

特集【ここまで来た再生医療】

指の再生

磯貝 典孝, 諸富 公昭

近畿大学医学部形成外科

Tissue Engineering of the Phalanx and Phalangeal Joint

Noritaka Isogai, Tadaaki Morotomi

Department of Plastic Surgery, Kinki University School of Medicine

手指欠損の再建治療

上肢機能の大部分は、指を有効に働かせるためであり、指はその最終的効果器として極めて重要な役割を担っている。指全体の構造において、指骨・指関節は機能上の中心となる支持組織であり、骨、軟骨、腱組織などの複合組織から構成されている。この基本骨格に、皮膚・軟部組織、固有の神経・血管系、および爪組織が加わって、指の形態・機能が構築されている。

指の再建手術では、正常指が有するこのような複雑な形態的・機能的特徴を、どの程度備えた再建がなされたかにより、術後成績が大きく左右される。このため、外傷、先天性、腫瘍切除後に生じた手指欠損に対する再建手術は、極めて困難とされている。特に、関節は、いったん損傷すると“再生”できないものと考えられていた。

現在、手指欠損の再建治療では、足趾を顕微鏡下に血管吻合を行って手指に移植する術式(Toe-to-Finger transfer)が、最も一般的に行われている。しかし、この方法は、手術手技が複雑で、また、長い手術時間が必要とされている。さらに、足趾を失うという点に最大の問題があり、小児や女性への手術適応は極めて制限されている(図1)。

この問題を解決し得る治療法の1つとして、近年、組織の再構築に関わる再生工学, tissue engineering が注目されてきている。この tissue engineering では、(1) 特定の組織を作り出す細胞、(2) その細胞の足場となる基質、(3) 細胞増殖や分化をコントロールするサイトカイン、(4) 組織生着を左右する血行の4つの要素を組み合わせることで組織再生を促している。

私たちの研究室では、この基本概念に基づき、高分化型の細胞を生分解性ポリマーに播種させて指骨格の再生に挑戦してきた。その結果、骨、軟骨、腱のそれぞれの細胞を生分解性ポリマーに組み込み、これらを組み合わせて移植する事により、臨床的に必要な大きさと複雑な3次元形態を有する指骨格の再生を可能とする技術を開発した。そこで本稿では、骨・軟骨・

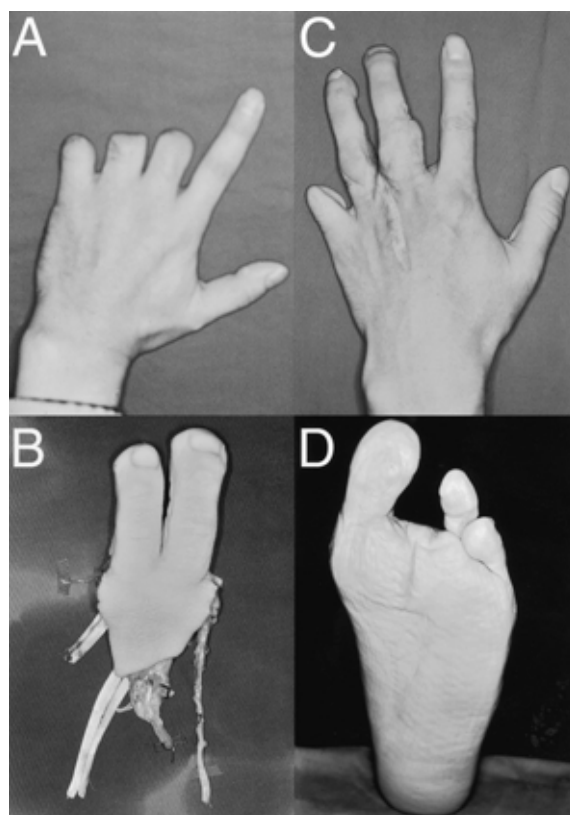


図1 足指を手指に移植する toe-to-finger transfer 法の実例

A. 手術前. 外傷により2本的手指を欠損した症例 B. 足指の採取 C. 移植手術の術後 D. 採取部(足)の状態

腱の同時再生モデルによって再生された指骨格(指骨・指関節)を紹介する。

指の再生

指骨格は、末節骨、中節骨、基節骨と呼ばれている3つの骨(指骨)が関節胞という支持組織で接続されている。また、指骨には、関節軟骨や腱組織が付着している。腱(屈筋腱、伸筋腱)が引かれることで関節

