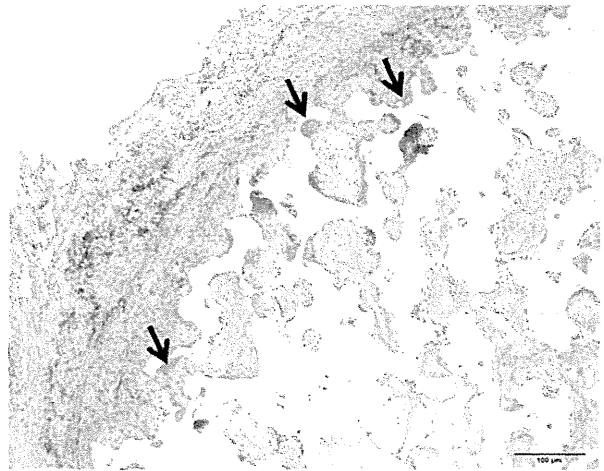
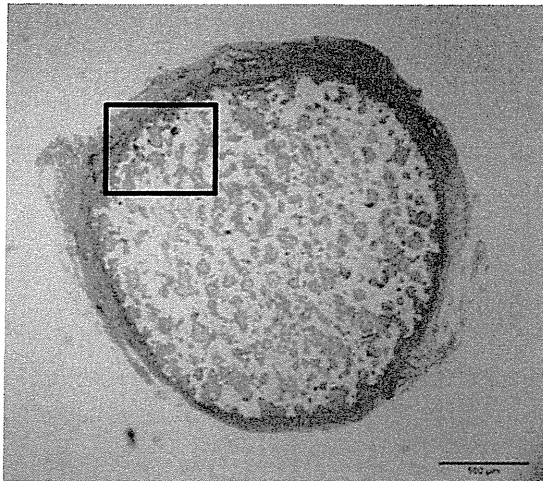


- cell injection results in bone formation. *J Tissue Eng Regen Med.* 2010; 4: 404-411.
9. M. Akahane, T. Ueha, T. Shimizu, H. Shigematsu, A. Kido, S. Omokawa, K. Kawate, T. Imamura, Y. Tanaka : Cell Sheet Injection as a Technique of osteogenic Supply. *Int J of Stem Cells.* Vol. 3, No. 2, 2010.
10. M. Akahane, T. Ueha, T. Shimizu, Yusuke Inagaki, Akira Kido, Tomoaki Imamura, Kenji Kawate, Yasuhito Tanaka. Increased osteogenesis with hydroxyapatite constructs combined with serially-passaged bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cell Discovery* 2, 133-140, 2012.

・ 図 1 生体内での細胞シートの骨形成能の検討結果 (組織像)

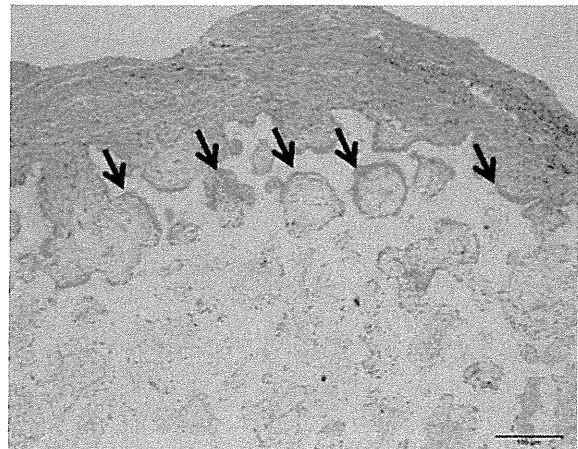
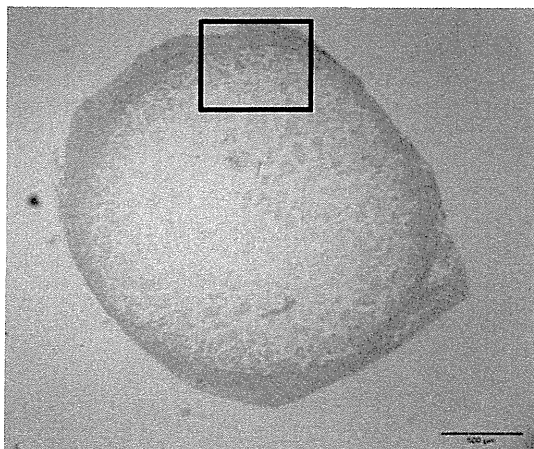
A. デキサメサゾン : 10nM

