

厚生労働科学研究費補助金  
ヒトゲノム・再生医療等研究事業

皮膚細胞を細胞源とする新規骨・軟骨産生法の開発と  
臨床応用

平成16年度～平成18年度 総合研究報告書

主任研究者 中村 耕三  
平成19（2007）年 3月

## 目 次

I. 総合研究報告		
皮膚細胞を細胞源とする新規骨・軟骨産生法の開発と臨床応用	-----	1
中村 耕三		
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	23
III. 研究成果の刊行物・別刷	-----	31

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム再生医療等研究事業）  
統括研究報告書

皮膚細胞を細胞源とする新規骨・軟骨産生法の開発と臨床応用

主任研究者 中村 耕三 東京大学大学院医学系研究科・整形外科 教授

研究要旨

本研究は、量的限界のある骨髄間葉系幹細胞を細胞源とした従来の骨・軟骨誘導法に代わり、骨・軟骨分化に必要な十分なシグナル伝達系を確定し、採取が容易で増殖能も高い皮膚線維芽細胞に骨・軟骨分化を誘導し、これを移植することで、新しい骨・軟骨再生治療法を確立することを目的としている。さらに、遺伝子導入における安全性を高めるためナノミセルテクノロジーを用いた人工ウイルスの開発を行い、担体による異物反応や狂牛病などの交差感染を防ぐため細胞シート工学を応用した担体なしの移植片作製法も確立する計画である。

分担研究者氏名・所属施設名および職名

高戸 毅

東京大学大学院医学系研究科口腔外科・教授

大河内 仁士

国立国際医療センター研究所細胞組織再生

医学研究部再生医学・部長

片岡 一則

東京大学大学院工学系研究科・教授

岡野 光夫

東京女子医科大学先端生命医科学研究所生

体材料工学・教授・所長

川口 浩

東京大学大学院医学系研究科整形外科・助教

授

鄭 雄一

東京大学大学院医学系研究科骨再生医療・助

教授

星 和人

東京大学大学院医学系研究科軟骨再生医

療・助教授

A. 研究目的

高齢化社会の到来とともに、骨・軟骨の加齢性疾患は社会経済的に大きな問題となっている。例えば、骨粗鬆症による骨折は高齢者寝たきりの原因第二位であり、歯周病による顎骨萎縮では65歳以上の30%以上が無歯顎となり、関節軟骨の老化疾患である変形性関節症は人口の10%近くが罹患し、多くの高齢者のQOLを著しく損なっている。また老化と

ともに悪性腫瘍は増加するが、頭頸部腫瘍切除後の、顎・顔面・口腔機能の低下も患者のQOLを著しく低下させている。

これらに対処すべく、組織工学的手法による骨・軟骨組織の再建や、自家及び他家骨・軟骨移植、また近年は骨髄間葉系幹細胞を用いた骨・軟骨再生法等が試みられているが、いずれも問題を解決するには至っていない。特に骨髄間葉系幹細胞から骨・軟骨細胞を誘導する手法は、最近の再生医学の発展とともに大いに期待されて研究されてきたが、分化能を保持して十分量の細胞を得ることは困難で、臨床上十分満足できるような質と量を兼ね備えた骨・軟骨産生法は未だ実現していない。

本研究は、量的限界のある骨髄間葉系幹細胞を細胞源とした従来の骨・軟骨誘導法に代わり、骨・軟骨分化に必要な十分なシグナル伝達系を確定し、採取が容易で増殖能も高い皮膚線維芽細胞に骨・軟骨分化を誘導し、これを移植することで、新しい骨・軟骨再生治療法を確立することを目的としている。さらに、遺伝子導入における安全性を高めるためナノミセルテクノロジーを用いた人工ウイルスの開発を行い、担体による異物反応や狂牛病などの交差感染を防ぐため細胞シート工学を応用した担体なしの移植片作製法も確立する計画である。

## B. 研究方法

### 1. 皮膚由来の再生用細胞取得のための多能性幹細胞の単離法と性状解析

#### ① 皮膚から多能性幹細胞の分離・培養

術前に承諾の得られた摘出皮膚 (n=3, 50-75歳) およびマウス(CD57BL/6J)の皮膚を用いた。2% B27 supplementを含むDMEM/F12培地を使用し、表皮細胞増殖因子20ng/ml、塩基性繊維芽細胞増殖因子10ng/ml添加し、2週間浮遊培養した。Sphereを適宜継代した。

#### ② 脂肪組織から多能性幹細胞の分離・培養

術前に承諾の得られた摘出皮膚の脂肪組織はコラゲナーゼ処理を行い、遠心して沈殿分画の間葉系幹細胞を分離した。まず10%FBS添加DMEM培地で1-3回継代後、前述の無血清培地でsphereを形成させた。

#### ③ 分化条件下における分化マーカーの検討

形成したsphereを、1%ウシ血清を含むDMEM/F12培地で1-2週間培養して分化を誘導した、必要に応じて市販の骨芽細胞誘導培地、脂肪細胞誘導培地などを使用した。ALP染色、von Kossa染色等を行った。

#### ④ 皮膚からSP細胞の分離・培養

術前に承諾の得られたヒト摘出皮膚およびマウス(CD57BL/6J)の皮膚を用いた。0.1%トリプシン溶液にて個細胞化し、hoechst33342を5ug/mlとなるように加え、UVレーザーを照射しFACS解析を行った。SP細胞群と非SP細胞群に分けて細胞を分取し、遺伝子発現並びに表面マーカーの解析を行った。

#### ⑤ 皮膚に存在するCD133陽性細胞の性状解析

E16.5あるいは成体マウスの皮膚からCD133陽性細胞をMACS (磁気ビーズ) を用いて集め、RT-PCRを行った。またFACSにより表面マーカーおよび細胞内蛋白の解析を行った。分取したCD133陽性細胞を培養皿に播種し、*in vitro* の分化条件 (1%FBS添加DMEM) にて2-3週間培養した。次に浮遊培養条件 (DMEM/F-12+B27+EGF+bFGF) でCD133陽性細胞を培養してsphere形成能を検討した。

### 2. 骨・軟骨分化増殖シグナルの最適化と皮膚線維芽細胞の骨・軟骨形質転換

#### ① 骨・軟骨の分化増殖に異常を来たす疾患

#### の原因遺伝子の解析 (必要因子の検索)

自然発症の低身長ラットであるKMIラットに着目して、その異常を候補遺伝子解析の手法で検討した。その原因遺伝子が、cGKIIであることを同定した。ノックアウトマウスを解析し、骨・軟骨分化必須遺伝子遺伝子との相互作用を調べた。そしてヒトにおいての低身長の原因である可能性を検索した。

#### ② 骨・軟骨の分化・増殖に影響を及ぼす遺伝子の解析

骨分化に関しては、BMP・IRS・Wnt・Hh・Runx2シグナルの刺激性あるいは抑制性因子を発現するアデノウイルス及びプラスミドを作製し、軟骨分化に関しては、BMP・IRS・Wnt・TGF- $\beta$ ・Soxシグナルの刺激性あるいは抑制性因子を発現するアデノウイルス及びプラスミドを作製し、そのmRNA・蛋白発現・蛋白活性を解析した。骨・軟骨の分化・増殖に影響を及ぼす遺伝子の過剰発現あるいはノックアウトによる、試験管内及び動物モデルの作製とその解析については、刺激性G蛋白・cGKII・IRS-1・SRC-1・Runx2などの因子の試験管内におけるGain-of-function及びLoss-of-function実験を行うとともに、そのノックアウトマウスを解析した。

#### ③ 骨・軟骨分化に十分なシグナルの最適化

骨分化に関してはBMP・IRS・Wnt・Hh・Runx2シグナルの全組合せから、軟骨分化に関してはBMP・IRS・Wnt・TGF- $\beta$ ・Soxシグナルの全組合せから、骨軟骨分化を特異的に検出する細胞センサーを用いて効率的に分化を誘導する組合せをスクリーニングした。

#### ④ 皮膚線維芽細胞の骨・軟骨形質転換

最適化されたシグナルをアデノウイルスベクターにより皮膚線維芽細胞に導入し、分化マーカーの発現の検討・染色等による基質産生の検討を通じて、その骨軟骨形質転換を検証した。

#### ⑤ 骨・軟骨の分化・増殖に影響を及ぼす因子群の相互作用の解析

BMP2/6ダブルノックアウトマウスの解析・PTHの骨同化作用におけるIRS-1の関与に関する解析・WntシグナルとSox9の軟骨分化における役割の*in vitro*解析を行った。

#### ⑥ 軟骨増殖に十分な液性因子の最適化

市販されている12種の液性因子 (FGF-2, IGF-I, インスリン, BMP2, PTH, 成長ホルモン, デキサメサゾン, 活性型ビタミンD3, トリヨードサイロニン, IL-1 受容体アンタゴニスト, 17β-エストラジオール, テストステロン) から軟骨細胞を効率的に増殖させる組合せの最適化を行った。

