

図 1 温度感受性 SV40T 抗原遺伝子導入トランスジェニックマウスと VDR 遺伝子ノックアウトマウスとの交配

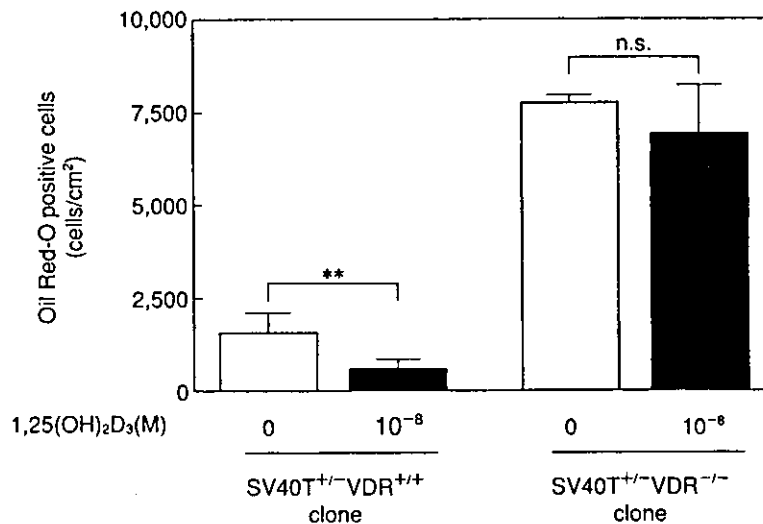


図 2 SV40T<sup>+/-</sup>VDR<sup>+/+</sup>細胞株と SV40T<sup>+/-</sup>VDR<sup>-/-</sup>細胞株の細胞増殖性の検討

いずれの細胞株も 33°C で培養を開始し、コンフルエントに達した時点で 39°C に培養温度を移行させた。

\*\* :  $p < 0.01$ . Each column depicts mean  $\pm$  S. D. ( $n = 4$ ).

に及ぼす影響を検討した。VDRKO マウスと SV40T tg マウスとの交配は図 1 に示す。最終的に目的とする SV40T<sup>+/-</sup>VDR<sup>-/-</sup>マウスを得て対照とした SV40T<sup>+/-</sup>VDR<sup>+/+</sup>マウスと比較した。

マウスから採取した大腿骨と脛骨からフラッシュアウトして単離した骨髓細胞は 10% ウシ胎仔血清を含む培地に巻き込み、33°C、95%湿度、5% CO<sub>2</sub>の条件下で培養を開始した。付着細胞を継代して増殖が安定した時点で limiting dilution 法によって株化した。

まず、その増殖性について検討した。SV40T<sup>+/-</sup>VDR<sup>+/+</sup>と SV40T<sup>+/-</sup>VDR<sup>-/-</sup>のいずれの遺伝子型を示すマウスから得られた細胞株ともに、33°C では増殖をするが、コンフルエントに達した後、39°C に培養温度を移行させると細胞増殖を停止したことから、温度感受性 SV40T 抗原依存性に細胞増殖が制御されていることが確認された(図 2)。また、これらの細胞株は 33°C で培養しているときは線維芽細胞様の形状を示していたが、骨芽細胞マーカーであるアルカリ性ホスファターゼ(ALP)

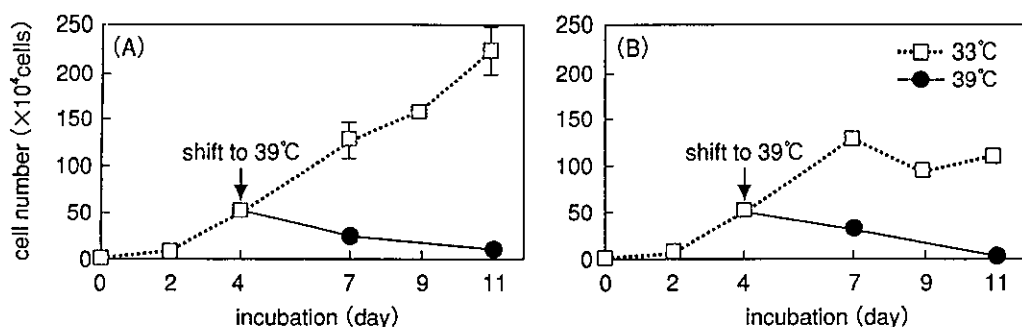


図3 ビタミンDのVDRを介した脂肪細胞分化抑制作用

A: SV40T clone (SV40T<sup>+/+</sup>VDR<sup>+/+</sup>), B: VDRKO/SV40T clone (SV40T<sup>+/+</sup>VDR<sup>-/-</sup>)