左図の枠内の拡大写真

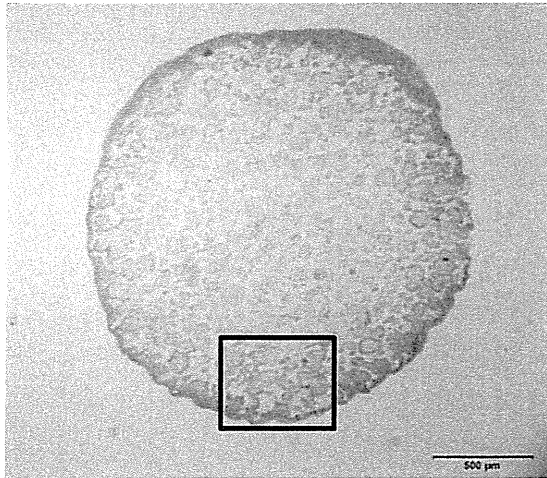


B. デキサメサゾン : 30nM

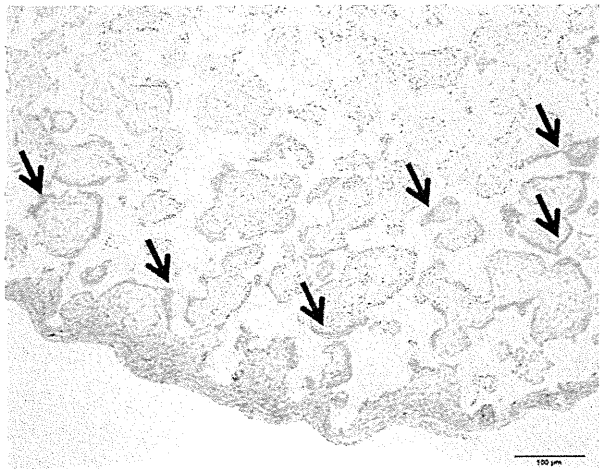
左図の枠内の拡大写真



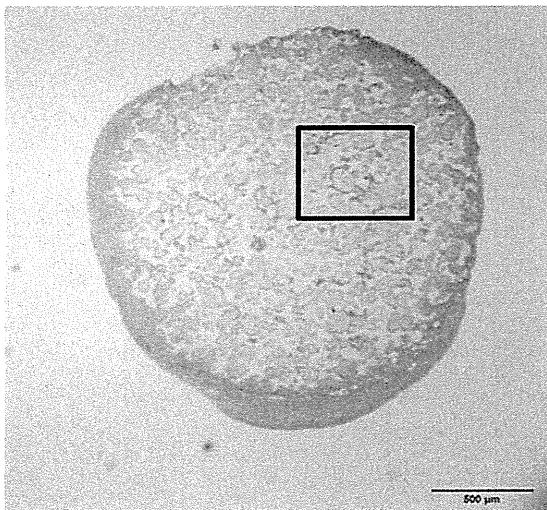
C. デキサメサゾン : 50nM



左図の枠内の拡大写真



D. デキサメサゾン : 100nM



左図の枠内の拡大写真

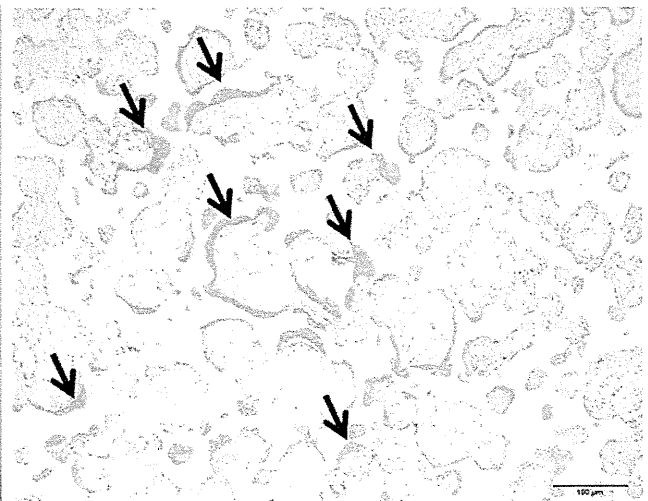
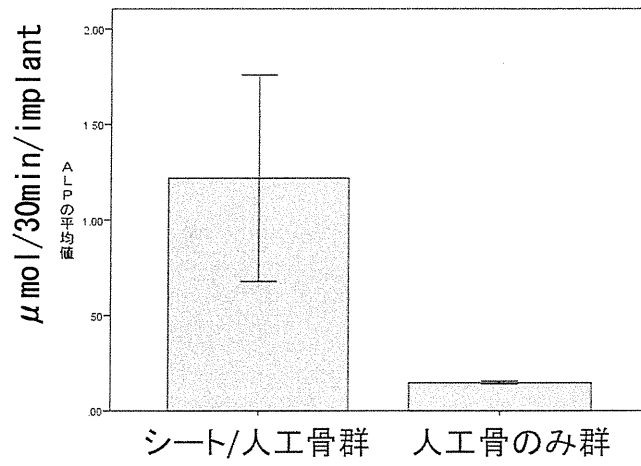


図2 生体内での細胞シートの骨形成能の検討結果（生化学的評価）

アルカリフォスファターゼ活性



Ⅲ. 研究発表に関する一覧表

・論文

	発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	頁	出版年
1	Yusuke Inagaki, Kota Uematsu, Manabu Akahane, Yusuke Morita, Munehiro Ogawa, Tomoyuki Ueha, Takamasa Shimizu, Tomohiko Kura, Kenji Kawate and Yasuhito Tanaka.	Osteogenic Matrix Cell Sheet Transplantation Enhances Early Tendon Graft to Bone Tunnel Healing in Rabbits.	BioMed Research International	84292	8	2013
2	T. Shimizu, M. Akahane, T. Ueha, A. Kido, S. Omokawa, Y. Kobata, K. Murata, K. Kawate, Y. Tanaka.	Osteogenesis of cryopreserved osteogenic matrix cell sheets.	Cryobiology.	66 (3)	326-332.	2013
3	Manabu Akahane, Tomoyuki Ueha, Takamasa Shimizu, Yusuke Inagaki, Akira Kido, Tomoaki Imamura, Kenji Kawate, Yasuhito Tanaka.	Increased osteogenesis with hydroxyapatite constructs combined with serially-passaged bone marrow-derived mesenchymal stem cells.	Stem Cell Discovery.	2(4)	133-140	2012
4	清水隆昌、川手健次、赤羽学、森田有亮、面川庄平、田中康仁	注入型骨移植を用いた偽関節治療における生体力学的考察	整形・災害外科	55 巻、11 号	1289-1292	2012