### ⑦ 脱分化した初代軟骨細胞の再分化誘導に十分な液性因子の最適化

市販されている12種の液性因子 (FGF-2, IGF-I, インスリン, BMP2, PTH, 成長ホルモン, デキサメサゾン, 活性型ビタミンD3, トリヨードサイロニン, IL-1 受容体アンタゴニスト, 17β-エストラジオール, テストステロン) の全ての組み合わせを検討した。

## 3. 高分子ナノミセルを用いた遺伝子導入方法の開発

### ① 細胞内還元環境応答型ナノミセル型遺伝子キャリアの構造最適化

ポリエチレングリコール-ポリ(L-リジン) (PEG-PLL) ブロック共重合体に対し、PLL側鎖アミノ基の一部をスルフヒドリル基(SH基)で置き換えジスルフィド架橋を施すことにより、細胞内環境変化(グルタチオン濃度の上昇)に応答して内包pDNAを制御放出するインテリジェントナノミセル型遺伝子キャリアを構築した。

### ② 細胞内還元環境応答型ナノミセル型遺伝子キャリアの機能検証

インテリジェントナノミセル型遺伝子キャリアの細胞内機能は、ルシフェーゼをコードしたpDNAの発現効率から評価した。主としてin vitroにおいては培養293T細胞、in vivoにおいてはマウスの尾静注によりレポーター遺伝子を投与し、肝臓での遺伝子発現により評価した。また架橋型ナノミセル型遺伝子キャリアの静脈内投与におけるpDNAの血中安定性をサザンブロット法により評価した。さらにin vivoとin vitroでの機能相関を定量的に評価する目的で、アレイ状に構築した初代肝実質細胞スフェロイドへの遺伝子導入を試みた。

### ③ 細胞内還元環境応答型ナノミセル型遺伝子キャリアの凍結乾燥製剤化の検討

遺伝子キャリアの臨床応用への展開を考慮した場合には、保存安定性や投与量の幅広い選

択性などの製剤学的要件の満足が必要であり、凍結乾燥製剤化が望まれるため、凍結乾燥前後における遺伝子発現効率を株化細胞実験により、また粒径測定を動的光散乱によって評価した。

### ④ 細胞内移行促進機能を有するナノミセル型遺伝子キャリアの構築

本システム構築のため、ブロック共重合体へ細胞内移行促進セグメントを導入した。具体的にはPEG-ポリ(β-ベンジルアスパルテート) (PEG-PBLA) ブロック共重合体の側鎖のベンジル基に対する定量的アミノリシスによって、pKaや疎水性などの異なる各種アミノ基を導入する方法を確立し、この手法で合成した種々のブロック共重合体からDNA内包ナノミセル型遺伝子キャリアを調製した。

### ⑤ A-B-C型トリブロック共重合体の合成

全身投与が可能なベクター系の構築を目指して、生体適合性のポリエチレングリコール、バッファ効果により細胞内移行能を賦与するpKaの低いポリカチオン、DNAを効率的に凝縮させるポリカチオンの3つの異なる機能性セグメントを有するA-B-C型トリブロック共重合体を新規に合成した。

### ⑥ A-B-C型トリブロック共重合体によって構築された遺伝子キャリアの担ガンマウスによるin vivo評価

固形ガン(マウス大腸ガンC-26細胞)を皮下移植したマウスに対し、3層構造ナノミセル型遺伝子ベクターを尾静脈内投与し、腫瘍部位での遺伝子発現を評価した。

### ⑦ 表層にリガンド分子を結合した高分子ナノミセル型遺伝子キャリアの構築

リガンドを導入するための反応性基として従来のアセタール基に加え、脱保護に伴う二量化反応が惹起されないベンジルアセタール基を片末端に導入したPEGを合成し、アセタール基およびベンジルアセタール基とポリアミノ酸側鎖の選択的脱保護を実現するために、温和なアルカリ条件で脱離可能な保護基を有するアミノ酸誘導体(例:ε-トリフルオロアセチル-L-リシン酸無水物)をPEG末端から重合させた。これにより、従来法では困難であったブロック共重合体の末端に、ラクトース、ペプチドを導入することを試みた。

### ⑧ ポリカチオンの合成とポリプレックスの

## 調製

アミノリシス法によるブロック共重合体合成を行った。ポリアスパラギン酸(P[Asp])側鎖にジエチレントリアミン(DET)を導入したP[Asp(DET)]ポリマーとポリエチレングリコール(PEG)とのブロック共重合体(PEG-DET)を合成した(PEG分子量12000,ポリアミノ酸重合度98)。ナノミセル型キャリアはトリスバッファー中でDNAとポリマー溶液を混合することによって調製した。

### ⑨ 初代培養株細胞への遺伝子導入

マウス皮膚組織より皮膚線維芽細胞を採取し、6穴プレートに播種、培養し、ナノミセル型キャリアによる遺伝子導入を行った。同様に新生マウス頭蓋骨由来の未分化骨芽細胞に対する遺伝子導入も行った。導入遺伝子はホタル発光ルシフェラーゼおよび蛍光タンパクであるYFPを用い、それぞれルミノメーター、蛍光顕微鏡にて遺伝子発現を評価した。また、遺伝子導入条件における細胞への毒性を評価するため、生細胞数の計測をMTTアッセイにより行った。

### ⑩ ナノミセル型キャリアの細胞内挙動観察

DNAを2種の波長の異なる蛍光分子で標識することにより、DNAがナノミセルに内包されると、2分子間の蛍光エネルギー移動により波長が変化する。一方DNAがキャリア外に放出されるとこのエネルギー移動は解消されるため、その変化を観察することにより、細胞内でのキャリア挙動、DNA放出をレーザー共焦点顕微鏡を用いて観察した。

### ⑪ 遺伝子発現の持続性評価

遺伝子発現の状態をより詳細に確認するため、その発現をmRNAレベルで評価した。ルシフェラーゼ遺伝子を導入し、細胞からmRNAを抽出、ルシフェラーゼ遺伝子mRNAの発現を定量PCR法にて評価した。

## 4. 骨軟骨再生用担体・細胞シートの開発

### ① 骨軟骨細胞増殖・分化に関わる担体の開発

生分解性高分子性細胞担体としてはポリ乳酸、ポリグリコール酸、および両者の共重合体、フィブリンゲルを評価した。ポリ乳酸、ポリグリコール酸、および両者の共重合体は

合成直後の状態では非常に疎水性が高く細胞接着性、組織親和性が非常に低いため、アルカリ処理により表面の親水化をおこなった。これらはラット背部ないし腹部皮下に移植し、移植部位の炎症など異物反応を組織学的に評価した。

### ② 皮膚線維芽細胞シート作製法の開発

8週齢雄C57BL/6Nマウス背部皮膚より採取・分離した線維芽細胞を、コラーゲンフィルム(高研社製)上に播種し、FBS添加DMEM培地中でコンフルエントになるまで培養下のち、フィルムごと分離し、増殖・分化・基質産生に影響を及ぼすかを分子生物学的・組織学的に評価した。アデノウィルスにてcaALK6+Runx2を導入後、線維芽細胞をアテロコラーゲン膜上にて培養し骨形質転換を誘導した。石灰化を確認後直径5 mmにカットし、移植片とした。

### ③ 培養骨膜シートの作製法の開発

②の代替技術として、培養骨膜細胞シートを安定して作製という培養条件を最適化し、生化学的、組織学的に評価すると共に、ラット頭頂骨骨欠損部位に移植した。培養骨膜細胞シートの回収には温度応答性培養皿を用い、低温処理(20℃)により回収した。

A) 定量的PCR: グアニジン塩酸フェノールにて細胞シートより拡散を抽出し、常法にしたがい逆転写後、TaqManプローブを用いた定量的PCRに供した。検討した遺伝子は以下のとおりである。

- type I collagen: 骨基質に最も多量に含まれるタンパク質
- alkaline phosphatase (ALP): 骨芽細胞の初期分化マーカー
- Osteopontin spp1: 骨芽細胞の中期分化マーカー
- Osteocalcin: 骨芽細胞の後期分化マーカー
- Runx2: 骨芽細胞の分化に必要な転写因子
- VEGF: 血管新生因子

B) 培養条件: グリセロリン酸(骨基質形成の際、リン脂質を供給し石灰化を促進する)、デキサメタゾン(骨芽細胞への分化を促進する)、アスコルビン酸(コラ

ーゲンのプロリンおよびリジン残基の水酸化を促進し、コラーゲンの合成・分泌、線維形成を促進する)を含む骨形成培地と異なる時間浸透させた以下の4群を比較検討した。培養期間の合計はいずれも同一である。

- I群 通常培地でのみ培養
- II群 骨形成培地で24時間浸透
- III群 骨形成培地で72時間浸透
- IV群 骨形成培地で120時間浸透

#### ④ 骨形質転換線維芽細胞シートの作製

8週齢雄C57BL/6Nマウス背部皮膚より採取・分離した線維芽細胞にアデノウイルスにてca ALK6+Runx2を導入した。導入後、線維芽細胞をアテロコラーゲン膜上にて培養し骨形質転換を誘導した。石灰化を確認後直径5 mmにカットし、移植片とした。

