

厚生科学研究費補助金

ヒトゲノム・再生医療等研究事業

組織工学技術を用いた骨・軟骨再生に関する研究

平成 13 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 上田 実

平成 14 (2002) 年 4 月

## 目 次

I. 総括研究報告書	
組織工学技術を用いた骨・軟骨再生に関する研究	----- 1
上田 実	
II. 分担研究報告	
1. 未分化間八葉系細胞・幹細胞培養に関する研究	----- 9
島 賢一郎	
2. 軟骨組織マトリックスの検討、臨床応用に関する研究	----- 11
鳥居 修平	
3. 細胞の大量培養システムの確立に関する研究	----- 13
小林 猛	
4. 骨組織マトリックスの作成に関する研究	----- 15
高井 治	
5. 培養器の表面性状の改良に関する研究	----- 17
小林 一清	
6. 軟骨基質の検討、細胞分化の評価に関する研究	----- 19
木全 弘治	
7. マトリックスの改良および開発に関する研究	----- 21
春日 敏宏	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 23
IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 25

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）

総括研究報告書

組織工学技術を用いた骨・軟骨再生に関する研究

主任研究者 上田 実 名古屋大学大学院医学研究科頭頸部・感覚器外科学講座 教授

研究要旨

ティッシュエンジニアリングは、生きた細胞を用いて移植組織が作製できる極めて優れた方法として世界的に注目されている。今回骨、軟骨組織の再生に着目し、これらティッシュエンジニアリングの手法を用いた骨系統疾患患者の治療方法を確立しようとするものである。本研究の特徴は、基礎的研究から臨床応用まで一貫して検討することにある。今年度は主に未分化間葉系細胞を分離培養し、これら細胞について細胞生物学的特徴を明らかにした。また種々のマトリックスの検討を行った。さらに骨、軟骨細胞の大量培養や分化促進を目的に機械的刺激下での培養を用いた方法を検討した。

分担研究者

畠賢一郎 名古屋大学医学部組織工学講座  
助教授

鳥居修平 名古屋大学医学部形成外科 教授

小林 猛 名古屋大学大学院工学研究科生  
物機能工学専攻生物プロセス工学講座 教授

高井 治 名古屋大学大学院工学研究科材  
料プロセス工学専攻 教授

小林一清 名古屋大学大学院工学研究科生  
物機能工学専攻生体材料工学講座 教授

木全弘治 愛知医科大学分子医科学研究所  
教授

春日敏宏 名古屋工業大学工学部材料工学  
科ハイブリッド機能機構学講座 助教授

とそのため基盤的技術を早急に確立させ、再生医療用製品生産に関わる産業の発展を促進させることが必要不可欠である。本研究開発は、多種類の細胞を生体中にある状態と同様に組織化し、組織・臓器の持つ高次な機能を再現するための細胞組織工学技術を確立するとともに、再生した細胞組織を用いての各種生理活性物質、例えばサイトカイン、各種成長因子、血清等の生産にも寄与する等、広範な分野での新規産業の創出に資するものである。

近年注目されているティッシュエンジニアリング技術を用い、自家あるいは同種の骨移植にかわりうる、新しい人工骨あるいは軟骨材料を開発し臨床応用に至る道筋を拓くことが本研究課題の主眼である。以下、本研究の具体的目標として、骨、軟骨組織に分けて述べる。

A. 研究目的

国民が高度な医療を享受してゆくためには、細胞組織工学（ティッシュエンジニアリング）を基礎としたヒト組織の再生技術

骨：整形外科または顎顔面外科においては欠損した骨の再建を日常臨床として行っている。現在までの研究により骨形成能を有

する細胞を培養増殖することが可能となり、これらを用いた人工骨への可能性は高い。したがって本研究課題としては、これらマトリックスの開発を含めた細胞の移植方法の確立が主なテーマである。

軟骨：現在までに軟骨形成能を有したままでの軟骨細胞の大量培養法は確立されていない。これは軟骨細胞の分化と増殖の制御が困難であることに由来する。本研究ではその前半でこれら軟骨細胞の大量培養法を試みる。その方法としてはバイオリクターを用いた培養や、メカニカルストレス下での培養を試みる。またこれら培養軟骨細胞を種々のマトリックスを用いて生体に移植し、関節軟骨を作成する。

さらに、未分化間葉系細胞（MSC）を分離し、それらを骨および軟骨に分化させる因子の解明を行っていく。本研究の成果いかなんでは、推定 1000 万人ともいわれる重症骨系統疾患患者の運動機能の回復に大きく貢献すると確信する。また本研究では最終的に臨床応用することを強く意識し、臨床現場で有効かつ使用が簡便な材料形状を念頭に置いた人工骨の開発を目指すことを付言したい。

## B. 研究方法

### 骨髄由来ヒト間葉系幹細胞の細胞機能研究

今後行っていく分化制御の前段階として培養中の細胞機能を詳細に観察することを目的として実験を行った。また遺伝子レベル(RNA)での検討も行い、細胞接着因子と骨分化誘導との関係を ALP, Osteocalcin, CBFA-1, BMP2 遺伝子の発現を ABI Prism 7000 sequence system により定量した。また各サイトカイン、機械刺激、酸素分圧等に

よる骨、軟骨分化に及ぼす影響について骨、軟骨マーカーにより生化学的に測定を行う。これらにより、この細胞を用いた組織作成上の指針となるデータが得られるものと考ええる。

