

再生医学丛书

(六)

骨骼系统

日本再生医療学会 监修

(日) 脇谷滋之 (日) 郑 雄一 编著

陶 凯 张敬东 马翔宇 全亮亮 主译

再生医学丛书

(六)

骨骼系统

日本再生医療学会 监修

(日) 脇谷滋之 (日) 郑 雄一 编著

陶 凯 张敬东 马翔宇 全亮亮 主译

辽宁科学技术出版社

· 沈阳 ·

KOKKAKUKEI (SAISEIIRYO SOUSHO 6)

Copyright © 2012 by Shigeyuki Wakitani, Yuichi Tei, JSRM Association
Chinese translation rights in simplified characters arranged with
ASAKURA PUBLISHING CO., LTD. through Japan UNI Agency, Inc.,
Tokyo

©2018, 简体中文版权归辽宁科学技术出版社所有。
本书由 ASAKURA PUBLISHING CO., LTD. 授权辽宁科学技术出版社在
中国出版中文简体字版本。著作权合同登记号: 06-2014 年第 17 号。

版权所有·翻印必究

图书在版编目 (CIP) 数据

骨骼系统 / (日) 脇谷滋之, (日) 郑 雄一编著;
陶凯等主译. — 沈阳: 辽宁科学技术出版社, 2019.3
(再生医学丛书)
ISBN 978-7-5591-0906-4

I. ①骨… II. ①脇… ②郑… ③陶… III. ①骨再生
—研究 IV. ①R68

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2018) 第 194723 号

出版发行: 辽宁科学技术出版社
(地址: 沈阳市和平区十一纬路25号 邮编: 110003)
印刷者: 辽宁新华印务有限公司
经销者: 各地新华书店
幅面尺寸: 170mm × 240mm
印 张: 11.25
插 页: 2
字 数: 250千字
出版时间: 2019年3月第1版
印刷时间: 2019年3月第1次印刷
责任编辑: 寿亚荷
封面设计: 刘冰宇
版式设计: 袁 舒
责任校对: 栗 勇

书 号: ISBN 978-7-5591-0906-4
定 价: 50.00元

邮购热线: 024-23284502
编辑电话: 024-23284370
E-mail: syh324115@126.com

译者名单

主 审 刘晓燕

主 译 陶 凯 张敬东 马翔宇 全亮亮

副主译 王 禾 王立新 梁久龙 金志刚

何景涛 刘双阳 宋英莉 付志强

边志超 孔 旭 张 权 郭冰玉

回 蔷

参译人员 时 杰 常 鹏 张 叶 刘 花

张庭辉 金 元 赵 海 王俊歌

林 枫 苗雨晴 唐 琪 邹日峰

徐志山 董 冰 马瑞珩 钟黎明

王 亮 赵 迪 滕海燕 马书丹

宋晓旭 车雨阳 林时秀

原著前言

骨和软骨与皮肤一样是最早进行再生医学研发的组织。但是，在日本，直到 2012 年 7 月出现自体软骨细胞产品（JACK）之前一直未得到许可。在世界范围内，在通过自体软骨细胞移植获得的商品化再生关节软骨方面，1997 年，美国 FDA 批准了世界上第一批骨科领域的产品。到目前为止，在欧美、韩国等国家和地区，已经实施了 2 万例以上的手术，之后多个软骨再生用产品通过审批。骨再生是从 20 世纪 80 年代开始由大串 始先生进行研究并且最早应用于临床的，但是当时并没有被批准生产产品。

像这样在日本获得批准生产的产品基本上不存在，不仅是骨和软骨，在所有的再生医学领域中均显示出基础研究的困难性。日本最初的再生治疗产品是 2007 年制造并通过审批的自体皮肤细胞 JACE，自体软骨细胞 JACK 是第二种。目前，再生治疗产品还是只有这两种。但是，从基础研究到临床研究，各种各样深入的研究正在进行。其中还有以治疗效果为目标的临床研究。在日本现在这方面的限制逐渐缓和，与以前相比，批准生产变得容易，但是门槛还是很高。今后，仍需要工业、政府和学术界三方面的努力。