### 5. 骨軟骨欠損モデルの作製とin vivo骨・軟骨再生法の開発

#### ① 運動器骨・軟骨欠損小動物モデル

マウスおよびラットの四肢に臨界骨・軟骨欠損を作製し、放射線学的(X線写真、CT)に1、2、3週間、1、2、3、4、5、6ヶ月とフォローした。

- 臨界荷骨欠損モデルでは、マウス及びラット頸骨の中央部3分の1を切除した。
- 臨界軟骨欠損モデルでは、マウスおよびラットの膝関節軟骨に歯科用ドリルで直径2 mmの円形の穴を全層または半層に穿ち、その時間経過を追った。

#### ② 頭蓋顎顔面部骨・軟骨欠損小動物モデル

マウスおよびラットの頭蓋・顎顔面領域に臨界骨・軟骨欠損を作製し、放射線学的(X線写真、CT)に1、2、3週間、1、2、3、4、5、6ヶ月とフォローした。

- 臨界骨欠損モデルでは、マウス及びラットの頭頂骨に4-5mmの骨欠損を作製した。
- 臨界軟骨欠損モデルでは、マウス及びラット耳介軟骨の中央部3分の1を切除した。

#### ③ 頭蓋骨欠損大動物モデル(イヌ)

11ヶ月齢—2歳10ヶ月(平均1歳10ヶ月)の健康ビーグル犬の頭蓋骨に1辺15 mmの骨欠損を作製した。術後1週・2週・3週・4週・8週・12週・16週・20週・24週で骨欠損部のCT撮影を行った。

#### ④ 関節軟骨欠損大動物モデル(イヌ)

11ヶ月齢—2歳10ヶ月(平均1歳10ヶ月)の健康ビーグル犬の膝関節軟骨にドリルで円形の穴を全層または半層に穿ち、その時間経過を追った。

術後1週・2週・3週・4週・8週・12週・16週・20週・24週で軟骨欠損部のCT撮影を行った。

#### ⑤ $\alpha$ -TCPテーラーメイド人工骨の移植

11ヶ月齢—2歳10ヶ月(平均1歳10ヶ月)の健康ビーグル犬の頭蓋骨に1辺15mmの骨欠損を作製した。骨欠損部のCTデータをもとに、骨欠損部の形状に成形された $\alpha$ -TCPテーラーメイド人工骨を作製した。作製にはインクジェットプリンターを用いた3次元積層法を用いた。対照には市販のハイドロキシアパタイトブロック(HAブロック)を切削加工したものを用いた。 $\alpha$ -TCP人工骨とHAブロックを骨欠損部に移植し、術直後及び術後1週・2週・3週・4週・8週・12週・16週・20週・24週で一般健康状態・血液検査・骨欠損部のCT撮影を行った。また24週時に頭蓋骨を採取し人工骨の組織学的検討を行った。

#### 「倫理面への配慮」

研究に用いたヒト皮膚および脂肪組織は術前に同意を得た手術標本の一部を使用した。DNA組み換え実験に関しては、各分担研究者の属する機関の組み換えDNA実験規則に従って行った。動物実験においては各研究機関の実験動物委員会の規則に従い、ヘルシンキ宣言の精神を尊重して十分な倫理的および動物愛護上の配慮のもとに実験を行った。

### C. 研究結果

1. 皮膚由来の再生用細胞取得のための多能性幹細胞の単離法と性状解析
- ① マウス皮膚より浮遊培養系を用いて、sphereを形成させ、半年以上の長期継代に成功した。In vitroでの多分化能を確認した。ヒト真皮由来の細胞はマウスに比べると

増殖が遅く、sphereの形成率も低かった。

- ② ヒトおよびマウスの脂肪組織由来の細胞は長期継代が可能で、骨芽細胞誘導培地にかえるとアルカリフォスファターゼ陽性細胞が多数出現し、4週間後にはカルシウム沈着もみられた。また脂肪細胞誘導培地にてOil Red Oに染まる脂肪滴を含んだ脂肪細胞の分化がみられた。真皮の細胞と同様にsphereを形成させて、神経分化条件にすると $\beta$ Tubulin、MAP2陽性細胞が出現した。
- ③ まずマウス皮膚を用いてSP細胞の存在を確認した。新生児マウス表皮では5-40% SP細胞が見られたのに対して、生後1ヶ月から0.1%程度に激減していた。6ヶ月や24ヶ月のマウスでも検討したが、0.1%以下の割合であった。真皮の細胞において検討したところSP細胞の割合は0.1%以下であった。Versican-GFP-Tgマウスから毛乳頭細胞のみを選択的に集めて検討したところ、SP細胞の割合は3%と上昇した。ヒトの皮膚においてもSP細胞の検討を行ったが、SP細胞の割合は0.01-0.1%程度と非常に少なかった。
- ④ CD133陽性細胞が毛乳頭に選択的に存在することが免疫染色により明らかになったので、CD133陽性細胞ソーティングして集め、RT-PCRを行うとneural crest originを示唆するSlug, Twist, Snailの発現が認められた。CD133陽性細胞を浮遊培養したところ、sphereを形成したが、SKP (真皮の多能性幹細胞)は1-2週間で形成するのに対し、6週間かかった。CD133のsphereは3回継代すると増殖が止まった。CD133陽性細胞は分化条件にすると、それぞれ5-10%の細胞がTuj, GFAP、 $\alpha$ SM Aの抗体によって染色され、脂肪細胞も検出された。骨芽細胞への分化は現在確認中である。

## 2. 骨・軟骨分化増殖シグナルの最適化と皮膚線維芽細胞の骨・軟骨形質転換

- ① KMI ラットの低身長の原因遺伝子が、cGKIIであることを同定した。
- ② BMP・IRS・Wnt・Hh・Runx2シグナルの

刺激性あるいは抑制性因子を発現するベクターの作製に成功し、その発現を確認した。

- ③ 刺激性 G 蛋白・cGKII・IRS-1・SRC-1・Runx2 が、正常な骨・軟骨の分化増殖に必須の因子であることを明らかにした。
- ④ 骨分化の最適化シグナルは BMP+Runx2 であり、軟骨分化の最適化シグナルは Sox5/6/9 であった。
- ⑤ 皮膚線維芽細胞において BMP+Runx2 を活性化させることで骨形質転換が誘導され、Sox5/6/9 を導入することで軟骨形質転換が誘導された。
- ⑥ BMP2/6 は共に骨分化に大きく関与すること、Wnt シグナルは Sox9 依存性に軟骨分化を促進すること、PTH の骨同化作用に IRS が関与することが明らかとなった。
- ⑦ FGF-2 とインスリン・IGF-I の組合せが軟骨再生に有効な軟骨増殖因子の組合せであることが明らかとなった。
- ⑧ BMP2・インスリン・トリヨードサイロニンが脱分化した初代軟骨細胞の再分化に十分な組合せであることが明らかとなった。

## 3. 高分子ナノミセルを用いた遺伝子導入方法の開発

①②PEG-PLL ブロック共重合体に対し、2種類のSH基導入法 (SPDP 試薬と2-イミノチオレン試薬による方法) を試み、いずれにおいても導入率を制御してSH基を導入することが可能であった。前者ではSH基の導入により荷電密度が減少し、後者では荷電密度が維持される。これらの手法によりジスルフィド架橋を施すことにより、細胞内環境変化 (グルタチオン濃度の上昇) に応答して内包pDNAを制御放出するインテリジェントナノミセル型遺伝子キャリアを構築した。

架橋高分子ナノミセル型遺伝子キャリアは、細胞外では内包pDNAを安定に保持する一方、細胞内還元環境下では架橋の解離に伴うpDNAの放出制御を通じて、非架橋ナノミセル型遺伝子キャリアに比較して一桁以上高い発現効率を実現した。さらにナノミセル型遺伝子キャリアを構成するブロック共重合体の連鎖長ならび

にジスルフィド架橋導入率と構造安定性、遺伝子発現能との間の構造—機能相関を明らかにするための系統的な研究を行い、ナノミセル型遺伝子キャリア内において有効なDNA凝縮を惹起するための臨界鎖長が存在することを明らかにし、DNA凝縮構造の形成と遺伝子発現活性との間の相関も見出した。また架橋導入率には最適値が存在し、その値が細胞種によって異なることも明らかにした。これは細胞内におけるグルタチオン濃度の差などに起因するものと考えられるが、これより架橋導入率の精密な制御によって、特定の細胞集団に遺伝子発現を誘導出来ることを示した。