### 骨再生に関する研究

すでに骨髄由来の骨形成能を有する細胞およびブロック型カルシウムーリン酸化合物を用いて、種々の動物に骨形成させてきた。臨床的操作性を考えるとブロック状のマトリックスより注入型マトリックスが有利であるが、生きた細胞を用いているために細胞周囲に密に無機化合物が存在することは、細胞にとっての呼吸および代謝に不利となる場合がある。いかにより多くの強固な骨組織を作るかに焦点をあて、多血小板血漿、基材、b-TCP 粉末の混合比や移植方法などの検討を行っていく。また間葉系幹細胞の骨分化時に超音波および細胞伸展ストレス刺激を行い、それらの刺激による骨分化能亢進作用について生物学的、生化学的解析を詳細に行うことによりサイトカイン類だけでなくストレス刺激による骨形成能の向上に役立てる。

今までに行った細胞培養技術と、注入型マトリックスを評価し、臨床応用に向けて総括する。また、整形外科領域における応用を考え、体幹における長幹骨への応用のために強度の大きいブロック状マトリックスを開発する。さらに、翌年からの臨床応用に向けて治療体系を確立する。

### 軟骨再生に関する研究

大量培養法の確立を目的に、バイオリクターおよび種々の機械的刺激装置を作成し、軟骨細胞の分化および増殖制御を検討する。軟骨細胞のマーカーとなりうるもの

を指標により多くの組織を作製できるよう超音波刺激および酸素分圧等による細胞変化について生化学的解析を行う。さらに前年度に行ってきた注入型マトリックスによる軟骨作製を検討する。未分化間葉系細胞の軟骨細胞への分化能について検討する。またスポンジ型および注入型マトリックスについて最適なものを決定する。これらを通じて臨床応用にむけた総括を行い、治療体系を確立する。

#### (倫理面への配慮)

本研究におけるヒト組織の取り扱いについては、申請者らが培養皮膚および粘膜の際に行っている方法を踏襲して行った。すなわち組織採取を行う場合、手術時に余剰となったものを利用することを原則に、該当患者に書面および口頭で十分に説明し同意を得た。さらにこれら説明文、同意書については名古屋大学倫理委員会にて承認されたものを用いた。また、採取したすべての組織については患者プライバシーの保護のためドナー情報は秘密にて行うこととする。また動物実験においては使用動物および使用法に関して慣例を逸脱しないように配慮した。

#### C. 研究結果

ヒト間葉系幹細胞(mesenchymal stem cell: MSC)に関する研究では、ヒト骨髓液からの分離、培養に関しては以前より成功をしており、さい帯血、ヒト末梢血中に存在するごく少量のMSCの採取、分離、培養技術に関して実験を試みている。骨髓より培養されたMSCから、その細胞の特異的細胞表面マーカーを、FACSによる抗体染色により検

討を行った。これらよりCD29, 44, 73, 105, 166 positive 抗体として、CD14, 34, 45 をnegative 抗体として、微量なMSCを取る上で関連がありそうな抗体であることが分かった。これらの抗体にマグネットビーズ付け、autoMACSによる分離法を行い、さい帯血、末梢血中に存在する微量なMSCを単離、濃縮することが可能となった。しかし、それらのとれた細胞からの十分な細胞増殖や骨芽細胞への分化能が得られておらず、更なる培養方法の検討が課題である。

また、骨髓MSCに関しては、より効率的かつ大量採取する方法、培養条件下における骨芽細胞への分化促進の方法、移植に用いるマトリックスの検討を加え、より効率的な骨形成率実現のために実験を試みた。細胞外マトリックスとしてfibrinogen, Type I collagen, fibrinogen + Type I collagen ディッシュ上で培養し、骨形成マーカーであるALP, osteocalcin, BMP-2, CBFA-1 遺伝子により、骨形成能をRNA レベルで比較検討した。その結果、ALPにおいてはコントロールに比べてfibrinogenはおよそ2倍、osteocalcinはfibrinogen + Type I collagenで約10倍、CBFA-1ではfibrinogen, Type I collagen, fibrinogen + Type I collagenそれぞれコントロールに比べ3倍、6倍、12倍に骨形成能をあげることがわかった。また低出力超音波(US)や伸展刺激が細胞機能におよぼす影響を検索し、人工骨、軟骨作製のためのメカニカルストレスの有用性を明らかにすることを目的として実験を行った。10%の細胞進展ストレス刺激、または $1.5 \text{ mW/cm}^2$ の強さによる超音波ストレス(US)を7日間持続的に行い、これらに対する細胞の反応性を評価した。その結果、伸展刺激および

US を付加したものは対照群と比較して ALP 活性、細胞内カルシウム蓄積量、各種骨基質マーカー（オステオポンチン、オステオネクチン、type I collagen 等）(Western blot)が 1.5〜2 倍上昇しており、骨芽細胞へ分化傾向にある細胞にとって、伸展刺激および US が何らかの影響により分化を促進する効果がある事が示唆された。

新しい注入型マトリックスを用いた骨補填剤の開発では、注入可能な骨形成マトリックスを作製し、ここに MSC を加え移植する検討を行っている。マトリックスには多血小板血漿(PRP)を用い、MSC より分化誘導した骨芽細胞を同時に投与することによって十分な骨形成が得られている。今後骨作製時における血管が入りやすい基材や臨床応用に適した流動性を持つような新たな材料学的検討を行っていく予定である。

