



## Effect of low - intensity pulsed ultrasound on osteogenic differentiation of human induced membrane - derived cells in Masquelet technique

高瀬, 恒平

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2024-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第8783号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/0100490008>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(課程博士関係)

## 学位論文の内容要旨

**Effect of low-intensity pulsed ultrasound on osteogenic differentiation of human induced membrane-derived cells in Masquelet technique**

Masquelet 法 induced membrane 由来細胞に対する低出力超音波パルスの骨分化促進効果

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻

整形外科学

(指導教員：黒田 良祐教授)

高瀬 恭平

## 【背景】

Masquelet 法は、大規模骨欠損に対する比較的新しい治療法である。本法では、骨欠損部に留置したセメントスペーサーの周囲に形成される膜様組織 (induced membrane、以下 IM) が、セメント除去後に移植される骨組織の骨形成促進に重要な役割を果たすと考えられている。先行研究では、IM には間葉系幹細胞や豊富な血管が含まれ、bone morphogenetic protein (BMP) の発現、成長因子の分泌、IM 自体の骨化などがその要因であると報告されている。

一方、低出力超音波パルス (low-intensity pulsed ultrasound、以下 LIPUS) は、その物理的刺激による骨折治癒・血管新生促進効果が知られている。LIPUS が骨折治癒に貢献する機序として、骨髓由来間葉系幹細胞の分化促進や、COX-2 の産生を刺激することによる骨リモデリング促進がこれまでに報告されている。また、骨芽細胞において血管新生関連遺伝子である vascular endothelial growth factor (VEGF) の発現を促進させるという報告もある。しかし、IM に対する LIPUS の効果についての報告は現状みられない。本研究では Masquelet 法で治療した患者から得た IM 由来細胞に LIPUS を照射し、その骨形成活性、骨分化能への影響について検討を行った。

## 【方法】

### 対象と組織採取

医学倫理委員会で承認を得て、患者からインフォームドコンセントを取り実施した。当院で 2020 年 6 月から 2021 年 5 月の間に Masquelet 法を行った患者 7 例(男性 4 例、女性 3 例、平均年齢 61 歳)から IM の一部を手術時に採取した。採取する IM の大きさは 1cm<sup>2</sup> とし、IM 以外の組織の混入を防ぐため、厚さは可能な限り薄くした。

### 細胞分離

得られた組織をコラゲナーゼ処理し細胞を分離した後、維持培地 (α-MEM に 10% FBS、2 mM L-glutamine を添加) で培養し、以下の評価を行った。

### 細胞表面抗原

蛍光免疫染色を用いて間葉系幹細胞マーカーである CD73、90、105 の発現を調べた。

### LIPUS 照射

LIPUS 照射群と対照群の 2 群に分けて 3 週間の骨分化誘導を行った。骨分化誘導培地には、維持培地に 10 nM dexamethasone、50 µg/ml ascorbic acid、10 mol/L β-glycerophosphate を添加したものを使用した。LIPUS 照射の設定は周波数: 1.5MHz、バースト幅: 200s、繰り返し周波数: 1kHz、照射出力: 30mW/cm とし、1 日 20 分間、毎日施行した。LIPUS を照射する 6 つのトランスデューサーの 5mm 上方に 6 ウェルプレートの各ウェルが配置されるように設置した。

### 細胞増殖能

6 ウェルプレートに 1 ウェルあたり合計  $3.3 \times 10^4$  の IM 由来細胞を播種し、4 日間維持培地で培養したのち、LIPUS 群にのみ上記の条件で LIPUS を照射し 3、5、7 日目に細胞数を計測し、両群間で比較した。

### 骨分化能

介入 7、14 日目にアルカリフオスファターゼ (ALP)活性、real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)による骨分化・血管新生関連遺伝子の発現の評価、21 日目に Alizarin Red S 染色による石灰化評価を行った。real-time RT-PCR では骨分化関連遺伝子である runt-related transcription factor 2 (*RUNX2*)、osterix (*OSX*)、osteocalcin (*OC*)、BMP-2、血管新生関連遺伝子である VEGF、間葉系幹細胞におけるケモカインである stromal cell-derived factor-1 (SDF-1)の発現量を測定した。

### 統計解析

統計学的解析には Wilcoxon signed-rank 検定を用い、p<0.05 を統計学的に有意とした。

## 【結果】

### 細胞表面抗原

IM 由来細胞は速やかに増殖し、プレート接着性のある線維芽細胞様の形態学的特徴を示した。免疫染色にて IM 由来細胞に間葉系幹細胞マーカーである CD73、90、105 の発現を認めた。

### 細胞増殖能

3、5、7 日目の細胞数は、対照群と LIPUS 照射群の間に有意差は認めなかった。

### 骨分化能

LIPUS 照射群の ALP 活性は対照群と比較して 7、14 日目ともに有意に高値であった。21 日目での Alizarin Red S 染色は LIPUS 照射群で対照群より多くの石灰沈着を認めた。real-time RT-PCR では LIPUS 照射群で 7 日目において *Runx2*、14 日目において *OSX*、*OC*、VEGF の発現が有意に増加していた。