本书阐述了关于软骨、骨、肌肉、半月板等骨科领域的再生医学研究现状，由进行最尖端研究的专家负责讲解，不仅包括细胞移植，还有细胞因子、Micro-RNA 等的再生研究。希望这个领域的研究者、学生，甚至是其他领域的研究者会对此产生很大的兴趣。在此向抽出宝贵时间执笔写作的诸位老师表示感谢！

脇谷滋之 郑 雄一

2012 年 10 月

原著作名单

编著者

脇谷滋之 武库川女子大学健康、运动科学部
郑 雄一 东京大学研究生院工学研究科

执笔者

(按编写顺序)

中佐智幸 广岛大学研究生院医齿药保健学研究院
安达伸生 广岛大学研究生院医齿药保健学研究院
出家正隆 广岛大学研究生院医齿药保健学研究院
龟井豪器 广岛大学研究生院医齿药保健学研究院
江口明生 广岛大学研究生院医齿药保健学研究院
越智光夫 广岛大学研究生院医齿药保健学研究院
星 和人 东京大学研究生院医学系研究科
高户 毅 东京大学研究生院医学系研究科
脇谷滋之 武库川女子大学健康、运动科学部
关矢一郎 东京医科齿科大学研究生院医齿学综合研究科
宗田 大 东京医科齿科大学研究生院医齿学综合研究科
冈田 稔 京都大学 iPS 细胞研究所
妻木范行 京都大学 iPS 细胞研究所
高冈邦夫 西宫渡边医院
川口 浩 东京大学研究生院医学研究科

- 胜部好裕 产业技术综合研究所健康工程学研究部门
弓场俊辅 产业技术综合研究所健康工程学研究部门
大串 始 大隈医院骨科
名井 阳 大阪大学医学部附属医院
吉川秀树 大阪大学研究生院医学研究科
大庭伸介 东京大学研究生院医学研究科
郑 雄一 东京大学研究生院工学研究科
龟井直辅 广岛大学医院再生医学部
石川正和 广岛大学研究生院医齿药保健学研究院
史 明 广岛大学研究生院医齿药保健学研究院
大川新吾 广岛大学研究生院医齿药保健学研究院
桥本祐介 大阪市立大学研究生院医学研究科

目 录

I 软 骨

1 去端肽胶原凝胶包埋培养软骨细胞移植技术	
..... (中佐智幸, 安达伸生, 出家正隆, 龟井豪器, 江口明生, 越智光夫) ...	2
1.1 培养软骨细胞移植技术	2
1.2 问题点和今后展望	8
2 使用软骨细胞的颌面部软骨再生	
..... (星 和人, 高户 毅) ...	11
2.1 颌面部软骨再生医学的必要性	11
2.2 颌面部的软骨组织	12
2.3 应用软骨再生医学的治疗现状	13
2.4 有关颌面部软骨再生医学的研究动向	15
2.5 需要应用软骨再生治疗的颌面部疾病	19
2.6 今后的研究方向	21
3 通过骨髓间充质细胞移植的关节软骨缺损修复	
..... (脇谷滋之) ...	24

3.1	关节软骨缺损修复	24
	专栏 1	26
3.2	通过自体骨髓间充质细胞移植的关节软骨缺损修复	27
3.3	新的骨髓间充质细胞移植方法	29
3.4	细胞培养的基础条件	29
3.5	软骨细胞分化诱导后的移植	30
3.6	关节软骨缺损的临床问题	31
	专栏 2	32
4	使用滑膜间充质干细胞的软骨再生	
	 (关矢一郎, 宗田 大) ...	36
4.1	软骨损伤	36
4.2	间充质干细胞的特征	36
4.3	滑膜间充质干细胞的移植	45
5	使用多能干细胞的软骨再生	
	 (冈田 稔, 妻木范行) ...	50
5.1	胚胎干细胞 (ES 细胞) 和诱导多能干细胞 (iPS 细胞)	51
5.2	iPS 细胞的安全性	53
5.3	小鼠 ES 细胞和 iPS 细胞的软骨细胞诱导	54
5.4	人 ES 细胞和 iPS 细胞的软骨细胞诱导和质量管理	55