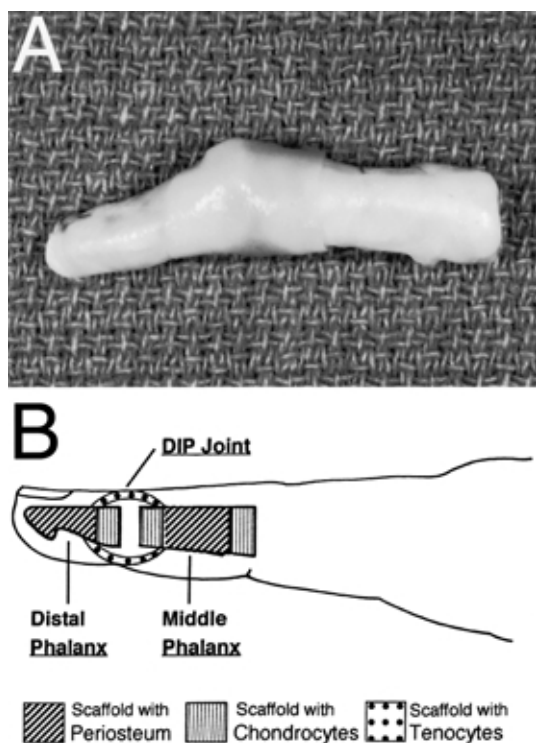


図2 複合体(骨膜・ポリマー, 軟骨細胞・ポリマー, 腱細胞・ポリマー)より作成した培養指骨・指関節(移植前)
A. 培養指骨・指関節 B. 細胞とポリマーの組み合わせ

が屈伸し, 手指の運動機能を果たす仕組みとなっている(図2)。

指の tissue engineering では, まず, 仔ウシの前腕から骨膜を採取した。次に, 肘関節の関節包を開けて関節面を露出し, 軟骨組織を採取した。最後に, 前腕の屈筋腱を採取した。軟骨組織と腱組織は, コラゲナーゼで酵素処理した後, それぞれの細胞を選択的に分離した。

播種細胞の足場となるポリマーの作成では, 手指の骨標本モデルから鋳型を作成した。この鋳型に, 生分解性ポリマーであるPGA ポリマーとPLLA ポリマーを混入し, 指形態を有する3次元ポリマーを作成した(図3)。この3次元ポリマーに骨膜を直接縫合して指骨を再生誘導し, 指骨周辺組織である腱と関節軟骨を再生するため, PGA ポリマーに軟骨細胞と腱細胞を播種した。このようにして出来上がった細胞・ポリマー複合体(骨部, 関節軟骨部, 腱部の3パーツ)を別々に in vitro で1週間培養したのちに, 解剖学的構造に準じて, 吸収糸で縫合し, 指骨格を作成した。最終的には, 骨膜・細胞・ポリマー複合体(指骨格)をヌードマウス皮下に移植し, in vivo で指骨格の組織発生を誘導した。

移植後20週目に再生組織を検討した。その結果, 再生末節骨モデルでは, 肉眼的に原型と同じ形態が維



図3 PGA/PLLA ポリマーの作成
末節骨の鋳型(左)の中に, PLLA 溶液に浸したPGA ポリマー(中央)を挿入する。でき上がったPGA/PLLA ポリマーを乾燥させて, 末節骨の3次元形態をもつポリマー(右)を作成する。

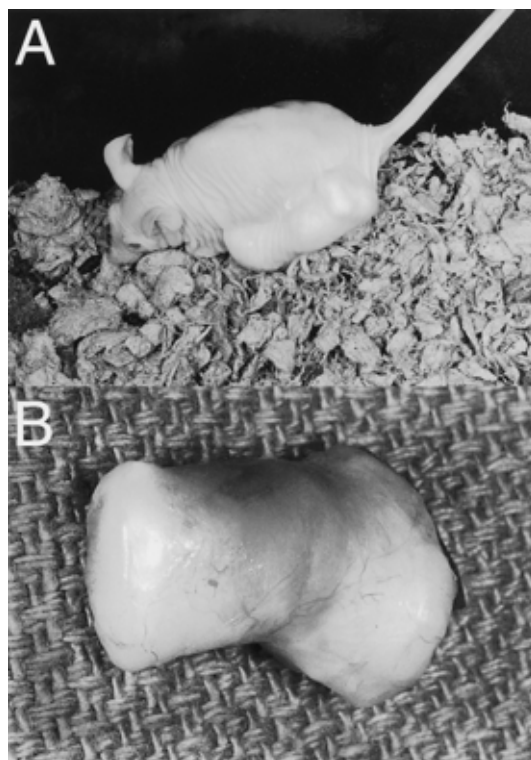


図4 tissue engineering により作成した中節骨(移植後)
A. ニードマウス皮下に移植した培養中節骨
B. 摘出標本の肉眼所見

持されており, 組織学的にも, 明らかな骨と軟骨形成を認めた。次に, 再生中節骨モデルでは, 中節骨独自の形態と構造が保たれていた(図4)。また, 骨断端の両面には, 関節軟骨が形成されていた。中節骨の骨幹端部を観察すると, 軟骨細胞領域, 肥大軟骨領域, 石灰化領域が連続して観察され, 成長帯の形成を示した。この結果から, 再生指骨が, しいに成長してい