・学会発表

	発表者氏名	演題	学会名	日付	場所
1	Kenichi Nakano, Keiichi Murata, Takamasa Shimizu, Manabu Akahane, Shohei Omokawa, Yasuhito Tanaka.	Osteogenesis of Vascularized Tissue-Engineered Bone Scaffold	The 68th Annual Meeting of the American Society for Surgery of the Hand	2013/10/3-5	San Francisco, USA

2	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-	第 33 回整形外科バイオマテリアル研究会	2013/12/7	奈良ホテル(奈良)
3	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、大西正宣、面川庄平、川手健次、田中康仁	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	第 20 回奈良・横浜・京都バイオメカカンファレンス	2013/12/21	奈良県立医科大学(奈良)
4	吉良務、赤羽学、清水隆昌、中野健一、小泉宗久、川手健次、田中康仁	簡便な細胞シートの保存および輸送条件の検討	第 33 回整形外科バイオマテリアル研究会	2013/12/7	奈良ホテル(奈良)
5	倉知彦、赤羽学、清水隆昌、加藤優喜、森田有亮、上羽智之、内原好信、藤間保晶、川手健次、田中康仁	凍結保存骨髄間葉系幹細胞由来細胞シートの注入移植による骨形成能の評価	第 28 回日本整形外科学会基礎学術集会	2013/10/17-18	幕張メッセ、国際会議場(千葉)
6	清水隆昌、赤羽学、森田有亮、上羽智之、稲垣有佐、面川庄平、村田景一、小島康宣、藤間保晶、川手健次、田中康仁	大腿骨偽関節に対する骨芽細胞シートによる治療	第 28 回日本整形外科学会基礎学術集会	2013/10/17-18	幕張メッセ、国際会議場(千葉)
7	赤羽学、清水隆昌、上羽智之、稲垣有佐、倉知彦、内原好信、中野健一、藤間保晶、川手健次、今村知明、田中康仁	簡便な細胞シートの輸送条件の検討	第 28 回日本整形外科学会基礎学術集会	2013/10/17-18	幕張メッセ、国際会議場(千葉)

8	吉良務、清水隆昌、赤羽学、面川庄平、小島康宣、村田景一、中野健一、仲西康顕、藤間保晶、川手健次、田中康仁	間葉系幹細胞シートの皮弁に対する影響の検討	第28回日本整形外科学会基礎学術集会	2013/10/17-18	幕張メッセ、国際会議場（千葉）
9	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製における骨芽細胞シートの有用性	第28回日本整形外科学会基礎学術集会	2013/10/17-18	幕張メッセ、国際会議場（千葉）
10	稲垣有佐、赤羽学、上松耕太、藤間保晶、小川宗宏、上羽智之、清水隆昌、田中寿典、川手健次、田中康仁	骨髄間葉系幹細胞の骨形成に対する低酸素環境の影響	第28回日本整形外科学会基礎学術集会	2013/10/17-18	幕張メッセ、国際会議場（千葉）
11	内原好信、赤羽学、森田有亮、中崎真太郎、上羽智之、清水隆昌、倉知彦、藤間保晶、川手健次、田中康仁	培養骨芽細胞シートによる放射線照射自家処理骨の骨形成	第28回日本整形外科学会基礎学術集会	2013/10/17-18	幕張メッセ、国際会議場（千葉）
12	赤羽学、清水隆昌、面川庄平、今村知明、田中康仁	細胞シート輸送をめざした保存条件の検討	第56回日本手外科学会学術集会	2013/4/18-19	神戸国際会議場（兵庫）
13	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	2013/4/18-19	神戸国際会議場（兵庫）
14	稲垣有佐、上松耕太、赤羽学、小川宗宏、川手健次、田中康仁	骨形成細胞シートによる家兎移植腱骨孔間治癒の促進	第120回中部日本整形外科災害外科学会・学術集会	2013/4/5-6	ホテルアバローム紀の国（和歌山）

