

大腿骨頭壊死症に対する骨髓間葉系細胞移植による骨再生

広島大学人工関節・生体材料学広島大学整形外科学

安永 裕司 1)、寺山 弘志 2)

石川 正和 2)、越智 光夫 2)

研究 1)

熱凝固によるラット外傷性大腿骨頭壊死モデルにおける壊死範囲制御の検討。

はじめに

大腿骨頭壊死症は臨床的に診断されたときにはすでに壊死が完成しているため、現在行われている治療法は力学的に骨頭圧潰を防止するものであり、壊死組織に直接働きかけ圧潰を防止する確実な方法は未だにない。そのため新たな外科的治療法の効果を判定するために確実な実験モデルが必要と考えられる。

大腿骨頭壊死症の動物モデルでは、ステロイド投与によるものが多く報告されているが、壊死発生の部位と大きさを制御することはできない。1998年Nomanらの発表したラットの外傷性大腿骨頭壊死モデルは、6ヶ月齢の雌ラットを用い、大腿骨頭を展開、円靭帯を切離することにより脱臼させた後、頸部を全周性に二回、メスで切離することにより、骨頭の骨端線中枢部で壊死を認めるものである。

手技が比較的容易ではあるが、このモデルの問題点としては壊死の範囲が小さく再現性が100%ではない。また、術後数週で自然治癒するため実験対象として比較検討を行うのが難しいと考えられる。そのため我々は壊死作製方法

を一部変更することにより、壊死発生の部位と大きさの点で安定した骨頭壊死モデルの作成を試みた。

材料および方法

1) 材料

体重 250g-300g、24 週齢の Sprague-Dawley ラット(以下SD ラット)を用いた。

2) 方法

a) Nomanらの原法では頸部基部を全周性にメスで切離しているが、我々は簡易焼灼器を用いて頸部基部に熱凝固を加えた。



大腿骨頭の露出



電気メスによる熱処理

その後大腿骨頭を整復し関節包を縫合した。全周性に3Aの電流で凝固した群をA、全周性に1.5Aの電流で凝固した群をB、頸部基部下方1/2を3Aで凝固した群をC、頸部基部上方

1/2を3 Aで凝固した群をDとした。それぞれ6匹ずつ、1週、2週、6週で屠殺し大腿骨頭を摘出した。

表1：電流の大きさと凝固範囲

群	電流 (A)	凝固範囲
A :	3	全周
B :	1.5	全周
C :	3	頸部下方
D :	3	頸部上方

b) 摘出した大腿骨頭を、脱灰後骨頭中心を通る解剖学的冠状面のパラフィン切片標本を作製しHE染色を行い骨壊死の評価を行った。

i) 壊死面積の計測：標本切片にて頸部基部から骨頭全体の総面積に対して、骨梁および骨梁間の細胞に壊死を認めた面積をNIH (National Institute of Health) imageを用いて計算し、その割合を壊死率とし、1週、2週、6週で評価した。

ii) 修復反応：壊死部に対する肉芽組織、繊維組織、添加骨形成などの修復反応の有無について検討した。

結果

a) 壊死率および部位術後1週で、A群、B群ともに骨頭及び頸部の壊死骨梁面積は100%で電圧による変化を認めなかった。

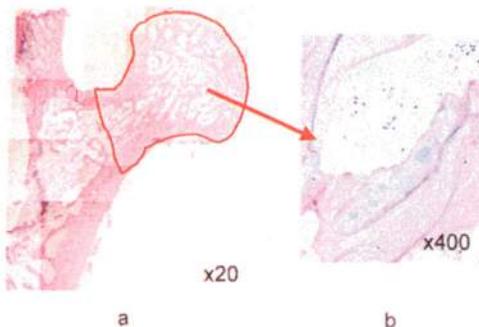


図2

- a) A群術後1週凝固部位より中枢で骨頭から頸部に至る骨壊死を認める。壊死率は100%。
b) 骨梁内骨細胞にemptylacunaeを認め、骨梁周囲の骨髓の壊死も認める。