## 【考察】

本研究により、Masquelet 法における IM 由来細胞に LIPUS を照射する事で骨分化を促進させることが明らかになった。Masquelet 法において骨癒合に要する平均期間は 9.1 ヶ月と報告されており、平均骨癒合率は 86.0% とされている。近年、この手技の改良に関するいくつかの基礎研究が報告されている。本研究では、LIPUS 照射によって ALP 活性の上昇、骨形成遺伝子である *Runx2*、*OSX*、*OC* の発現の上昇、石灰化の増加によって IM 由来細胞の骨分化能を促進することを初めて証明した。今回の結果は、LIPUS 照射が Masquelet 法における骨癒合率や期間をさらに改善させる可能性

があるという点で、臨床的に重要な意味を持つ。

IM の生物学的機能はまだ不明な点が多い。IM の豊富な血管は移植骨の骨形成に寄与すると考えられており、本研究で LIPUS が IM 由来細胞の VEGF 発現を増強させたという結果は、移植骨への血流をより増強させうることを示している。さらに、IM 由来細胞内の間葉系幹細胞は移植骨の骨形成に重要な役割を果たすと報告されており、本研究においても IM 由来細胞が間葉系幹細胞と同様の表面抗原を持つ細胞を含んでいることを示した。LIPUS 照射により間葉系幹細胞の骨形成が促進されることが報告されており、今回の結果と一致している。

LIPUS によって骨折治癒が促進されるメカニズムとして SDF-1/CXCR4 経路が活性化し間葉系幹細胞を誘導することにより骨折治癒に寄与することが少数の研究で指摘されている。しかしながら、本研究では SDF-1 の発現レベルに両群間で有意差は認めなかった。一方、LIPUS 照射がラットの骨芽細胞における BMP-2 発現を増強させると報告されており、本研究においては、有意差はないものの LIPUS 照射により IM における BMP-2 タンパクの発現が増強する傾向が示された。BMP-2 は Smad シグナル伝達経路の活性化を通じて骨芽細胞分化に重要な役割を果たすことが知られており、BMP-2 の発現上昇が IM 由来細胞の骨形成に影響を与えた可能性があると考えられる。細胞増殖能に関しては、LIPUS 照射は IM 由来細胞の細胞増殖に影響を及ぼさないことが示された。これらの結果から、LIPUS 照射は細胞増殖ではなく IM 由来細胞の分化を介して骨形成を促進した可能性が示唆された。

## 【結論】

本研究において、LIPUS 照射による IM 由来細胞の骨分化能と石灰化の促進と、骨分化および血管新生関連遺伝子の発現増強が示され、Masquelet 法の周術期において LIPUS 照射が骨形成を促進させる可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 3354 号	氏名	高瀬 恭平
論文題目 Title of Dissertation	<p>Effect of low-intensity pulsed ultrasound on osteogenic differentiation of human induced membrane-derived cells in Masquelet technique</p> <p>Masquelet 法 induced membrane 由来細胞に対する 低出力超音波パルスの骨分化促進効果</p>		
審査委員 Examiner	<p>主査 Chief Examiner</p> <p>副査 Vice-examiner</p> <p>副査 Vice-examiner</p> <p>井上昌也 小谷義治 勝郁夫</p>		

(要旨は1,000字~2,000字程度)

## 【背景】

Masquelet 法は、大規模骨欠損に対する比較的新しい治療法である。本法では、骨欠損部に留置したセメントスペーサーの周囲に形成される膜様組織 (induced membrane、以下 IM) が、セメント除去後に移植される骨組織の骨形成促進に重要な役割を果たすと考えられている。先行研究では、IM には間葉系幹細胞や豊富な血管が含まれ、bone morphogenetic protein(BMP)の発現、成長因子の分泌、IM 自体の骨化などがその要因であると報告されている。一方、低出力超音波パルス (low-intensity pulsed ultrasound、以下 LIPUS) は、その物理的刺激による骨折治癒・血管新生促進効果が知られている。LIPUS が骨折治癒に貢献する機序として、骨髄由来間葉系幹細胞の分化促進や、COX-2 の産生を刺激することによる骨リモデリング促進がこれまでに報告されている。また、骨芽細胞において血管新生関連遺伝子である vascular endothelial growth factor (VEGF)の発現を促進させるという報告もある。しかし、IM に対する LIPUS の効果についての報告は現状みられない。本研究では Masquelet 法で治療した患者から得た IM 由来細胞に LIPUS を照射し、その骨形成活性、骨分化能への影響について検討を行った。

## 【方法】

### 対象と組織採取

医学倫理委員会で承認を得て、患者からインフォームドコンセントを取り実施した。当院で 2020 年 6 月から 2021 年 5 月の間に Masquelet 法を行った患者 7 例(男性 4 例、女性 3 例、平均年齢 61 歳)から IM の一部を手術時に採取した。採取する IM の大きさは  $1\text{cm}^2$  とし、IM 以外の組織の混入を防ぐため、厚さは可能な限り薄くした。