15	倉知彦、赤羽学、清水隆昌、藤間保晶、川手健次、田中康仁	冷凍保存骨髄間葉系幹細胞由来細胞シートへの注入移植による骨形成能の評価	第120回中部日本整形外科学会・学術集会	2013/4/5-6	ホテルアバローム紀の国（和歌山）
16	稲垣有佐、上松耕太、赤羽学、森田有亮、藤間保晶、小川宗宏、上羽智之、清水隆昌、倉知彦、川手健次、田中康仁	骨形成細胞シートによる移植腱骨孔間治癒の促進	第19回横浜・京都・奈良バイオメカニクスカンファレンス	2012/12/22	奈良県立医科大学（奈良）
17	藤間保晶、大串始、土肥祥子、谷掛洋平、岩田栄一郎、高澤伸、赤羽学、田中康仁	再生医療技術による組織構築～薬剤を用いた骨移植法の基礎的研究～成能の評価	第19回横浜・京都・奈良バイオメカニクスカンファレンス	2012/12/22	奈良県立医科大学（奈良）
18	倉知彦、赤羽学、清水隆昌、上羽智之、内原好信、藤間保晶、川手健次、田中康仁	冷凍保存骨髄間葉系幹細胞由来細胞シートによる骨形成能の評価	第19回横浜・京都・奈良バイオメカニクスカンファレンス	2012/12/22	奈良県立医科大学（奈良）
19	清水隆昌、赤羽学、面川庄平、小島康宣、村田景一、中野健一、川手健次、田中康仁	冷凍保存骨髄間葉系幹細胞由来細胞シートへの骨形成評価	第32回整形外科学会バイオマテリアル研究会	2012/12/01	東京慈恵会医科大学（東京）
20	上羽智之、赤羽学、清水隆昌、中野健一、倉知彦、川手健次、田中康仁	高齢ラットにおける骨芽細胞シートへの有用性	第32回整形外科学会バイオマテリアル研究会	2012/12/01	東京慈恵会医科大学（東京）
21	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回整形外科学会バイオマテリアル研究会	2012/12/01	東京慈恵会医科大学（東京）
22	谷掛洋平、中島弘司、林宏治、加藤宣伸、藤間保晶、大串始、	FibronectinをコートしたβTCPの骨形	第27回日本整形外科学会基礎学術集会	2012/10/26-27	名古屋国際会議場（名古屋）

	土肥祥子、赤羽学、高澤伸、川手健次、田中康仁	成能			
23	藤間保晶、土肥祥子、大串始、谷掛洋平、高澤伸、赤羽学、田中康仁	骨髄由来間葉系細胞搭載人工骨の骨形成能に対するポリADPリボースポリメラーゼ阻害剤の影響	第27回日本整形外科学会基礎学術集会	2012/10/26-27	名古屋国際会議場(名古屋)
24	清水隆昌、赤羽学、森田有亮、面川庄平、小島康宣、村田景一、中野健一、上羽智之、藤間保晶、川手健次、田中康仁	骨芽細胞シートを用いたラット大腿骨偽関節治癒過程の特徴	第27回日本整形外科学会基礎学術集会	2012/10/26-27	名古屋国際会議場(名古屋)
25	内原好信、赤羽学、上羽智之、清水隆昌、倉智彦、藤間保晶、川手健次、田中康仁	培養骨芽細胞シートを用いた放射線照明白家処理骨の骨形成	第27回日本整形外科学会基礎学術集会	2012/10/26-27	名古屋国際会議場(名古屋)
26	稲垣有佐、上松耕太、赤羽学、小川宗宏、藤間保晶、倉智彦、粥川陽介、森田有亮、川手健次、田中康仁	骨形成細胞シートによる家兎移植健骨孔間治療の促進	第27回日本整形外科学会基礎学術集会	2012/10/26-27	名古屋国際会議場(名古屋)
27	中野健一、村田景一、清水昌隆、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	2012/10/26-27	名古屋国際会議場(名古屋)
28	清水隆昌、赤羽学、上羽智之、森田有亮、粥川陽介、藤間保晶、面川庄平、城戸顕、川手健次、田中康仁	細胞シートを用いた注入型骨移植による偽関節治療	第11回日本再生医療学会総会	2010/06/13-14	パシフィコ横浜(横浜)

IV. 研究発表に関する参考資料

添付資料参照

一般演題 1 組織再生 1

07 簡便な細胞シートの保存および輸送条件の検討

¹奈良県立医科大学医学部整形外科、²奈良県立医科大学医学部健康政策医学講座、
³奈良県立医科大学人工関節・骨軟骨再生医学講座

○吉良 務(きら つとむ)¹、赤羽 学²、清水 隆昌¹、中野 健一¹、小泉 宗久¹、
川手 健次³、田中 康仁¹

【背景】我々は骨芽細胞シートが偽関節治療や壊死骨再生等の骨組織再生に有用であることを報告してきた。将来的に細胞シートによる骨組織再生を広く普及させるためには、細胞シートを簡便な方法で保存・輸送することが必要となる。

【目的】輸送を目的とした細胞シート保存条件の検討を行ったので報告する。

【方法】7週齢F 344 ラットの大腿骨から採取した骨髄間葉系幹細胞を6cm径培養皿に 1×10^4 cell/cm²で播種した。二次培養を14日間デキサメサゾン・アスコルビン酸添加培地で行い、細胞シートを採取した。細胞シート1枚当たり10mlの培養液を入れた密閉チューブを用いて、6、12、24時間の保存を行った。保存温度は、37℃と室温(約22℃)の2条件とした。保存後、円盤状 β TCPと組み合わせてラット皮下に移植した。4週後、組織像とオステオカルシン量で骨形成を評価した。対照群は新鮮シート(保存なし)とし、各群n=5とした。

【結果】細胞シートは、37℃群と室温群ともに保存後もその形態を維持していたが、保存時間とともに収縮する傾向が見られた。組織像では全群で骨形成がみられた。オステオカルシン量は、37℃群、室温群ともに新鮮群に比べて有意な低下は見られなかった。

【考察】従来の輸送方法として、凍結保存や低温下(4℃)での輸送がある。最近では細胞シート輸送のための装置が開発されているが、比較的大型で高価な装置である。細胞シートによる骨組織再生を普及させるためには、細胞培養センター(CPC)を持たない医療機関への輸送も必要となるため、より簡便な保存・輸送方法が望まれる。本研究結果から、細胞シートを培養液とともに密閉チューブに入れて保存すれば室温でも輸送が行え、骨組織再生に利用できる可能性が示唆された。今後はより少ない培養液量での検討も必要であると考えられる。

