

Figure 2. Establishment of MDA-MB-231 overexpressing cadherin-11. (A) Expression of the intact (upper) and the variant (lower) forms of cadherin-11 in MDA/Pa, MDA/Cad11 and MDA/Var. (B) Attachment of the MDA-MB-231 clones to NIH3T3-3 or MC3T3-E1 cells. Expression of cadherin-11 in NIH3T3-3 (NIH) and MC3T3-E1 (MC3T3) is shown in the inset. Data are expressed as number of cancer cells adhered. Data are mean \pm SE (n=4/group). *Significantly different from MDA/Pa adhered to MC3T3-E1 cells ($p < 0.05$).

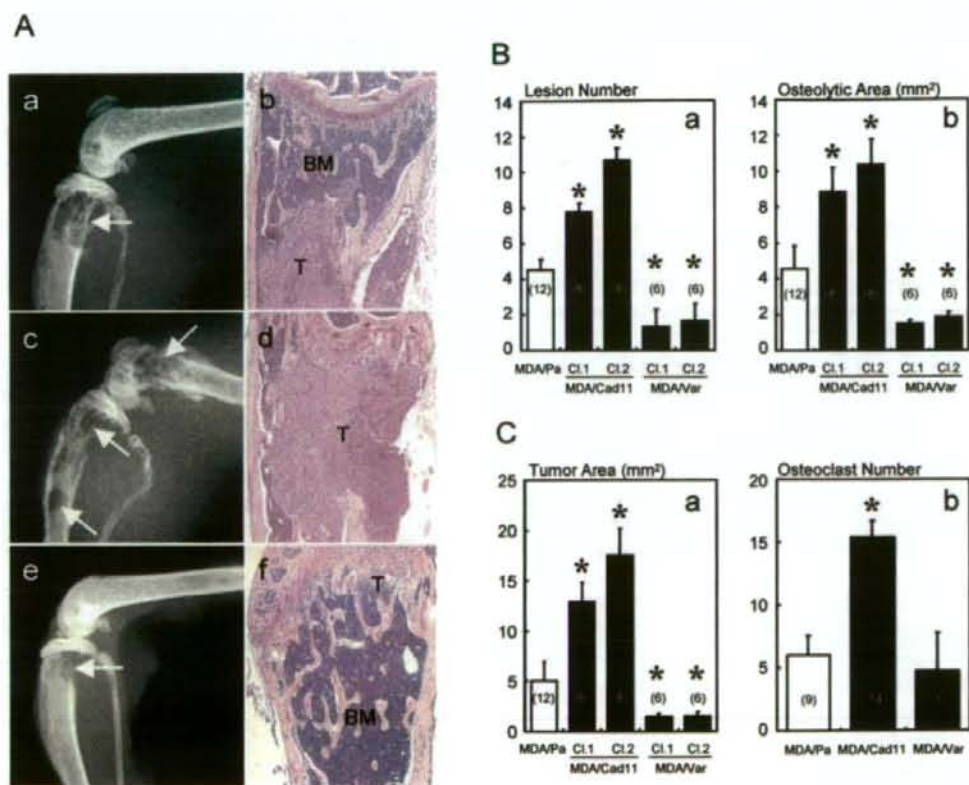


Figure 3. Bone metastases of MDA-MB-231 overexpressing cadherin-11. (A) Representative radiological and histological view of bone metastases of MDA/Pa (a and b), MDA/Cad11 (c and d) and MDA/Var (e and f) in the hindlimbs at day 28. Arrows indicate osteolytic lesions. Histological sections were stained with H&E. (T, tumor; BM, bone marrow; original magnification $\times 50$). (B) Radiographical analysis of the number (a) and the area (b) of osteolytic lesions of MDA/Pa, MDA/Cad11 and MDA/Var. Two clones (Cl.1 and 2) of MDA/Cad11 and MDA/Var were tested in this study. Data are expressed as number or area (mm²) of osteolytic lesions per mouse. Numbers in parentheses indicate the number of mice studied (combination of two separate experiments). Data are mean \pm SE. *Significantly different from MDA/Pa ($p < 0.05$). (C) Histomorphometrical examination of tumor burden and osteoclast number in bone metastases of MDA/Pa, MDA/Cad11 and MDA/Var. Data are expressed as tumor area (mm²) per mouse (a) or osteoclast number per mm tumor-bone interface (b). Numbers in parentheses indicate the number of mice studied (combination of two separate experiments). Data are mean \pm SE. *Significantly different from MDA/Pa ($p < 0.05$).

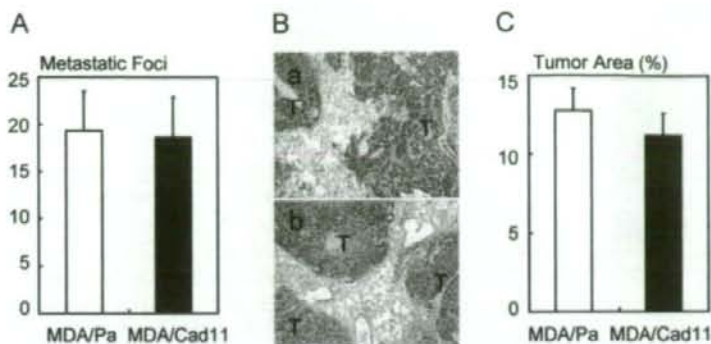


Figure 4. Lung metastases of MDA-MB-231 cells overexpressing cadherin-11. (A and C) The number (A) and the area (C) of metastases in lung were determined as described in Materials and methods. Data are expressed as number of metastatic foci per mouse (A) or tumor area (%) (C). Data are shown as mean \pm SE (n=8/group). (B) Representative histological view of lung metastases of MDA/Pa (a) and MDA/Cad11. (H&E staining; T, tumor; original magnification x100).

Effects of cadherin-11 overexpression on bone metastases.

To examine the role of cadherin-11 in the development of bone metastases, we established MDA-MB-231 cells stably transfected with the intact and the variant forms of cadherin-11 cDNA (MDA/Cad11 and MDA/Var, respectively) (Fig. 2A). Cell proliferation of these transfectants in monolayer cultures was not different from MDA/Pa (data not shown). Cell dissociation assay that indicates the Ca^{2+} -dependent cell adhesion ability showed that MDA/Cad11 acquired higher adhesiveness than MDA/Pa and MDA/Var (data not shown). Furthermore, MDA/Cad11 showed increased attachment to the monolayer of MC3T3-E1 cells that inherently expressed cadherin-11 (11) compared with MDA/Pa and MDA/Var (Fig. 2B), whereas there were no differences in the attachment to the monolayer of cadherin-11-negative NIH3T3-3 cells among MDA/Pa, MDA/Cad11 and MDA/Var (Fig. 2B). These results suggest that the wild-type and variant cadherin-11 introduced in MDA/Pa cells were biologically functional as we expected. We then examined the capacity of these transfectants to develop bone metastases following intracardiac inoculation into female nude mice. Radiographical analyses demonstrated that the number and size of osteolytic lesions were significantly increased in MDA/Cad11 compared to MDA/Pa (Fig. 3A and B). In contrast, MDA/Var developed reduced osteolytic bone metastases (Fig. 3A and B). Histological examination also showed that the metastatic tumor burden in bone was increased in MDA/Cad11, while it was significantly decreased in MDA/Var (Fig. 3A and C). The number of TRAP-positive osteoclasts at tumor-bone interface was significantly increased in the bone metastases of MDA/Cad11 compared with MDA/Pa and MDA/Var (Fig. 3C).

Role of cadherin-11 in lung metastases. To study the role of cadherin-11 in metastasis to non-bone sites, we examined lung metastases of MDA/Cad11 by tail vein inoculation. Macroscopic and histological examinations showed that the number of metastatic foci and the tumor burden in lung was not changed in MDA/Cad11 compared with MDA/Pa (Fig. 4). These results suggest that cadherin-11 selectively promotes bone metastases.

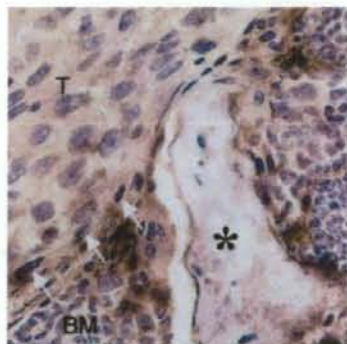


Figure 5. Immunohistochemical examinations of bone metastases of MDA/Cad11 at day 28. Cadherin-11-positive tumor cells (T) are in direct contact with cadherin-11-positive bone marrow stromal cells (arrows). (BM, bone marrow; asterisk, bone; original magnification x400).

MDA/Cad11 cell arrest in bone marrow. Immunohistochemical examination revealed that MDA/Cad11 cells were in direct contact with cadherin-11-positive spindle-shaped stromal cells in bone (Fig. 5), showing that metastatic MDA/Cad11 cells establish a homophilic cell-cell interactions with residing bone marrow stromal cells.

To determine the mechanism by which cadherin-11 selectively increased bone metastases, we examined whether cadherin-11 increases cancer cell arrest in bone marrow *in vivo*. To approach this, fluorescent dye-labeled MDA/Pa, MDA/Cad11 and MDA/Var cells were inoculated into the heart and the number of arrested cells in bone marrow was counted by FACS 48 h later. The number of MDA/Cad11 arrested in bone marrow was significantly greater than MDA/Pa (Fig. 6). In contrast, the arrest of MDA/Var was significantly decreased (Fig. 6).

Effects of cadherin-11 on cell migration. We next examined the effects of cadherin-11 on cell migration using transwell chambers as described in Materials and methods (18). Migration of MDA/Cad11 cells was significantly stimulated when cultured with MC3T3-E1 cells that expressed

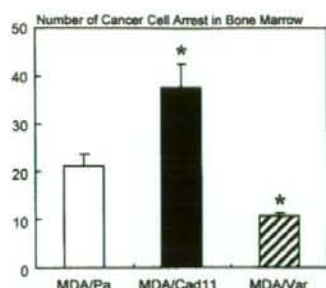


Figure 6. Early stage colonization of the MDA-MB-231 clones in bone marrow. Forty-eight hours after the intracardiac injection, the number of cancer cells arrested in bone marrow was determined by FACS as described in Materials and methods. Data are expressed as number of cancer cells arrested in bone per mouse. Data are mean \pm SE (n=10/group). *Significantly different from MDA/Pa ($p < 0.05$).

