に移動され、反対咬合や眼球突出は改善した。6 か月後の側面頭部 X 線規格写真を示す。

資料 2-9 装置抜去後 1 か月。自然な顔貌に近づいてきた。

資料 2-10 咬合を示す。成人に近い状態まで上顎を前方移動した。

資料 2-11 側面頭部 X 線規格写真の重ね合わせを示す。

資料 2-12 8 歳の女兒。クルーズン症候群。上顎と下顎の切歯の距離を示す Over jet は 15mm であった。

資料 2-13 延長中。

資料 2-14 手術 6 か月後。顔面は前

方に移動され、反対咬合や眼球突出は改善した。6 か月後の側面頭部 X 線規格写真を示す。

資料 2-15 装置抜去後 1 か月。自然な顔貌に近づいてきた。

資料 2-16 本システムの利点を列挙した。

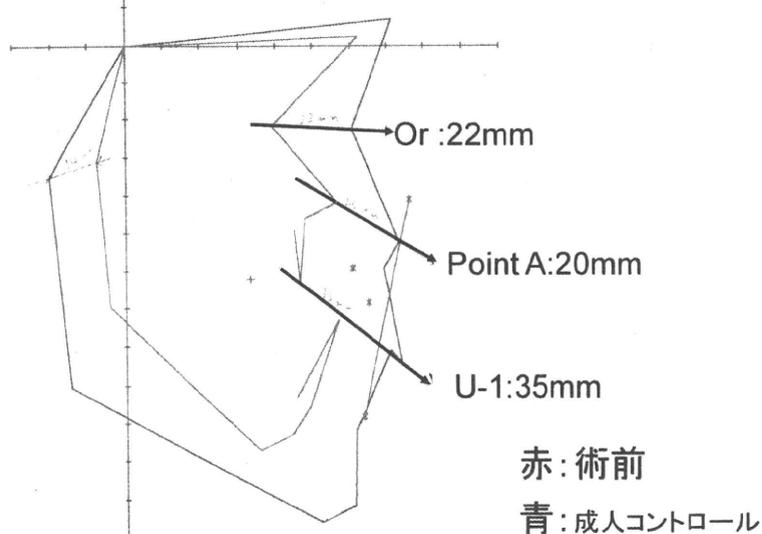
資料 2-17 考察。

資料2-1

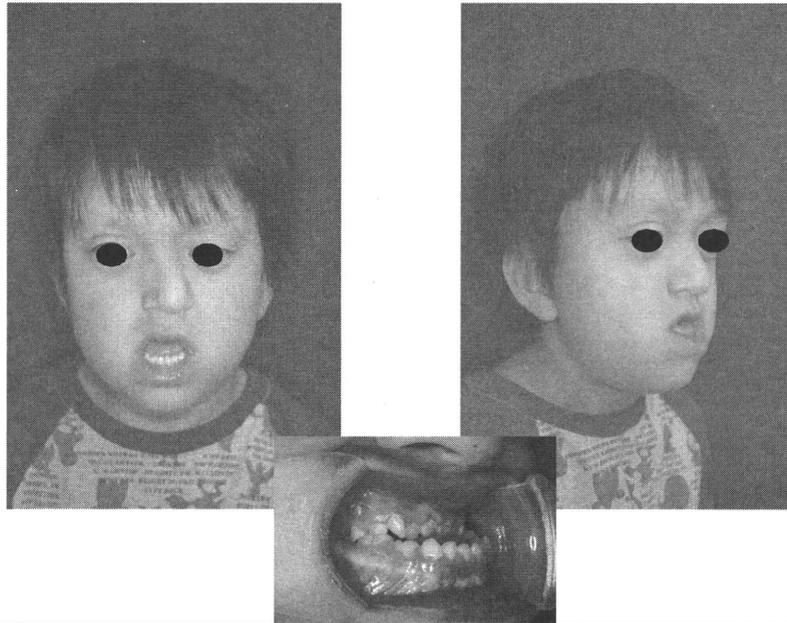
目的

我々は、小児のsyndromic craniosynostosisに対して、延長距離と延長方向を共に制御できる新しい顔面骨延長システムを開発した。
その方法と短期結果について報告する。

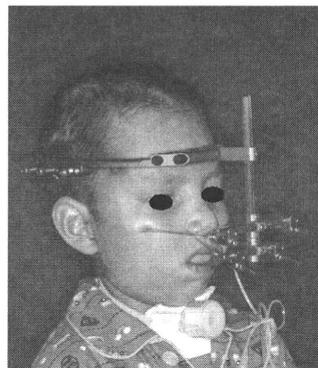
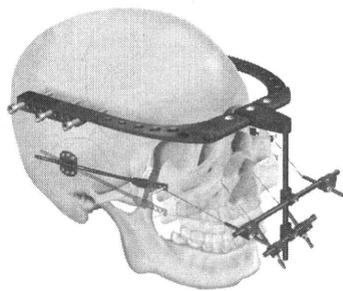
資料2-2 側面頭部X線規格写真上での 理想の移動距離・方向