培養細胞系において良好な遺伝子発現を示した細胞内還元環境応答型ナノミセル型遺伝子キャリアのin vivo機能評価においては、マウスの尾静脈投与によって、肝臓実質細胞に一樣にレポーター遺伝子を発現させ得ることに成功した。また血管壁への遺伝子導入においては、内皮細胞への遺伝子導入が可能であることを実証した。これらの結果を受け、in vivoとin vitroでの機能相関を定量的に評価する目的で、アレイ状に構築した初代肝実質細胞スフェロイドへの遺伝子導入を試み、時間依存的に遺伝子導入が可能であることを見出している。これは、非分裂期にある細胞への遺伝子導入がナノミセル型遺伝子キャリアを用いて行えることを示した点で特筆すべきものであり、ナノミセル型遺伝子キャリアの細胞内核移行についても新しい知見を与えることが期待される。

さらに架橋型ナノミセル型遺伝子キャリアの静脈内投与におけるpDNAの血中安定性をサザンブロッティング法により評価した結果、架橋導入率の上昇に伴うpDNAの血中安定性の向上が確認された。ナノミセル型遺伝子キャリアへの架橋導入は、内包DNAの血中安定性を向上させるために極めて有用であると考えられる。さらに適用可能な投与方法を拓げる目的で、ナノミセル型遺伝子キャリアの気管内投与を行い、肺における遺伝子発現を評価した。その結果、ナノミセル型遺伝子ベクターは、非架橋ナノミセル型遺伝子キャリアや市販の遺伝子導入試薬であるポリエチレンイミンと比較して、顕著に高い遺伝子発現を導くことに成功した。この様に、架橋型ナノミセル型遺伝子キャリアは、系中に遊

離ポリカチオンを含まないために極めて毒性が低く、in vivo遺伝子導入に適した構造と性能を有することが明らかとなった。

③本システムの臨床応用に向けては、保存安定性や投与量の幅広い選択性などの製剤学的要件の満足が必要であり、凍結乾燥製剤化が望まれるが、ナノミセル型遺伝子キャリアは凍結乾燥に伴う粒径変化や遺伝子発現活性の減弱が全く認められず、将来の臨床展開においても極めて有利な形態であることが明らかとなった。

④PEG-PBLAブロック共重合への定量的アミノリシスによって、側鎖構造単位に高pKa(〜9)と低pKa(〜7)の2種類のアミノ基を有する系がスムーズな細胞質移行を示し、良好な遺伝子発現を導くことを見出した。すなわち一つのカチオン性ユニットへ構造の異なる二種類のアミノ基を導入することにより、DNAとのコンプレックス形成とエンドソーム内pH低下を防ぐバッファー効果とを両立させる機能分担型の分子設計が合目的性を有することが明らかになった。

また、これらの側鎖に2種類のアミノ基を有するブロック共重合体の中でも、ジエチレントリアミン(DET)を導入したブロック共重合体(PEG-DET)が、細胞毒性を示すことなく極めて効率的な遺伝子導入を示すことを明らかにした。市販の遺伝子導入試薬は、初代培養細胞に対して顕著な細胞毒性を示したが、PEG-DETは種々の初代培養細胞(骨芽細胞、線維芽細胞、滑膜細胞)に対して細胞毒性を示すことなく高効率の遺伝子発現を導いた。PEG-DETの遺伝子導入メカニズムに関しては、今後さらなる検討が必要であるが、低毒性と効率的な遺伝子発現を実現した人工遺伝子キャリアとして高い有用性が期待される。

⑤上記の知見に基づいて、さらに、経静脈全身投与が可能なキャリア系の構築を目指して、生体適合性のポリエチレングリコール、バッファー効果により細胞内移行能を賦与するpKaの低いポリカチオン、DNAを効率的に凝縮させるポリカチオンの3つの異なる機能性セグメントを有するA-B-C型トリブロック共重合体を新規に合成した。トリブロック共重合体は、DNAを凝縮した内核、バッファー能を有する中間層、生体適合性のPEG外殻からなる3層構造を形成し、培養細胞実験

において従来のPEG-PLLの50倍以上の遺伝子導入効率を実現した。

⑥固形ガン（マウス大腸ガンC-26細胞）を皮下移植したマウスに対し、3層構造ナノミセル型遺伝子キャリアを尾静脈内投与した結果、腫瘍部位での選択的かつ効率的遺伝子導入が確認された。対照的にpDNAのガン組織への直接注射においては、3層構造ナノミセル型遺伝子キャリアの10分の1以下の遺伝子発現しか確認されず、市販の遺伝子導入試薬では投与した全てのマウスの死亡が確認された。人工遺伝子キャリアの静脈内投与により大腸ガンに遺伝子発現を認めたのは、世界的に見てもこの研究が初めての例であり、3層構造ナノミセル型遺伝子キャリアは全身投与によるin vivo遺伝子治療を実現する遺伝子デリバリーシステムとしての展開が期待される。

⑦これまでの研究により、遺伝子DNAやオリゴ核酸を効率良く搭載し、高い生理機能を発現するナノミセル型遺伝子キャリアの構造設計が確立したことを受け、ナノミセル型遺伝子キャリア表層へのリガンド分子装着のための分子設計として、 $\alpha$ -末端に各種のパイロット分子を結合可能なブロック共重合体の新規合成ルートの確立を行った。この場合、数種類の化学反応による修飾を多段階に重ねるという制約のために、リガンドを担持したブロック共重合体の合成は一般には困難を伴うが、既に確立していた合成経路を抜本的に見直し、各々の反応操作が互いに干渉しない新規合成経路を探索することによって、効率良くリガンド導入ブロック共重合体を合成する経路の構築に成功した。これにより、従来法では困難であったブロック共重合体の末端に、ラクトース、ペプチドを導入することに成功した。

この結果、表層にラクトースを導入したナノミセル型遺伝子キャリアが、ラットより調製した初代培養肝実質細胞に対して、高い遺伝子発現効率を示すことを確認した。さらに血管内皮細胞や平滑筋細胞など多くの細胞に発現が認められるインテグリンに対して特異的結合能を有するRGDペプチドを表層に導入したナノミセル型遺伝子キャリアを

構築した。RGDペプチド導入ナノミセル型遺伝子キャリアを、ウサギ頸動脈バルーン擦過モデルの内膜肥厚を形成している動脈壁に対して局所投与を行ったところ、従来のシステムと比較して10倍以上高い遺伝子導入効率を実現された。これによりナノミセル型遺伝子キャリアに導入したりガンド分子が生体内においても有効に機能することを確認した。

⑧⑨PEG-DET/DNAナノミセル型キャリアにより、皮膚線維芽細胞においてほとんど毒性を示すことなく遺伝子発現が確認された。ルシフェラーゼ遺伝子による評価で、ポリマーのカチオン電荷対DNAの電荷比を80 (N/P=80) にて調製したナノミセルにおいて最も優れた遺伝子発現が得られることが確認され、YFP遺伝子発現の蛍光顕微鏡による観察では、導入後6日で約20%の細胞に遺伝子発現を認めた。

また、未分化骨芽細胞に対してはさらに良好な遺伝子導入が可能であり、導入後3日で約50%の細胞に遺伝子発現が観察された。何れの細胞においても細胞は形態的に遺伝子導入を行っていないコントロール細胞とくらべほとんど影響は見られず、MTTアッセイによる生細胞数計測にても、コントロールとの有意差を認めなかった。代表的な遺伝子導入用カチオンポリマーであるポリエチレンイミンでは、強い毒性が生じており、対照的な結果となった。

⑩フルオレセインおよびCy3のふたつの蛍光分子で標識したDNAをナノミセル型キャリアに内包し、蛍光分子間のエネルギー移動 (FRET) により、キャリアの細胞内移動を観察した。

PEG-DET/DNAナノミセル型キャリアにより遺伝子導入で、24時間後明らかに細胞質内でのDNAの効率よい放出が観察され、本キャリアにより効率よいDNAの細胞内デリバリーが達成されていることが確認された。これは同様の効率的細胞内遺伝子デリバリーが可能なポリエチレンイミンの結果と相関するものであり、本キャリアによっても、細胞内に取り込まれた後、効率よいエンドソーム脱出の起こっていることが示唆された。

①ナノミセル型キャリアでは非常に低毒性で細胞へ遺伝子導入することが可能のため、キャリア共存下で長時間培養することが可能となる。その結果として、非常に長期間にわたる遺伝子発現が観察される。この発現が実際に核内転写レベルで起こっていることを確認するため、細胞からmRNAを抽出、遺伝子発現を定量PCR法で評価したところ、ナノミセル型キャリアでは、むしろ1日目より3、5日目にかけてmRNAの発現が増加する傾向が観察された。一般的な脂質由来の市販遺伝子導入試薬であるFuGENE6では、mRNAレベルの発現としては、1日目で非常に高い発現が見られるものの、以後急激に減少し、全く異なった発現のパターンとなっていることが明らかとなった。ナノミセル型キャリアでは、核内転写レベルにおいても遺伝子発現が持続することにより、長期にわたる高い遺伝子発現の得られることが確認された。