軟骨再生に関する研究においても、骨再生の実験と同様に、メカニカルストレスの影響による細胞分化促進効果についての実験を行っており、超音波を 15 mW/cm<sup>2</sup> 一日 10 分間 1 週間かけた群で軟骨マーカーであるコンドロカルシン量やムコ多糖の量などが上昇する傾向にあった。今後、MSC からの軟骨作製時にも、超音波刺激によるより高性能な組織を作製する検討を行っている。

#### D. 考察

骨：整形外科または顎顔面外科においては欠損した骨の再建を日常臨床として行っている。現在までの研究により骨形成能を有する細胞を培養増殖することが可能になり、これらを用いた人工骨への可能性が高くなった。MSC の分化や増殖に関わる増殖因子、

接着因子、メカニカルストレス等さらなる検討を行い、マトリックスの開発を含めた細胞の移植方法の確立が主なテーマとなるであろう。

軟骨：現在までに軟骨形成能を有したままでの軟骨細胞の大量培養法は確立されていない。これは軟骨細胞の分化と増殖の制御が困難であることに由来する。本研究でこれら軟骨細胞の大量培養法の指針を示すことができた。バイオリクターを用いた培養や、メカニカルストレス下での培養を実際に行い、臨床に基づく大量培養法の確立を試みる。またこれら培養軟骨細胞を種々のマトリックスを用いて生体に移植し、関節軟骨を作成し、評価をする必要があるであろう。

#### E. 結論

今年度の実験結果により、高性能な骨および軟骨作製に関する有利な条件検討ができ、よりよい移植材料作製に関する指針を開発することができた。注入型マトリックスとしてよりよい骨形成能をもつ基材についての検討を続けていくことにより、臨床応用に向けた改良を進めたい。これらのことは MSC からより早く、またより多くの組織を作製することを目標に、パッケージングも含めこれら改良に着手する。具体的には、骨、軟骨形成率や分化度を指標に、各種生理活性物質やサイトカイン類、細胞外マトリックス、メカニカルストレス刺激などの影響について本格的に検討を行う。また、口腔外科的に、インプラント治療の治療期間短縮への応用も考慮にいれて行き、より臨床応用を視野にいれていくこととする。また、歯周病における応用へも広げて

行くよう研究を進めることとしている。

#### F. 健康危険情報

本研究において国民の生命、健康に重大な影響を及ぼす事項は発生していません。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Ueda M., Tohnai I., Nakai H. Tissue engineering research in oral implant surgery. *Artificial Organs.* 25(3): 164-71, 2001

Sumi, Y., Muramatsu, H., Hata, K., Ueda, M., Muramatsu, T.

Midkine Enhances Early Stages of Collagen Gel Contraction *J. Biochem* 2000 127 : 247-251

Ueda, M., Sumi, Y., Mizuno, H., Honda, M., Oda, T., Wada, K., Boo, J., Hata, K.

Tissue engineering: application for maxillofacial surgery

*Materials Science and Engineering* 2000 C13 7-14

Sumi, Y., Muramatsu, H., Hata, K., Ueda, M., Muramatsu, T.

Secretory Leukocyte Protease Inhibitor Is a Novel Inhibitor of Fibroblast-mediated Collagen Gel Contraction. *Experimental Cell Research* 2000 256 : 203-212

Minoru Ueda, et al.: Establishment of Bioskin bank: How we do it in our hospital.

*Ann. Plast. Surg.* 1999, 42, 5, 574-576

Honda, M., Yada, T., Ueda, M., and Kimata, K.: Cartilage formation by cultured chondrocytes in a new scaffolds made of poly (L-lactide-ε-caprolactone) sponge, *J. Oral Maxillofac., Surg.* 58, 767-775, 2000.

夫 才成, 日比野祥敬, 山田陽一, 新美敦, 本田雅規, 岡崎恭宏, 畠賢一郎,

吉川隆章, 上田 実.

生体吸収性セラミック β-TCP を足場に用いた培養人工骨に関する実験的研究.

*日本口腔外科学会誌*, VOL47, 2000

(分担研究者)

(畠 賢一郎)

Maeda, H., Kasuga, T., Nogami, M., Hibino, Y., Hata, K., Ueda, M., Ota, Y. Biomimetic apatite formation on polylactic acid composites containing calcium carbonates

*Journal of Materials Research*, (as a Rapid Communication)(in press)

Boo JS, Yamada, Y., Okazaki, Y., Hibino, Y., Okada, K., Hata, K., Yoshikawa, T., Sugiura, Y., Ueda, M. Tissue Engineered bone using mesenchymal stem cells and a biodegradable scaffold

*J. Cranio-fac. Surg.* (in press)

Hiramatsu. Kagami H. Horie K. Okazaki Y. Shigetomi T. Hata K. Kobayashi S. Ueda M. Effects of basic fibroblast growth factor on cultured rat and human submandibular salivary gland cells. *Archives of Oral Biology.* 45(7): 593-9, 2000

M. Matsuno, K. Hata, et al: In vitro analysis of distraction osteogenesis

*J. Craniofac. Surg.* 2000 11(4): 303-307

H. Mizuno, N. Emi, A. Abe, I. Takahashi, T. Kojima, H. Saito, Y. Sumi, K. Hata, M. Ueda: Successful Culture and Sustainability in Vivo of Gene-Modified Human Oral Mucosal Epithelium. *Human Gene Therapy*, 1999 10, 825-830,

Ueda, M., Matsuno, M., Sakai, K., Hata, K.  
Mechanism of New Bone Formation During  
Distraction Osteogenesis

Craniofacial Distraction osteogenesis: 37-41,  
2001

Yukio Sumi, Ken-ichiro Hata, Yoshihiro Sawaki,  
Hirokazu Mizuno, Minoru Ueda: Clinical  
application of cultured oral epithelium for  
palatal wounds after palatoplasty:a preliminary  
report.