いずれの細胞株も33°Cで培養を開始しコンフルエントに達した時点で39°Cに培養温度を移行させた。その際、1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>を10<sup>-8</sup>Mとなるように添加し、7日間培養後にOil Red O染色により脂肪細胞数を計測した。

染色を行ったところ、SV40T<sup>+/+</sup>VDR<sup>+/+</sup>マウス由来の2株のうち1株と、SV40T<sup>+/+</sup>VDR<sup>-/-</sup>由来の9細胞株のうち2株についてはALP染色陽性であり、継代を繰り返してもALP染色性は保持された。このことからSV40T抗原が作用している条件下では種々の分化段階の株化が可能であり、樹立された細胞は増殖性とともその分化形質も維持していると考察された。

つぎに、細胞分化について調べた。SV40T<sup>+/+</sup>VDR<sup>+/+</sup>マウスとSV40T<sup>+/+</sup>VDR<sup>-/-</sup>マウス由来細胞株は33°Cで培養してコンフルエントに達した後、39°Cに移行させると、SV40T<sup>+/+</sup>VDR<sup>-/-</sup>細胞株にのみ、Oil Red-O染色に陽性の脂肪細胞が出現することを見出した。すなわち、SV40T<sup>+/+</sup>VDR<sup>+/+</sup>細胞ではOil Red-O陽性細胞数は1,854±287 cells/cm<sup>2</sup>にとどまったのに対しSV40T<sup>+/+</sup>VDR<sup>-/-</sup>細胞では著明な脂肪細胞分化の亢進を認め、7,740±27 cells/cm<sup>2</sup>と4倍以上に増加した。そこで、ビタミンDのVDRを介した脂肪細胞分化への影響を検討する目的で、39°Cに培養温度移行時より1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>を終濃度10<sup>-8</sup>Mとなるように添加したところ、SV40T<sup>+/+</sup>VDR<sup>+/+</sup>細胞ではOil Red-O陽性細胞が806±170 cells/cm<sup>2</sup>に減少したのに対しSV40T<sup>+/+</sup>VDR<sup>-/-</sup>細胞では6,934±1,437 cells/cm<sup>2</sup>とほとんど影響を受けなかった(図3)。

以上のことから、ビタミンDがVDRを介して脂肪細胞分化を抑制することが明らかになった。

## おわりに

著者らは、間葉系細胞にビタミンDを作用させることによって脂肪細胞の分化が抑制されること、さらに、その作用はビタミンD受容体を介する可能性を明らかにすることができた。骨欠損部における骨形成については担体に細胞を染み込ませて足場を形成することが重要であると報告されているが<sup>8)</sup>、今回、骨粗鬆症治療薬として広く用いられているビタミンDには再生骨を形成させるうえで有利な細胞種構成を提供することができる可能性を認めたことは動物実験の結果ではあるが、非常に興味深い。

今後、他の成長因子や担体および添加物などについて詳細な検討を継続していくことで、骨石灰化を確実にするための条件の最適化も可能になると期待している。

## 文献

- 1) Consensus Development Conference: *Am. J. Med.*, **94**: 646-650, 1993.
- 2) Suda, T. et al.: *Endocr. Rev.*, **20**: 345-357, 1999.
- 3) Teitelbaum, S. L.: *Science*, **289**: 1504-1508, 2000.
- 4) Feldman, D. et al.: *Vitamin D*, Academic press (ed. by Feldman, D. et al), San Diego, 1997, p. 1285.
- 5) Yoshizawa, T. et al.: *Nature Genetics*, **16**: 391-396, 1997.
- 6) Higashi, S. et al.: *J. Bone Miner. Res.*, **15**(Suppl.): F505, 2000.
- 7) Shiraiishi, A. et al.: *J. Bone Miner. Res.*, **15**: 770-779, 2000.
- 8) Ochi, K. et al.: *J. Cell. Physiol.*, **194**: 45-53, 2003.