シンポジウム2 人工骨は自家骨を超えられるか

34 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—

¹奈良県立医科大学整形外科、²市立奈良病院四肢外傷センター、³奈良県立医科大学健康政策医学、
⁴奈良県立医科大学人工関節骨軟骨再生医学

○中野 健一 (なかの けんいち)¹、村田 景一²、清水 隆昌¹、上羽 智之¹、
吉良 務¹、赤羽 学³、面川 庄平¹、川手 健次⁴、田中 康仁¹

【目的】我々は第32回本会において、培養骨髄由来間葉系幹細胞 (MSCs) から作製した高い骨形成能と血管誘導能を有する骨芽細胞シートを用いることで、血管柄付き人工骨 (vascularized tissue-engineered bone:VTEB) が作製可能であること報告した。今回、VTEB 作製における骨芽細胞シートの有用性を検討した。

【方法】11週齢 Fischer344 ラットの大腿動静脈を挙上し、径6mm、長さ10mm、気孔率75%の β TCP (Superpore®:PENTAX) に作製した側溝 (幅2mm) に組み合わせた。人工骨に血管束のみ組み合わせた群を control 群、細胞浮遊液搭載型人工骨に血管束を組み合わせた群を cell 群、人工骨と血管束の間に骨芽細胞シートを充填したものを sheet 群とした (各群 n=16)。術後2、4週でサンプルを摘出し、組織像および、real time PCR で ALP、OC、VEGF-A の mRNA 発現量を測定し比較検討を行った。

【結果】組織像では、移植後2週においてすべての群で人工骨内部にわずかな新生血管を認め、control 群および cell 群で骨形成は認めず、sheet 群で血管束周囲に骨形成を認めた。移植後4週において control 群および cell 群で人工骨内にわずかな新生血管を認めたが、cell 群では人工骨周縁に骨形成を認めた。一方、sheet 群では血管束から人工骨内へ放射状に旺盛な骨形成および新生血管を認めた。術後2週の mRNA 発現量は ALP、OC は cell 群、sheet 群ともに control 群と比較し高値を示した ($p < 0.001$) が、VEGF-A は cell 群が control 群および sheet 群よりも高値を示した ($p < 0.01$)。術後4週の mRNA 発現量は全項目で sheet 群が control 群および cell 群より高値を示した ($p < 0.001$)。

【考察】細胞浮遊液を搭載した人工骨と比較し、骨芽細胞シートを人工骨と組み合わせることで血管束周囲に旺盛な血管新生と骨形成が認められた。血管束を骨芽細胞シートが取り巻くことで人工骨内に骨形成能と血管誘導能の両方を促すことが可能であると考えられることから、VTEB 作製における骨芽細胞シートの有用性が示された。さらに、本方法により人工骨中心部から血管新生が促進されることから、さまざまな形状や大きさの 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ている。

1-5-9

凍結保存骨髄間葉系幹細胞由来細胞シートの注入移植による骨形成能の評価

倉知彦¹ 赤羽学² 清水隆昌¹ 加藤優喜³
森田有亮³ 上羽智之¹ 内原好信¹ 藤間保晶¹
川手健次¹ 田中康仁¹

【目的】われわれは培養骨髄由来の間葉系幹細胞(MSCs)を用いて、骨形成能をもつ細胞シートの有用性を報告してきた。今回、凍結保存した細胞シートの細胞活性と骨形成能を評価した。

【方法】7週齢ラットの大腿骨から骨髄を採取し、初期培養で獲得したMSCsを培養皿に播種後、デキサメサゾン・アスコルビン酸添加培地で二次培養を行い細胞シートを作製した。細胞シートの凍結は、凍結処理容器を用いて-85°Cに経速凍結処理し、24時間後液体窒素で保存した。解凍は、37°C恒温槽で急速解凍とした。比較は凍結保存した細胞シート(凍結群)と凍結保存しない作製直後の細胞シート(新鮮群)の2群にて行った。両群細胞シートの細胞活性をCell Counting Kit-8を用いて測定した。さらに同系ラットの背部皮下に両群細胞シートを注入移植した(n=5)。移植4週後に摘出し、X線像および組織像、アルカリフォスファターゼ(ALP)およびオステオカルシン(OC)mRNA発現の定量、ELISA法を用いたOC定量を行った。また、ラット大腿骨骨欠損モデルに凍結保存シート(凍結群)を移植し、6週後に力学試験を行い非移植群と比較した(n=6)。

【結果】細胞活性は凍結群では新鮮群の約7割であった。注入移植の摘出標本では、両群ともX線像で石灰化を認め、組織像でも骨組織を認めた。形成された骨組織のサイズは凍結群でやや小さかった。mRNA発現に有意差はなかったが、OC定量は有意に新鮮群で高値を示した。力学試験では、非移植群に比較し凍結群で有意に高かった(p<0.05)。

【考察と結論】われわれは新鮮細胞シートの注入移植で壊死骨や偽関節部に骨形成能を付与できることを報告している。本結果より、新鮮細胞シートと同様に、凍結保存細胞シートでも骨形成能を付与することができると思われる。一度の採取と培養操作で細胞シートを複数作製後保存し、必要時に解凍して注入を行うことができるため、凍結保存細胞シートは臨床医療において非常に有用と考える。