Oral Diseases, 1999,5,307-312

(鳥居 修平)

Ando H. Ito K. Torii S. Kasai Y. Akiyama S.  
Nakao A. Pedicle myocutaneous flaps for  
reconstruction following total pelvic  
exenteration of intrapelvic recurrent rectal  
cancer: report of a case. Surgery Today.  
31(4): 363-6, 2001.

Kato H. Takada T. Yukawa Y. Yanase M.  
Torii S. External venous shunt as a solution  
to venous thrombosis in microvascular  
surgery. British Journal of Plastic Surgery.  
54(2): 164-6, 2001

Kamei Y. Torii S. Hasegawa T. Aoyama H.  
Yokoo K. Endoscopic correction of pectus  
excavatum. Plastic & Reconstructive Surgery.  
2001 107(2): 333-7

Kamei Y. Torii S. Natural skin reduction and  
breast recovery using a tissue expander after  
enucleation of a giant breast tumour.  
Scandinavian Journal of Plastic &  
Reconstructive Surgery & Hand Surgery. 2000  
34(4):383-5

Iwashita N., Muramatsu H., Toriyama K., Torii  
S., Muramatsu T.: Expression of midkine in

normal

and burn sites of rat skin. Burns: 1999,  
25(2):119-124

(小林 猛)

Hirokazu Kikuta, Kenjiro Kano, Hiroyuki  
Honda and Takeshi Kobayashi : Optimization  
of bovine cathepsin C production by cultivation  
of recombinant methylotrophic yeast *Candida  
boidinii*, Journal of Chemical Engineering of  
Japan, 2001 34(6), 848-851

Masataka Suzuki, Masashige Shinkai, Hiroyuki  
Honda, Masamichi Kamihira, Shinji Iijima and  
Takeshi, Kobayashi : Construction of tumor-  
specific cells expressing a membrane- anchored  
single-chain Fv of anti-ErbB-2 antibody,  
*Biochimica et Biophysica Acta*, 2001 1525,  
191-196

Eiji Nagamori, Mariko Omote, Hiroyuki Honda  
and Takeshi Kobayashi : Enhanced and  
prolonged production of regenerated plantlet  
from carrot callus in viscous additive-  
supplemented medium, *Journal of Bioscience  
and Bioengineering*, 2001 91(3), 283-287

(高井 治)

Gomez-Vega JM. Hozumi A. Saiz E. Tomsia  
AP. Sugimura H. Takai O. Bioactive  
glass-mesoporous silica coatings on Ti6Al4V  
through enameling and triblock-copolymer-  
templated sol-gel processing. *Journal of  
Biomedical Materials Research*. 56(3): 382-9,  
2001

N.Asai,Y.Inoue,H.Sugimura, O.Takai: Structural  
and Electrochromic Properties of InN Thin  
Films *Thin Solid Films*,:1999, Vol.332 No.1 267  
H.Sugimura,O.Takai,N.Nakagiri: Scanning  
Probe Lithography for Electrode Surface



Modification. J. Electroanal. Chem.: 1999, Vol. 473  
No. 1-2, 230-234

H. Sigimura, Y. Sato, K. Shiyama, O. Takai, Y. Sakamoto, M. Takaya, N. Nakagiri: Characterization of Individual Diamond Crystals in Micro Diamond Rays Using an AFM-based Technique. Appl. Surf. Sci.: 1999, 1, 144-145, 593-597

(木全 弘治)

L. Zhuo, M. Yoneda, M. Zhao, W. Yingsung, N. Yoshida, Y. Kitagawa, K. Kawamura, T. Suzuki, K. Kimata. Defect in SHAP-hyaluronan complex causes severe female infertility. J Biol Chem 2001; 276:7693-7696.

J. Rong, H. Habuchi, K. Kimata, U. Lindahl, M. Kusche-Gullberg. Substrate specificity of the heparan sulfate hexuronic acid 2-O- sulfotransferase. Biochemistry 2001; 40:5548-5555

(春日 敏宏)

T. Kasuga, Y. Hosoi, M. Nogami, and M. Niinomi, J. Am. Ceram. Soc., Apatite Formation on Calcium Phosphate Invert Glasses in Simulated Body Fluid, Soc 2001., 84, 450-452

T. Kasuga, Y. Ota, M. Nogami, and Y. Abe, Preparation and Mechanical Properties of Polylactic Acid Composites Containing Hydroxyapatite Fibers, Biomaterials, 2001 22, 19-23

T. Kasuga, T. Mizuno, M. Watanabe, M. Nogami, and M. Niinomi, Calcium Phosphate Invert Glass-Ceramic Coatings Joined by Self-Development of Compositionally Gradient Layers on a Titanium ALLOY, BIOMATERIALS, 2001 22, 577-582

(小林 一清)