## 骨再生・形状システムの構築

——生分解性ハイブリッドシートを用いて  
Custom-shaping system for bone regeneration



梅澤明弘(写真) 槌谷宏平 牛田多加志 陳 国平

Akihiro UMEZAWA<sup>1</sup>, Kohei TSUCHIYA<sup>2</sup>, Takashi USHIDA<sup>2</sup> and Guoping CHEN<sup>3</sup>

国立成育医療センター研究所生殖医療研究部<sup>1</sup>, 東京大学大学院医学系研究科附属疾患生命工学センター<sup>2</sup>, 物質・材料研究機構生体材料研究センター細胞基盤技術グループ<sup>3</sup>

◎骨の再生医療に対し発生学、材料工学、細胞生物学の発展に伴い、あらたな試みがはじまっている。対象となる骨粗鬆症、骨再生能低下の原因は、閉経後婦人、寝たきり手術後安静、老化、宇宙といった無重力状態、またダイエットと多岐にわたる。腫瘍の術後骨欠損や、骨形成不全症など先天性の骨疾患に対する機能再建の必要性も増している。これらの社会的問題に対し骨組織の再生、維持は、国民の健康、医療、福祉の向上、政策医療の観点からも急務であり、欠くことのできない問題となっている。そのなかで、“骨をつくる”という課題に対し生分解性ポリマーおよびマトリックスは細胞とハイブリッドすることできわめて重要な働きを示す。あらたに骨をつくる医療における生分解性ポリマーおよびマトリックスの利益と不利益を意識する。そのうえで一定の手続きを踏み、それらの過程が公開されながら骨の再生医療に関する新しい治療法を社会から祝福される形で世に送り出してあげたい。

**Key word** : 骨髄間質, 骨, 再生医療, 足場, 細胞移植

広島で開催された日本臓器保存生物医学会で、「ブタ、ウシといった異種からのウイルス感染が問題であるから動物の臓器を移植に用いてヒトの治療を行うことはその成否とは別に社会的認知を受けない」という発表が5月22日にあった。社会的認知を受けにくいという点は理解できたけれども異種ウイルスがヒトに対して疾病を引き起こし、不利益を生じさせることは少ないと著者(梅澤)は思った。たとえば、狂牛病のウイルスが臓器に潜み、ヒトに感染したとしてもヒトに疾病が生じる可能性は少ないので、異種ウイルスによって感染する不利益よりもヒトの疾病が重篤である場合は得られる患者の利益が上まわるので、動物臓器を利用する医療は成立すると考えた。しかし、広島から羽田に向かう飛行機のなかで、研究員の寺井政憲氏より、そんな考えは論外であると指摘された。寺井氏の説明はつぎのとおりである。

異種のウイルスがヒトに対して病原性を有することは少ないことはそうかもしれないし、そうでないかもしれない。しかし、ここで重要なのは異種ウイルスがヒトに対して病原性を有することではなく、あらたに病原性を有するようになることがありうることである。異種ウイルスがヒトの体内で変異や組換えを起こし、ヒトに新規の疾病を起こすようになることは十分考えられる。科学的に証明された、そのような事実も存在する。あらたにでてきたウイルスがヒトに対して致死性であった場合はどうするんですか。そして、そのウイルスがヒトにどんどん感染していったらどうするんですか。

異種ウイルスの感染に対する、著者(梅澤)の考えは甘かった。再生医療に用いるヒト細胞の培養には本特集の骨形成能を有する細胞を含め、患者からの自己血清を使用するか、無血清培養とした

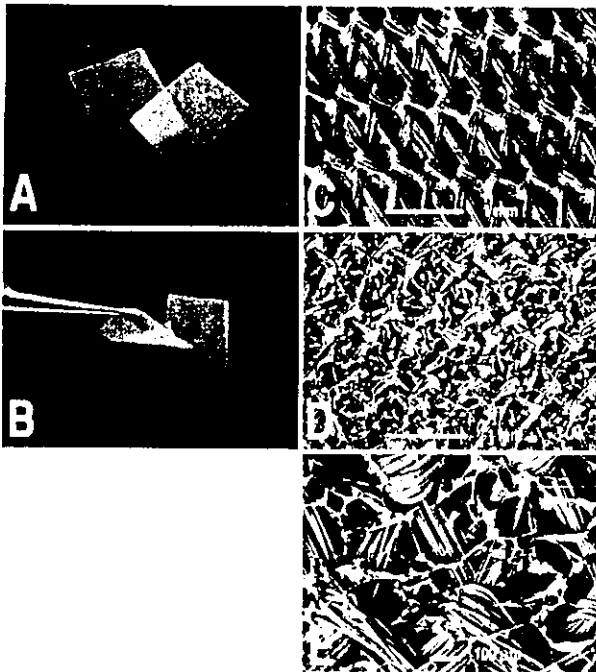


図 1 骨形成における細胞の足場である Poly(DL-lactic-co-glycolic acid) (PLGA) シート  
足場のひとつである PLGA とコラーゲンのハイブリッド・シートを示す。  
A, B: シートの内眼像, C: コラーゲンのマイクロスポンジを載せていない状態のシートの走査型電子顕微鏡像, D(低倍), E(高倍): PLGA にマイクロスポンジを載せた走査型顕微鏡像。