利益相反：無

¹奈良医大整形 ²奈良県立医科大学健康政策医学 ³同志社大学生命医科学部医工学学科 ⁴奈良県立医科大学人工関節骨軟骨再生医学講座

1-PC-3

大腿骨偽関節に対する骨芽細胞シートによる治療

清水 隆昌¹ 赤羽 学² 森田 有亮³ 上羽 智之¹稲垣 有佐¹ 面川 庄平¹ 村田 景一¹ 小島 康宣¹藤間 保晶¹ 川手 健次¹ 田中 康仁¹

【目的】偽関節に対してはさまざま治療法の有用性が実験的に証明されているが、多くが「偽関節モデル」に対する有用性の検証である。骨切部周囲の軟部組織の状態も良好である偽関節モデルに対し、実際の臨床における偽関節では周囲に著しい癒痕形成を認め、特に萎縮性の偽関節では、偽関節部の癒痕を掻爬せずに骨癒合を獲得するのは困難である。今回われわれは、完成した偽関節部に骨芽細胞シート(OMCS)を2通りの方法で移植しその有用性を検討した。

【方法】11週齢のFischer344ラットの右大腿骨の骨膜および骨髄を除去し、骨折部を髓内釘固定したあと、術後12週で骨切部が骨癒合していないことを確認し偽関節を作製した。OMCSは、7週齢Fischer344ラットの大腿骨から採取した骨髄由来の間葉系幹細胞を初期培養し、デキサメサゾン(10 nM)、アスコルビン酸(82 µg/ml)を添加した培地で二次培養することで作製した。OMCSの移植は、右大腿部に切開を加え、偽関節部の癒痕組織を直視下に掻爬し移植した群(open群)と、大腿部に切開を加えず、注射針で偽関節部を盲目的に掻爬し注入で移植した群(injection群)の2通りで行った。両群における偽関節の治癒過程をX線画像、µCT、組織像、力学試験を用いて評価した。

【結果】open群は、X線画像、µCT、組織像で偽関節部の良好な骨形成を認め、術後12週で全例骨癒合を認めたのに対し、injection群では、OMCSによる新生骨形成が限局される傾向を認め、骨癒合を得られなかったものが半数以上存在した。移植後12週での力学試験で両群に有意差を認めた。

【考察と結論】OMCSは、完成した偽関節に対しても偽関節部を骨癒合させることが可能であった。移植の方法に関しては、注入法を用いた低侵襲な偽関節治療を行う場合、偽関節周囲の癒痕組織を確実に切除することや、追加の注入などが必要であると考えられる。

利益相反：無

¹奈良医大整形 ²奈良医大健康政策 ³同大生命医科学部医工学 ⁴奈良医大人工関節・骨軟骨再生医学

日整会誌 (J. Jpn. Orthop. Assoc.) 87 (8) 2013

1-PC-4

簡便な細胞シート輸送条件の検討

赤羽 学¹ 清水 隆昌² 上羽 智之² 稲垣 有佐²倉 知彦² 内原 好信² 中野 健一² 藤間 保晶³川手 健次⁴ 今村 知明⁵ 田中 康仁²

【目的】われわれは骨芽細胞シートが硬組織再生、特に偽関節治療や壊死骨再生に有用であることを報告してきた。将来、細胞シートによる硬組織再生を広く普及させるためには、細胞シートを簡便な方法で保存・輸送することが必要となる。そこで今回、輸送を目的とした細胞シート保存条件の検討を行ったので報告する。

【方法】7週齢F344ラットの大腿骨から採取した骨髄間葉系幹細胞を6-cm径培養皿に 1×10^4 cell/cm²で播種した。二次培養を14日間デキサメサゾン・アスコルビン酸添加培地で行い、細胞シートをスクリーンパイプで採取した。細胞シート1枚当たり10 mlの培養液を入れた密閉チューブを用いて、6、12、24時間の保存を行った。保存温度は37°Cと室温(約22°C)の2条件とした。保存後、円盤状β-TCPと組み合わせてラット皮下に移植した。4週後、組織像とオステオカルシン量で骨形成を評価した。対照群は新鮮シート(保存なし)とし、各群n=5とした。

【結果】細胞シートは、37°C群と室温群ともに保存後もその形態を維持していたが、保存時間とともに収縮する傾向が見られた。組織像では全群で骨形成がみられた。オステオカルシン量は、37°C群、室温群ともに新鮮群と比較して有意な低下は見られなかった。

【考察と結論】従来の輸送方法として、凍結保存や低温(4°C)での輸送がある。最近では細胞シート輸送のための装置が開発されているが、比較的大型で高価な装置である。細胞シートによる硬組織再生を普及させるためには、細胞培養センター(CPC)を持たない医療機関へも輸送が必要となるため、より簡便な保存・輸送方法が望まれる。本研究結果から、細胞シートを培養液とともに密閉チューブに入れて保存することで、近隣地域内であればCPCで作製した細胞シートの室温輸送が行え、硬組織再生に利用できる可能性が示唆された。今後はより少ない培養液量での検討やヒト細胞を用いた研究が必要であると考えられる。