Yoshihiro Nishida, Kideaki Tamakoshi, and

Kazukiyo Kobayashi

A Novel Bovine b1, 4-Galactosyltransferase Reaction with an Acyclic Amino Alcohol to Yield 3-O-b-D-Galactosyl-sn-glycerol Skeleton Org. Lett. 2001 3, 1-3

Kazunori Matsuura, Miki Hibino, Yoshinao Yamada, and Kazukiyo Kobayashi

Construction of Glyco-clusters by Self-organization of Site-specifically Glycosylated Oligonucleotides and Their Cooperative Amplification of Lectin-recognition J. Am. Chem. Soc. 2001, 123, 357-358

Yoshihiro Nishida, Masaya Suzuki, Kazukiyo Kobayashi, Yoshiharu Toriumi, and Hideki Hashimoto

Crystal Structure of Methyl 5-Acetamido-2-t-butyl-2-methyl-1, 3-benzodioxole-4-carboxylate Anal. Sci. 2001, 17, 685-686

2. 学会発表

国内

口頭発表 1件

原著論文による発表 1件

それ以外（レビュー等）の発表 2件

海外

口頭発表 3件

原著論文による発表 2件

それ以外（レビュー等）の発表 0件

そのうち主なもの

Third International Congress of Craniofacial and Maxillofacial Distraction

June 14-16, 2001 Paris

Effects of ultrasonic waves on distraction osteogenesis of the mandible

Hata, K., Ueda, M.

Fourth International Meeting of the Tissue Engineering Society international

Nov 7-10, 2001 Freiburg, Germany

The effects of ultrasonic waves on the distraction osteogenesis

Hata, K., Ueda, M., Okada, K., Sojo, K., Hibino, Y., Sawaki, Y.

Boo, J.S., Yamada, Y., Hibino, Y., Niimi, A., Honda, H., Okazaki, Y., Hata, K., Yoshikawa, T., and Ueda, M. Tissue Engineered Bone Using a Biodegradable and Unbiodegradable Scaffold. Italy, 2000.11.20-30

第37回 日本歯科理工学会 21世紀記念大会「21世紀の歯科医療に福音ー歯科生体材料ー」 2001.3.31-4.1 東京  
島 賢一郎 歯科・口腔外科領域におけるティッシュエンジニアリングの現状と将来展望

第44回 日本口腔科学会中部地方会  
ミニシンポジウム 2001.9.29 岐阜  
島 賢一郎 口腔外科領域のティッシュエンジニアリング

第3回 生体関連セラミックス・ビギナーズセミナー2001.11.30 津 島 賢一郎  
ティッシュエンジニアリングによる組織再生およびその臨床応用

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

特許取得

特願 2002-64235

骨又は歯周組織形成用の組成物

PCT/JP01/07289

骨又は歯周組織形成用医薬組成物及びその調整方法、並びに、骨又は歯周組織形成用注射剤及びその調整法

PCT/JP01/9800

骨又は歯周組織形成用組成物及び骨又は歯周組織形成用注射剤

2. 実用新案登録

当該数件について登録出願検討中である

3. その他

特になし

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）

分担研究報告書

組織工学技術を用いた骨・軟骨再生に関する研究

分担研究者 畠 賢一郎 名古屋大学医学部組織工学講座 助教授

### 研究要旨

MSC の新規細胞ソースとして末梢血やさい帯血から分離することは、ドナーの負担軽減や安全性などから重要な意味を持つことが予想される。今回の実験において末梢血およびさい帯血より未分化間葉系幹細胞（MSC）を分離することに成功した。しかしまだ、分離した細胞から十分な増殖が得られていない。また骨髄から培養された MSC の特徴をメカニカルストレスによる骨誘導能促進の観点から検討し、分化促進効果が見られることが分かった。

#### A. 研究目的

末梢血およびさい帯血から未分化間葉系幹細胞（MSC）を単離、培養することが可能になれば、骨髄液から採取するよりもドナーの負担も少なく安全に採取することが可能である。また、大量培養法の確立を目的に、バイオリアクターおよび種々の機械的刺激装置を作成し、骨、軟骨細胞の分化および増殖制御を検討する。また MSC のメカニカルストレスの骨誘導能促進効果については、より早期により大きな移植組織を作製する上で重要な位置づけをしめる事が考えられる。

#### B. 研究方法

末梢血およびさい帯血はリンホプレップによる単核球分離の後、MACS による各種表面抗体分離を行い、MSC を単離した。骨髄 MSC のメカニカルストレス実験においては超音波ストレス(15 mW/cm<sup>2</sup>)と伸展ストレス(15 %) 1 週間刺激の効果について検討を行った。

#### (倫理面への配慮)

採取した組織は患者プライバシーの保護のためドナー情報は秘密にて行った。また動物実験においては使用動物および使用法に関して慣例を逸脱しないように配慮した。

#### C. 研究結果

末梢血およびさい帯血より未分化間葉系幹細胞（MSC）を分離することに成功した。しかし、未だ分離した細胞から十分な増殖が得られていない。また骨髄 MSC を超音波刺激および伸展刺激による骨誘導能促進の観点から検討した結果、それぞれ骨基質マーカーの量が 1.5~2 倍程上昇したことより、分化促進効果が示唆された。

#### D. 考察

単離された MSC 様細胞がごく少量の場合でも、増殖し、培養可能になるためには、feeder layer 細胞や至適 condition medium の調整、サイトカイン添加などの工夫が必要であると考えられる。メカニカルストレス