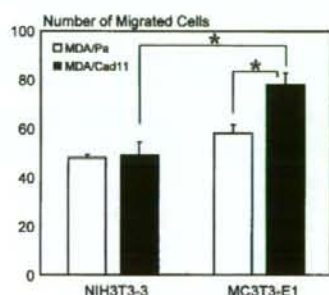


Figure 7. Effects of cadherin-11 on cell migration. MDA/Pa and MDA/Cad11 cells were labeled with fluorescent dye and the number of cells migrated to the opposite side of the membranes was counted. Data are expressed as migrated cell number per mm² membrane area. Data are mean \pm SE (n=4/group). *Significantly different ($p < 0.05$).

cadherin-11 (Fig. 7). In contrast, there was no significant difference in the number of migrated cells between MDA/Pa and MDA/Cad11 cultured with NIH3T3-3 cells that did not express cadherin-11 (Fig. 7).

Effects of cadherin-11-mediated cell adhesion on osteoclast formation. To determine the mechanism of increased osteoclast number in the bone metastases of MDA/Cad11 (Fig. 3C), we examined the production of osteoclast-stimulating factors in the MDA-MB-231 clones as a consequence of the homophilic interactions with bone marrow stromal/osteoblastic cells via cadherin-11. Semi-quantitative RT-PCR analysis demonstrated that mRNA expression of PTH-rP, a major osteoclastogenic factor produced by MDA-MB-231 cells (19), was up-regulated in the co-cultures of MDA/Cad11 and MC3T3-E1 cells but not of MDA/Cad11 and NIH3T3-3 cells (Fig. 8A). Since we used human-specific primers in these experiments, the results shown represent PTH-rP mRNA expression in the MDA-MB-231 clones of human origin. There was no up-regulation of PTH-rP mRNA expression in the co-cultures of MDA/Pa or MDA/Var and MC3T3-E1 (Fig. 8A).

The CM from the co-cultures of MDA/Cad11 and MC3T3-E1 markedly increased TRAP-positive osteoclast-like cell formation (Fig. 8B). This stimulatory effect was blocked by a neutralizing antibody to PTH-rP (Fig. 8B). The CM harvested from the co-cultures of other combinations also showed stimulatory effects presumably due to intrinsic PTH-rP production by MDA-MB-231 cells but to a significantly lesser extent (Fig. 8B).

Discussion

Cancer metastasizes to distant organs with distinct organ preference (1-3). Since Paget proposed 'Seed and Soil'

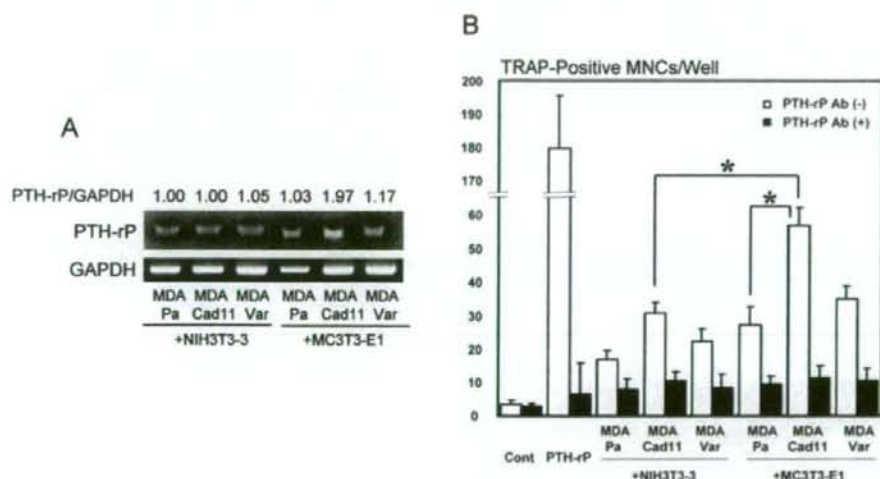


Figure 8. Production of osteoclastogenic activity in the co-cultures of the MDA-MB-231 clones with osteoblastic cells. (A) Semi-quantitative RT-PCR analysis of PTH-rP mRNA expression in the co-cultures of MDA-MB-231 clones with NIH3T3-3 or MC3T3-E1 cells. Since the primer sets used in this study are human specific, the data shown here indicate mRNA expression of human PTH-rP and GAPDH in MDA/Pa, MDA/Cad11 or MDA/Var that are of human origin. Quantification of amplified mRNA was done as described in Materials and methods and indicated as fold induction to the control and normalized to GAPDH. (B) Osteoclast-like cell formation in mouse bone marrow cells cultured with the CM obtained from the co-cultures of MDA/Pa, MDA/Cad11 or MDA/Var and MC3T3-E1 or NIH3T3-3 cells in the absence (open bar) or presence (closed bar) of a neutralizing antibody to human PTH-rP. Data are expressed as number of TRAP-positive multinucleated cells (MNCs) per well per 48-well plate. Data are mean \pm SE (n=4/group). *Significantly different ($p < 0.05$).

theory more than a century ago (20), the interactions between metastatic tumor cells and host environment have been implicated in organ-selective metastasis. Recent studies using microarray analyses of the bone- (21) and lung-seeking clones (22) of MDA-MB-231 cells demonstrated that the gene expression profile of these clones was distinct from the parental cells. Identification of these signatures of bone and lung metastases has increased our understanding of the mechanism underlying organ-selective metastasis of breast cancer. However, key molecules responsible for organ-selective metastasis still need to be elucidated.

Interactions of cancer cells with organ environments mediated by CAMs have been thought to contribute to organ preferential metastasis (4-6). Cadherins have been implicated in cancer invasion and metastasis (9,10). We previously reported that the classical type 1 cadherin family member E-cadherin inhibited breast cancer metastasis to bone in a well-characterized animal model of bone metastasis (23). Consistent with our results, E-cadherin has been shown to be a tumor suppressor (9,10). In contrast, cadherin-11 has been proposed to be a tumor promoter (12,24). Earlier studies showed that aggressive human breast tumor cells express elevated levels of cadherin-11 (12). Along this line, it is notable that stromal and osteoblastic cells in bone marrow inherently express cadherin-11 as well (11). These observations collectively led us to hypothesize that cadherin-11 is involved in the preferential metastasis of breast cancer cells to bone via homophilic interactions with resident bone marrow stromal/osteoblastic cells.

In the present study, we showed that the cadherin-11 expression in the bone-seeking clone of MDA-MB-231 cells (15) was markedly increased compared to the parental and the brain-seeking clone, suggesting an involvement of cadherin-11 in the bone-seeking nature of breast cancer. This notion is supported by the finding that the introduction of the intact form of cadherin-11 enhanced the development of bone metastases of MDA-MB-231 cells. Importantly, however, cadherin-11 overexpression in MDA-MB-231 cells did not change the metastasis to lung. These results suggest that cadherin-11 specifically promotes bone metastases of breast cancer.

Of note, overexpression of the variant form of cadherin-11 reduced the cell adhesion and the development of bone metastases. It has been reported that the splice variant of cadherin-11 shows no homophilic cell-cell adhesion property. However, it has not been defined whether this variant form acts to inhibit the function of intact cadherin-11. Kashima *et al* suggested that the secreted form of cadherin-11, which is derived from the intact form by proteinase cleavage, impedes the function of the intact form in osteosarcoma cells (14). Our results show that the variant form suppresses bone metastases. These results are consistent with the notion that the establishment of homophilic interaction between metastatic cancer cells and bone marrow stromal cells via cadherin-11 is critical to the development of bone metastases.

Cancer cell arrest in target organs is a critical step for the initiation of metastases (2). Our experiments using FACS analysis of the fluorescent dye-labeled MDA-MB-231 cells showed that the early settlement of cancer cells following heart inoculation was significantly increased in MDA/Cad11

compared with MDA/Pa. Furthermore, MDA/Var displayed significantly less arrest than MDA/Pa. These results suggest that cadherin-11 plays an important role in the initial colonization of breast cancer cells in bone marrow via promoting the homophilic cell-cell interactions with resident stromal/osteoblastic cells. Increased cancer cell arrest in bone marrow consequently leads to increased bone metastases.

Directed cell migration is also crucial for cancer cells to metastasize to distant organs. It has been shown that N-cadherin increases cell migration and metastases (25). Our study using the Boyden chamber assay showed that the directed cell migration of MDA/Cad11 was promoted when they interacted with cadherin-11-expressing MC3T3-E1 cells, whereas the interactions with non-cadherin-11-expressing NIH3T3-3 cells did not stimulate MDA/Cad11 migration. These results suggest that cadherin-11 also plays a critical role in directed migration of breast cancer cells through the homophilic cell-cell interactions.

The establishment of distant metastases in target organs requires not only migration and homing of cancer cells but also successful proliferation and survival in the local environment (2,3). A key essential event for metastatic cancer cells to colonize bone is osteoclastic bone resorption. Bone resorption releases a variety of bone-stored growth factors such as IGFs and TGF β into the bone micro-environment, which in turn promotes cancer cell proliferation, survival and metabolism (2,3,26). In this context, it should be noted that our histological examination demonstrated that osteoclastic bone resorption was significantly increased in the bone metastases of MDA/Cad11 compared to MDA/Pa and MDA/Var. Consistent with these results, the co-cultures of MDA/Cad11 and MC3T3-E1, both of which express cadherin-11, increased the mRNA expression of PTH-rP, a well-described potent osteoclastogenic cytokine, in MDA/Cad11 cells. Furthermore, the CM harvested from the co-cultures of MDA/Cad11 and MC3T3-E1 stimulated TRAP-positive osteoclast-like cell formation in mouse bone marrow cultures and this stimulatory effect was blocked by a neutralizing antibody to human PTH-rP. These results suggest that the contact with cadherin-11 expressed in bone marrow stromal/osteoblastic cells stimulates the production of PTH-rP by MDA/Cad11, leading to increased osteoclastic bone destruction and bone metastases. Although the mechanism by which the homophilic cell-cell interactions via cadherin-11 increase PTH-rP production in breast cancer cells is currently unknown, we have previously shown that the cell-cell contact between bone marrow stromal cells and myeloma cells via vascular cell adhesion molecule 1 and $\alpha 4\beta 1$ integrin also enhanced the production of osteoclast-stimulating activity (27). The activation of cadherin signaling pathways likely plays a role in the up-regulation of PTH-rP production in MDA-MB-231 cells (28).