5.5 成纤维细胞向软骨细胞诱导	57
------------------------	----

II 骨

6 应用骨形成蛋白 (BMP) 的骨再生诱导	(高冈邦夫) ... 64
6.1 骨再生医学技术的现状和将来	64
6.2 BMP 应用于骨再生研究的历史背景和经过	65
6.3 使用合成 BMP 的骨再生治疗	67
6.4 在动物模型中通过 BMP/多聚体/ β -TCP 复合体进行骨再生的研究	69
6.5 其他应用 BMP 的可能性	78
6.6 具有增强 BMP 生物活性 (骨诱导分化) 的药物	78
7 应用成纤维细胞生长因子-2 的骨再生	(川口 浩) ... 81
7.1 骨软骨生成中 FGF 的生理作用	81
7.2 FGF-2 和骨生成	82
7.3 重组 FGF-2 的临床治疗试验	83
8 应用间充质干细胞的骨再生	(胜部好裕, 弓场俊辅, 大串 始) ... 88

8.1	骨组织特点	88
8.2	骨再生和骨移植	89
8.3	包含培养细胞的新骨移植(再生培养骨移植)	89
8.4	再生培养骨的制作方法	91
8.5	备受期待的技术	97
8.6	应用同种 MSC 的骨再生	99
8.7	展望	102
9	应用骨髓间充质干细胞和陶瓷人工骨的骨再生 (名井 阳, 吉川秀树) ...	105
9.1	通过定制人工骨进行骨再生	105
9.2	骨再生医学的临床评价方法	112
10	应用多能干细胞的骨再生 (大庭伸介, 郑 雄一) ...	120
10.1	应用 ES 细胞的骨再生方法	121
10.2	应用 iPS 细胞的骨再生方法	125
10.3	ES 细胞和 iPS 细胞应用于骨再生时的问题及其解决方法 ...	127
10.4	未来展望	128

III 骨骼肌和半月板

11 骨骼肌的再生

.....	(龟井直辅,石川正和, 中佐智幸, 史 明, 大川新吾, 越智光夫) ...	134
11.1	骨骼肌损伤后的修复机制	134
11.2	针对骨骼肌损伤的细胞移植治疗	134
11.3	外磁场产生的细胞输送系统	140
11.4	应用 micro-RNA 的新型治疗方法	143

12 半月板再生

.....	(桥本祐介) ...	151
12.1	正常半月板的性质	152
12.2	半月板损伤的表现	157
12.3	半月板再生的尝试	158

I

软骨

1 去端肽胶原凝胶包埋培养 软骨细胞移植技术

关节软骨中没有血管、神经、淋巴管,少数的软骨细胞主要被由胶原蛋白和蛋白聚糖形成的丰富的软骨基质所包围。软骨细胞本身是高度分化的,几乎不进行增殖,发生损伤后很难通过一般的修复机制进行修复。因此,一旦发生软骨损伤,损伤部分不仅不能自然修复,还会产生时序性周围软骨组织的变性和破坏,最后发展为变形性关节炎。因此,在早期对关节软骨进行修复至关重要。通过原有的软骨进行完全修复的技术尚未成熟。骨髓刺激法和骨软骨移植技术作为关节软骨修复的常规方法经常被使用。骨髓刺激法是指在软骨损伤部位从软骨下骨到骨髓制作一个贯穿骨孔,从骨髓向软骨损伤部位诱导,可以使用各种各样的生长因子和骨髓来源的细胞,使软骨损伤部位被纤维软骨组织覆盖^[1]。骨髓刺激法具有操作简便、微创等优点,但是覆盖软骨损伤部位的组织不是原来的关节软骨而是纤维软骨,在力学上具有一定的脆弱性,存在效果不稳定等问题。骨软骨移植技术是指在股骨的非负重部位采集骨软骨,并将其移植到软骨损伤部位。该技术虽然具有使用原来的关节软骨进行修复的优点,但是由于移植的软骨与缺损部位的曲率值不能完全一致,关节面很难恢复到原来水平,而且该方法存在采集部位创伤大、骨软骨获取数量有限等问题^[2]。