C群では、骨頭及び頸部ともに下方に壊死骨梁を認め、骨頭では65%、頸部では53%であった。

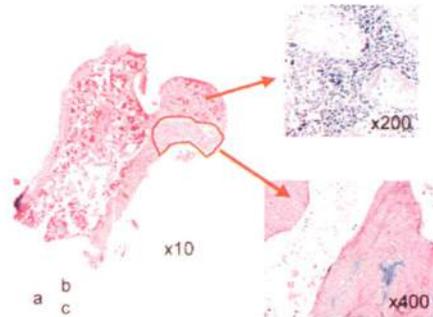


図3

- a) C群術後2週骨頭上方は正常な領域を認めるが、凝固部より中枢で骨頭から頸部下1/2に骨壊死を認める。
b) 正常組織は骨梁内骨細胞の核が顆粒で、骨髓細胞を認める。
c) 骨梁内骨細胞に銜商1aCmaeを認め、骨梁間の骨髓壊死を認める。

D群では上方に壊死骨梁を認め、骨頭では47%、頸部では52%であった。術後2週では全群で新生骨は認めず、壊死骨梁面積の変化は認めなかった。6群とD群で正常骨髓組織の壊死骨梁間への進入を認めた。術後6週ではA・B群ともに全例骨頭骨折を認めたが、C・D群では少ない傾向があった。

表2：壊死率

群	1週	2週	6週
A :	100% (n=6)	100% (n=6)	— (n=6)
B :	100% (n=6)	100% (n=6)	— (n=6)
C :	48% (n=6) (range 38 ~ 56%)	50% (n=6) (44 ~ 61%)	45% (n=6) (38 ~ 54%)
D :	57 (39 ~ 71%) (n=6)	56 (53 ~ 60%) (n=6)	49 (42 ~ 61%) (n=6)

考察

Nomanらの動物モデルは、血行途絶による骨壊死モデルとして発表され、壊死部が骨端線

中枢に限られることからペルテス氏病に近いモデルとされている。特徴として、骨壊死を術後2～5日目に認め、術後2週間で骨梁間への細胞浸潤や破骨細胞の活性化など修復過程を認めている。また術後3週から7週で多くの骨頭が正常に回復している。このモデルは、破骨細胞の活性化、骨梁間内への肉芽組織とそれに続く細胞浸潤および血管形成などヒトと似通った回復経過を認め、骨壊死の再生を観察するには適しているが、壊死範囲が比較的狭く、早期に自然回復を認めることから、細胞移植など治療による壊死の再生の効果を検討するには適していないと考えられる。壊死の再現性も60%程度とそれほど高くない。

我々のモデルは、頸部をメスで切離し骨頭壊死を作製するNommanらの方法を変更し頸部を凝固し壊死を作製した。この方法で、骨壊死を100%認め、確実に壊死を作成することが可能であった。壊死の範囲は、頸部を全周性に凝固すると、電流の大きさによらず、骨頭全体であった。また、凝固部位を頸部の上1/2、あるいは下1/2に限定することで壊死の発生部位を限局した範囲に制御することができた。

大腿骨頸部を全周生もしくは部分的に凝固することにより大腿骨頭への血行を途絶させ虚血を生じさせる我々の外傷性骨頭壊死症のモデルは、壊死範囲を制御可能であり、今後の細胞治療などの、骨頭壊死再生の評価のためのモデルとして可能性がある。