資料2-5 症例1 6歳 クルーゾン

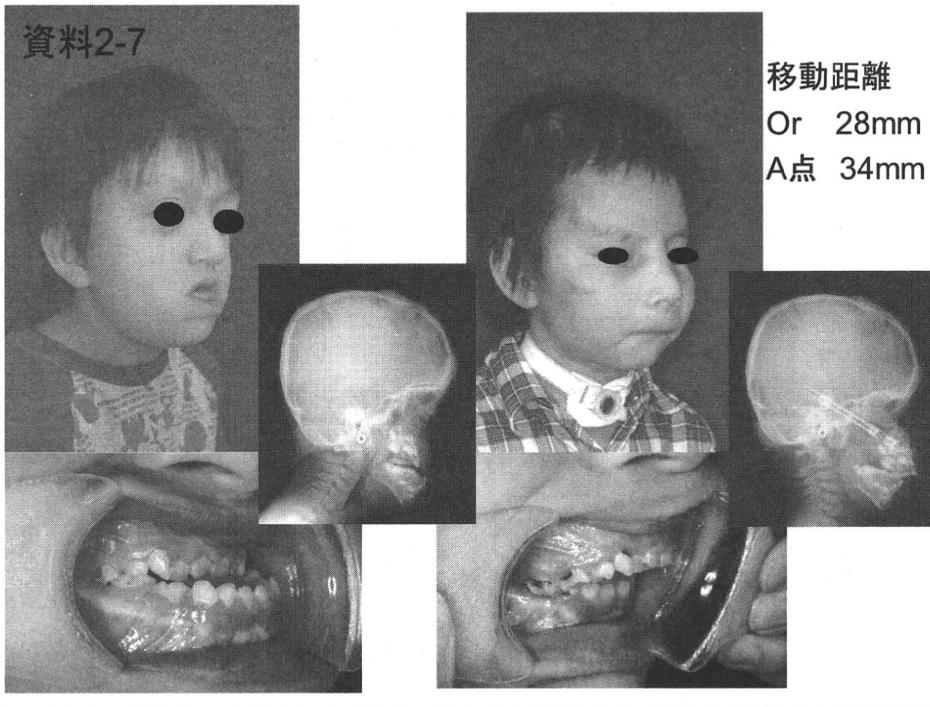


資料2-6

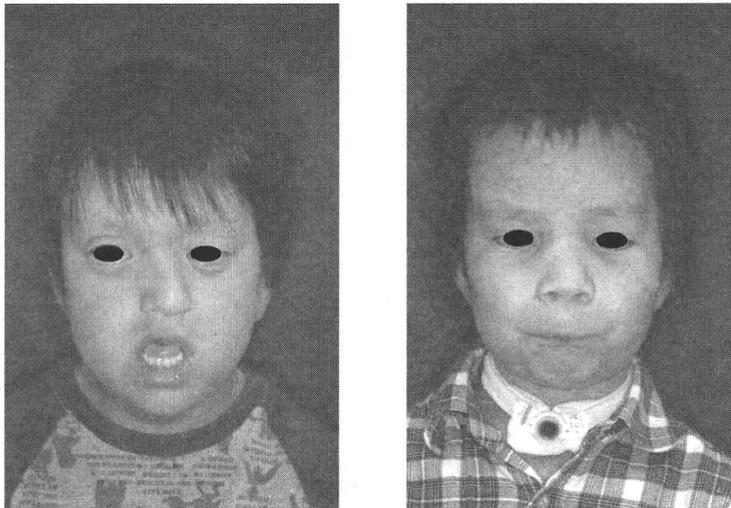


・延長方向は、創内型延長装置の装着位置に規定されない

資料2-7



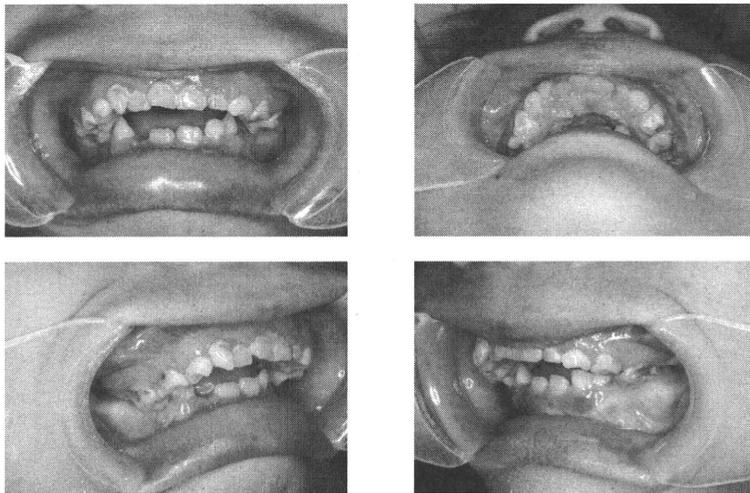
資料2-8



資料2-9

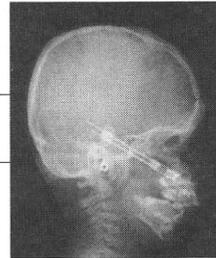
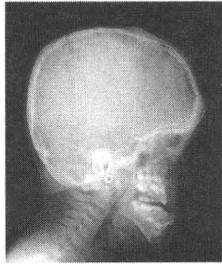


資料2-10



資料2-11 側面頭部X線規格写真の

重ね合わせ



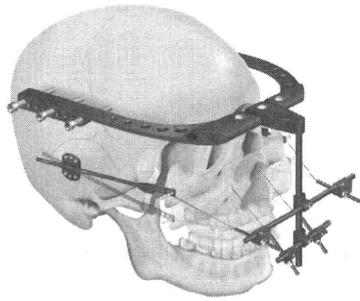
黒:術前
赤:術後

移動距離
Or 28mm
A点 34mm

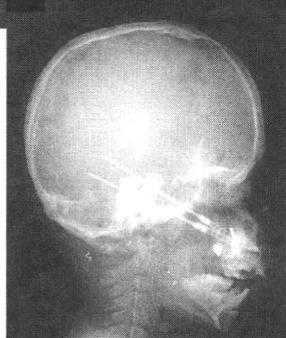
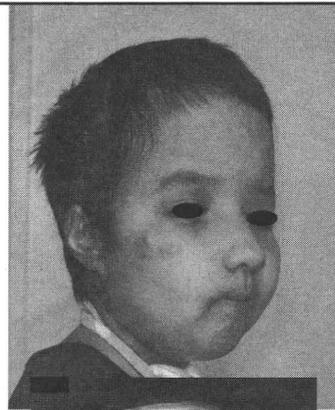
資料2-12 症例2 8歳 クルーゾン



資料2-13



資料2-14



資料2-15



資料2-16

本システムの利点

1. 再現性の良いOvercorrectionが可能である。
2. 創内骨延長装置が左右対称に固定されていなくても、術後に方向の制御が可能である。
3. Consolidation期間を待たずに、延長終了直後に創外型骨延長装置を抜去可能である。
4. Transmaxillary K-wireにより脆弱なzygomaticomaxillary sutureの骨折を予防することができる。