利益相反：無

¹奈良医大健康政策医学 ²奈良県立医科大学整形外科 ³国立病院機構奈良医療センター ⁴奈良県立医科大学人工関節・軟骨再生医学

1-PO-11

間葉系幹細胞シートの皮弁に対する影響の検討

吉良 務¹ 清水 隆昌¹ 赤羽 学² 面川 庄平³
小島 康宣¹ 村田 景一¹ 中野 健一¹ 仲西 康頭¹
藤間 保晶³ 川手 健次⁴ 田中 康仁¹

【目的】 間葉系幹細胞(MSCs)は血管内皮細胞増殖因子(VEGF)などの血管新生因子を産生しているため、局所血流の改善効果が期待できる。MSCsを用いた皮弁生着範囲や生着率の改善に関する報告は数多くあるが、細胞シートを用いた研究はまだまだ少ないため、今回われわれはMSCsシート皮下移植による皮弁の生着面積への影響を検討した。

【方法】 7週齢オスの Fisher344 (F344) ラットの大腿骨からMSCsを採取し、初期培養を行った。2週後に10 cm径培養皿に播種し、アスコルビン酸(82 µg/ml)添加標準培地で二次培養(14日間)を低酸素環境下(酸素濃度5%)で行い、SCシートとして採取した。15週齢オスのF344ラットの背部正中線の左右に、外側胸動脈、後肋間動脈および深腸骨回旋動脈を切離して遠位の皮膚のみを茎とする縦11 cm横3 cmの隣り合う2枚の乱軸型皮弁をデザインした。左の皮弁と皮下組織の間には短冊状に切れ目を入れたMSCsシートを挟み、7-0 ナイロン糸でMSCsシートを皮弁に縫着後に5-0 ナイロン糸で皮弁を元の位置に縫合した(シート群)。一方で右の皮弁は挙上後直ちに元の位置に5-0 ナイロン糸で縫合した(対照群)。7日後に皮弁の面積を計測し、壊死していない範囲の比を算出した。面積比を両群間で比較した(n=9)。

【成績】 全例で術部の感染は生じなかった。シート群では皮弁生着面積比は64.2±4.7%、対照群では63.1±6.1%となり両群間に統計学的に有意な差を認めなかった(p>0.05)。

【考察および結論】 MSCsシートはMSCs浮遊液の移植と異なり細胞外基質を有しているため、移植後でも局所にとどまり効果が長期間期待できる。本研究ではMSCsシートが皮弁への血流を改善する効果を期待したが、その効果が現れるよりも早く皮弁が壊死したと考えられる。今後、皮弁挙上前にMSCsシートを皮下注入することで皮弁生着範囲や生着率が改善するか検討する必要がある。

利益相反：無

¹奈良医大整形 ²奈良医大健康政策医学 ³国立病院機構奈良医療センター ⁴奈良医大人工関節骨軟骨再生医学

2-4-26

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

中野 健¹ 村田 景¹ 清水 隆昌¹ 上羽 智¹
吉良 務² 赤羽 学² 面川 庄平² 川手 健次³
田中 康仁¹

【目的】われわれはこれまでに、培養骨髄由来間葉系幹細胞(MSCs)から作製した骨芽細胞シートが高い骨形成能を有することを報告してきた。今回、血管柄付き人工骨(vascularized tissue-engineered bone: VTEB)作製における骨芽細胞シートの有用性を検討した。

【方法】11週齢 Fischer344 ラットの大腿動静脈を挙上し、径6mm、長さ10mm、気孔率75%のβTCP(SUPER-PORE: PENTAX社)に作製した側溝(幅2mm)に組み合わせた。人工骨に血管束のみ組み合わせた群をcontrol群、細胞浮遊液搭載型人工骨に血管束を組み合わせた群をcell群、人工骨と血管束の間に骨芽細胞シートを充填したものをsheet群とした(各群n=16)。術後2、4週でサンプルを摘出し、組織像およびreal-time PCRでALP、OC、VEGF-AのmRNA発現量を測定し比較検討を行った。

【結果】術後2週のmRNA発現量はcell群、sheet群ともにcontrol群と比較し全項目で高値を示したが、VEGF-Aはcell群がsheet群よりも高い値を示した。術後4週では、OCのmRNA発現量はsheet群がcell群よりも高い値を示した(p<0.01)が、ALP、VEGF-Aでは両群に有意差を認めなかった。術後4週の組織像で、cell群は人工骨周囲の骨形成と人工骨内のわずかな血管新生を認めたが、sheet群は、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。

【考察】細胞浮遊液を搭載した人工骨と比較し、骨芽細胞シートを人工骨と組み合わせることで血管束周囲に旺盛な血管新生が認められた。血管束を骨芽細胞シートが取り巻くことで人工骨内に骨形成と血管新生の両方を促すことが可能であると考えられることから、VTEB作製における骨芽細胞シートの有用性が示された。

利益相反：無

奈良医大整形外科¹ 奈良医大健康政策医学² 奈良医大人工関節骨軟骨再生医学³

2-5-1

骨髄間葉系幹細胞の骨形成に対する低酸素環境の影響

稲垣 有佐¹ 赤羽 学² 上松 耕太¹ 藤間 保晶¹
小川 宗宏¹ 上羽 智之¹ 清水 隆昌¹ 田中 寿典¹
川手 健次³ 田中 康仁¹

【目的】骨髄由来間葉系幹細胞(BMSC)は骨再生医療分野で盛んに用いられている。その骨形成能に影響を与える要因も多数報告されているが、低酸素環境はその1つである。本研究では、通常酸素と低酸素培養の組み合わせがBMSCの骨形成能に与える影響を検討した。