の実験においては、メカニカルストレス自身に分化を起こす作用はないものの、分化を促進する能力があることが分かった。このことはMSCから骨組織を作製する際、物理刺激をかけることにより、より効率的に移植材料を作製することができる可能性がある。

#### E. 結論

引き続き、MSCの単離、培養実験を行う。単離されたMSCに各種サイトカインやコンディションメディウムによる増殖を第一目標に研究を行っていく。とれたMSCの特徴を通常の骨髄からとれたMSCと同様であるか詳細に検討を行う。MSCが骨、軟骨細胞に分化する際、物理刺激を加えることよって骨、軟骨への分化が促進された。これらの細胞マーカーの更なる検討より、分化過程に及ぼす物理刺激のメカニズムに至るまで研究を行っていく予定である。

#### F. 健康危険情報

本研究において国民の生命、健康に重大な影響を及ぼす事項は発生していません。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Ueda, M., Sumi, Y., Mizuno, H., Honda, M., Oda, T., Wada, K., Boo, J.S., and Hata, K.: Tissue Engineering: applications for Maxillofacial surgery. *Materials Science Engineering*, 13, 7-14, 2000.

M. Matsuno, K. Hata, et al: In vitro analysis of distraction osteogenesis

*J.Craniofac.Surg.* 2000 11(4): 303-307

Yukio Sumi, Ken-ichiro Hata, Yoshihiro Sawaki, Hirokazu Mizuno, Minoru Ueda: Clinical application of cultured oral epithelium for palatal wounds after palatoplasty: a preliminary report.

*Oral Diseases*, 1999, 5, 307-312

H. Mizuno, N. Emi, A. Abe, I. Takahashi, T. Kojima, H. Saito, Y. Sumi, K. Hata, M. Ueda: Successful Culture and Sustainability in Vivo of Gene-Modified Human Oral Mucosal Epithelium. *Human Gene Therapy*, 1999 10, 825-830,

##### 2. 学会発表

Third International Congress of Craniofacial and Maxillofacial Distraction

June 14-16, 2001 Paris

Effects of ultrasonic waves on distraction osteogenesis of the mandible

Hata, K., Ueda, M.

Fourth International Meeting of the Tissue Engineering Society international

Nov 7-10, 2001 Freiburg, Germany

The effects of ultrasonic waves on the distraction osteogenesis

Hata, K., Ueda, M., Okada, K., Sojo, K., Hibino, Y., Sawaki, Y.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

総括研究報告書に記す

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）

分担研究報告書

組織工学技術を用いた骨・軟骨再生に関する研究

分担研究者 鳥居 修平 名古屋大学医学部形成外科 教授

### 研究要旨

軟骨作製に関わる、組織マトリックスの検討や実際の臨床応用を視野に入れた検討を行っていく。軟骨作製においてもメカニカルストレスの影響があることが考えられ、細胞変化における観察項目は、細胞の増殖能変化に加え、コンドロカルシン量、ムコ多糖量などを中心とした軟骨マーカーを指標に観察した。

#### A. 研究目的

再生医療におけるティッシュエンジニアリング組織の中で軟骨は比較的臨床応用されやすく、また移植軟骨組織を必要とする患者の数も多い。本研究では軟骨移植の臨床応用に向けてより効率的な軟骨移植組織作製を念頭に実験を行った。

#### B. 研究方法

牛軟骨細胞から PLA, カプロロクトンなどをマトリックスにヌードマウスの背部皮下に移植を行い、軟骨組織を作製した。できた軟骨組織の検討により、それぞれのマトリックスを評価した。また、軟骨細胞のメカニカルストレス時の細胞変化をしらべるため、超音波(15 mW/cm<sup>2</sup>)を一日10分間、1週間かけたときの軟骨マーカー変化を見た。

(倫理面への配慮)

採取した組織は患者プライバシーの保護のためドナー情報は秘密にて行った。また動物実験においては使用動物および使用方法に関して慣例を逸脱しないように配慮した。

#### C. 研究結果

牛軟骨細胞から良好な軟骨組織が作製できた。今まで軟骨作製時に用いてきた材料よりも、PLA, カプロラクトンをマトリックスにした移植組織の方がより良好な結果を得た。軟骨細胞の超音波刺激に関する変化は、軟骨細胞自身にはそれほど変化が見られなかったものの、MSC より軟骨細胞に分化をかける間に、超音波をかけると細胞の増殖能があがり、well あたりのタンパク質量が増加する傾向にあった。

#### D. 考察

超音波に結果に関しては、まだ予備的実験の段階で、細胞の増殖や分化にプラスに働くかどうか再実験する必要がある。

#### E. 結論

きたる臨床応用に向け、概略は整いつつある。動物を用いた、よりよい移植組織の評価と毒性試験、実際にヒトで行う場合の保存、運搬方法、パッケージングの問題等、具体的な事例の検証が望まれる。

#### F. 健康危険情報

本研究において国民の生命、健康に重大な影響を及ぼす事項は発生しておりません。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Hypoxic enhancement of type IV collagen secretion accelerates adipose conversion of 3T3-L1 fibroblasts. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1540, 179-87, 2001.