In conclusion, our results suggest that the expression of cadherin-11 in breast cancer cells promotes homing, directed cell migration and osteoclastogenesis via homophilic interactions with cadherin-11 expressed in resident bone marrow stromal/osteoblastic cells and thereby stimulates colonization of breast cancer cells in bone, resulting in an enhancement of bone-selective metastases. Thus, cadherin-11 is, at least in part, responsible for the preferential spread of breast cancer

cells to bone. The results also suggest that cadherin-11 is a potential therapeutic molecular target for specific and effective prevention and treatment of bone metastases.

Acknowledgements

The authors are grateful to Dr Akira Kudo (Tokyo Institute of Technology, Kanagawa, Japan) for providing an intact and a variant form of cadherin-11 cDNA. This work was supported in part by Grants-in-aid 14771020, 16791123, 18592031 (T.H.), 12137205 and 21st century C.O.E. program (T.Y.) from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, Senri Life Science Foundation Research Grant (T.H.), Osaka Cancer Society Research Grant (T.H.), and Research Grant from Sagawa Foundation for Promotion of Cancer Research (T.H.).

References

- Coleman RE: Skeletal complications of malignancy. *Cancer* 80: 1588-1594, 1997.
- Mundy GR: Metastasis to bone: causes, consequences and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer* 2: 584-593, 2002.
- Yoneda T and Hiraga T: Crosstalk between cancer cells and bone microenvironment in bone metastasis. *Biochem Biophys Res Commun* 328: 679-687, 2005.
- Dimitroff CJ, Lechpammer M, Long-Woodward D and Kutok JL: Rolling of human bone-metastatic prostate tumor cells on human bone marrow endothelium under shear flow is mediated by E-selectin. *Cancer Res* 64: 5261-5269, 2004.
- Driffin JE, McFarlane S, Hill A, Johnston PG and Waugh DJ: CD44 potentiates the adherence of metastatic prostate and breast cancer cells to bone marrow endothelial cells. *Cancer Res* 64: 5702-5711, 2004.
- Zao Y, Bachelier R, Treilleux P, Peyruchaud O, Baron R, Clement-Lacroix P and Clezardin P: Tumor $\alpha v \beta 3$ integrin is a therapeutic target for breast cancer bone metastases. *Cancer Res* 67: 5821-5830, 2007.
- Yagi T and Takeichi M: Cadherin superfamily genes: functions, genomic organization, and neurologic diversity. *Genes Dev* 14: 1169-1180, 2000.
- Angst BD, Marozzi C and Magee AI: The cadherin superfamily: diversity in form and function. *J Cell Sci* 114: 629-641, 2001.
- Oka H, Shiozaki H, Kobayashi K, Inoue M, Tahara H, Kobayashi T, Takatsuka Y, Matsuyoshi N, Hirano S, Takeichi M and Mori T: Expression of E-cadherin cell adhesion molecules in human breast cancer tissues and its relationship to metastasis. *Cancer Res* 53: 1696-1701, 1993.
- Jiang WG and Mansel RE: E-cadherin complex and its abnormalities in human breast cancer. *Surg Oncol* 9: 151-171, 2000.
- Okazaki M, Takeshita S, Kawai S, Kikuno R, Tsujimura A, Kudo A and Amann E: Molecular cloning and characterization of OB-cadherin, a new member of cadherin family expressed in osteoblasts. *J Biol Chem* 269: 12092-12098, 1994.
- Pishvaian MJ, Feltes CM, Thompson P, Bussemakers MJ, Schalken JA and Byers SW: Cadherin-11 is expressed in invasive breast cancer cell lines. *Cancer Res* 59: 947-952, 1999.
- Kawaguchi J, Takeshita S, Kashima T, Imai T, Machinami R and Kudo A: Expression and function of the splice variant of the human cadherin-11 gene in subordination to intact cadherin-11. *J Bone Miner Res* 14: 764-775, 1999.
- Kashima T, Kawaguchi J, Takeshita S, Kuroda M, Takahashi M, Horiuchi H, Imamura T, Ishikawa Y, Ishida T, Mori S, Machinami R and Kudo A: Anomalous cadherin expression in osteosarcoma. Possible relationship to metastasis and morphogenesis. *Am J Pathol* 155: 1549-1555, 1999.
- Yoneda T, Williams PJ, Hiraga T, Niewolna M and Nishimura R: A bone-seeking clone exhibits different biological properties from the MDA-MB-231 parental human breast cancer cells and a brain-seeking clone *in vivo* and *in vitro*. *J Bone Miner Res* 16: 1486-1495, 2001.
- Hiraga T, Myoui A, Choi ME, Yoshikawa H and Yoneda T: Stimulation of cyclooxygenase-2 expression by bone-derived transforming growth factor β enhances bone metastases in breast cancer. *Cancer Res* 66: 2067-2073, 2006.
- Hiraga T, Williams PJ, Ueda A, Tamura D and Yoneda T: Zoledronic acid inhibits visceral metastases in the 4T1/luc mouse breast cancer model. *Clin Cancer Res* 10: 4559-4567, 2004.
- Goldberg GS, Moreno AP and Lampe PD: Gap junctions between cells expressing connexin 43 or 32 show inverse permselectivity to adenosine and ATP. *J Biol Chem* 277: 36725-36730, 2002.
- Guise TA, Yin JJ, Taylor SD, Kumagai Y, Dallas M, Boyce BF, Yoneda T and Mundy GR: Evidence for a causal role of parathyroid hormone-related protein in the pathogenesis of human breast cancer-mediated osteolysis. *J Clin Invest* 98: 1544-1549, 1996.
- Paget S: The distribution of secondary growths in cancer of the breast. *Lancet* 1: 571-573, 1889.
- Kang Y, Siegel PM, Shu W, Drobnjak M, Kakonen SM, Cordon-Cardo C, Guise TA and Massague J: A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone. *Cancer Cell* 3: 537-549, 2003.
- Minn AJ, Kang Y, Serganova I, Gupta GP, Giri DD, Doubrovin M, Ponomarev V, Gerald WL, Blasberg R and Massague J: Distinct organ-specific metastatic potential of individual breast cancer cells and primary tumors. *J Clin Invest* 115: 44-55, 2005.
- Mbalaviele G, Dunstan CR, Sasaki A, Williams PJ, Mundy GR and Yoneda T: E-cadherin expression in human breast cancer cells suppresses the development of osteolytic bone metastases in experimental metastasis model. *Cancer Res* 56: 4063-4070, 1996.
- Tomita K, van Bokhoven A, van Leenders GJ, Ruijter ET, Jansen CF, Bussemakers MJ and Schalken JA: Cadherin switching in human prostate cancer progression. *Cancer Res* 60: 3650-3654, 2000.
- Hazan RB, Phillips GR, Qiao RF, Norton L and Aaronson SA: Exogenous expression of N-cadherin in breast cancer cells induces cell migration, invasion, and metastasis. *J Cell Biol* 148: 779-790, 2000.
- Hauschka PV, Mavrikos AE, Iafrafi MD, Doleman SE and Klagsbrun M: Growth factors in bone matrix. Isolation of multiple types by affinity chromatography on heparin-sepharose. *J Biol Chem* 261: 12665-12674, 1986.
- Michigami T, Shimizu N, Williams PJ, Niewolna M, Dallas SL, Mundy GR and Yoneda T: Cell-cell contact between marrow stromal cells and myeloma cells via VCAM-1 and $\alpha 4 \beta 1$ -integrin enhances production of osteoclast-stimulating activity. *Blood* 96: 1953-1960, 2000.
- Cowin P, Rowlands TM and Hatsell SJ: Cadherins and catenins in breast cancer. *Curr Opin Cell Biol* 17: 499-508, 2005.

腫瘍による骨欠損に対する再生医療

名井 陽* 吉川 秀樹**

骨腫瘍に対する骨再生医療では大型の骨欠損が対象となる。悪性骨腫瘍切除後の生物学的再建に用いられている自家処理骨移植法に併用して、処理骨の再生を促す方法にも期待が寄せられている。骨再生のための足場としては、気孔が連通する多孔質セラミックス人工骨が適している。我々は多孔質人工骨の内部に自家骨髄由来間葉系幹細胞を導入し、さらに骨芽細胞分化を誘導することにより、骨形成能を賦与した“培養骨”の技術の安全性・有効性を検証するため、臨床試験を開始した。このような臨床試験を通じて、骨再生医療の安全性・有用性を慎重に見極めていく必要がある。

Update on Tissue Engineering : Bone and Cartilage.

Regenerative medicine in bone tumor surgery.

*Osaka University Hospital, Medical Center for Translational Research/
Osaka University Graduate School of Medicine, Department of Orthopaedics*

Akira Myoui

Osaka University Graduate School of Medicine, Department of Orthopaedics

Hideki Yoshikawa

In bone tumor surgery, target of bone tissue engineering technique will be the reconstruction of large bone void after tumor excision. It may be also useful to accelerate the regeneration of processed autologous bone grafts such as irradiated bone. Interconnected porous ceramics bone substitutes have been considered to be useful as a scaffold for bone engineering. We started a clinical trial on bone regeneration to evaluate its safety and efficiency using mesenchymal stem cells derived from autologous bone marrow aspirates and porous hydroxyapatite ceramics as a scaffold. In this study, after osteoblastic differentiation culture for several weeks, cells integrated to porous ceramics are transplanted into the defect after removal of large benign bone tumor.