### 細胞表面抗原

蛍光免疫染色を用いて間葉系幹細胞マーカーである CD73、90、105 の発現を調べた。

### LIPUS 照射

LIPUS 照射群と対照群の 2 群に分けて 3 週間の骨分化誘導を行った。骨分化誘導培地には、維持培地に 10 nM dexamethasone、50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ascorbic acid、10 mol/L  $\beta$ -glycerophosphate を添加したものを使用した。LIPUS 照射の設定は周波数: 1.5MHz、バースト幅: 200s、繰り返し周波数: 1kHz、照射出力: 30mW/cm とし、1 日 20 分間、毎日施行した。LIPUS を照射する 6 つのトランステューサーの 5mm 上方に 6 ウェルプレートの各ウェルが配置されるように設置した。

### 細胞増殖能

6 ウェルプレートに 1 ウェルあたり合計  $3.3 \times 10^4$  の IM 由来細胞を播種し、4 日間維持培地で培養したのち、LIPUS 群にのみ上記の条件で LIPUS を照射し 3、5、7 日目に細胞数を計測し、両群間で比較した。

### 骨分化能

介入 7、14 日目にアルカリフォスファターゼ (ALP)活性、real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)による骨分化・血管新生関連遺伝子の発現の評価、21 日目に Alizarin Red S 染色による石灰化評価を行った。real-time RT-PCR では骨分化関連遺伝子である runt-related transcription factor 2 (RUNX2)、osterix (OSX)、osteocalcin (OC)、BMP-2、血管新生関連遺伝子である VEGF、間葉系幹細胞におけるケモカインである stromal cell-derived factor-1 (SDF-1)の発現量を測定した。

## 【結果】

**細胞表面抗原:** IM 由来細胞は速やかに増殖し、プレート接着性のある線維芽細胞様の形態学的特徴を示した。免疫染色にて IM 由来細胞に間葉系幹細胞マーカーである CD73、90、105 の発現を認めた。

**骨分化能:** LIPUS 照射群の ALP 活性は対照群と比較し 7、14 日目ともに有意に高値であった。21 日目の Alizarin Red S 染色は LIPUS 照射群で対照群より多くの石灰沈着を認めた。real-time RT-PCR では LIPUS 照射群で 7 日目において Runx2、14 日目において OSX、OC、VEGF の発現が有意に増加していた。

## 【考察】

本研究により、Masquelet 法における IM 由来細胞に LIPUS を照射する事で骨分化を促進させることができ明らかになった。Masquelet 法において骨癒合に要する平均期間は 9.1 ヶ月と報告されており、平均骨癒合率は 86.0% とされている。近年、この手技の改良に関するいくつかの基礎研究が報告されている。本研究では、LIPUS 照射によって ALP 活性の上昇、骨形成遺伝子である Runx2、OSX、OC の発現の上昇、石灰化の増加によって IM 由来細胞の骨分化能を促進することを初めて証明した。今回の結果は、LIPUS 照射が Masquelet 法における骨癒合率や期間をさらに改善させる可能性があるという点で、臨床的に重要な意味を持つ。

IM の生物学的機能はまだ不明な点が多い。IM の豊富な血管は移植骨の骨形成に寄与すると考えられており、本研究で LIPUS が IM 由来細胞の VEGF 発現を増強させたという結果は、移植骨への血流をより増強させうることを示している。さらに、IM 由来細胞内の間葉系幹細胞は移植骨の骨形成に重要な役割を果たすと報告されており、本研究においても IM 由来細胞が間葉系幹細胞と同様の表面抗原を持つ細胞を含んでいることを示した。LIPUS 照射により間葉系幹細胞の骨形成が促進されることが報告されており、今回の結果と一致している。

LIPUS によって骨折治癒が促進されるメカニズムとして SDF-1/CXCR4 経路が活性化し間葉系幹細胞を誘導することにより骨折治癒に寄与することが少数の研究で指摘されている。しかしながら、本研究では SDF-1 の発現レベルに両群間で有意差は認めなかった。一方、LIPUS 照射がラットの骨芽細胞における BMP-2 発現を増強させると報告されており、本研究においては、有意差はないものの LIPUS 照射により IM における BMP-2 タンパクの発現が増強する傾向が示された。細胞増殖能に関しては、LIPUS 照射は IM 由来細胞の細胞増殖に影響を及ぼさないことが示された。これらの結果から、LIPUS 照射は細胞増殖ではなく IM 由来細胞の分化を介して骨形成を促進した可能性が示唆された。

本研究は LIPUS 照射による IM 由来細胞の骨分化能と石灰化の促進と、骨分化および血管新生関連遺伝子の発現増強を示し、Masquelet 法の周術期において LIPUS 照射が骨形成を促進させる可能性を明らかにした価値ある業績であると考える。よって本研究者は、博士(医学)の学位を得る資格があると認める。