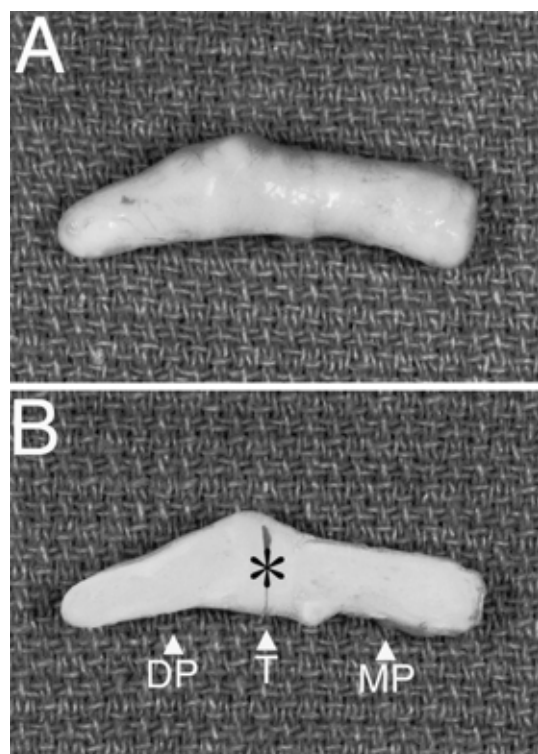


図5 tissue engineering により作成した指関節（移植後）

A. ノードマウス皮下に移植した培養指骨・指関節 B. 3次元形態を有する摘出標本の断面。DP(末節骨), MP(中節骨), T(関節包), * (関節腔)を示す

ることが判明した。最後に、関節モデルでは、関節腔と関節包が、連続する2つの指骨の間に認められ、指関節の正常な形態と構造が再生された(図5)。

再生組織の長期的観察

移植後20週の段階では、再生技術により、正常組織に認められる形態と構造が再生された。しかし、再生組織が経時的にどのように変化するかという点が問題であるため、長期結果を検討した。

移植後60週目に標本採取を行ったところ、移植した中節骨モデルへ周囲組織から十分な血行が供給される様子が肉眼的に観察された。また、正常な指骨の大きさと3次元形態は、移植60週後においても良好に維持されていた。再生指骨は極めて硬いため、歯科用ドリルにて採取標本を半切して断面観察をしたところ、再生中節骨は、正常の解剖学的配列を有する新生骨組織および軟骨組織から構成されていた。

今後の課題と将来展望

Tissue engineering によって再生された新生組織において、播種した細胞と母床由来の細胞のうち、どち

らの細胞により最終的な再生組織が生じるかという点がこれまで不明であり、大きな研究課題として残っていた。

近年、マウス皮下に移植したウシ由来細胞(骨膜、軟骨細胞)・生分解吸収性ポリマー複合体から再生された指骨を用いて、免疫組織化学および *in situ* hybridization を行った結果が報告された。その結果、指骨の関節軟骨部では、播種細胞(ウシ)由来の aggrecan, II型コラーゲンが陽性であり、また、骨幹部においても、播種細胞(ウシ)由来の osteopontin, bone sialoprotein が陽性であった。このことから、マウス皮下に移植した細胞・生分解性ポリマー複合体は、母床(マウス)からの血行は受けるが、新生組織そのものは、播種細胞(ウシ)から構成されることが示唆され、未分化な播種細胞が組織再生に重要な役割を担っていることが明らかとなった。そのため、今後、播種細胞の未分化状態の維持、特定細胞への分化へのメカニズムの解明が必須である。

また、この未分化細胞の増殖・分化能を高める目的でサイトカインの投与方法や、少量の組織から効率良く大量の培養細胞を獲得するための回転培養法の導入も注目される。

現段階では、再生指骨格の臨床応用では、組織再生の期間を大幅に短縮するために血管柙付骨膜を用い、組織再生に適した部位で、異所性に複合体を prefabrication した後、手指欠損部位へ移植する手法が現実的と考えている。また、tissue engineering の手法を用いて、基本構造を満足する関節は再生できるが、一方、靭帯などの関節周囲組織を含めた複雑な関節は未だ再生されていない。このため、臨床応用に際しては、非利き手で、側方への関節動揺性の影響が少ないとされる中指、環指のMP関節への適応の可能性が考えられる。

最後に

この一連の研究を通じ、生分解吸収性高分子を足場として特定細胞を培養し再分化させることで、比較的正確な3次元的構築をもつ複合組織を同時再生できることが判明した。しかし、これらは、まだ小動物レベルの実験結果であるため、この再生技術をヒトに応用するためには、大動物実験が必須となる。

私どもを訪れる患者さんの場合、手指が切断されていれば、再接着術による手指の再建は可能である。しかし、手指外傷例で高度挫滅を伴う場合や、先天的に組織欠損が大きい場合は、手の機能・形態を満足するような再建には限界があり、現在のところ効果的治療法は極めて少ない。Tissue engineering は、これまで難治とされてきた症例に対して、極めて理想的な手技であり、この新しい技術が、まもなく、臨床の場へ導入されると確信している。