参考文献

1. Glimcher M.J. et al. The biology of the osteonecrosis of the human femoral head and its clinical implication. I. Tissue Biology. Clin. Orthop. 138 (1979a), 284-309.
2. Bassett L.W. et al. Ischemic necrosis of the femoral head: Correlation of magnetic resonance imaging and histologic sections. Clin. Orthop. 223 (1987), 181-187.
3. Roach H.I. et al. The choice of an experimental model: A guide for reason workers. J. Bone Joint Surg. 71B (1989), 549-553
4. Yamamoto T. et al. Corticosteroid enhances the experimental induction of osteonecrosis in rabbits with Shwartzman reaction. Clin. Orthop 316 (1995), 235-243
5. Norman D, et al. Vascular deprivation-induced necrosis of the femoral head of the rat. An experimental model of avascular osteonecrosis in the skeletally immature individual or Legg-Perthes disease. Int J Exp Pathol Vol,79(1998), 173-181.
6. Jones L.P. JR. Etiology and pathogenesis of osteonecrosis. Sem. Arthroplasty 2, (1991), 160-168
7. Takaoka K. et al. The repair process in experimentally induced avascular necrosis of the femoral head in dogs. Arch. Trauma. Surg. 99 (1981), 109-115.
8. Usui Y. et al. An electronmicroscopic study of changes observed in osteocytes under ischaemic conditions. J. Orthop. Res. 7 (1989), 12-21
9. Boss JH, et al. Postosteonecrosis Osteoarthritis-like disorder of the femoral head of rats. J Comp Pathol, 129(2003), 235-239
10. Glimcher M.J. et al. The biology of the osteonecrosis of the human femoral head and its clinical implication. II. The pathological changes in the femoral head as an organ and in the hip joint. Clin. Orthop. 139 (1979b), 283-312
11. Glimcher M.J. et al. The biology of the osteonecrosis of the human femoral head and its clinical implication. 111. Discussion of the etiology and the genesis of the pathological sequelae, com-

ments on treatment. Clin.Orthop. 140 d (1979c), 273-312

12. Hirano T. et al. Necrosis of the femoral head in growing rats. Occlusion of lateral epiphyseal vessels. Acta Orthop. Scand. 60 (1989). 407-410
13. Boss, J.H. et al. Osteonecrosis of the femoral head of laboratory animals: the lessons learned from a comparative study of osteonecrosis in man experimental animals. Vet. Pathol/40 (2003), 345-354.
14. Hirano. T. et al. Osteonecrosis of the femoral head of growing, spontaneously hypertensive rats. Acta Orthop. Scand 59 (1988). 530-535
15. Berman AT. et. al. Thermally induced necrosis in rabbits. Relation to implant failure in humans. Clin. Orthop. Relat. Res.1984 Jun;(186):284-92.

研究 2)

ラット大腿骨頭壊死モデルにおけるヒト末梢血由来 CD34 陽性細胞移植の骨再生効果。

はじめに

血管内皮前駆細胞(Endothelial Progenitor Cell : EPC)は、1997年、浅原らにより報告された末梢血、骨髄の血液幹細胞分画に存在す

る非常に強力な血管再生能をもった細胞分画であり(Asahara et al Science 1997)、循環器領域においては移植再生医療の有力な細胞ソースとして臨床応用も始まっている。

我々も、2005年7月より、大腿骨頭壊死症の患者に対し・血管再生・骨再生を目指した自家骨髄単核球移植を行い、大きな問題も生じず良好な結果を得ており、学会にて報告も行っている(2006年日本股関節学会)。

このメカニズムとしては、血管再生による骨再生が大きく関与していると考えている。このことを考えると、現在使用している骨髄単核球 heterogeneous な細胞集団であり、間葉系幹細胞などの様々な幹細胞・前駆細胞を含む利点もあるが、採取する患者のバックグラウンドを反映するという欠点もある。そのため強力な血管再生能力を持ち、より純粋な細胞集団としての EPC に着目した。

本研究の目的は、血行不全がその主原因として考えられている大腿骨頭壊死に対して EPC による血管再生を介した骨再生が可能であることを証明し、これまでにない効果的な細胞移植療法の開発を目指した基礎的研究を行うことである。