くてはいけない。

## 骨形成における足場

再生医療において細胞・材料はきわめて重要な要素である<sup>1-5)</sup>。細胞を足場と組み合わせることによって欠損部に再生誘導を起こすための適切な環境を与え、自己修復への自然の流れをつくってやることによって再生が得られる。この場の構築のための技術は化学工学の進歩によるところが大きい。陳 国平と牛田多加志は合成高分子ポリ乳酸-グリコール酸重合体(PLGA)の網目状構造をもつ織布に、ウシ型コラーゲンのマイクロスポンジを複合化、グルタルアルデヒドにて架橋し、蜘蛛の巣状構造をしたシート状とすること<sup>6,7)</sup>で、再生医療における足場としての妥当性をもたせることに成功している(図 1-A~C)。細胞との親和性をもたせるために、生分解性のポリマー上に、コラーゲンのマイクロスポンジをまぶし(図 1-D, E)、骨形成におけるきわめて有効な足場とする。作製したコラーゲン複合化シートは厚さ 200 $\mu$ m の織

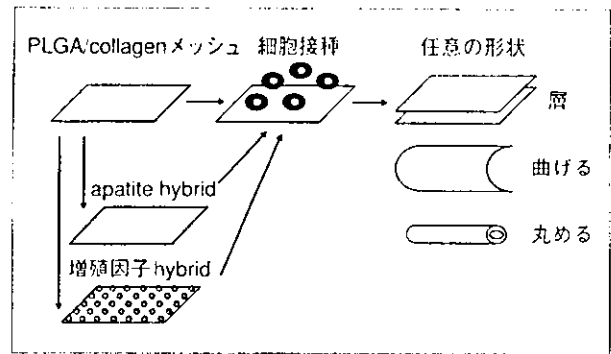


図 2 PLGA・コラーゲン・ハイブリッドシート(メッシュ)により任意の形状の骨を作製する模式図

PLGA・コラーゲンハイブリッドシート(メッシュ)に細胞を接種し、その後、叢状にしたり曲げる作業、丸める作業を行った後に、生体に移植する。このハイブリッドシートは増殖因子やヒドロキシアパタイト(apatite)とさらにハイブリッドすることによって骨形成を促進させることを可能とする特性を有する。

布に蜘蛛の巣様であり、そのうえにコラーゲンのマイクロスポンジが載る。このシートは操作性に優れ、容易に把持や形状を変化させることが可能である。

この足場のもうひとつのよい点は生分解性を有する点であり、生体内で水と二酸化炭素に分解され、消失する。細胞と一緒に移植すれば、異物反応もなくなる。これは単に骨の足場材料の例を示すだけであるけれども他の臓器でもそれぞれに相性のよい材料があるはずであり、脳、眼球、軟骨、皮膚、心筋、横紋筋、血管、平滑筋、肝、腎、胆管、尿管、膀胱など、数えあげればきりが無い。そのなかで、PLGA 複合化シートは骨形成の足場として最良な材料のひとつになる。

## PLGA 複合化シート重層による頭蓋骨欠損に対する治療

頭蓋骨欠損を作製、細胞を播種した複合化シート 5 枚を重ねて移植した(図 2)。対照として細胞を播種しないシートのみおよび骨欠損のみの群を作製し、各 10 匹の観察を行った<sup>1)</sup>。マウス頭蓋に作製した骨欠損は対照群(非移植群および細胞未播種シート群)において組織学的に骨の形成が観察されなかったのに対し重層化し移植した細胞播種シート群においては 4 週で良好な骨形成を生