#### 4. 骨軟骨再生用担体・細胞シートの開発

①ラット皮下に移植した、生分解性高分子性細胞担体はいずれも、分解にともなって強い炎症反応を惹起した。このような炎症反応は軽度あれば毛細血管網の誘導等で、組織再生に関して優位にはたらくことが期待される。実際に、毛細血管網の誘導が生じることを組織学的に明らかにした。しかし、極少数の幹細胞を播種して移植するような系では、強い炎症反応により移植した幹細胞が障害を受けることが懸念される。アルカリ処理により、ポリ乳酸、ポリグリコール酸および両者の共重合体の表面を大きく親水化できることが明らかになったが、同時に表面の分解性も著しく増加し、より強い炎症反応が生じることが分かった。今後、アルカリ処理条件の最適化が必要である。

②アテロコラーゲンフィルム上に、骨形質転換させた皮膚線維芽細胞シートを作製することに成功した。皮膚線維芽細胞を含む間葉系の細胞は、これまで細胞シートに用いられてきた上皮系あるいは筋肉の細胞と異なり、基質を多く産生しその中に埋入しているため、従来のコーティングでは剥離が困難であることが判明した。対処方として、薄いアテ

ロコラーゲンフィルムを底に敷くことで、細胞シートを一塊として取り出すことができた。さらにこの細胞シートをマウス頭蓋部骨欠損モデルに移植したところ、術後4週で、骨再生が認められた。再生骨の長期経過については現在経過観察中である。

③ラット頭頂骨骨膜より採取した骨膜細胞を酵素処理し初代培養に供した後、継代した2代目培養骨膜細胞を温度応答性培養皿に播種すると、コンフルエント到達後、低温処理のみで培養骨膜シートとして回収できる条件を確立した。細胞シート中に含まれる培養骨膜細胞をアルカリフォスファターゼ(ALP)染色すると、多数のALP陽性細胞が確認された。この観察は、本細胞シート内には骨芽細胞の分解時に必要なニッチェとしての条件を最低限有する細胞外マトリックス環境が培養の間に構築されていることを強く示唆している。ラットへの移植実験からは、本細胞シートは、生分解性高分子性担体のような強い炎症反応などの異物反応を惹起しない(少なくともきわめて軽微である)ことが明らかになっており、細胞シートを新規幹細胞担体として活用しうる可能性を強く示唆している。

骨形成培地に長く浸透するほど初期マーカーの発現が減少し、後期マーカーの発現が強くなることが明らかになった。一方、Runx2とVEGFの発現には有意な差を認めなかった。

#### 5. 骨軟骨欠損モデルの作製とin vivo骨・軟骨再生法の開発

①運動器骨・軟骨欠損小動物モデルでは、放射線学的には、6ヶ月経過しても明らかな治癒は認められなかった。

②頭蓋顎顔面部骨・軟骨欠損小動物モデルでは放射線学的には、術後3ヶ月程度までは自然治癒がなかったが、それ以降若干の骨形成が辺縁から起こることが観察された。

③イヌ頭蓋部骨欠損モデルにおいては、放射線学的には、6ヶ月経過しても治癒につながる明らかな骨形成は認められなかった。

④イヌ軟骨欠損大動物モデルでは、半層欠損モデルではマウス、ラットともに2ヶ月経過すると自然治癒が認められるが、全層欠損モ

デルでは6ヶ月経過しても永久軟骨による修復ではなく、線維性基質による一部修復が観察されたが、欠損部の陥没は残存したままであった。

⑤ $\alpha$ -TCPテーラーメイド人工骨の移植では術中合併症はなく、術後の健康状態・血液検査値に関しても大きな異常は認められなかった。CT撮影の結果、 $\alpha$ -TCP人工骨内孔の狭小化と周囲骨との架橋形成が認められ骨再生を誘導していることが示唆された。組織学的検索から、 $\alpha$ -TCP人工骨内孔と周囲に骨様組織が誘導されていることが確認された。さらに $\alpha$ -TCP人工骨内部に骨髓腔の形成が認められた。

#### D. 考察

##### 1. 皮膚由来の再生用細胞取得のための多能性幹細胞の単離法と性状解析

ヒト皮膚とマウス皮膚から浮遊培養によりsphereを形成させることによって多能性幹細胞を単離・培養することができた。また色素排出能に注目して幹細胞の候補であるSP細胞を皮膚から採取する方法を試みた。いずれの方法によっても幹細胞の採取に成功したが、マウスに比べてヒトでは細胞数が少なかった。またSP細胞の培養法については条件の検討の余地が大きいと思われた。真皮ではSP細胞のデータから毛乳頭部に多能性幹細胞の存在が示唆された。最近他のグループの報告でも毛乳頭部における多能性幹細胞の存在が示唆されているが、これまで毛乳頭細胞に特異的な表面マーカーが見つからないために、*explant culture*以外に毛乳頭細胞を採取することは困難であった。今回我々の検討で皮膚においてCD133が毛乳頭細胞に特異的に発現していることが明らかになり、CD133陽性細胞が*in vitro*において多能性を示す結果が得られた。CD133陽性細胞は浮遊培養では増殖が遅く、接着培養では多分化能が低下する傾向が見られたので、やはりさらなる培養条件の検討が必要と思われる。

一方ヒトおよびマウスの脂肪組織にも間葉系幹細胞の存在が示唆され、骨芽細胞への分化も見られた。接着培養で比較的増殖能力は保たれていたが、分化能には年齢による差

がみられたので、症例数を増やしてさらなる検討が必要と思われる。

##### 2. 骨・軟骨分化増殖シグナルの最適化と皮膚線維芽細胞の骨・軟骨形質転換

本研究で最適化された増殖・分化に有効な因子を使用することで、皮膚線維芽細胞からの効率的な骨軟骨分化誘導系を確立できることが示唆された。特に、CGKIIは、骨・軟骨を制御する重要な因子である可能性が高く、その活性を制御することで、骨・軟骨分化誘導をより効率的に調節することができるかもしれない。また、さらに有効な因子を求めて分化・増殖シグナルに関する検討を今後も重ねる必要があると思われた。

##### 3. 高分子ナノミセルを用いた遺伝子導入方法の開発

本研究では実際の治療に用いることが可能な人工遺伝子ベクターの開発を目的とする。そのための要件として、高い遺伝子導入効率とともに、ほとんど細胞毒性を示さないことが不可欠となる。特に生体由来の初代培養株細胞は、市販遺伝子導入試薬を用いる際も細胞毒性の影響を受けやすいことが知られており、毒性の少なさは重要なポイントとなる。

PEG-DET/DNAナノミセル型キャリアは、ほとんど細胞への毒性を示すことなく、良好な遺伝子導入を実現しており、臨床応用を視野に入れたキャリアとして非常に有望なシステムといえる。また、長期間にわたる核内転写の持続という特徴も併せ持つことが明らかとなった。これは例えば細胞分化誘導を行う目的に治療用遺伝子を機能させる際には、非常に重要なポイントとなりうることである。さらにポリマーの構造、鎖長と最適化することにより、生体組織内での遺伝子発現を時間的、空間的にコントロールすることの出来るインテリジェント遺伝子デリバリーシステムへの展開が期待される。

##### 4. 骨軟骨再生用担体・細胞シートの開発

上皮系でない皮膚線維芽細胞のような場合でも、サポートとなる膜状物質を加えるこ

とで、細胞シートを回収できる可能性が示された。さらに、骨膜由来細胞シート内の細胞外マトリクスを単独で、あるいは生分解性高分子性担体と組み合わせて活用することにより、従来法ではえられなかった生体親和性が高く、幹細胞維持能を有する新規担体が開発しうることが示唆された。また、骨分化誘導培地との接触時間を十分に最適化する必要があることが示唆された。

## 5. 骨軟骨欠損モデルの作製とin vivo骨・軟骨再生法の開発

モデルによっては完全な不可逆性欠損でないことがあるので、観察期間やコントロールに注意する必要がある。小動物モデルにおいては3ヶ月、大動物モデルにおいては6ヶ月という期間内であれば、再生実験の際の臨界骨・軟骨欠損モデルとして使用可能であると考えられた。

臨界骨欠損モデルでは、確実に自然骨修復はないものと思われるが、軟骨欠損モデルでは膝関節の軟骨の厚みがマウスでは約0.2-0.3 mm、ラットでは約0.3-0.4 mmと薄いので一定の厚みで半層軟骨欠損を作製するためには器具の開発や改善が不可欠であった。しかし、全層軟骨欠損は約1 mmの厚みを持つ歯科用バーを用いることによって定量的な軟骨削除を作製することができた。

大動物骨欠損モデルにおいて、 $\alpha$ -TCPテーラード人工骨の安全性と有効性が示唆されたが、自家骨への置換は完全ではなかった。安全性と併せて、さらに長期にわたる経過の観察が必要であると考えられる。