材料および方法

1) 材料

異種間による移植実験のため免疫不全ラット(雌180-200g、以下ヌードラット)を使用した。

2) 方法

a) Nomanらの方法を改良し電気凝固を加えた方法で大腿骨頭壊死モデルを作成した。

移植細胞にはCambrex社より購入した凍結保存ヒトCD34陽性細胞を使用した。CD34移植群には 1×10^5 個ずつPBSに調整したCD34陽性細胞を、壊死作成直後に大腿静脈より経静脈的に移植した。コントロール群にはPBSのみを経静脈的に投与した。

b) 肉眼的評価で頸部骨折の有無を、骨頭の経時的観察が可能なin vivoマイクロCTを用いて骨頭の変形・陥没を評価する目的で骨頭体

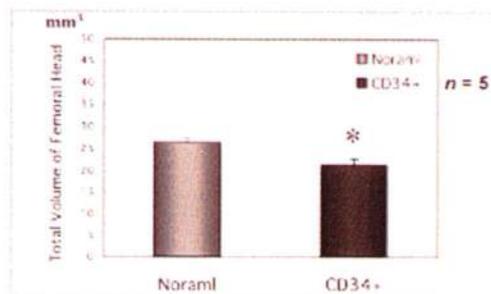
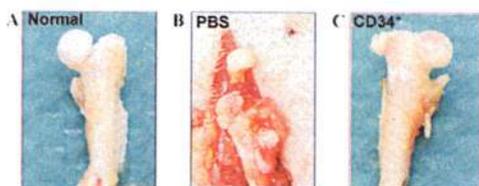


積の計測を行った。組織学的評価はHE染色にて行い、さらにマイクロフィルを用いて新生血管の造影を行い、血管内皮マーカであるvWF、骨芽細胞マーカであるオステオカルシンとヒト特異的ミトコンドリア抗体を用いて組織内における移植細胞の評価を行った。

結果

a) 肉眼的評価コントロール群では移植後

4週で60%に、6週で100%に頸部骨折を認めた。CD34移植群では移植後4週、6週ともに頸部骨折を認めた症例はなかったが、骨頭表面の軟骨変性を認めた。



c) 組織学的評価

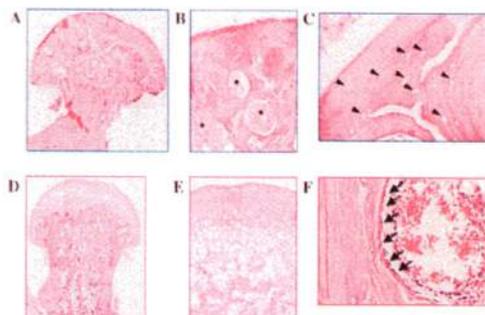
術後4週でのコントロール群、およびCD34移植群のHE染色組織像を評価した。コントロール群では、骨頭が扁平化し頸部が狭小化し、骨梁内にはempty lacunaを認め、骨梁間には骨髓組織を認めず、骨再生を示す所見は認めなかった(図A,B,C)。CD34移植群では、骨梁内にはempty lacunaを認めたが、骨梁表面にlining Cellを多数認めた。一部には壊死骨梁表面に添加骨形成を認め、また骨梁間に骨髓細胞を認め、骨再生の所見と考えられた(図D,E,F)。

Table 1. Experimental Models and Evaluation Headings at week 4 after Transplantation.

Groups (Number)	Micro-CT analysis	Histological evaluation	Immunofluorescent staining	Microangiography	Neck Fracture (Number:%)
PBS (n=20)	n = 5	n = 5	n = 5	n = 5	14/20 (70%)
CD34 (n=20)	n = 5	n = 5	n = 5	n = 5	0/20 (0%)

b) *in vivo* マイクロCTによる骨頭体積の評価

術後4週のコントロール群は頸部骨折を来しており体積の測定ができなかった。移植後4週でCD34移植群は頸部骨折を認めないものの、骨頭の扁平化を認めるものがあった。大腿骨頭の体積は、正常骨頭と比較してCD34移植群は少ない傾向にあるものの有意差を認めなかった。このことから、骨頭の著しい変形は来していないものと考えられた。



d) 血管造影

樹脂による血管造影では、コントロール群では移植後2週では骨頭の血管は造影されなかった。移植後4週では頸部骨折を来しており血管造影による評価はできなかった。CD34移植群では、移植後4週で骨頭に明らかな血管を認めた。

e) 免疫組織学的評価

抗ヒトミトコンドリア抗体を用いて、骨頭における移植細胞の存在の確認と、血管内皮マーカーであるvWF、および骨芽細胞のマーカーであるオステオカルシンでの2重染色をそれぞれ行った。