5. 抜去は、頭皮冠状切開を必要とせず容易である。

考察

1. 本システムの良い適応は、再手術のために癒痕が強い症例や延長量が20mm以上の症例であると考えられた。
2. 就学前後のLe Fort IIIは、OrやA点の予定位置決定が難しい。他の骨切り(Le Fort I, II)を併用することが望ましいと考えられた。

II. 分担研究報告書

厚生労働科学研究費補助金 (難治性疾患克服研究事業)

総括研究報告書

症候性頭蓋縫合早期癒合症に対する「軟骨間葉系幹細胞」を用いた軟骨再生療法の開発

-ヒト耳介軟骨膜由来「軟骨間葉系幹細胞」を用いた新規弾性軟骨再構築法の開発-

研究協力者 武部貴則

分担研究者 谷口英樹

研究要旨

頭蓋縫合早期癒合症の組織変形に対する現在の標準的な治療法では、広範な変形に対する治療は困難であり、長期的な形態保持性の観点からも満足が行く臨床成績が得られていない。そこで、これらの課題を克服しうる新たな治療法の一つとして、組織再生工学を用いたヒト弾性軟骨の臨床的再構築法の開発が待望されている。我々は、低侵襲操作で採取可能なヒト耳介軟骨膜中から高い増殖能、多分化能、自己複製能などの特徴を有する軟骨幹/前駆細胞を分離することに成功した。このヒト軟骨幹/前駆細胞は、*in vitro* で耳介軟骨細胞と同等の軟骨基質産生を行うことが確認されただけでなく、重症免疫不全マウスへの皮下移植により長期形態保持性に優れたヒト弾性軟骨組織を再構築した。我々が開発したヒト弾性軟骨再構築法は、次世代の弾性軟骨再生治療の実現にとって革新的な方法となる可能性がある。