##### 2. 学会発表

本研究に関わる学会発表は特になし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

総括研究報告書に記す

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）

分担研究報告書

組織工学技術を用いた骨・軟骨再生に関する研究

分担研究者 小林 猛 名古屋大学大学院工学研究科生物機能工学専攻  
生物プロセス工学講座 教授

### 研究要旨

細胞の大量培養システムの確立を念頭においた、バイオリアクターの開発を行った。また、バイオリアクターを稼働させ、弱い加圧下で骨芽細胞および軟骨細胞の分化および増殖制御を検討した。

#### A. 研究目的

この研究チームにおいては、この分野において最も重要な様々な臓器より採取したヒト正常細胞の培養技術は確立している。今後はこれらのインフラを基盤に、さらに少量の細胞からより大量の細胞にする技術が重要視される。バイオリアクターなどの自動培養装置に大量の細胞培養が可能になれば、より高性能な移植組織の作製に有利となる。また、バイオリアクターでの培養中に加圧などの変化をつけられることにより、細胞の分化、増殖に関与するかどうか、検討を行う。

#### B. 研究方法

完成したバイオリアクターの性能を測定し、細胞の自動培養を行った。このバイオリアクターで、弱い加圧をかけ細胞の機能発現について検討した。

（倫理面への配慮）

採取したすべての組織についてドナー情報は秘密にて行うこととした。また動物実験においては使用動物および使用法に関して慣例を逸脱しないように配慮した。

#### C. 研究結果

バイオリアクターを用いた細胞大量培養方法については現段階までの結果について、弱い加圧下で可能であった。加えて、加圧成分として酸素および二酸化炭素分圧変化について評価を行ったが、これについては著明な変化を認めていない。

#### D. 考察

大量自動培養装置としてのバイオリアクターの完成は、組織工学分野で非常に注目度が高い。少量の細胞を脱分化や変異をおこさずに大量の細胞に増やす事は、ティッシュエンジニアリングにおける共通の問題点である。加圧や酸素分圧の違いによりよい細胞の増殖、分化を見つけることは意義深い。

#### E. 結論

このような大量自動バイオリアクターシステムを開発することは、これからの組織工学分野において重要な位置づけを占めることが考えられる。

## F. 健康危険情報

本研究において国民の生命、健康に重大な影響を及ぼす事項は発生しておりません。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Hirokazu Kikuta, Kenjiro Kano, Hiroyuki Honda and Takeshi Kobayashi : Optimization of bovine cathepsin C production by cultivation of recombinant methylotrophic yeast *Candida boidinii*, *Journal of Chemical Engineering of Japan*, 2001 34(6), 848-851

Masataka Suzuki, Masashige Shinkai, Hiroyuki Honda, Masamichi Kamihira, Shinji Iijima and Takeshi Kobayashi : Construction of tumor-specific cells expressing a membrane- anchored single-chain Fv of anti-ErbB-2 antibody, *Biochimica et Biophysica Acta*, 2001 1525, 191-196

Eiji Nagamori, Mariko Omote, Hiroyuki Honda and Takeshi Kobayashi : Enhanced and prolonged production of regenerated plantlet from carrot callus in viscous additive-supplemented medium, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2001 91(3), 283-287

## H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

総括研究報告書に記す



厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）

分担研究報告書

組織工学技術を用いた骨・軟骨再生に関する研究

分担研究者 高井 治 名古屋大学大学院工学研究科材料プロセス工学専攻 教授

研究要旨

新しい骨形成マトリックス作製のために、特に無機材料を中心として研究開発を行った。すなわち、 $\beta$  TCPなどのリン酸カルシウム系無機材料を粉末化し、その物性を評価した。またこれらカルシウム製材に適当な生分解性高分子材料を添加することで、流動性を持たせることができた。さらに、これら材料を動物へ移植し、その生体適合性などの評価を行った。これらを通じて、流動性骨形成マトリックス開発に必要な基盤技術を完成することができた。

A. 研究目的

$\beta$  TCPなどのリン酸カルシウム系製材を用いて、細胞を組み込むための流動性骨形成マトリックスの開発を行う。その際、これらマトリックスの物性を移植手技の観点から評価し、さらに組織異害性などの検討を行う。また、実際にこれら材料にわれわれの調整した未分化間葉系幹細胞を付加し、骨形成能について検討を加える。

B. 研究方法

$\beta$  TCPおよびハイドロキシアパタイトを粉末化した。さらに、これら粉末化した材料をフィブリン、アルギン酸、コラーゲンなどの生分解性材料と混合し、その物性を検討した。また、これら材料をラット背部皮下に移植することで材料の生体親和性を評価した。また同様に未分化間葉系幹細胞を付加したものを作製し、ヌードマウス、ラット背部皮下、イヌ顎骨欠損部に移植した。これらについて組織学的評価を行い、材料特性を評価した。

(倫理面への配慮)

動物実験を行う際には相当の配慮を行った。また、それ以外に本研究を通じて特に倫理的問題が生じる事項はない。

C. 研究結果

粉末作製に当たっては所望の粒径のものを得ることができたが、粉砕方法によっては組成が変化することが明らかとなった。さらに、これら材料が生体に異害作用をもたらすことはなかった。また、 $\beta$  TCP粉末に生分解性材料を添加することで材料が吸収され、良好に骨形成が確認できた。

D. 考察

ブロック型 $\beta$  TCPを用いて人工骨を作製した場合においては良好な骨形成を認めている。今回の方法では $\beta$  TCPの粉末を添加することで、新しい流動性骨形成材料を作り出す試みである。本研究の結果からこれら材料は粉末化する際に若干の構造変化を認め、均質な材料ではなくなった。こ