移植後4週において抗ヒトミトコンドリア抗体とvWFの両方で染色される細胞を骨頭内血管、また抗ヒトミトコンドリア抗体とオステオカルシンの両方で染色される細胞を骨形成部に認めた。

考 察

ヒト末梢血由来CD34陽性細胞はラット心筋梗塞モデルへの移植で強力な血管再生及び心筋再生促進することが明らかになっており、ラット大腿骨癒合不全モデルへの移植においては強力な血管再生、骨再生を惹起することが報告されている。

骨頭壊死における修復過程では、既存骨の骨吸収がおこらず壊死骨表面に新生骨が形成される様式をとるため長期にわたり壊死骨が残存する。そのため正常な骨組織への置換に時間がかかると考えられる。経静脈的に移植したCD34陽性細胞は壊死部周囲に集積し、強力に血管再生を惹起することにより、新生骨の早期形成による骨代謝の促進が骨再生における作用機序が推測された。

参考文献

1. Mont MA, Jones LC, Einhorn TA, et al. 1998. Osteonecrosis of the femoral head. Potential treatment with growth and differentiation factors. Clin Orthop Relat Res 1998 355: S314-335.
2. Trancik T, Lunceford E, Strum D. 1990. The effect of electrical stimulation on osteonecrosis of the femoral head. Clin Orthop Relat Res 256: 120-124.
3. Ludwig J, Lauber S, Lauber HJ, et al. 2001. High-energy shock wave treatment of femoral head necrosis in adults. Clin Orthop Relat Res 387: 119-126.
4. Massari L, Fini M, Cadossi R, et al. 2006. Biophysical stimulation with pulsed electromagnetic fields in osteonecrosis of the femoral head. J Bone Joint Surg Am 3: 56-60.
5. Kawate K, Yajima H, Ohgushi H, et al. 2006. Tissue-engineered approach for the treatment of steroid-induced osteonecrosis of the femoral head: transplantation of autologous mesenchymal stem cells cultured with beta-tricalcium phosphate ceramics and free vascularized fibula. Artif Organs 30(12): 960-962.
6. N6th U, Reichert J, Reppenhagen S, et al. 2007. Cell based therapy for the treatment of femoral head necrosis. Orthopade 36(5): 466-471.
7. Hernigou P, Beaujean F. 2002. Treatment of osteonecrosis with autologous bone marrow grafting. Clin Orthop Relat Res 405: 14-23.
8. Gangi V, Hauzeur JP, Matos C, et al. 2004. Treatment of osteonecrosis of the femoral head with implantation of autologous bone-marrow cells. A pilot study. J Bone Joint Surg Am 86-A(6): 1153-1160.
9. Gangii V, Hauzeur JP. 2005. Treatment of osteonecrosis of the femoral head with implantation of autologous bone-marrow cells. Surgical technique. J Bone Joint Surg Am 87: 106-112.