1.1 培养软骨细胞移植技术

1994年,博瑞格等报道了从股骨非负重部位采集软骨细胞进行培养,将增殖后的软骨细胞向软骨缺损部位进行移植的技术^[3,4]。他把软骨组织摘取后用酶进行处理,使软骨细胞游离,进行单层培养并使之增殖后制成软骨细胞悬浮液,将悬浮液向自体骨膜覆盖的软骨缺损部位注入。移植后共报道有23

例病例获得了良好效果。但是,此方法也存在着若干问题。首先,由于软骨细胞是在悬浮状态下进行移植的,因此移植过程中可能从修补的骨膜的间隙中漏出大量软骨细胞。并且,软骨细胞可能因单层培养而去分化。索恩等发现,悬浮液移植的软骨细胞由于受到重力影响而分布不均匀^[5]。为了克服这些问题,奥基等将自体软骨细胞置于去端肽胶原凝胶内进行三维立体培养,之后制作成软骨样组织,再向软骨缺损部位移植,并于1996年开始临床应用^[6,7]。去端肽胶原凝胶是用牛的真皮精制而成的I型胶原蛋白,因为去除了具有抗原性的端肽,具有免疫反应少、安全性高等优点,目前已经逐渐应用于临床。去端肽胶原凝胶内部为非常密集的网孔状结构,具有适合细胞增殖的支架结构。内羽等把人的软骨细胞置于去端肽胶原凝胶内进行三维立体培养,使软骨细胞保持球形的状态,在不用去分化的条件下进行增殖,结果在其周围确认了II型胶原蛋白和硫酸软骨素等细胞外基质的产生^[8]。胜兵清光等将在去端肽胶原凝胶内进行立体培养的软骨细胞制作成软骨样组织,再将其移植到兔软骨缺损模型中。与单层培养的软骨细胞悬浮液组相比,此方法得到了良好的修复效果^[9]。以软骨细胞增殖和基质产生为目标,多位学者进行了多方面的研究和讨论。岩佐沙罗等就去端肽胶原凝胶内的不同细胞密度所导致的细胞增殖能力及基质产生的差异进行了研讨。他分别采用 2×10^5 个/mL、 2×10^6 个/mL、 2×10^7 个/mL的细胞密度进行4周的三维立体培养,发现其中 2×10^5 个/mL的密度使软骨细胞增殖最多。另一方面,在 2×10^7 个/mL的细胞密度中硫酸软骨素产生是最多的,但在此密度下观察到细胞数量发生了下降^[10]。栗山等通过2周的软骨细胞单层培养和之后1周的立体培养,得到了良好的软骨细胞增殖和细胞外基质产生的结果^[11]。通过对碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)、透明质酸、低输出的超声波对去端肽胶原凝胶内软骨细胞的增殖及细胞外基质产生影响的调查发现,bFGF、透明质酸使细胞数量增加,透明质酸还能够使软骨基质的产生增加^[12,13]。低输出超声波虽然能够使硫酸软骨素的产生亢进,但是对细胞数量没有影响^[11]。

通过进行这些基础实验研究,已经逐步开始实施去端肽胶原凝胶包埋培养软骨细胞移植技术。以下对这项技术的操作进行叙述^[6,7,13]。

1.1.1 软骨损伤的评价

在关节镜下，可以对软骨损伤的位置、形状、大小、深度进行评价（图 1.1）。特别是大小和形状可以作为制作软骨样组织的参考，对正确地掌握损伤情况十分重要。本方法适用于大小在 1cm^2 以上、到达软骨下骨水平的软骨损伤。

1.1.2 软骨获取

在判断软骨缺损治疗适用本方法后，进行软骨获取。在关节镜下，应用髓核钳钳夹股骨内外侧髁非负重部位的软骨片（图 1.2）。如果有骨软骨游离体，也需要进行软骨片的采取。大约需要采取 300mg 的软骨片作为细胞源，之后将其置入无菌培养基内用手术剪刀剪成小碎片（图 1.3）。采用注射器、试管等收集软骨片，用 PBS 洗净后，使用胰蛋白酶、胶原酶进行酶处理，使软骨细胞游离，大约得到 2×10^6 个软骨细胞。采集患者的外周血，分离血清，制作成培养液。