A. 研究目的

頭蓋・顎・顔面領域の先天奇形や外傷に起因する組織変形に対する新しい治療法の開発は、全世界で100万人以上の患者に待ち望まれている極めて重要な臨床的解決課題である。現在の標準的な治療法は、自家軟骨/骨組織を移植する方法や合成高分子化合物などの医用材料を移植する方法である。しかし、自己組織移植では、採取量の制限と採取部位の侵襲が軟骨/

骨組織移植に共通した問題である。また、軟骨組織移植に伴う経年的な組織変形と吸収や、骨組織移植に伴う経月的な組織吸収も極めて大きな問題となっており臨床的に満足いく長期成績が得られていない。医用材料を移植する方法においても、それらが人体にとり異物であることから、感染や炎症、それらに起因する皮膚穿孔などが生じることが知られており、これらの問題が未解決である。このような問題

点を克服することの可能な新しい治療法として、組織再生工学を用いたヒト弾性軟骨の臨床的再構築法の開発が切望されている。

ヒト弾性軟骨の再構築法に適応可能な細胞源として、幾つかの可能性が示唆されている。ヒト耳介軟骨細胞は良好な基質産生能などの優位性を有するものの、採取部位への侵襲に加え、自己複製能を有する幹細胞が存在しないために細胞寿命に起因する長期的な組織維持の困難性などの問題点を抱えている。骨髄由来のヒト間葉系幹細胞は、これらの諸問題を解決できる可能性を持つ細胞の一つであるが、骨髄穿刺の侵襲が大きいこと、成熟軟骨細胞への分化能が極めて低いこと、血管侵入や石灰沈着をきたすことなどの様々な問題を抱えているため実用化の可能性は低い。他にも脂肪組織由来のヒト間葉系幹細胞など候補となる細胞は存在するものの、いずれも成熟軟骨細胞への分化能力が低く、弾性軟骨における細胞外マトリックスの産生能は全く確認されていないことから、ヒト弾性軟骨の再構築法に応用可能な優れた細胞源は見いだされていないのが現状である。

本研究では、全く解明の進んでいないヒト弾性軟骨における軟骨間葉系幹細胞の分離・同定を、低侵襲操作で臨床的に採取が可能な耳介軟骨膜部を対象として試みた。また、分離したヒト軟骨間葉系幹細胞の操作技術を検討し、臨床応用の可能な優れた弾性軟骨再構築法の開発を行った。さら

に、我々が新規に開発した革新的な生分解性足場材料がヒト弾性軟骨の再構築に有用か否かを検討した。

B. 研究方法

1. Isolation and cultivation of human perichondrocytes

横浜市立大学附属病院倫理委員会より承認を得て(approval #03-074), 30人の小耳症患者より、手術の際に余剰となる残存耳介弾性軟骨を供与頂き研究を遂行した。軟骨膜部を分離し、組織を細切後、細胞を分取した。各組織の細胞懸濁液はナイロンメッシュ (BD Biosciences) で濾過し、PBSによる洗浄を3度行った。細胞懸濁液は、37 °C, CO₂ 5%に設定したインキュベータで 10 % fetal bovine serum (MOREGATE) , 1 % Antibiotic Antimycotic Solution (SIGMA) を含有する Dulbecco's modified Eagle medium and Ham's F-12 medium (日水製薬) を含む増殖培地により培養を行った。尚、長期増殖能の評価では、継代に際し血球計算板を用いて細胞数をカウントした後、1200 cells/cm²の密度で35mmディッシュに播種し、コンフルエントに達した際に同様に継代をする、という操作を繰り返した。

2. In vitro colony assay

各細胞を、35 mm 細胞培養ディッシュに 52 cells/cm²の密度で播種した。14日間の増殖培地による培養後、コロニー数のカウントを行った。カウントに際してはギムザ染色 (武藤化学薬品)

による染色を行った後、50 個以上の細胞集団を 1 コロニーとし定量した。

3. Multipotent differentiation in vitro
軟骨分化誘導に関しては積層化培養法を用いた。各細胞を 2.5×10^4 cells/cm² の密度で播種し、播種後 48 時間まで増殖培地で培養を行い、その後は L-ascorbic acid 2-phosphate (SIGMA), Dexamethasone (SIGMA), human-recombinant Insulin-like Growth Factor- I (SIGMA), human-recombinant basic Fibroblast Growth Factor (Wako) を添加した分化誘導培地を用いて培養を行った。5 日間の培養の後、さらに 2.5×10^4 cells/cm² の細胞を上にも播種し、同様の手順で培養を行うという操作を計 2 回繰り返した。骨および脂肪分化誘導に関しては、以前の報告に準じた。