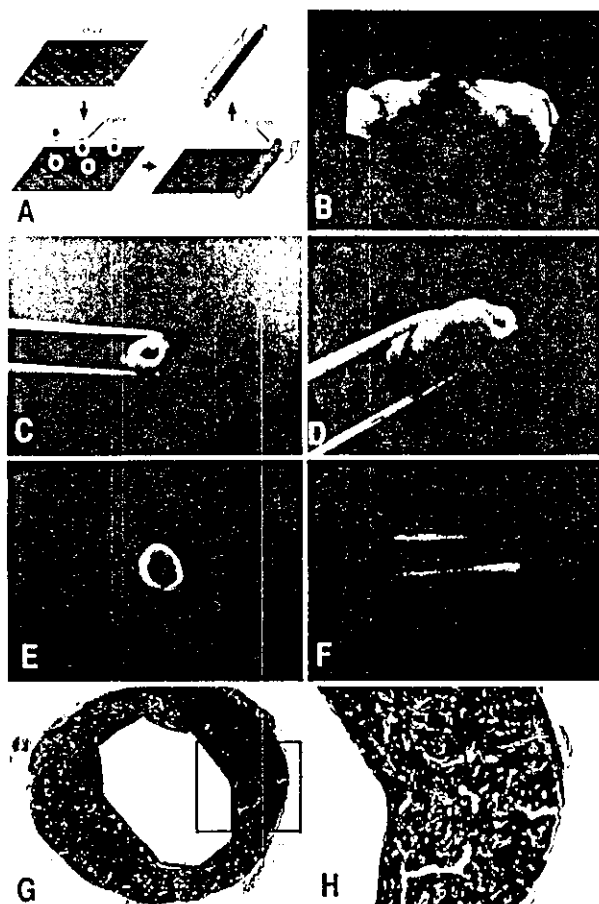


図3 足場による整形性

足場と細胞を使用することにより筒状の骨をつくる。

A: 方法, B-D: 作成した骨の内眼像, E, F: 作成した骨のX線像, G(低倍), H(高倍): できあがった骨の組織像。みごとな骨梁が形成されている。細胞だけではこのような筒状の形態の骨ができることはない。

じさせることに成功した。

この足場のすばらしい点のひとつはその整形性である<sup>1)</sup>。どのような形でも作成することが可能であり、つくりたい形の骨をつくることができる。まず、具体的に形状作製および維持が可能かどうかを確認する。次にシートのうゑに骨芽細胞を載せ、シートを丸め管状骨を模倣した円管形態を作製し、筒状の骨を作成する(図3)。また、実用的なところでは指の骨をつくる(図4)。シリコンにシートを巻き付け指骨形態を模倣しマウス皮下に移植した。4週において目的とした形態そのままの骨が形成されることが証明された。さらに、複雑な形を模索していき、結んだ骨(bone knot)はその例のひとつである(図5)。できあがった骨を結