1.1.3 培养

把游离的软骨细胞和去端肽胶原凝胶混合、包埋，置于 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 环境中凝胶化，加入培养液进行 3 周的培养。培养液中加入患者本人的血清和

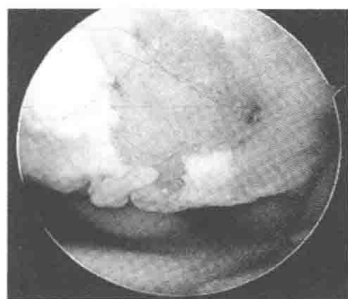


图 1.1 软骨损伤部位（引用文献 15）

在关节镜下对软骨损伤进行评价，重点观察形状、大小、深度等指标。如果为本方法的适应证，则从非负重部位获取软骨。

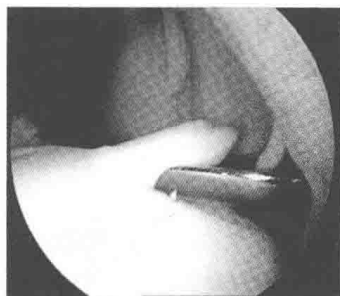


图 1.2 从非负重部位获取软骨（引用文献 15）

通过关节镜下的观察，用髓核钳获取软骨组织。

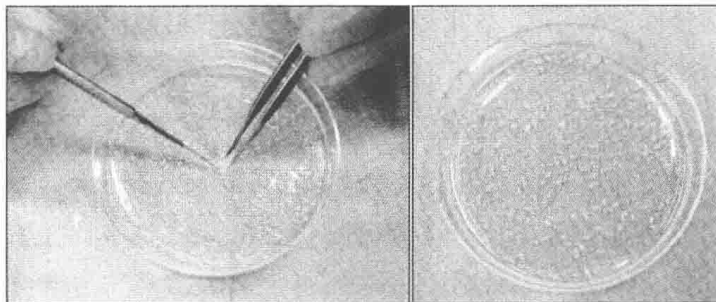


图 1.3 获取的软骨片（修改自文献 15，有改动）

获取到的软骨片置于无菌培养基内，并用手术剪刀剪成大小约为 1mm^3 的小碎片。如果有骨组织混入，应尽可能除去。

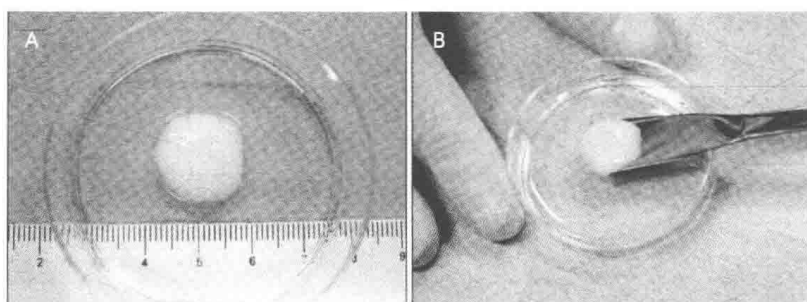


图 1.4 经过 3 周培养后的软骨样组织 (A)。培养期间组织的硬度增加，能够用镊子夹取 (B)（修改自文献 15，有改动）

抗生素，并加入影响软骨基质产生重要物质 L- 抗坏血酸，每 3 天更换培养液。在 3 周的培养时间里，软骨细胞在去端肽胶原凝胶中产生细胞外基质的同时也进行增殖。在培养终末期，形成了软骨样组织（图 1.4）。

1.1.4 移植操作

a. 关节的展开

取仰卧位，使用空气驱血带驱血，在无血术野下进行手术。在软骨损伤部位上，为了使软骨损伤部位充分暴露，使用侧板等调整屈膝角度十分重要。具体方法为，当股骨髁部的软骨发生损伤时，选择从这个部位的内侧或者外侧膝盖旁进行切开，切关关节后显露软骨损伤部位。

b. 软骨损伤部位的清理

软骨损伤部位显露后，对软骨损伤部位、损伤周围软骨的变性进行评价（图 1.5）。之后将软骨损伤部位连同周围的变性软骨一并进行清理（图 1.6）。