## E. 結論

皮膚の真皮や脂肪組織から多能性幹細胞の取得に成功したが、ヒトの細胞では採取のしやすさや増殖能力の点で、脂肪組織由来の細胞が優れていると考えられた。

骨軟骨分化・増殖制御因子の最適化をおこない、またそれらの因子の詳細な作用を明らかにした。さらに皮膚線維芽細胞からの骨・軟骨形質転換を誘導した。

新規合成、最適化したブロック共重合体を用いたナノミセル型遺伝子キャリアにより、

皮膚線維芽細胞を含めた初代培養株細胞への低毒性かつ効率よい遺伝子導入が確認された。

アテロコラーゲンフィルム上に、骨形質転換皮膚線維芽細胞シートを作製することに成功し、細胞がその機能を維持していることが明らかとなった。また、骨膜由来細胞シートの新規担体としての有効性を期待しうる結果を得ることができた。

運動器・頭蓋顎顔面部における骨・軟骨欠損小動物モデル(マウス、ラット)を作成し、長期自然経過を明らかにした。また、大動物頭蓋骨・関節軟骨欠損モデルの長期の自然経過を明らかにし、実験を行う場合の至適条件を明らかにした。さらに大動物臨界骨欠損モデルにおいて、3次元積層法にて作製した $\alpha$ -TCPテーラード人工骨の安全性と有効性が確認され、基礎データを収集した。

## F. 健康危険情報 該当なし

## G. 研究発表 分担研究報告書参照

## H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。) 分担研究報告書参照

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム再生医療等研究事業）  
分担研究報告書

骨軟骨欠損モデルの作製とin vivo骨・軟骨再生法の開発①

分担研究者 中村 耕三 東京大学大学院医学系研究科・整形外科 教授

研究要旨

テーラーメイド医療の実現は骨軟骨再生においても大きなテーマである。組織欠損部に適合した外部形態と内部構造を有する人工臓器あるいは組織再生を誘導するインプラントを用いることは再生組織量と再生組織の質の向上につながると考えられる。そこで、第一に運動器骨・軟骨欠損モデルの確立を目指した。マウス・ラット・イヌの運動器・顎顔面頭蓋部の臨界骨・軟骨欠損モデルの長期の自然経過と、実験を行う場合の至適条件を明らかにした。次に、大動物（イヌ）骨欠損モデルを使用し、欠損部に適合した人工骨の基礎データの収集を試みた。3次元積層法にて作製した $\alpha$ -TCPテーラーメイド人工骨を移植したところその安全性と有効性が確認された。

A. 研究目的

テーラーメイド医療の実現は骨軟骨再生においても大きなテーマである。組織欠損部に適合した外部形態と内部構造を有する人工臓器あるいは組織再生を誘導するインプラントを用いることは再生組織量と再生組織の質の向上につながると考えられる。そこで、第一に分担研究者の川口とともに運動器骨・軟骨欠損モデルの確立を目指した。マウス・ラットの運動器臨界骨・軟骨欠損モデルの長期の自然経過と、実験を行う場合の至適条件を明らかにすることを試みた。次に、これら小動物の基礎データをもとに、臨床応用を視野に入れた大動物（イヌ）頭蓋骨・関節軟骨欠損モデルの確立を目指した。それらの自然経過を追うことで実験を行う場合の至適条件を明らかにすることを試みた。以上より得られた知見をもとに、分担研究者の高戸とともに臨床応用を視野に入れた大動物（イヌ）骨欠損モデル使用し、欠損部に適合した人工骨の基礎データの収集を試みた。3次元積層法にて作製した $\alpha$ -TCPテーラーメイド人工骨を移植しその安全性と有効性を検証した。

B. 研究方法

(1) 運動器骨・軟骨欠損小動物モデル

マウスおよびラットの四肢に臨界骨・軟骨欠損を作製し、放射線学的（X線写真、CT）に1、2、3週間、1、2、3、4、5、6ヶ月とフォローした。

- ① 臨界荷骨欠損モデルでは、マウス及びラット頸骨の中央部3分の1を切除した。
- ② 臨界軟骨欠損モデルでは、マウスおよびラットの膝関節軟骨に歯科用ドリルで直径2 mmの円形の穴を全層または半層に穿ち、その時間経過を追った。

(2) 頭蓋骨欠損大動物モデル（イヌ）

11ヶ月齢—2歳10ヶ月（平均1歳10ヶ月）の健常ビーグル犬の頭蓋骨に1辺15 mmの骨欠損を作製した。術後1週・2週・3週・4週・8週・12週・16週・20週・24週で骨欠損部のCT撮影を行った。

(3) 関節軟骨欠損大動物モデル（イヌ）

11ヶ月齢—2歳10ヶ月（平均1歳10ヶ月）の健常ビーグル犬の膝関節軟骨にドリルで円形の穴を全層または半層に穿ち、その時間経過を追った。

術後1週・2週・3週・4週・8週・12週・16週・20週・24週で軟骨欠損部のCT撮影を行った。

(4)  $\alpha$ -TCPテーラーメイド人工骨の移植

11ヶ月齢—2歳10ヶ月（平均1歳10ヶ月）の健康ビーグル犬の頭蓋骨に1辺15mmの骨欠損を作製した。骨欠損部のCTデータをもとに、骨欠損部の形状に成形された $\alpha$ -TCPテーラーメイド人工骨を作製した。作製にはインクジェットプリンターを用いた3次元積層法を用いた。対照には市販のハイドロキシアパタイトブロック（HAブロック）を切削加工したものを用いた。 $\alpha$ -TCP人工骨とHAブロックを骨欠損部に移植し、術直後及び術後1週・2週・3週・4週・8週・12週・16週・20週・24週で一般健康状態・血液検査・骨欠損部のCT撮影を行った。また24週時に頭蓋骨を採取し人工骨の組織学的検討を行った。

（倫理面への配慮）

DNA組み換え実験、動物実験に関しては、各分担研究者の属する機関の組み換えDNA実験規則および、動物実験実施マニュアルに従って行った。

### C. 研究結果

#### (1) 運動器骨・軟骨欠損小動物モデル

このモデルでは、放射線学的には、6ヶ月経過しても明らかな治癒は認められなかった。

#### (2) 頭蓋骨欠損大動物モデル（イヌ）

イヌ頭蓋部骨欠損モデルにおいては、放射線学的には、6ヶ月経過しても治癒につながる明らかな骨形成は認められなかった。

#### (3) 軟骨欠損大動物モデル（イヌ）

⑤ このモデルでは、放射線学的には、6ヶ月経過しても明らかな治癒は認められなかった。

⑥ このモデルでは、半層欠損モデルではマウス、ラットともに2ヶ月経過すると自然治癒が認められるが、全層欠損モデルでは6ヶ月経過しても永久軟骨による修復ではなく、線維性基質による一部修復が観察されたが、欠損部の陥没は残存したままであった。

#### (4) $\alpha$ -TCPテーラーメイド人工骨の移植

術中合併症はなく、術後の健康状態・血液検査値に関しても大きな異常は認められなかった。CT撮影の結果、 $\alpha$ -TCP人工骨内孔の狭小化と周囲骨との架橋形成が認められ骨再

生を誘導していることが示唆された。組織学的検索から、 $\alpha$ -TCP人工骨内孔と周囲に骨様組織が誘導されていることが確認された。さらに $\alpha$ -TCP人工骨内部に骨髓腔の形成が認められた。

### D. 考察

#### 骨軟骨欠損動物モデル

モデルによっては完全な不可逆性欠損でないことがあるので、観察期間やコントロールに注意する必要がある。臨界骨欠損モデルでは、確実に自然骨修復はないものと思われるが、軟骨欠損モデルでは膝関節の軟骨の厚みがマウスでは約0.2-0.3 mm、ラットでは約0.3-0.4 mmと薄いので一定の厚みで半層軟骨欠損を作製するためには器具の開発や改善が不可欠であった。しかし、全層軟骨欠損は約1 mmの厚みを持つ歯科用バーを用いることによって定量的な軟骨削除を作製することができた。小動物モデルにおいては3ヶ月、大動物モデルにおいては6ヶ月という期間内であれば、再生実験の際の臨界骨・軟骨欠損モデルとして使用可能であると考えられた。

#### $\alpha$ -TCPテーラーメイド人工骨の移植

大動物骨欠損モデルにおいて、 $\alpha$ -TCPテーラーメイド人工骨の安全性と有効性が示唆されたが、自家骨への置換は完全ではなかった。安全性と併せて、さらに長期にわたる経過の観察が必要であると考えられる。

### E. 結論

運動器骨・軟骨欠損小動物モデル（マウス、ラット）を作成し、長期自然経過を明らかにした。また、大動物頭蓋骨・関節軟骨欠損モデルの長期の自然経過を明らかにし、実験を行う場合の至適条件を明らかにした。さらに大動物臨界骨欠損モデルにおいて、3次元積層法にて作製した $\alpha$ -TCPテーラーメイド人工骨の安全性と有効性が確認され、基礎データを収集した。