*大阪大学医学部附属病院未来医療センター 副センター長・病院教授 / 大阪大学大学院医学系研究科器官制御外科学(整形外科)・准教授(みょうい・あきら)

**大阪大学大学院医学系研究科器官制御外科学(整形外科)・教授(よしかわ・ひでき)

はじめに

悪性骨腫瘍の局所療法では患肢温存術がこの20年余りの間に確立され主流となっており、切断術が行われることは少なくなっている。しかし、このような悪性骨腫瘍切除後をはじめとする大型の骨欠損の治療法は必ずしも容易ではなく、機能的制限があり、またきわめて合併症率が高いことから、より優れた治療法の開発が望まれ、組織工学的な治療法に大きな期待が寄せられている。本稿では、骨腫瘍による骨欠損に対する再生医療技術を利用した治療法の開発状況と今後の展望について概説する。

骨腫瘍による骨欠損の現状と問題点

骨腫瘍による骨欠損の補填・修復では、その大きさや形状、部位、年齢のみならず、腫瘍の良悪性、関節との距離、予後、局所循環の状態などの多因子を考慮して適切な方法が選択されている。良性骨腫瘍による骨欠損の現在の標準的治療は、自家骨移植、人工骨（リン酸カルシウム系多孔体セラミックス、またはリン酸カルシウム系ペースト）¹⁾²⁾であり、金属材料や高分子材料などは使用せず、比較的生物学的な修復が得られる方法がよく利用されている。しかし、これらの方法でも、自家骨移植では侵襲、出血、疼痛、神経損傷、骨折などの合併症や、量や形状、質の制限など、問題点がないわけではなく³⁾、ハイドロキシアパタイト (HA) など種々のセラミックス人工骨やペーストでは優れた臨床成績が報告されているが、あくまでも“骨欠損補填材”であり骨伝導能を有するものの骨形成能の点では限界がある。

一方、悪性骨腫瘍による大型の骨欠損では、自家骨移植や現在の人工骨では骨の修復は不可能であり、やむを得ず生物学の修復を断念して腫瘍用の金属製大型人工関節 mega-prosthesis で置換

することが標準的治療になっている。しかしながら、mega-prosthesis は機能、耐久性、ゆりみ、日常生活活動の制限といった点で問題が多く、一部の症例、一部の施設においては悪性腫瘍による大型骨欠損に対してできるだけ生物学的な修復を行うため、自家処理骨移植⁴⁾ や骨延長を応用した方法⁵⁾での再建が試みられているが、標準的治療といえるまでには至っていない。このような現在の治療法が抱える諸問題を解決するため、“生きた”、“機能的な”骨で生物学的に修復する方法として、組織工学の技術を応用した骨再生に大きな期待が寄せられている。

骨再生のための足場 (scaffold)

組織工学における重要要素の一つ、足場 (scaffold) として、骨の再生において有用性が高いと考えられている材料は、力学的強度、形状賦与性、多孔質性、骨伝導性を合わせもつリン酸カルシウム系多孔体セラミックス人工骨である。現在、臨床で用いられている人工骨のうち、我々が物質・材料研究機構、コバレントマテリアル(株)、(株)エム・エム・ティーと共同で開発した連通多孔体 HA 人工骨 (Interconnected Porous Calcium Hydroxyapatite: IP-CHA, ネオボーン®)⁶⁾ や、HOYA 社製超高気孔率連通多孔体 HA (アパセラム-AX)⁷⁾、オリンパステルモバイオマテリアル社製超高気孔率連通多孔体リン酸三カルシウムセラミックス (オスフェリオン®)⁸⁾ は、気孔どうしが互いに大きな気孔間連通孔で連結した連通気孔構造を特徴とする。そのため骨欠損部に移植したとき気孔内に骨組織が侵入しやすく、骨補填材として臨床的に優れた成績を示すのに加え、気孔内への細胞やサイトカインの導入が容易であることから骨再生の足場として有用であろうと考えられる。我々は骨、軟骨、筋、脂肪など多様な間葉系細胞に分化する

HA: ハイドロキシアパタイト

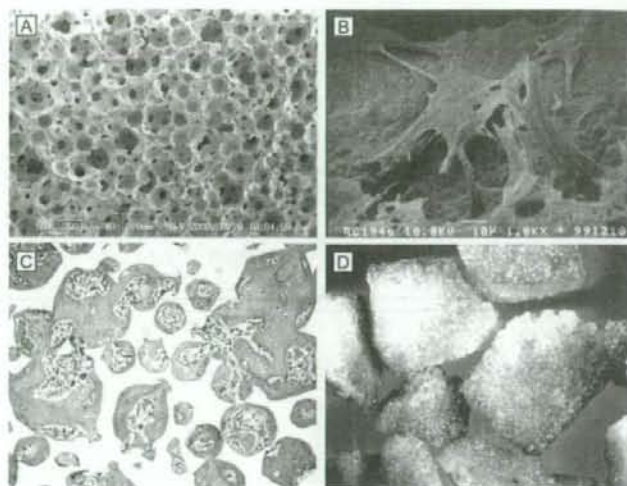


図1 連通多孔体セラミックス人工骨と培養骨

- A: 連通多孔体セラミックス人工骨の一つ、ネオボーン®の走査電子顕微鏡像(×50)。
 B: 気孔内壁に接着して広がる間葉系幹細胞(×1,000)。
 C: ラット皮下移植にて作成された異所性の培養骨。ほぼすべての気孔内に骨形成あり。
 D: ヒト間葉系幹細胞を導入して培養した培養骨のアルカリホスファターゼ染色。濃染する部分に骨芽細胞が接着している。

(筆者ら提供、一部文献 10 より引用)

多分化能と高い増殖能を併せもつ骨髄由来間葉系幹細胞と IP-CHA を組み合わせた骨再生実験を試みた。ラット大腿骨より得た骨髄細胞のうち、培養皿に接着する細胞を培養増幅すると間葉系幹細胞を多く含む細胞集団が得られる。この細胞の浮遊液中に IP-CHA を浸漬すると気孔内に細胞が侵入し気孔壁に接着する。この細胞含有 IP-CHA をデキサメサゾンを含む分化誘導培地でさらに培養し、骨芽細胞へ分化誘導したのちラット皮下に移植すると、皮下という異所性の環境にも関わらず、ほぼすべての気孔内にきわめて旺盛な骨形成がみられた¹⁾(図1)。さらに、同様の方法で作成したウサギ培養骨を用いた橈骨骨幹部分節状骨欠損モデルでも気孔内の旺盛な骨形成と骨欠損部の修復が観察され、IP-CHA が骨髄由来間葉系細胞

を用いた骨再生の scaffold として優れていることが確認された。

骨髄由来間葉系細胞を用いた骨再生の臨床試験

このような実験結果をふまえて、産業技術総合研究所セルエンジニアリング研究部門と共同で、大阪大学医学部附属病院未来医療センターの臨床研究プロジェクトとして「自家骨髄由来培養細胞導入人工骨による骨疾患の治療—第 I / II 相臨床試験」を開始した¹⁰⁾(図2, 3)。未来医療センターは、大学発シーズの橋渡し研究機関として再生医療や遺伝子治療などの探索的臨床研究プロジェクトについて、プロトコル作製支援、医学的評価、倫理的・社会的評価を経て系統的に推進し、細胞治療製剤等の院内製剤の製造の支援や質

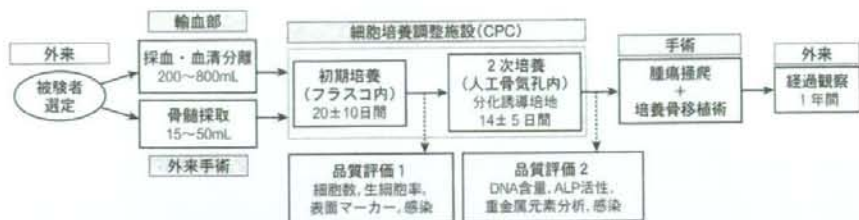


図2 自家骨髓由来培養細胞導入人工骨の臨床試験のフローチャート

大阪大学医学部附属病院未来医療センターに設置された細胞培養調整施設にて患者の自家骨髓細胞を培養し、人工骨と複合化して“培養骨”を作製する。

(文献 10 より引用改変)

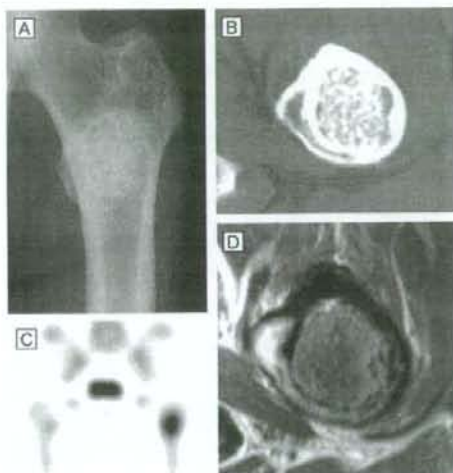


図3 間葉系幹細胞と連通多孔体 HA 人工骨による骨再生

47歳男性、左大腿骨転子部骨腫瘍。ネオボーン®と自家骨髓由来間葉系幹細胞を用いて作製した培養骨を移植した。

A：術後12カ月の単純X線像，B：単純CT像。いずれも顆粒間の境界が不明瞭化している。

C：術後6カ月の骨シンチSPECT像。移植部分は強い取り込みを示し、活発な骨形成を示唆する。

D：術後12カ月の造影MRIT1強調画像。移植部全体が造影され、血流が再開し深部まで組織再生が起きていることを示唆する。

(筆者ら提供)

の高い臨床研究の実施援助を通じて、有効性・安全性・経済性などについての客観性の高い分析を支援している。

本研究では、倫理性・安全性・品質の担保のため、医療用具の製造管理および品質管理規則 (good manufacturing practice: GMP [高品質の製品を保証するための製造工程における管理・遵守事項]) 準拠を基本として、血清分離、骨髓採取、培養、試薬の調整、品質検査、材料の受入、

製品の出荷、試料保存などすべての製造・品質管理工程について手順書を作成し、それに則った作業・管理・記録を行うシステムを構築した。対象は長径 30 mm 以上の良性骨腫瘍の 20 歳以上の患者で、まず ① 患者から 200 ~ 800 mL の末梢血を採取し遠心分離にて血清を分離、この自己血清を添加した細胞培地を調整する。② 外来処置にて骨髓穿刺を行い骨髓液 15 ~ 50 mL を採取、③ 未来医療センター内に設置された細胞培養調