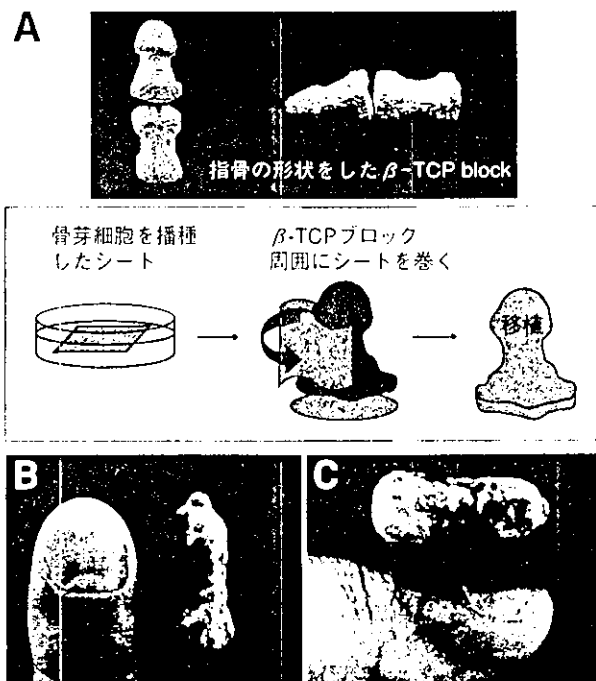


図4 指骨の作成

A: 指の骨(phalanges)を $\beta$ -TCPとPLGA sheetを用いて作製する方法を示す。

B, C: PLGA sheetと骨芽細胞によって作製された指骨。対照として作製者である樋谷公平の親指を示す。

んだわけではなく、丸めたシートにて結び目を作製し、結んだ足場に骨をつくり出したというわけである。

## おわりに

骨組織の維持・再生に関する研究へ社会的注目が集まるようになって久しい。先天性・後天性の難治性骨欠損に加え加齢、閉経による骨粗鬆症、炎症性疾患による骨形成能低下など骨組織の再生医療が待ち望まれている疾患が多々存在する。多くの骨再生に関する治療法が検討されているものの、すでに骨形成能の低下した病態への画期的な治療法はいまだないのが現状である。近年の再生医学研究より組織構成要素である細胞とポリマーからなる足場が治療材料となることが明らかになった。そのなかでも骨への分化能、再生能、整形性に優れたメッシュ状の生体分解性ポリ乳酸からなる足場を作成し、さらにその表面にコラーゲンを添加した新規足場の開発成功を紹介した。

謝辞: 多くの方々から学問における教授および研

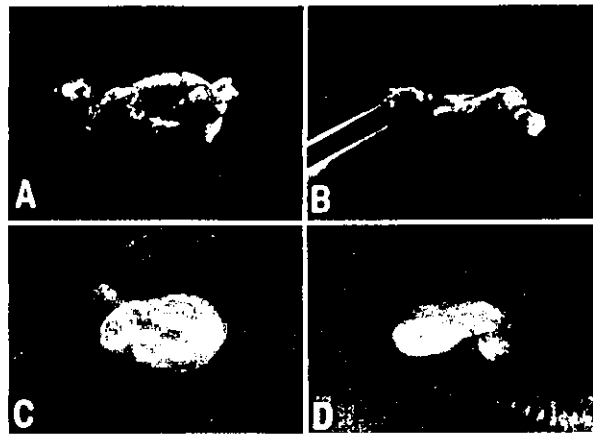


図 5 複雑な形の骨形成を示す意味で“骨の結び目”作成  
足場を利用することにより複雑な形の骨を作成できる。ここでは結んだ骨(bone knot)を示す。  
A, B:肉眼像, C, D: X線像。

究生活における助けを受けてきた。そして現在も受け続けている。このことに、感謝している。心より、お礼申し上げます。これからも指導を請うことは間違いないけれども何らかの形で、それぞれの方々対し、そして同時にサイエンスに対し恩返しをできれば嬉しい。

#### 文献/URL

- 1) Tsuchiya, K. et al. : Custom-shaping system for bone regeneration by seeding marrow stromal cells onto a web-like biodegradable hybrid sheet. *Cell Tissue Res.*, **316** : 141-153, 2004.
- 2) Ochi, K. et al. : The use of isolated mature osteoblasts in abundance acts as desired-shaped bone regeneration in combination with a modified poly DL-lactic co-glycolic acid(PLGA)-collagen sponge. *J. Cell. Physiol.*, **194** : 45-53, 2003.
- 3) Gojo, S. et al. : In vivo cardiovascularogenesis by direct injection of isolated adult mesenchymal stem

cells. *Exp. Cell Res.*, **288** : 35-50, 2003.

- 4) Takeda, Y. et al. : Can the life-span of human marrow stromal cells be prolonged by bmi-1, E6, E7, and or telomerase without affecting cardiomyogenic differentiation? *J. Gene Med. DOI* : 10. 1002/jgm. 583.
- 5) マウス骨髄間質から拍動する心筋細胞への分化を示したサイト：  
<http://1985.jukuin.keio.ac.jp/umezawa/HTML/ヒト骨髄間質から拍動する心筋細胞への分化を示したサイト/>  
ヒトとマウスの骨髄間質細胞のカタログを示すサイト：  
[http://1985.jukuin.keio.ac.jp/umezawa/jgm\\_ubet7/](http://1985.jukuin.keio.ac.jp/umezawa/jgm_ubet7/)  
ヒトとマウスの骨髄間質細胞のカタログを示すサイト：  
[http://1985.jukuin.keio.ac.jp/umezawa-link.html](http://1985.jukuin.keio.ac.jp/umezawa/link.html)
- 6) Chen, G. et al. : The use of a novel PLGA fiber/collagen composite web as a scaffold for engineering of articular cartilage tissue with adjustable thickness. *J. Biomed. Mater. Res.*, **67A** : 1170-1180, 2003.
- 7) Chen, G. et al. : A biodegradable hybrid sponge nested with collagen microsponges. *J. Biomed. Mater. Res.*, **51** : 273-279, 2000.

\* \* \*