4. Gene expression analysis

軟骨・脂肪・骨分化能を調べるため、Reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), 並びに quantitative PCR (qPCR) を行った。RT-PCR による各分化関連遺伝子の発現の確認には以下のプライマーを用いた。type I collagen(COL1A1), type II collagen(COL2A1), type X collagen(COL10A1), aggrecan(ACAN), elastin(ELN), lipoprotein lipase(Lpl/LPL), C/EBP α (Cebpa/CEBPA), aP2(Fabp4), Adipsin(CFD), PPAR γ (PPARGC1A), runt-related transcription factor 2 (Runx2), alkaline phosphatase (ALPL)

を用いた。qPCR には、TaqMan® Gene Expression Assays (Applied Biosystems) の COL1A1 : Hs00266273_ml, COL2A1 : Hs00164099_ml, CSPG2 : Hs01007933_ml, ELN : Hs00355783_ml, FBN1 : Hs00171191_ml の primer/probe set を用いた。

5. ELISA

積層化培養による軟骨分化誘導下で培養 1, 3 週間目に、培養上清を回収した。上清中に分泌されたプロテオグリカン, エラスチン, コラーゲンを、それぞれ BLYSCAN, FASTIN, SIRCOL assays(Biocolor)のキットを用いて定量測定を行った。

6. In vivo transplantation

軟骨分化誘導を行った細胞をその産生基質とともにシリンジに回収し、重症免疫不全マウス(NOD/SCID)(三協)の背部皮下に 1 ml ずつ移植を行った。Scaffold に細胞を播種した群では、円柱上にくり抜いた pCol-HAp/ChS (Tokyo Institute of Technology), Collagen sponge(テルモ), ハイドロキシアパタイトスキャフォールド(オリンパス) に各々 3 カ所ずつ計 1ml の細胞浮遊液を添加し、NOD/SCID マウスの背部皮下に移植した。移植後、4 週目、12 週及び 40 週目に摘出を行い、組織学的に検討した。尚、実験動物の飼育、取り扱いに関しては横浜市立大学医学部動物実験センターの規定に基づき行った。

7. Histochemical and immunohistochemical analysis

組織切片, または培養細胞を固定した後, H&E, アルシアンブルー, エラスチカ・ワンギーソン, アリザリンレッドS, オイルレッドO (武藤化学薬品) で組織化学染色を行った. 免疫組織化学染色に際しては, rabbit anti-human type I collagen monoclonal antibody(Col1) (MONOSAN), mouse anti-chicken type II collagen polyclonal antibody(Col2) (CHEMICON) を用いて 4 °C, over night で反応させた. 洗浄後, 適切な動物種に対する Alexa488- and/or Cy3-conjugated 二次抗体 (1:800, Molecular Probes) を添加し, 室温で 1 時間反応させた. その後 4',6-diamidino-2- phenylindole (DAPI) を添加した FA Mounting Fluid (BD Biosciences) にて核染色及び封入を行い, LSM510 Laser Scanning Microscope (ZEISS) を用いて観察, 画像を撮影した.

8. Statistical analysis

データは, 少なくとも 3 人以上の独立した検体による実験から得た mean ± s.d. を表記した. 統計学的解析には, まず 3 あるいは 4 群のデータに対し Kruskal Wallis-H test を行い, $P < 0.01$ と判定された場合に, Mann-Whitney's U test with Bonferroni correction による多重比較検定を行った. 有意確率 P 値が $P < 0.001$ または $P < 0.01$ を満たす場合を統計学的有意差ありと判定した.

9. 倫理面への配慮

前述検体の供与に関して, 当院の倫理委員会の承認を得て施行した. また, 患者へは目的と方法, および想定される合併症とその対処法を説明し, 文章による同意を得た. さらに倫理面へ配慮し, 研究への参加は個人の意思を尊重した. 得られたデータに関しても ID や氏名などの個人情報を含めず匿名化して行った.

C. 研究結果

High proliferative capacity of human perichondrocytes

我々は高い増殖能, 多分化能, 自己複製能, 組織再構築能などの幹細胞としての特徴を有する細胞集団は耳介軟骨膜部に存在するものと仮定した. これらの仮説を実証するため, 小耳症患者から摘出した残存耳介軟骨を対象として, ヒト弾性軟骨組織における軟骨間葉系幹細胞の分離・同定を試みた. 残存耳介軟骨を提供した患者の性別に偏りはなく, 平均年齢は 10.6 ± 1.4 歳であった. 残存耳介軟骨を外科的に摘出後, 軟骨膜部, 軟骨-軟骨膜移行部, 軟骨実質部の三層に分離し, 各々から単離した細胞をそれぞれ培養した (Fig.1a). まず各層由来細胞の増殖能を比較するため, 低密度培養 (52 cells/cm^2) によるクローン性コロニー形成能の解析を行った. 培養 4 週後, 各細胞からクローン性コロニーが形成された (Fig.1b). 形成されたクローン性コロニー数は, 播種細胞 500 個あたり軟骨膜細胞で 23.9 ± 4.5 個, 軟骨

膜-軟骨移行部細胞で 9.9 ± 6.8 個、軟骨細胞で 2.3 ± 0.4 個であり、軟骨膜細胞は他と比べて極めて高いコロニー形成能を有していた (Fig.1c).