CPC: cell processing center (細胞培養調整施設), GMP: good manufacturing practice (高品質の製品を保証するための製造工程における管理・遵守事項)

整施設 (cell processing center: CPC) において、骨髄由来の付着系細胞を①で調整した自己血清含有細胞培地を用いて間葉系幹細胞を培養増幅する (初期培養)。④ 初期培養終了時、トリプシン処理により細胞を分離、細胞数、生細胞率、細胞表面マーカー (CD105 [+] CD34 [-]) を計測、感染検査として培養上清の無菌試験、マイコプラズマ試験、エンドトキシン定量を行う。⑤ 間葉系幹細胞の浮遊液に IP-CHA を浸漬して気孔内に細胞を導入後、デキサメサゾン、 β グリセロリン酸、アスコルビン酸を含む培地で骨芽細胞分化誘導培養 (2次培養) を行う。合計 4~6 週の培養のうち、⑥ 培養終了時の DNA 含量、骨芽細胞のマーカーであるアルカリホスファターゼ活性および感染検査を実施。その結果を確認して、⑦ 最終製品である“培養骨”を手術室に搬送し、良性骨腫瘍の掻爬術で生じた骨欠損部に移植している。

このような細胞製品を用いた骨の再生医療は、まだ始まったばかりであり、臨床での安全性、有効性を客観的に評価した報告はこれまでほとんどない^{11)~13)}。我々の研究でも、主たるエンドポイントは安全性の評価としている。一方、本研究では培養骨の有効性の臨床の評価も副次的な目的としているが、骨の再生医療に関する標準的臨床評価法として確立されたものはなく、従来の人工骨移植術で得られた経験から、探索的なものを含め多角的な骨再生能の臨床の評価法を設定して検討を行っている。具体的には、骨形成の指標として単純 X 線によるグレード分類、アルミステップによる X 線透過性の定量、DXA (dual energy X-ray absorptiometry) 法による培養骨移植部の骨密度 (bone mineral density) 定量、CT (CT 値を含む)、造影 MRI (magnetic resonance imaging) を、臨床評価として、患肢機能評価 (Enneking)¹⁴⁾、

包括的 QOL (quality of life) 評価 (SF-36, Japanese ver. 1.2)¹⁵⁾ を行っている。また、抜釘術が必要な症例では、組織学的評価も行う。上記の評価項目のほかにも、骨シンチ SPECT (single photon emission computed tomography: 単光子放射線コンピュター断層撮影装置) や¹⁸F-PET (positron emission tomography: 陽電子放出型断層撮影装置) などの核医学検査も骨再生を非侵襲的に、かつ生物学的に評価する方法として有用である可能性があり、検討を行っている¹⁶⁾。

このような細胞を用いた再生医療、特に自家由来細胞を用いる場合、細胞製品の品質を担保することは容易ではないが、きわめて重要なことである。「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」においても、製品は薬事法に規制されない院内製剤でありながら、薬事法に準ずるレベルの品質管理が求められている。将来、このような治療法も標準的な技術の一つとして広く利用可能になると考えられるが、現時点では、倫理的かつ慎重な臨床研究の遂行と客観的、科学的評価で、まずは安全性、続いて有効性のエビデンスを一つ一つ積み重ねていく必要がある。本研究は進行中であり、安全性、有効性の評価や品質管理法、有効性評価法そのものの検討ができる段階ではないが、今後の骨再生医療における安全性に加え、品質管理の評価基準や有効性の臨床の評価基準を確立するための重要なデータが得られるはずである。

今後の展望

幹細胞を用いた骨再生医療は、少なくとも現時点では、安全性、費用対効果などの面で高いハードルがあり、おそらく主たるターゲットは現在の治療法できわめて問題点の多い疾患となるであろう。骨腫瘍の領域においてはやはり悪性骨腫瘍の

DXA: dual energy X-ray absorptiometry, MRI: magnetic resonance imaging, QOL: quality of life, SPECT: single photon emission computed tomography (単光子放射線コンピュター断層撮影装置)

切除後の再建で難渋している様な場合である。悪性骨腫瘍切除後の再建法として、標準的治療である mega-prosthesis による置換の問題点を解決するため、あるいは人工関節が使用できない部位の再建を行うため、オートクレーブ、温熱処理、放射線照射、液体窒素処理などによる自家処理骨を用いた生物学的修復が試みられているが、自家処理骨は移植後、壊死骨となりモデリングによる骨再生は期待されたほど容易ではないことが明らかになってきている¹⁷⁾。これに対し、幹細胞を用いた再生医療を追加することで処理骨の再生を促進し、より機能的な再建を目指す試みが始まっており¹⁸⁾、これまでに臨床例での報告はないが、安全性(特に腫瘍発生)が確立してきた時点で、臨床での自家処理骨の再生への応用が始まることになるであろう。この中では骨形成因子などの骨形成を促進する薬剤と比較した安全性・有効性、費用対効果の検討も必要となってくる。

おわりに

幹細胞を使用した再生医療はコスト、品質管理、安全性など種々の問題点を抱えている。骨の再生医療はまだまだ臨床研究が始まったばかりの段階であり、この技術が本当の意味で社会に還元され貢献するまでにはきわめて長い道のりがある。しかし、再生医療に対する期待は大きく、その本当の価値、すなわち「幹細胞による骨再生医療には、ほかの治療法ではできない何かができるのか？」を臨床研究で明らかにしていくことは骨再生医療の臨床研究に携わるものの責務であると考えている。

謝辞

骨再生の基礎・臨床研究の実施に際し、共同研究者として多大なるご指導をいただいた産業技術総合研究所セルエンジニアリング研究部門組織・再生工学研究グループの大串 始先生に深謝いたします。

文 献

- 1) Uchida A, Araki N, Shinto Y, et al : The use of calcium hydroxyapatite ceramic in bone tumour surgery. *J Bone Joint Surg* **72-B** : 298-302, 1990.
- 2) Matsumine A, Myoui A, Kusuzaki K : Calcium hydroxyapatite ceramic implants in bone tumour surgery. A long-term follow-up study. *J Bone Joint Surg Br* **86** (5) : 719-725, 2004.
- 3) Arrington ED, Smith WJ, Chambers HG, et al : Complications of iliac crest bone graft harvesting. *Clin Orthop* **329** : 300-309, 1996.
- 4) Araki N, Myoui A, Kuratsu S, et al : Intraoperative extracorporeal autogenous irradiated bone grafts in tumor surgery. *Clin Orthop* **368** : 196-206, 1999.
- 5) Tsuchiya H, Tomita K, Minematsu K, et al : Limb salvage using distraction osteogenesis. A classification of the technique. *J Bone Joint Surg Br* **79** (3) : 403-411, 1997.
- 6) Tamai N, Myoui A, Tomita T, et al : Novel hydroxyapatite ceramics with an interconnective porous structure exhibit superior osteoconduction *in vivo*. *J Biomed Mater Res* **59** : 110-117, 2002.
- 7) Sakamoto M, Nakasu M, Matsumoto T, et al : Development of superporous hydroxyapatites and their examination with a culture of primary rat osteoblasts. *J Biomed Mater Res A* **82** : 238-242, 2007.
- 8) Ogose A, Hotta T, Kawashima H, et al : Comparison of hydroxyapatite and beta tricalcium phosphate as bone substitutes after excision of bone tumors. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* **72** : 94-101, 2005.
- 9) Nishikawa M, Myoui A, Ohgushi H, et al : Bone tissue engineering using novel interconnected porous hydroxyapatite ceramics combined with marrow mesenchymal cells : quantitative and three-dimensional image analysis. *Cell Transplant* **13** (4) : 367-376, 2004.
- 10) 名井 陽 : 自家骨髄間葉系細胞と連通多孔体人工骨による骨再生の臨床試験。 *メディカル朝日* 6月

号：48-49, 2005.

- 11) Morishita T, Honoki K, Ohgushi H, et al : Tissue engineering approach to the treatment of bone tumors : three cases of cultured bone grafts derived from patients' mesenchymal stem cells, *Artif Organs* **30** : 115-118, 2006.
- 12) Marcacci M, Kon E, Moukhachev V, et al : Stem cells associated with macroporous bio-ceramics for long bone repair : 6- to 7-year outcome of a pilot clinical study. *Tissue Eng* **13** : 947-955, 2007.
- 13) Ohgushi H, Kotobuki N, Funaoka H, et al : Tissue engineered ceramic artificial joint--*ex vivo* osteogenic differentiation of patient mesenchymal cells on total ankle joints for treatment of osteoarthritis. *Biomaterials* **26** : 4654-4661, 2005.
- 14) Enneking WF, Dunham W, Gebhardt MC, et al : A system for the functional evaluation of reconstructive procedures after surgical treatment of tumors of the musculoskeletal system. *Clin Orthop* **286** : 241-246, 1993.
- 15) 福原俊一 : MOS Short-Form 36-Item Health Survey : 新しい患者立脚型健康指標, 厚生省の指標 **46** : 40-45, 1999.
- 16) Lee SW, Padmanabhan P, Ray P, et al : Stem cell-mediated accelerated bone healing observed with *in vivo* molecular and small animal imaging technologies in a model of skeletal injury. *J Orthop Res*. Published online, 2008.
- 17) 名井 陽, 上田孝文, 玉井宣行ほか : 骨・軟部腫瘍の診断と治療 - 21世紀への展開 - 術中体外放射線照射自家骨移植法, 別冊整形外科 **43** : 152-157, 2003.
- 18) 藤間保晶, 田所美香, 大串 始ほか : 幹細胞処理骨に搭載した培養骨髄間葉系細胞の骨形成能の経時間的变化. *日整会誌* **80** : S954, 2006.