10. Gangji V, Toungouz M, Hauzeur JP. 2005. Stem cell therapy for osteonecrosis of the femoral head. *Expert Opin Biol Ther* 5(4): 437-442.
11. Slack JM. 2000. Stem cells in epithelial tissues. *Science* 287: 1431-1433
12. Blau HM, Brazelton TR, Weimann JM. 2001. The evolving concept of a stem cell: entity or function? *Cell* 105: 829-841 .
13. Korblyng M, Estrov Z. 2003. Adult stem cells for tissue repair - a new therapeutic concept? *New Engl J Med* 349: 570-582.
14. Weissman IL. 2000. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell* 100:1 57-168.
15. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. 1997. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 275 : 964-967.
16. Asahara T, Masuda H, Takahashi T, et al. 1 999. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res* 85 : 22 1-228.
17. Takahashi T, Kalka C, Masuda H, et al. 1 999. Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med* 5 : 434-438.
18. Kawamoto A, Tkebuchava T, Yamaguchi J, et al. 2003. Intranryocardial transplantation of autologous endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization of myocardial ischemia. *Circulation* 1 07: 461 -468.
19. Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ, et al. 2001. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat Med* 7: 430-436.
20. Kawamoto A, Gwon HC, Iwaguro H, et al. 2001. Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia. *Circulation* 103: 634-637.
21. Iwasaki H, Kawamoto A, Ishikawa M, et al. 2006. Dose-dependent contribution of CD34-positive cell transplantation to concurrent vasculogenesis and cardiomyogenesis for functional regenerative recovery after myocardial infarction. *Circulation* 113:1311-1325.
22. Matsumoto T, Kawamoto A, Kuroda R, et al. 2006. Therapeutic potential of vasculogenesis and osteogenesis promoted by periphera blood CD34-positive cells for functional bone healing. *Am J Pathol* 169(4): 1440-1457.
23. Norman D, Reis D, Zinman C, et al. 1998. Vascular deprivation-induced necrosis of the femoral head of the rat. An experimental model of avascular osteonecrosis in the skeletally immature individual or Legg-Perthes disease. *Int J Exp Pathol* 79(3): 173-181.
24. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284(5411): 143-147.
25. Lee HS, Huang GT, Chiang H, et al. 2003. Multipotential mesenchymal stem cells from femoral bone marrow near the site of osteonecrosis. *Stem Cells* 21(2): 1 90-199.
26. Yuan B, Liu Z. 2007. Treatment of osteonecrosis of the femoral head: combination of operation and multiple cellular mediators. *Med Hypotheses* 68(3): 502-505.

27. Mont MA, Marulanda GA, Seyler TM, et al. 2007. Core decompression and nonvascularized bone grafting for the treatment of early stage osteonecrosis of the femoral head. *Instr Course Lect* 56: 213-220.
28. Dailiana ZH, Toth AP, Gunneson E, et al. 2007. Free vascularized fibular grafting following failed core decompression for femoral head osteonecrosis. *J Arthroplasty* 22(5): 679-688.
29. Vadasz Z, Misselevich I, Norman D, et al. 2004. Localization of vascular endothelial growth factor during the early reparative phase of the rats' vessels deprivation-induced osteonecrosis of the femoral heads. *Exp Mol Pathol* 77(2): 145-148.
30. Majka M, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak J, et al. 2001. Numerous growth factors, cytokines, and chemokines are secreted by human CD34(+) cells, myeloblasts, erythroblasts, and megakaryoblasts and regulate normal hematopoiesis in an autocrine/paracrine manner. *Blood* 97: 3075-3085.
31. Long MW, Williams JL, Mann KG. 1990. Expression of human bone-related proteins in the hematopoietic microenvironment. *J Clin Invest* 86: 1387-1395.
32. Chen JL, Hunt P, McElvain M, et al. 1997. Osteoblast precursor cells are found in CD34+ cells from human bone marrow. *Stem Cells* 15: 368-377.
33. Tondreau T, Meuleman N, Delforge A, et al. 2005. Mesenchymal stem cells derive from CD133 positive cells in mobilized peripheral blood and cord blood: proliferation, Oct-4 expression and plasticity. *Stem Cells* 23(8): 1105-1112.
34. Janowska-Wieczorek A, Majka M, Ratajczak J, et al. 2001. Autocrine/paracrine mechanisms in human hematopoiesis. *Stem Cells* 19: 99-107.
35. Goodell MA, Rosenzweig M, Kim H, et al. 1997. Dye eflux studies suggest that hematopoietic stem cells expressing low or undetectable levels of CD34 antigen exist in multiple species. *Nat Med* 3: 1337-1345.
36. Brugger W, Heimfeld S, Berenson RJ, et al. 1995. Reconstitution of hematopoiesis after high-dose chemotherapy by autologous progenitor cells generated ex vivo. [see comment] [retraction in Kanz L, Brugger W. *N Engl J Med*. Jul 5;345(1):64; PMID: 11439953]. *N Engl J Med* 333: 283-287.
37. Kessinger A, Armitage JO. 1991. The evolving role of autologous peripheral stem cell transplantation following high-dose therapy for malignancies. *Blood* 77: 211-213.