軟骨膜細胞の長期的な増殖能を継代培養系で解析した. 形態学的には、各層由来細胞は長期培養後 (12w~) には扁平化し、線維芽細胞様の形態を有するようになった (Fig.1d). 196 日間にわたって 14 回の継代培養を行った結果、 9.42×10^3 個の軟骨膜細胞は、 1.20×10^{27} 個まで約 1.27×10^{22} 倍に増殖した. 一方、 9.42×10^3 個の軟骨細胞は、 1.26×10^{24} 個まで約 1.30×10^{19} 倍に増殖した. すなわち、軟骨膜細胞は軟骨細胞に比べ約 949 倍の子孫細胞を生み出す能力を有していることが判明し、有意に高い増殖活性をもつことが明らかとなった (Fig.1e).

In vitro elastic cartilage differentiation potential of human perichondrocytes

軟骨膜細胞の弾性軟骨への分化能を評価することを目的として、積層化培養法を用いて軟骨細胞への分化誘導を行った (Fig.2a). 軟骨膜細胞は積層化を行うことによって、プロテオグリカン、Type II collagen(Col 2)を産生する軟骨細胞へ分化することが確認された (Fig.2b). 軟骨膜細胞から分化した軟骨細胞は種々のムコ多糖類を分泌するようになり、培養液は高い粘性を有する基質様性状へと変化した.

軟骨細胞への分化能を定量的に検討するため、リアルタイム PCR を用いた弾性軟骨分化関連遺伝子の発現

変化を解析した. 軟骨膜細胞を積層化培養することにより、弾性軟骨に特徴的な基質である versican(CSPG2), elastin (ELN), alpha 1 type II collagen (COL2A1), fibrillin 1 (FBN1)遺伝子の発現レベルは、各々4.2倍、9.6倍、2.1倍、17.2倍に著名に上昇することが確認された (Fig.2d-g). 一方、軟骨膜部に特徴的な alpha 1 type I collagen(COL1A1)の発現は0.18倍に低下した (Fig.3c). ELISA を用いて、弾性軟骨組織の細胞外マトリックスであるプロテオグリカン、エラスチン、コラーゲン産生能の解析を行ったところ、積層化した軟骨膜細胞においては各々 17.5 ± 4.3 , 235.6 ± 19.9 , $61.8 \pm 7.5 \mu\text{g/ml}$ の基質産生が確認された. 驚くべき事に、この基質産生能は、同様に積層化した軟骨細胞のプロテオグリカン、エラスチン、コラーゲン産生能 (各々 19.0 ± 1.3 , 234.0 ± 16.3 , $55.8 \pm 4.9 \mu\text{g/ml}$) と同等であることが判明した (Fig.2h-j).

In vitro multi-differentiation and self-renewal capabilities of human perichondrocytes

軟骨細胞への分化能に加え、軟骨膜細胞の脂肪および骨分化能の有無を検討した. 脂肪分化誘導培地による3週間の培養により、軟骨膜細胞は卵円形の形態に変化し、Oil Red Oにて染色される脂肪滴を形成することが確認された. また、骨分化誘導培地による3週間の培養により、軟骨膜細胞はAlizarin Red Sにて染色されるCaを多量に産生することが確認された