やさしい リウマチ治療薬の基礎知識

東邦大学医療センター大森病院リウマチ膠原病センターセンター長 川合 眞一 著

A4判 80頁 定価 1,680円 (本体 1,600円 + 税5%) 送料実費
ISBN4-7532-2220-9 C0047

◎新薬の登場で、劇的な改善例もみられるようになったリウマチ疾患。長期の治療を納得して受けるために必要な、薬の正しい知識をこの1冊で！

◎生物学的製剤を含む、主要な治療薬13種の解説付表つき！

株式会社 医薬ジャーナル社 〒541-0047 大阪市中央区淡路町3丁目1番5号・淡路町ビル21 電話 06(6202)7280(代) FAX 06(6202)5295 (書籍番号)
〒101-0061 東京都千代田区三崎町3丁目3番1号・TKビル 電話 03(3265)7681(代) FAX 03(3265)8369 00910-1-33353

人工骨による骨・関節疾患の治療

大阪大学大学院医学系研究科器官制御外科学(整形外科) *教授 **病院教授

*よしかわひでき たまゐのりゆき みよしい せつ
*吉川秀樹 玉井宣行 **名井 陽

整形外科において広く行われている骨移植術は、主として骨腫瘍や感染による骨欠損の補填、難治性骨折や偽関節などの修復促進、関節固定や脊椎固定の骨性癒合、人工関節周辺の母骨の補填、骨粗鬆症により脆弱化した骨の補強などに用いられる。従来から、患者自身の腸骨、腓骨などから移植骨を採取し、患部に移植するという自家骨移植が広く施行されてきた。自家骨移植は、骨再生に優れるが、採骨部の疼痛、血腫、骨折などの術後合併症の頻度が高く、高侵襲手術である。

近年、自家骨移植に代わり、種々の人工骨が開発され、臨床での使用が急速に普及しつつある¹⁾。人工骨は、①移植骨採取の侵襲がない、②任意の量・形状を調節できる、③生体適合性が良い、④免疫反応がない、などの利点を有するが、一方では、①力学的強度が弱い、②細胞の侵入が困難である、③高価である、などの問題点も有している。今日まで人工骨として、アルミナ、バイオガラス、ハイドロキシアパタイト、 β -リン酸3カルシウムなど様々な素材が使用されてきた。形状も、顆粒状、ブロック状、液体注入型など、種々の人工骨が薬事認可を受け、保険適用されている。

その中で、ハイドロキシアパタイトはヒトの骨の無機質成分に近く、海綿骨以上の力学的強度を有し、その優れた生体親和性、骨伝導能から人工骨として最も適していると考えられている。1980年代より整形外科、歯科口腔外科、脳外科領域において骨補填材料として広く臨床使用されてきた¹⁾。筆者らは、力学的強度を有し、かつ幹細胞や骨増殖因子の導入が可能な骨補填材料として、気孔間連通構造を有する新規ハイドロキシアパタイトを開発した(図1)²⁾⁻⁴⁾。

本稿では、種々の骨・関節疾患に対し本人工骨(NEOBONE[®])を用いて治療した症例を提示し、その有用性について解説する。

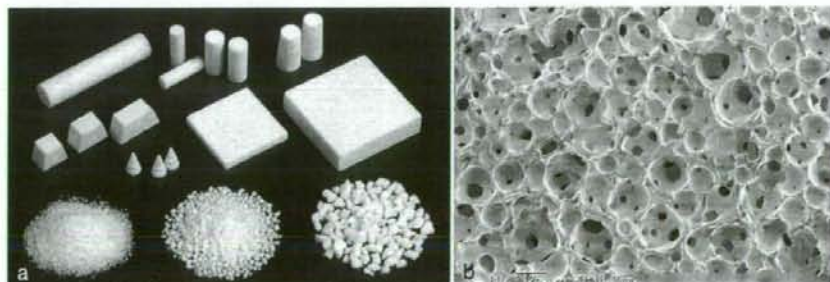


図1 連通多孔体ハイドロキシアパタイト人工骨(NEOBONE)

a: 市販の各種NEOBONE, b: 走査電顕像での内部微細構造。

〔症例1(図2)〕28歳、男性、内軟骨腫。

バレーボールにて右手中指を突き指し、受傷した。1週間、疼痛、腫脹が消失しないため受診し、単純X線により中節骨の骨溶解像を認めた。内軟骨腫と診断し、局所麻酔下に病巣搔爬を行い、欠損部に対し顆粒状人工骨(NEOBONE)を充填した。以後経過良好で、術後3、6、12、27カ月の単純X線では人工骨は一体化し、膨隆していた中節骨は、骨リモデリングにより正常化した。

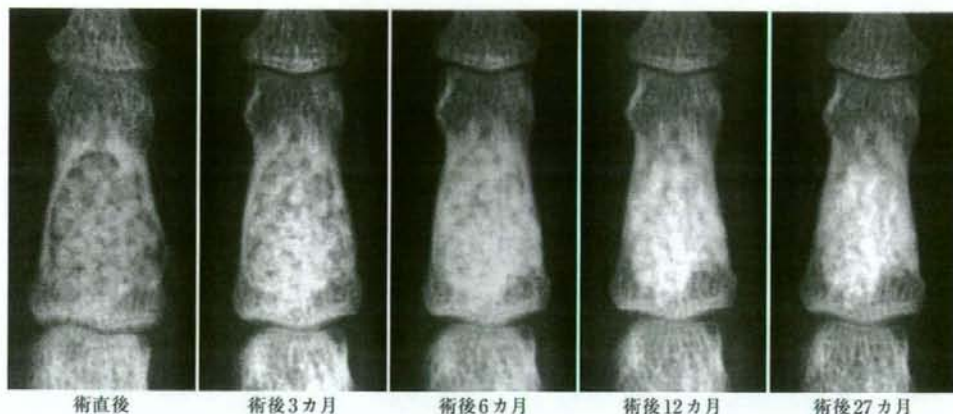


図2 右手中指中節骨の内軟骨腫における経時的X線像の変化

〔症例2(図3)〕14歳、男子、単発性骨嚢腫。

野球で投球した後、右肩激痛が出現し、続行不能となった。単純X線により右上腕骨の骨溶解像を認めた(a)。MRIにより、内部は嚢腫様で大部分が液体成分であったため、単発性骨嚢腫と診断した。術中所見では、骨皮質は菲薄化し、内部は紫液性で、骨髄は欠損していた(b)。顆粒状人工骨(NEOBONE)のみを充填し、自家骨移植は行わなかった(c)。術後3カ月の単純X線像では、術直後に見られた顆粒状陰影はほぼ消失し、豊富な骨再生が認められた(d)。術後3年、再発を認めない。

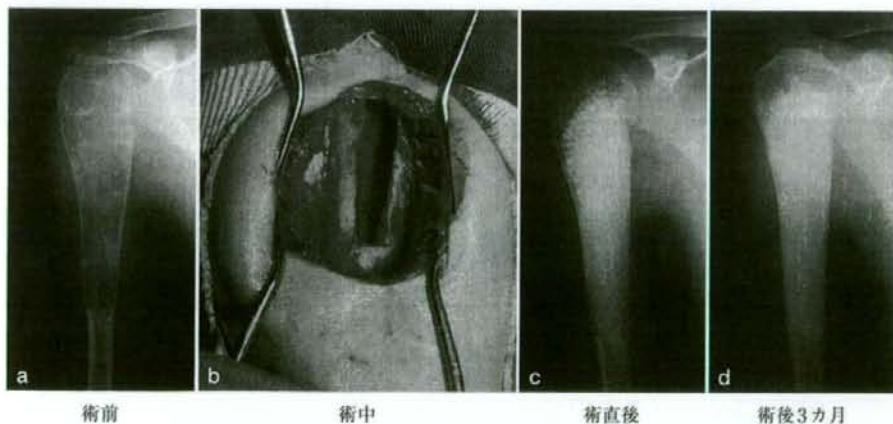


図3 右上腕骨の単発性骨嚢腫

〔症例3(図4)〕58歳，女性，変形性膝関節症。

約3年前から，歩行時，左膝関節内側に疼痛が出現し，徐々に痛みが増強した。単純X線では，左膝内側関節裂隙の狭小化を認めた。MRIによると，内側関節軟骨は，非薄化しているものの残存しており，年齢も考慮して，高位脛骨骨切り術を選択した。骨切り後の骨欠損部には，術前CT三次元構成画像に基づき，切削機により加工したブロック状人工骨 (NEOBONE) を移植した (a～g)。術後6カ月で良好な骨癒合が得られた (h)。

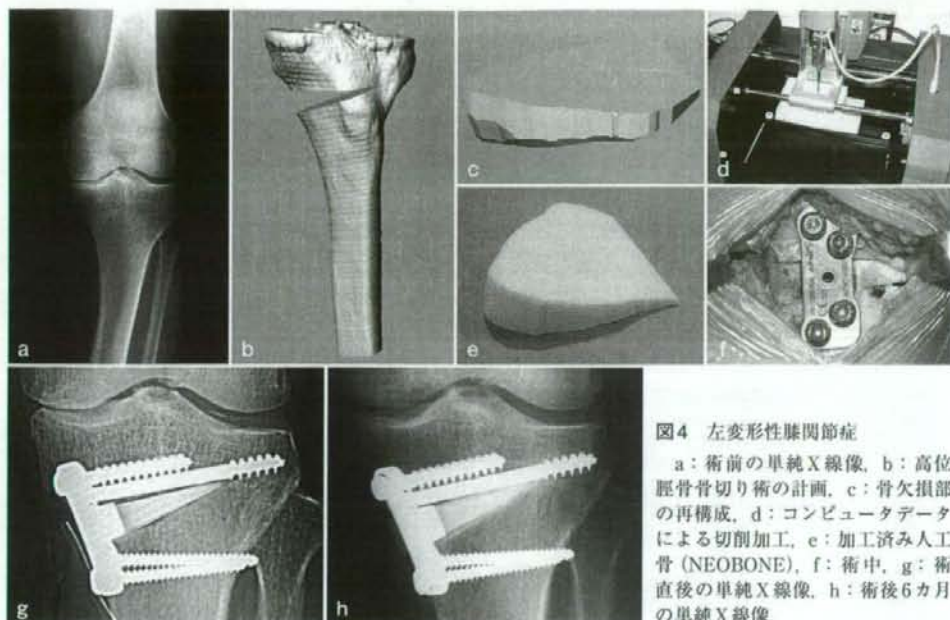


図4 左変形性膝関節症

a: 術前の単純X線像，b: 高位脛骨骨切り術の計画，c: 骨欠損部の再構成，d: コンピュータデータによる切削加工，e: 加工済み人工骨 (NEOBONE)，f: 術中，g: 術直後の単純X線像，h: 術後6カ月の単純X線像。