【方法】7週齢雄F344ラットの骨髄細胞を初期培養して得たBMSCを 1×10^4 cells/cm²で播種し、骨形成条件(デキサメサゾン、アスコルビン酸、 β グリセロリン酸添加)で14日間培養を行った。骨形成能に対する低酸素(5%酸素)の影響を次の4パターンで観察した。NN群:14日間通常酸素、NH群:前半7日通常酸素・後半7日低酸素、HN群:前半7日低酸素・後半7日通常酸素、HH群:14日間低酸素。骨形成能の評価として、ELISA法による培養液中オステオカルシン(OC)の継時的定量(n=4)および14日目のアルカリフォスファターゼ(ALP)活性(n=5)と沈着カルシウム(Ca)定量を行った(n=5)。また低酸素の細胞増殖能に対する影響について、BMSC播種後、通常培地培養3日目にMTS法で評価した。

【結果】位相差顕微鏡画像ではNN群、HN群に旺盛なCa沈着を認めた。HN群のOC量が早期から増加していた。14日目のCa量はHN群が他群より有意に高く、ALP活性はHH群がNH群に対して高値であった以外に群間差を認めなかった。MTS法では低酸素培養は有意に細胞増殖を促進した($p < 0.05$)。

【考察および結論】本研究結果から、BMSCの骨形成能は低酸素培養と通常酸素培養を組み合わせることで効果的に増加することが示唆された。細胞播種直後の低酸素環境が細胞増殖を促進する一方で、培養期間後半の低酸素は骨芽細胞への分化を抑制する可能性が考えられる。今後、詳細な機序の解明が必要ではあるが、通常酸素環境と低酸素環境を効果的に組み合わせることで、従来よりも高い骨形成能をもつ培養人工骨を作れる可能性もあり、再生医療における有用な手段となる可能性がある。

利益相反:無

¹奈良医大整形 ²奈良医大健康政策医学 ³奈良医大人工関節
骨軟骨再生医学

2-5-9

培養骨芽細胞シートによる放射線照射自家処理骨の骨形成

内原 好信¹、赤羽 学²、森田 有亮³、中崎 真太郎³、
上羽 智之⁴、清水 隆昌⁴、倉 知彦⁴、藤間 保晶⁵、
川手 健次⁶、田中 康仁⁴

【目的】われわれは骨髄間葉系幹細胞(MSC)から作製した培養骨芽細胞シートを放射線照射処理骨に組み合わせることで新生骨が形成されることを報告してきた。今回、大腿骨の一部を切除し、切除部に放射線照射処理骨を移植した実験モデルを作製し、移植骨周囲に細胞シートを置くことによる移植床との骨癒合について検討した。

【方法】7週齢F344ラット骨髄細胞の初期培養により獲得したMSCを10cm培養皿に播種した(1×10^4 cells/cm²)。デキサメサゾンとアスコルビン酸含有培地で2週間培養し、スクレーパーで細胞シートを作製した。移植骨は12週齢F344ラットから大腿骨骨幹部を10mm長の円柱状に切除し摘出後、骨髄を生理食塩水で除去し放射線照射(60Gy)を行うことで作製した。12週齢F344ラット大腿骨骨幹部を10mm切除し、この処理骨を移植し直径1.2mmのKワイヤーで髓内固定した群を対照群(D群)、移植した照射骨周囲に細胞シートを移植した群をシート群(S群)とした(n=4)。12週後にX線像、組織像、3点曲げ試験で新生骨形成、骨癒合を評価した。

【結果】X線像、組織像はD群では全例偽関節となったが、S群では全例移植床との間で骨性架橋を作り骨癒合良好であった。3点曲げ試験の最大曲げ荷重はD群、S群で平均34.4N、84.4NとS群の強度が有意に高かった(p<0.05)。

【考察】骨腫瘍切除後の再建術では放射線照射等で殺細胞処理した自家処理骨移植が行われるが、殺細胞処理により生物学的活性は低下し、移植床との骨癒合が得にくい。われわれはこれまでに細胞シートを用い、殺細胞処理骨に骨形成能を付与する方法を報告してきた。今回、新たに臨床に則したモデルを作製して検討を行い、細胞シートにより処理骨と移植床との間で骨性架橋を作り早期に骨癒合が得られることが証明された。本手技は各種処理骨移植に応用可能と考えられる。

利益相反：有

¹吉本病院整形 ²奈良医大健康政策医学 ³同志社大学生命医
科学部医工学科 ⁴奈良医大整形 ⁵奈良医療センター ⁶奈良
医大人工関節・骨軟骨再生医学

2-5-24

骨芽細胞シート移植を併用した血管柄付き人工骨作製

Vascularized artificial bone with osteogenic matrix sheet

中野 健一 (奈良県立医科大学 整形外科)

村田 景一, 赤羽 学, 面川 庄平, 田中 康仁

手外科領域では様々な血管柄付き骨移植術が行われているが、我々は、人工骨に骨芽細胞シートを併用することで新たな血管柄付き骨移植術の可能性を検討したので報告する。人工骨内部に血管束を導入し骨芽細胞シート移植を併用することで、人工骨に骨形成能を付与するだけでなく、血管束から人工骨内部へ新生血管が誘導される事が証明された。本研究から、良好な骨形成能を有する血管柄付き人工骨の作製が可能であることが示された。