### F. 健康危険情報

主任研究者が一括して報告。

### G. 研究発表

1. 論文発表

1. Ohba S, Ikeda T, Kugimiya F, Yano F, Lichtler AC, Nakamura K, Takato T, Kawaguchi H, Chung UI. Identification of a potent combination of osteogenic genes for bone regeneration using embryonic stem (ES) cell-based sensor. *FASEB J* in press,2007
2. Kawaguchi H, Jingushi S, Izumi T, Fukunaga M, Matsushita T, Nakamura T, Mizuno K, Nakamura T, Nakamura K. Local application of recombinant human fibroblast growth factor-2 on bone repair: A dose-escalation prospective trial on patients with osteotomy. *J Orthop Res*. 2007 Jan 4;25(4):480-487
3. Igawa K, Mochizuki M, Sugimori O, Shimizu K, Yamazawa K, Kawaguchi H, Nakamura K, Takato T, Nishimura R, Suzuki S, Anzai M, Chung UI, Sasaki N. Tailor-made tricalcium phosphate bone implant directly fabricated by a three-dimensional ink-jet printer. *J Artif Organs*. 2006;9(4):234-40.
4. Kono SJ, Oshima Y, Hoshi K, Bonewald LF, Oda H, Nakamura K, Kawaguchi H, Tanaka S. Erk pathways negatively regulate matrix mineralization. *Bone*. 2007 Jan;40(1):68-74.
5. Kamekura S, Kawasaki Y, Hoshi K, Shimoaka T, Chikuda H, Maruyama Z, Komori T, Sato S, Takeda S, Karsenty G, Nakamura K, Chung UI, Kawaguchi H. Contribution of runt-related transcription factor 2 to the pathogenesis of osteoarthritis in mice after induction of knee joint instability. *Arthritis Rheum*. 2006 Aug;54(8):2462-70.
6. Oka H, Yoshimura N, Kinoshita H, Saiga A, Kawaguchi H, Nakamura K. Decreased activities of daily living and associations with bone loss among aged residents in a rural Japanese community: the Miyama Study. *J Bone Miner Metab*. 2006;24(4):307-13.
7. Sakanishi H, Hoshi K, Nakajima S, Akune T, Takeshita K, Yamamoto M, Kawaguchi H, Nakamura K, Seichi A. Vertebral hemangioma compressing the thoracic spinal cord: application of computer-aided navigation and intraoperative spinal sonography for surgery through anterior and posterior approaches. *J Orthop Sci*. 2006 May;11(3):294-7.
8. Seichi A, Takeshita K, Kawaguchi H, Matsudaira K, Higashikawa A, Ogata N, Nakamura K. Neurologic level diagnosis of cervical stenotic myelopathy. *Spine*. 2006 May 20;31(12):1338-43.
9. Yamada T, Kawano H, Koshizuka Y, Fukuda T, Yoshimura K, Kamekura S, Saito T, Ikeda T, Kawasaki Y, Azuma Y, Ikegawa S, Hoshi K, Chung UI, Nakamura K, Kato S, Kawaguchi H. Carminerin contributes to chondrocyte calcification during endochondral ossification. *Nat Med*. 2006 Jun;12(6):665-70.
10. Yoshimura N, Kinoshita H, Hori N, Nishioka T, Ryujin M, Mantani Y, Miyake M, Takeshita T, Ichinose M, Yoshiida M, Oka H, Kawaguchi H, Nakamura K, Cooper C. Risk factors for knee osteoarthritis in Japanese men: a case-control study. *Mod Rheumatol*. 2006;16(1):24-9.
11. Horikoshi T, Maeda K, Kawaguchi Y, Chiba K, Mori K, Koshizuka Y, Hirabayashi S, Sugimori K, Matsumoto M, Kawaguchi H, Takahashi M, Inoue H, Kimura T, Matsusue Y, Inoue I, Baba H, Nakamura K, Ikegawa S. A large-scale genetic association study of ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine. *Hum Genet*. 2006 Jul;119(6):611-6.
12. Shinoda Y, Yamaguchi M, Ogata N, Akune T, Kubota N, Yamauchi T, Terauchi Y, Kadowaki T, Takeuchi Y, Fukumoto S, Ikeda T, Hoshi K, Chung UI, Nakamura K, Kawaguchi H. Regulation of bone formation by adiponectin through autocrine/paracrine and endocrine pathways. *J Cell Biochem*. 2006 Sep 1;99(1):196-208.

13. Yamaoka H, Asato H, Ogasawara T, Nishizawa S, Takahashi T, Nakatsuka T, Koshima I, Nakamura K, Kawaguchi H, Chung UI, Takato T, Hoshi K. Cartilage tissue engineering using human auricular chondrocytes embedded in different hydrogel materials. *J Biomed Mater Res A*. 2006 Jul;78(1):1-11.
  14. Kugimiya F, Ohba S, Nakamura K, Kawaguchi H, Chung UI. Physiological role of bone morphogenetic proteins in osteogenesis. *J Bone Miner Metab*. 2006;24(2):95-9.
  15. Katagiri M, Ogasawara T, Hoshi K, Chikazu D, Kimoto A, Noguchi M, Sasamata M, Harada S, Akama H, Tazaki H, Chung UI, Takato T, Nakamura K, Kawaguchi H. Suppression of adjuvant-induced arthritic bone destruction by cyclooxygenase-2 selective agents with and without inhibitory potency against carbonic anhydrase II. *J Bone Miner Res*. 2006 Feb;21(2):219-27.
2. 学会発表
1. 山口雅之、篠田裕介、亀倉暁、緒方直史、中村耕三、川口浩：副甲状腺ホルモン（PTH 1-34）の骨同化作用における IGF-I/IRS-1 シグナルの関与（優秀ポスター受賞）. 第 22 回日本骨代謝学会. 2004. 8. 4-7 (大阪国際会議場、大阪).
  2. 川口浩、阿久根徹、緒方直史、下赤隆、星和人、鄭雄一、中村耕三：インスリン受容体基質（IRS）シグナルによる骨代謝調節と骨再生医療への応用. 第 19 回日本整形外科学会基礎学術集会（シンポジウム：基礎の成果を臨床に：萌芽的最先端医療 - 運動器の再生医療 -）. 2004. 10.21-22 (新高輪プリンスホテル、東京).
  3. 亀倉暁、星和人、下赤隆、筑田博隆、鄭雄一、小守壽文、中村耕三、川口浩：Runx2 による関節軟骨細胞の病的肥大化が変形性関節症の発症に重要である - 新規 OA 誘発モデルを用いた Runx2 ヘテロ欠損マウスの解析 -. 第 18 回日本軟骨代謝学会. 2005. 3.18-19 (大阪千里ライフサイエ
  - ンスセンター、大阪).
  4. 瀬戸宏明、亀倉暁、三浦俊樹、山本愛一郎、筑田博隆、緒方徹、平岡久忠、織田弘美、中村耕三、黒沢尚、鄭雄一、川口浩、田中栄：滑膜線維芽細胞での軟骨特異的遺伝子発現における Smad pathway と p38 pathway の役割について. 第 18 回日本軟骨代謝学会. 2005. 3.18-19 (大阪千里ライフサイエンスセンター、大阪).
  5. 茂呂徹、高取吉雄、中村耕三、川口浩：関節摺動面の MPC ポリマー処理は人工股関節の弛みを抑制する - 耐摩耗性と生体適合性に優れた新規人工股関節の開発 -. 第 49 回日本リウマチ学会総会・学術集会. 2005. 4.17-20 (パシフィコ横浜、神奈川).
  6. 山田高嗣、河野博隆、亀倉暁、腰塚裕、中村耕三、加藤茂明、川口浩：軟骨特異的遺伝子 Cystatin 10 は軟骨細胞の石灰化を介して変形性関節症・異所性石灰化に関与している. 第 49 回日本リウマチ学会総会・学術集会. 2005. 4.17-20 (パシフィコ横浜、神奈川).
  7. 河野博隆、佐藤隆史、山田高嗣、松本高広、中村耕三、川口浩、加藤茂明：男性ホルモンの骨量維持作用 - 男性ホルモン受容体遺伝子欠損マウスの解析 -. 第 78 回日本整形外科学会学術集会. 2005. 5.12-15 (パシフィコ横浜、神奈川).
  8. 川口浩、河村直洋、阿久根徹、緒方直史、星和人、鄭雄一、窪田直人、山内敏正、寺内康夫、門脇孝、中村耕三：Insulin/IGF-I・IRS・Akt シグナルによる骨リモデリング調節（ミニシンポジウム「骨リモデリングの分子メカニズム」）. 第 23 回日本骨代謝学会. 2005. 7. 21-23 (大阪国際会議場、大阪).
  9. 川口浩、篠田裕介、山口雅之、阿久根徹、大庭伸介、緒方直史、鄭雄一、窪田直人、山内敏正、寺内康夫、門脇孝、中村耕三：脂質代謝調節分子による骨代謝制御（ミニシンポジウム「メタボリックシンドロームと骨」）. 第 23 回日本骨代謝学会. 2005. 7. 21-23 (大阪国際会議場、大阪).
  10. 川口浩、神宮司誠也、泉敏弘、福永仁夫、