〔症例4(図5)〕58歳，女性，関節リウマチ。

10年前に発症した関節リウマチで治療中に右手関節の疼痛が著明となった。単純X線では，手根骨の骨破壊と橈骨関節近傍の円形の骨溶解像を認めた (a)。関節リウマチによる骨嚢胞と診断し，骨破壊の進行予防，病的骨折予防の目的で，骨嚢胞に対し人工骨移植術を施行した。橈骨骨皮質を小開窓し，嚢胞内を掻爬後，顆粒状人工骨 (NEOBONE) を充填した (b・c)。術後1カ月で手関節痛は軽減し，以後徐々に骨形成が進行した (d)。術後2年，疼痛は消失している。

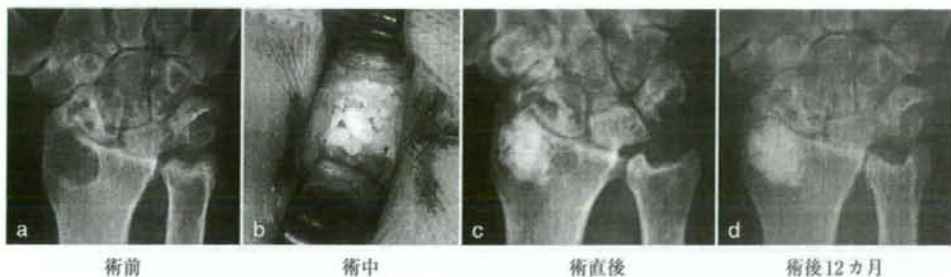


図5 右手関節の関節リウマチ

〔症例5(図6)〕65歳、女性、関節リウマチ。

7年前に発症した関節リウマチで治療中に左膝関節の疼痛が著明となった。単純X線では、膝関節の骨破壊、関節裂隙の消失、脛骨近位中央部の巨大な囊腫様変化を認めた(a・b)。この状態での人工膝関節の設置は不安定であるため、骨破壊の進行予防、病的骨折予防の目的で、まず脛骨骨嚢胞に対し、人工骨(NEOBONE)移植術を施行した(c)。術後6カ月で、良好な骨再生が確認されたため、この時点で人工膝関節全置換術を施行した(d)。術後3年、人工関節のゆるみも生じず、経過良好である。



図6 左膝関節の関節リウマチ

〔まとめ〕

近年、種々の人工骨の開発が進められ、骨の再生医療への臨床応用が期待されている。本稿で述べたように、筆者らが開発したNEOBONEの使用により、骨盤などからの自家骨の採取が不要となり、低侵襲手術が可能となった。また、骨の小病変などに対しては、従来、自家骨を採取してまでは手術適応とならなかった症例があったが、NEOBONEの使用により、そのような症例にも手術適応が拡大した。将来的には、NEOBONEの気孔間連通構造を利用して、骨髄幹細胞や骨形成蛋白(BMP)等の増殖因子を気孔

内に導入したり、外科的に血管を導入することにより、さらなる骨再生の促進が期待できる。近い将来、先端医療としての骨組織のtissue engineeringが可能になるものと思われる。

〔参考文献〕

- 1) 吉川秀樹, 他: カレントセラピー 21: 276, 2003.
- 2) 玉井宣行, 他: 関節外科 23: 256, 2004.
- 3) 名井 陽, 他: 骨・関節・靭帯 17: 1205, 2004.
- 4) 名井 陽, 他: 日整会誌 80: 262, 2006.
- 5) 吉川秀樹: 関節外科 25: 999, 2006.
- 6) 名井 陽, 他: 治療 90: 1815, 2008.

セラミックス人工骨の進歩

*¹大阪大学医学部附属病院未来医療センター、
*²大阪大学大学院医学系研究科器官制御外科学(整形外科)

名井 陽*^{1,2}, 山崎 直美*², 玉井 宣行*², 橋本 伸之*²,
村瀬 剛*², 吉川 秀樹*²

Akira MYOUI, Naomi YAMASAKI, Noriyuki TAMAI, Nobuyuki HASHIMOTO,
Tsuyoshi MURASE, Hideki YOSHIKAWA



1. はじめに

骨腫瘍や外傷などによる骨欠損の治療では、古くから自家骨移植が優れた方法としてゴールドスタンダードである。しかし、自家骨移植は自分の骨の一部を採取する必要があるため大きさや形状に制限があることから、その代替品として同種骨から化学合成品までを含む広義の“バイオマテリアル”が広く用いられてきた。欧米では同種骨バンクが整備され、必要な大きさ、形状の同種骨が容易に得られるため、広く利用されているのに対し、我が国では、宗教上の理由などから同種骨が普及せず、骨バンクも大規模なもの構築されていない。化学合成材料としては、古くは石膏(硫酸カルシウム)が使用されたこともあったが、世界をリードする我が国のセラミックス技術によって合成リン酸カルシウムセラミックスの人工骨が世界に先駆けて臨床応用され、さらなる発展を遂げつつある。本稿では、近年、続々と市場に出てきた高気孔率・連通多孔体セラミックス人工骨を中心とした人工骨研究開発の現況を概説する。

2. 従来の多孔体人工骨

通常の骨折治療過程をみると骨の再生能力はきわめて高いという印象を持つが、ある程度の大きさの欠損が起こった場合や、血行不良や感染など治療阻害因子が合併した場合には自然修復を期待しにくいために、何らかの補填を行って治療過程を促進する試みが古くから行われてきた。その代表的な方法が自家骨移植であり、今もお標準的治療とされている。自家骨移植は、病変部の手術の際に必要

な移植骨片を患者自身の腸骨や腓骨などから採取し、これを病変部の骨欠損部に移植するものである。まさに“生きた骨”を移植するため、移植片そのものが骨芽細胞などの骨形成細胞を含むことから骨形成能が備わっているだけでなく、力学的特性も必要なものに近いものが得られるため、有用性、信頼性の高い方法である。しかし、移植骨を採取するには別の皮切が必要となることが多く、手術時間が延長し、また必要な形状・サイズの移植骨が必ずしも得られない。さらに、この手技に伴って出血、採骨部の変形、持続する痛みをはじめとして、重篤なものとしては骨折や神経麻痺などを含むドナーサイトの合併症が多いことも問題視されている。

このような問題を克服するために、1980年代半ばより骨の無機質の主成分であり骨と直接結合するハイドロキシアパタイト(hydroxyapatite; HA)や生体内で吸収されるβリン酸3カルシウム(beta-tricalcium phosphate; βTCP)など種々のバイオセラミックスによる人工骨が開発・臨床応用され、とくに内部に“気孔”と呼ばれる小空隙を多数有する多孔体人工骨は、良性骨腫瘍切除後の海綿骨の欠損の補填を中心に概ね良好な臨床成績が報告されている^{1)~5)}。このような多孔体人工骨は、その気孔内に新生骨が侵入し母床骨と完全に同化することが期待されたが、開発当初の多孔体HA人工骨に関する長期の臨床症例の解析から、気孔内への新生骨侵入は数ミリ程度に限られることが明らかになってきた⁶⁾。このような新生骨の侵入していない気孔は強度面で不利であり、多孔体HA人工骨移植後2,3年経過してから骨折した症例も報告されている^{1),2),7),8)}。これまでの多孔体HA人工骨の気孔構造はいわゆる“軽石状”であり、気孔間連通性が低かったため深部気孔まで気孔内骨形成(いわゆるbone ingrowth)が起こらず、脆弱性が持続したと考えられる。

■ 著者連絡先

大阪大学医学部附属病院未来医療センター
(〒565-0871 大阪府吹田市山田丘2-15)
E-mail: myoi@hp-mctr.med.osaka-u.ac.jp

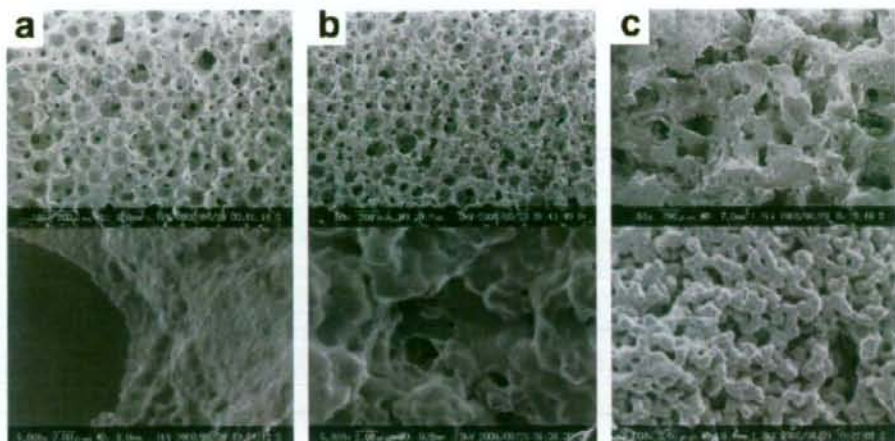


図1 高気孔率・連通多孔体人工骨の微細構造

a: ネオボーン®, b: アパセラム-AX®, c: オスフェリオン®。上段: 50倍, ネオボーン®とアパセラム-AX®は直径100~200ミクロンの規則的な気孔が, オスフェリオン®は不規則な気孔が連通している。下段: 5,000倍, ミクロポアは, ネオボーン®には無く, アパセラム-AX®で少数見られ, オスフェリオン®では無数に見られる。



図2 アパセラム-AX®骨内埋植後の組織像

a: 埋植後2週間の脱灰後HE染色像。すでに旺盛な骨形成が見られる。b: 埋植後2週間のTRAP染色像。多数のTRAP陽性破骨細胞が出現している。c: 埋植後6ヶ月の非脱灰標本。黒い人工骨骨格部分の辺縁が不明瞭になり。吸収が始まっている。