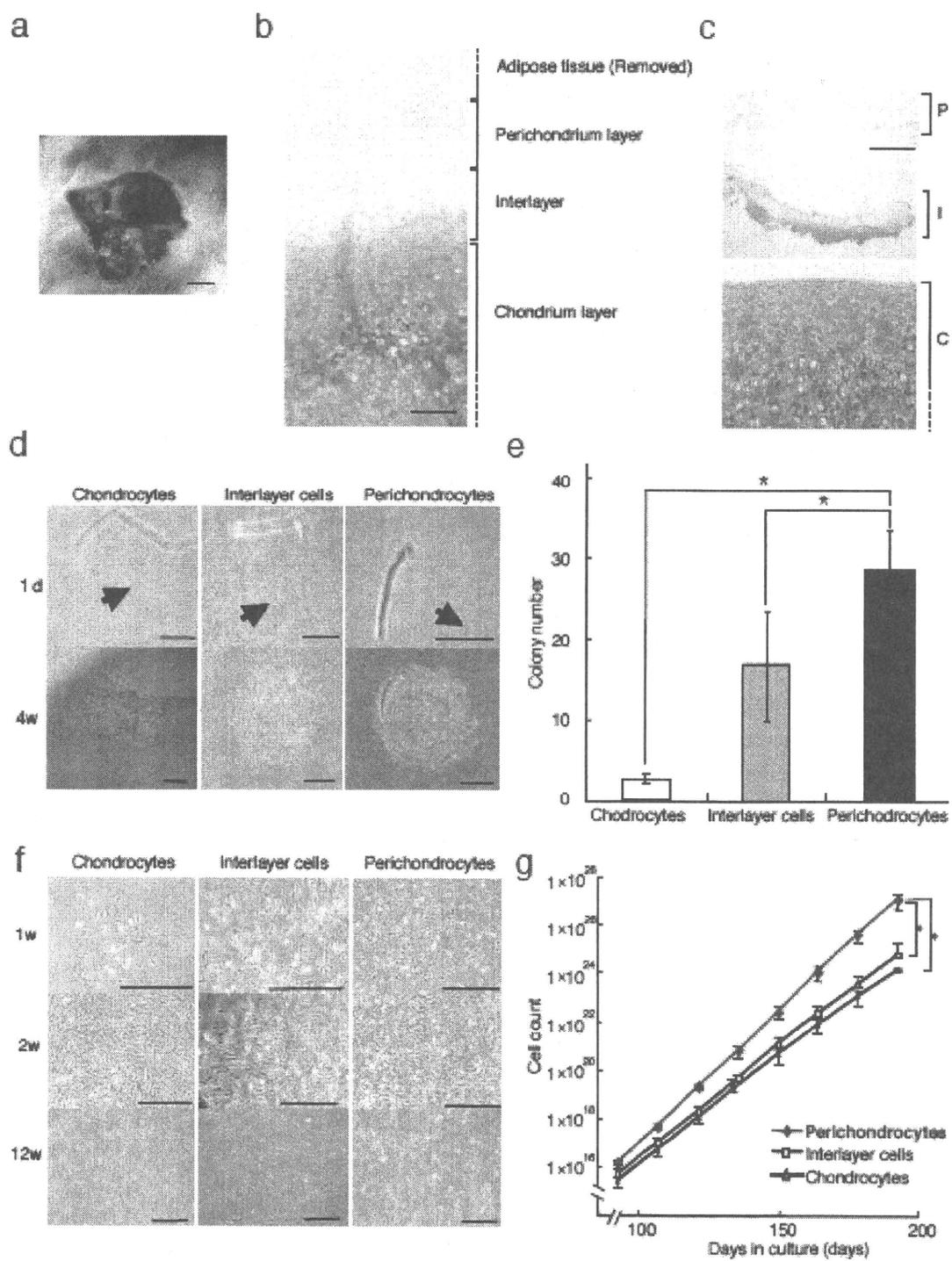
(Fig.3a 右). 軟骨細胞を対象として同様の分化誘導を行ったところ, 脂肪滴形成も Ca 沈着も認めなかったことから, 軟骨膜細胞のみが軟骨分化能に加え脂肪・骨への多分化能をもつ事が示された (Fig.3a 左).

長期間にわたって, 多分化能を有した幹/前駆細胞が自己複製により維持されていることを証明するため, 継代培養を行った軟骨膜細胞を対象として多分化能の解析を行った. 第3継代, 7継代, 10継代培養後の各軟骨膜細胞は, 細胞化学染色, RT-PCR の結果より何れも軟骨, 脂肪, 骨への多分化能を維持していたことから, これらの細胞のうち少なくとも一部は自己複製能を有している事が示唆された (Fig.3b,c).