- 松下隆、中村孝志、水野耕作、中村利孝、中村耕三：リコンビナントヒト線維芽細胞増殖因子-2 (rhFGF-2)の骨形成促進作用 -骨切り症例における前向き多施設臨床試験 - (優秀演題賞受賞) . 第23回日本骨代謝学会. 2005. 7. 21-23 (大阪国際会議場、大阪).
11. 河村直洋、釘宮典孝、大庭伸介、緒方直史、山口雅之、福田明、鈴木亮、戸邊一之、門脇孝、中村耕三、鄭雄一、川口浩：Akt1による生体内骨代謝調節作用とそのメカニズム (優秀演題賞受賞) . 第23回日本骨代謝学会. 2005. 7. 21-23 (大阪国際会議場、大阪).
  12. 大庭伸介、池田敏之、釘宮典孝、矢野文子、藤田隆司、小守壽文、小笠原徹、星和人、中村耕三、高戸毅、川口浩、鄭雄一：Runx2シグナルとBMPシグナルは協調的にCbfbを制御することによって骨芽細胞分化の最小かつ十分なシグナルユニットとして機能する (優秀演題賞受賞) . 第23回日本骨代謝学会. 2005. 7. 21-23 (大阪国際会議場、大阪).
  13. 丸山善治郎、豊澤悟、古市達哉、金谷直子、藤田隆司、中村耕三、川口浩、小守壽文：Osterixの骨芽細胞における過剰発現は、骨芽細胞の増殖を促進、成熟を抑制し、著明な骨減少を引き起こす (優秀演題賞受賞) . 第23回日本骨代謝学会. 2005. 7. 21-23 (大阪国際会議場、大阪).
  14. 星和人、劉光耀、小笠原徹、浅輪幸世、鄭雄一、高戸毅、中村耕三、川口浩：甲状腺ホルモン (T3) は、BMP-2 およびinsulin と協調し、脱分化型軟骨細胞の理想的な再分化を実現する. 第23回日本骨代謝学会. 2005. 7. 21-23 (大阪国際会議場、大阪).
  15. 篠田裕介、山口雅之、緒方直史、阿久根徹、中村耕三、川口浩：Adiponectinのautocrine/paracrineおよびendocrine作用による骨代謝調節 (優秀ポスター賞受賞) . 第20回日本整形外科学会基礎学術集会. 2005.10.20-21 (三重県営サンアリーナ、三重).
  16. 山川聖史、亀倉暁、村上誠、工藤一郎、植松智、審良静男、中村耕三、川口浩：膜型プロスタグランジン E2 合成酵素-1 (mPGES-1)の骨折治癒および変形性関節症への関与. 第19回日本軟骨代謝学会. 2006. 3.3-4 (はまぎんホールヴィアマーレ、横浜).
  17. 筑田博隆、釘宮典孝、星和人、池田敏之、小笠原徹、河野博隆、亀倉暁、土田温子、横井伯英、中村耕三、米田嘉重郎、鄭雄一、川口浩：低身長ラットKMIの原因遺伝子cGMP-dependent protein kinase II (cGKII)はSox9の核内移行を抑制し、軟骨細胞の肥大分化への分子スイッチとして働く. 第19回日本軟骨代謝学会. 2006. 3.3-4 (はまぎんホールヴィアマーレ、横浜).
  18. Satoru Kamekura, Kazuto Hoshi, Takashi Shimoaka, Hirotaka Chikuda, Ung-il Chung, Zenjiro Maruyama, Toshihisa Komori, Kozo Nakamura, and Hiroshi Kawaguchi: Runx2 contributes to pathogenesis of osteoarthritis through chondrocyte hypertrophy and matrix breakdown in articular cartilage under mechanical stress (Young Investigator Award). 26th annual meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. 2004. 10.1-5 (Seattle, Washington, USA).
  19. Fumitaka Kugimiya, Hirotaka Chikuda, Kazuto Hoshi, Toshiyuki Ikeda, Toru Ogasawara, Satoru Kamekura, Kozo Nakamura, Kajuro Komeda, Ung-il Chung, and Hiroshi Kawaguchi: Cyclic GMP-dependent protein kinase II is a molecular switch from proliferation to hypertrophic differentiation of chondrocytes through attenuation of Sox9 function (Young Investigator Award). 26th annual meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. 2004. 10.1-5 (Seattle, Washington, USA).
  20. Masayuki Yamaguchi, Yusuke Shinoda, Satoru Kamekura, Naoshi Ogata, Takashi Kadowaki, Yasuo Terauchi, Kozo Nakamura, and Hiroshi Kawaguchi: Insulin receptor

substrate-1 (IRS-1) is essential for bone anabolic function of parathyroid hormone (1-34). 26th annual meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. 2004. 10.1-5 (Seattle, Washington, USA).

21. Kawamura N, Kugimiya F, Suzuki R, Tobe K, Kadowaki T, Nakamura K, Chung UI, Kawaguchi H: Akt1 in osteoblasts and osteoclasts contributes to the maintenance of bone mass and turnover (Young Investigator Award). 27th annual meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. 2005. 9.23-27 (Nashville, Tennessee, USA).
22. Saito T, Ikeda T, Nakamura K, Chung U, Kawaguchi H: S100A1 and S100B, transcriptional target molecules of SOX5, SOX6 and SOX9 (the SOX trio), inhibit hypertrophic differentiation and calcification of chondrocytes (Young Investigator Award). 27th annual meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. 2005. 9.23-27 (Nashville, Tennessee, USA).
23. Kawasaki, F. Kugimiya, H. Chikuda, T. Ikeda, T. Saito, F. Yano, K. Nakamura, U. Chung, H. Kawaguchi: cGKII Controls Hypertrophic Differentiation of Chondrocytes through Phosphorylation and Inactivation of GSK-3 $\beta$ . (Young Investigator Award) 28th annual meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. 2006. 9.15-19 (Philadelphia, Pennsylvania, USA).

#### H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

##### 1. 特許取得

- 組織癒着・関節拘縮防止材 特願  
2005-243984

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム再生医療等研究事業）  
分担研究報告書

骨軟骨欠損モデルの作製とin vivo骨・軟骨再生法の開発②

分担研究者 高戸 毅 東京大学大学院医学系研究科・口腔外科 教授

研究要旨

頭蓋・顎顔面領域における骨・軟骨欠損モデルの確立を目指した。マウス・ラットにおける頭蓋顎顔面部骨・軟骨欠損小動物モデルとイヌ頭蓋骨欠損モデルの自然経過と、移植実験を行う際の至適条件を明らかにした。

A. 研究目的

頭蓋・顎顔面領域における骨・軟骨欠損モデルの確立を目指した。まず、マウスとラットに骨・軟骨欠損モデルを作成し、その自然経過を追うこととした。これら小動物の基礎データをもとに、臨床応用を視野に入れた大動物（イヌ）臨界骨・軟骨欠損モデルの確立を目指した。イヌに骨・軟骨欠損モデルを作製し、その自然経過を追うことで実験を行う場合の至適条件を明らかにすることを試みた。

B. 研究方法

(1) 頭蓋顎顔面部骨・軟骨欠損小動物モデル

マウスおよびラットの頭蓋・顎顔面領域に臨界骨・軟骨欠損を作製し、放射線学的（X線写真、CT）に1、2、3週間、1、2、3、4、5、6ヶ月とフォローした。

- ① 臨界骨欠損モデルでは、マウス及びラットの頭頂骨に4-5mmの骨欠損を作製した。
- ② 臨界軟骨欠損モデルでは、マウス及びラット耳介軟骨の中央部3分の1を切除した。

(2) 頭蓋骨欠損大動物モデル（イヌ）

11ヶ月齢—2歳10ヶ月（平均1歳10ヶ月）の健康ビーグル犬の頭蓋骨に1辺15 mmの骨欠損を作製した。術後1週・2週・3週・4週・8週・12週・16週・20週・24週で骨欠損部のCT撮影を行った。

（倫理面への配慮）

DNA組み換え実験、動物実験に関しては、各

分担研究者の属する機関の組み換えDNA実験規則および、動物実験実施マニュアルに従って行った。

C. 研究結果

(1) 頭蓋顎顔面部骨・軟骨欠損小動物モデル

放射線学的には、術後3ヶ月程度までは自然治癒がなかったが、それ以降若干の骨形成が辺縁から起こることが観察された。

(2) 頭蓋骨欠損大動物モデル（イヌ）

イヌ頭蓋部骨欠損モデルにおいては、放射線学的には、6ヶ月経過しても治癒につながる明らかな骨形成は認められなかった。

D. 考察

モデルによっては完全な不可逆性欠損でないことがあるので、観察期間やコントロールに注意する必要がある。小動物モデルにおいては3ヶ月、大動物モデルにおいては6ヶ月という期間内であれば、再生実験の際の臨界骨・軟骨欠損モデルとして使用可能であると考えられた。

E. 結論

頭蓋顎顔面部骨・軟骨欠損小動物モデル、および頭蓋骨欠損大動物モデルの長期の自然経過を明らかにし、実験を行う場合の至適条件を明らかにした。

F. 健康危険情報