のような無機材料学的変化は興味深く、今後の検討課題である。さらに、移植後これらの材料が骨形成に障害とならないことが明らかとなったため、新しい人工骨の基材としては十分に期待がもてる。

#### E. 結論

種々のリン酸カルシウム系無機材料を粉末化し、細胞の担体としての可能性を検討した。その結果、良好な骨形成を認め、人工骨基材としては有用であることが示唆された。

#### F. 健康危険情報

本研究を通じて、健康に危険をもたらす事項を認めていない。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Gomez-Vega JM, Hozumi A, Saiz E, Tomsia AP, Sugimura H, Takai O. Bioactive glass-mesoporous silica coatings on Ti6Al4V through enameling and triblock-copolymer-templated sol-gel processing. *Journal of Biomedical Materials Research*. 56(3): 382-9, 2001

H.Sugimura,O.Takai,N.Nakagiri:Scanning Probe Lithography for Electrode Surface Modification. *J.Electroanal.Chem*: 1999, Vol.473 No.1-2, 230-234

H.Sugimura,Y.Sato,K.shiyama,O.Takai,Y.Sakamoto,M.Takaya,N.Nakagiri:Characterization of Individual Diamond Crystals in Micro Diamondrrays Using an AFM-based Technique. *Appl.Surf. Sci.*: 1999,1, 144-145,593-597

#### H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

総括研究報告書にまとめて記す

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）

分担研究報告書

組織工学技術を用いた骨・軟骨再生に関する研究

分担研究者 小林 一清 名古屋大学大学院工学研究科生物機能工学専攻  
生体材料工学講座 教授

### 研究要旨

注入型骨および軟骨に関する高分子材料学的検討を行った。すなわち、本研究の中心的テーマである未分化間葉系幹細胞を用いて骨再生において、特に注入型のものを作るために、従来のアルギン酸を改良した。具体的にはアルギン酸に糖付加を行い動物への移植実験を試みた結果、移植部において毛細血管形成の亢進を認めている。さらに、移植した材料内への細胞浸潤が従来のアルギン酸単独のものと比較し亢進していた。この結果は、われわれの求めている注入型骨の移植基材として有用であることが示唆された。

#### A. 研究目的

注入型骨を作る際の移植基材において適当な流動性を持ち、かつ賦形性を有する高分子材料が望ましい。またこの材料は生体吸収性であり、強い起炎物質でなく、細胞障害性を持たないことが必要となる。本研究の目的はこれら細胞移植における材料の開発に主眼をおいている。

#### B. 研究方法

アルギン酸のカルボキシル基に対して、グルコース、キトビオースを付加し（これら糖候補については *in-vitro* など予備実験にて選択）糖付加型アルギン酸を作製した。さらに、これら糖付加型アルギン酸を材料単独および未分化間葉系幹細胞を混合しラット背部皮下に移植した。移植後2週、4週にてこれら移植材料をマクロおよび組織学的所見にて評価した。

（倫理面への配慮）

本研究において倫理面で問題となるよう

なことは行っていない。

#### C. 研究結果

移植された材料のうち糖付加型アルギン酸は、通常のアルギン酸と比較して明らかに血管新生能が亢進しており、材料内への毛細血管の進入が確認できた。また、細胞を添加したものでは材料内での細胞の増殖が確認できた。さらにキトビオース添加型アルギン酸では線維芽細胞およびその周囲の肉芽組織形成が著明であった。

#### D. 考察

アルギン酸のような適当な流動性および賦形性を有する材料は、細胞組込型人工組織の基材として比較的古くから用いられている。しかし、一方ではアルギン酸自体に細胞遊走能を阻害する効果も持っており、決して望むべき材料とは言い難い。本件で検討を行った糖付加型アルギン酸は従来のアルギン酸と比較して明らかに強い細胞浸

潤を認め、また移植した細胞塊も残存している。これらの結果はアルギン酸の短所を改善し、われわれの所望する材料となりうる可能性を示唆しているといえる。

#### E. 結論

グルコースおよびキトビオースを用いて糖付加型アルギン酸を作製し、動物への移植実験を行った結果、これら材料は従来のアルギン酸と比較して明らかに細胞浸潤が亢進し、われわれの所望の材料となりうることが示唆された。

#### F. 健康危険情報

本研究を通じて研究者およびその周囲のものの健康に重大な影響をもたらす事項は発生していない。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Yoshihiro Nishida, Kideaki Tamakoshi, and Kazukiyo Kobayashi

A Novel Bovin b1, 4-Galactosyltransferase Reaction with an Acyclic Amino Alcohol to Yield 3-O-b-D-Galactosyl-sn-glycerol Skeleton  
Org. Lett. 2001 3, 1-3

Kazunori Matsuura, Miki Hibino, Yoshinao Yamada, and Kazukiyo Kobayashi

Construction of Glyco-clusters by Self-organization of Site-specifically Glycosylated Oligonucleotides and Their Cooperative Amplification of Lectin-recognition  
J. Am. Chem. Soc. 2001, 123, 357-358

Yoshihiro Nishida, Masaya Suzuki, Kazukiyo Kobayashi, Yoshiharu Toriumi, and Hideki Hashimoto

Crystal Structure of Methyl 5-Acetamido-2-t-butyl-2-methyl-1, 3-benzodioxole-4-carboxylate  
Anal. Sci. 2001, 17, 685-686

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

総括研究報告書に記す