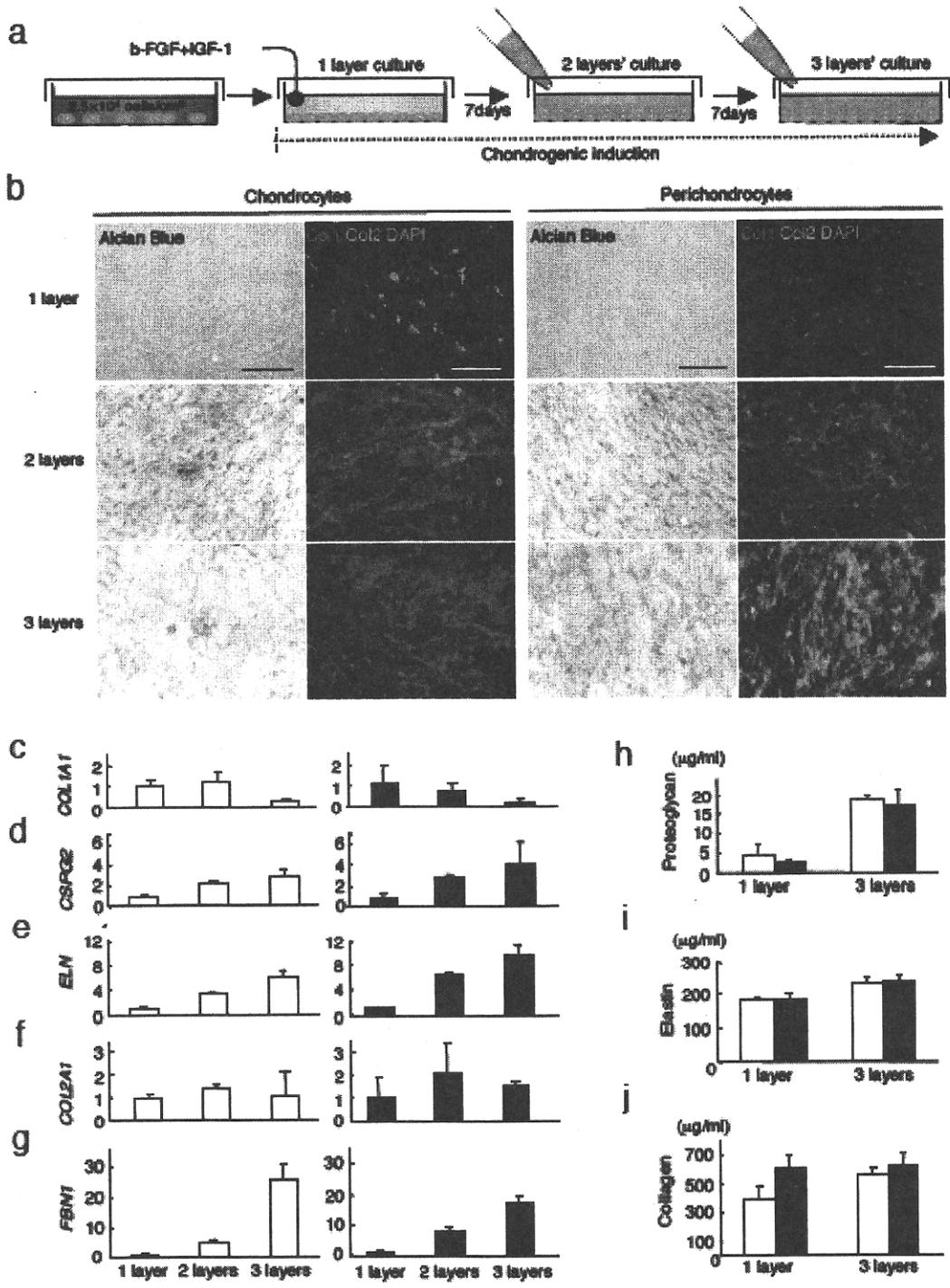
In vivo tissue reconstruction capability of human perichondrocytes

我々は高い軟骨細胞への分化能や自己複製能などの特徴を有している軟骨膜細胞を用いれば, in vivo において優れた弾性軟骨再構築法を新規開発できるものと考えた. このアプローチの実現可能性を検討するため, ヒト軟骨膜細胞を軟骨分化誘導の後, 粘性を帯びた培養上清とともに重症免疫不全マウスの皮下に移植した. 尚, 比較のためヒト軟骨細胞についても同

様の手順で移植を行った. 軟骨膜細胞は, 移植3ヶ月目に軟骨様組織形成した (Fig.4a,i). 組織学的解析から, 軟骨膜細胞は, 軟骨細胞と同様に in vivo で成熟軟骨細胞へと分化し, その産生基質であるプロテオグリカンや弾性線維に富む弾性軟骨組織を再構築することが判明した (Fig.4b-g,j-o). 一方, 免疫組織化学染色からは軟骨膜細胞より再構築された組織においてのみ, Col 2 陽性弾性軟骨組織の周囲を Type I collagen (Col 1) 陽性の膜様組織が被覆していることが確認された (Fig.4h,p). 長期間に渡って再構築組織が維持されていることを示すため, 軟骨膜細胞を移植後6ヶ月並びに10ヶ月目に摘出した組織においても同様の解析を行った. いずれの時点においても摘出組織は Col 1 陽性膜様組織で被覆されており, 成熟軟骨細胞とその産生基質から構成される弾性軟骨組織であることが判明した. 一方, 腫瘍形成や, 骨髄由来間葉系幹細胞で見られる様な線維性組織形成, 血管侵入や石灰化沈着は全く観察されなかった. これらの結果から, 軟骨膜細胞は in vivo で生体組織と同様に軟骨実質部, 軟骨膜部からなる組織構造を持つ弾性軟骨組織を長期的に再構築することが判明した.



(Fig.1) High proliferative capacity of human perichondrocytes



(Fig.2) In vitro chondrogenic potential of human perichondrocytes.