3. 高気孔率・連通多孔体人工骨(図1)

我々が物質・材料研究機構(田中順三主任研究員, 菊池正紀研究員, 生駒俊之研究員), コバレントマテリアル(株), (株)エム・エム・ティと共同で開発したHAセラミックス人工骨ネオボーン®(コバレントマテリアル(株)製)は, 気孔間の連通性に主眼を置いて開発された骨補填材であり, その特徴は, ほぼ全ての気孔が大きい径の気孔間連通孔でつながり, 深部の気孔にまで新生骨が侵入すること, そして術前加工性や術中操作性に問題の無い強度を同時に実現したことである⁹⁾。ネオボーン®を用いた動物実験では, 骨内に埋植後, 時間経過と共に気孔内に骨形成が起こり, それに伴って移植した人工骨部の圧縮強度が増加し, 1年以上強度が維持されることがわかっている。埋植後のネオボーン®は動物実験でも臨床的にもほとんど吸収されない¹⁰⁾。

2006年に発売になったアパセラム-AX®(HOYA(株)製)は, 85%の超高気孔率と高い気孔間連通性, 数ミクロンからナノメートルサイズのミクロポア(micropore)を有するHA人工骨である¹¹⁾。ミクロポアは, 走査型電子顕微鏡で高倍率にて観察すると, 多孔体の壁部分に非常に細かい直径数ミクロン以下の細孔として観察される。初期強度は弱いものの, 我々の実験ではきわめて早いbone ingrowthを示すこと, それに伴って圧縮強度が増大し維持されること, 人工骨そのものが緩徐に吸収されることが示された(図2)。臨床的にも速やかな骨形成が観察されている。

一方, β TCP製と同様に高い気孔間連通性とミクロポアを有する多孔体人工骨オスフェリオン®(オリンパスモバイオマテリアルズ(株)製)も気孔内への速やかな組織侵入と骨形成が起こるが^{12), 13)}, 初期強度は弱く, 海綿骨欠損部に埋植した場合, その後も強度は増大しない。しかし材料そのものの吸収はきわめて速く, 半年から1年でほぼ



図3 オスフェリオン®の臨床症例

a: 3歳男児、脛骨骨のう腫に対してオスフェリオン®顆粒を埋植した。b: 埋植後3ヶ月、良好な骨形成が見られる。c: 埋植後10ヶ月、中心部分の人工骨が吸収され、骨髓腔が形成されている。

消失する。臨床的にも良好な骨形成、材料の吸収が起こる(図3)。これらの第2世代とも呼ぶべき高連通性多孔体人工骨は、高気孔率、高連通性が共通の特徴であり、生体骨内に埋植したあとの早期(数週間程度)では気孔内骨形成が共通して見られるが、吸収については材料の違い(HAか β -TCPか)およびマイクロポアの存在によるところが大きいようである。

このような最近のリン酸カルシウム系人工骨は、75~85%ときわめて高い気孔率を持つものが多く、初期強度を犠牲にしてもbone ingrowthを重視する傾向があり、ブロック体を荷重負荷がかかるような設置方法で埋植した場合に術後早期の破損を来す可能性がある。このため、荷重負荷がかかるような埋植の際には、適切な免荷(内固定等を含む)を行う必要がある。このような負荷の大きい状況においてより安全に利用できることを目的として、現在我々は荷重負荷に耐えうる緻密体セラミックス部分と優れたbone ingrowthを示す多孔体部分を適切に配置した緻密体/多孔体コンポジットセラミックスを開発中である¹⁰⁾。

4. CAD/CAM技術による形状最適化

骨折後の変形治療などで骨の角度を矯正する必要があるとき、骨をわざと切断し変形を矯正して固定する“矯正骨切り術”という手術が行われる。自家骨を移植片として用いる楔開き矯正骨切り術では、術中に移植片の形態を加工する必要があるため、正確な移植片を得ることが困難である。人工骨では患部の術前CTデータなどに基づいて術前に正

確な移植片の作製が可能であり、ネオボーン®の場合、海綿骨の数倍の圧縮強度を有し、さらにブロック体でもbone ingrowthが期待できることから、矯正骨切り術において有用性が高いと考えている^{14),15)}。

図4は48歳女性、橈骨遠位端骨折の変形治療であるが、術前のCTから再構成した三次元画像において、楔開き矯正骨切り術のシミュレーションを行い、楔状の移植片の形状を決定した。この形状の三次元データに基づき、切削ラビッドプロトタイプリング(RP)の手法を用いて、ネオボーン®の直方体ブロックから移植用の楔状ブロック体を削り出した。近年の工業製品はCAD(computer-aided design)すなわちコンピューター上でデザインされるが、切削RPとは三次元CADデータを元にコンピューター制御でプラスチックなどをドリルで削って試作品を作製するCAM(computer-aided manufacturing)の方法の一つである。この方法で作成した楔状ブロックは、術中一切加工せずに骨切部にフィットし正確な矯正が得られた。10ヶ月後のレントゲン像では、移植したブロックの圧潰はなく矯正位が保たれ、完全な骨癒合が得られていた。この技術は現時点で一般に普及するまでには至っていないが、比較的安価に加工システムが構築できるので、今後広まるであろう。

5. 骨再生医療のスcaffoldingとしての多孔体人工骨

もう一つの新たな試みは、人工骨の再生医療への応用である。最近の人工骨の連通性に優れた気孔は、血管や新生骨など再生に必要な組織の侵入が容易なだけでなく、液体

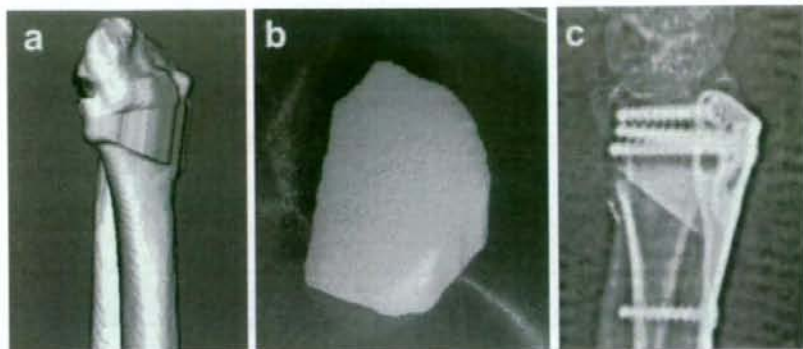


図4 CAD/CAM技術によるネオボーン®の術前加工

48歳女性、機骨遠位端骨折変形治療に対する機骨近位端矯正骨切り術。a:術前CTデータを三次元再構築したモデル上で施行した手術シミュレーション。必要な人工骨の形状のCADデータを抽出する。b:得られたCADデータから切削RPの手法を用いて作製した機状スパーサー。c:術後X線画像。正確な矯正が得られている。

に浮遊させた細胞や骨形成因子 (bone morphogenetic protein: BMP) 溶液の導入が容易であることから、骨の再生医療における間葉系幹細胞やBMPなどの“足場 (scaffold)”として有用であると考えられる。これまでに我々は、ネオボーン®を足場として利用した実験において、間葉系幹細胞を用いた系¹⁶⁾やBMPを用いた系^{17),18)}でその有用性を証明してきた。同様の有用性がアパセラム-AX®およびオスフェリオン®についても報告されている^{11),19)}。

これらの実験結果を得て、我々は大坂大学医学部附属病院未来医療センターの細胞培養調整施設を利用し、良性骨腫瘍および骨腫瘍類似疾患の患者を対象に、「自家骨髄由来培養細胞導入人工骨による骨疾患の治療臨床試験」を開始している²⁰⁾。局麻下に骨髄穿刺を行い、患者腸骨より15~50 mlの骨髄液を得る。骨髄細胞を、15%自己血清を含む α MEM培地で2~3週間ほど培養すると、紡錘形の付着性細胞が増殖してくる。この細胞は約90%が増殖能と骨芽細胞など間葉系細胞への分化能を維持する間葉系幹細胞である。この細胞の浮遊液にネオボーン®を一晩浸すと、気孔内に細胞が導入され気孔壁に付着する。これをさらに約2週間、アスコルビン酸、 β -グリセロリン酸、デキサメサゾンを追加した15%自己血清を含む α MEMで培養し骨芽細胞へ分化誘導したのち、手術で骨欠損部に移植している。この方法は、将来的には骨形成にとって極めて不利な条件の病巣、たとえば悪性腫瘍切除後や外傷・骨髄炎などによる巨大な骨欠損を機能的に再建するための新しい治療法として期待される。

6. おわりに

リン酸カルシウムセラミックス人工骨の歴史はわずか20年あまりであるが、確実に進化を遂げている。しかし、これらの人工骨は移植母床に存在する骨形成細胞による骨欠損修復の足場となる“骨伝導能”を有するが、自ら新たに、あるいは異所性に骨を作る能力である“骨誘導能”は無く、難治性骨欠損の治療では自家骨移植に取って代わるまでには至っていない。次世代人工骨として、骨形成因子などを利用して骨誘導能を担持させた人工骨に強い期待が寄せられている。

文 献

- 1) Uchida A, Araki N, Shinto Y, et al: The use of calcium hydroxyapatite ceramic in bone tumour surgery. *J Bone Joint Surg* 72: 298-302, 1990
- 2) Yoshikawa H, Uchida A: Clinical application of calcium hydroxyapatite ceramic in bone tumor surgery. *Biomaterials and Bioengineering Handbook*, ed by Wise DL, Marcel Dekker, New York, 2000, 433-55
- 3) Matsumine A, Myoui A, Kusuzaki K, et al: Calcium hydroxyapatite ceramic implants in bone tumour surgery. A long-term follow-up study. *J Bone Joint Surg Br* 86: 719-25, 2004
- 4) Shibuya K, Kurosawa H, Takeuchi H, et al: The medium-term results of treatment with hydroxyapatite implants. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 75: 405-13, 2005
- 5) Ogose A, Hotta T, Kawashima H, et al: Comparison of hydroxyapatite and beta tricalcium phosphate as bone substitutes after excision of bone tumors. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 72: 94-101, 2005
- 6) Ayers RA, Simske SJ, Nunes CR, et al: Long-term bone ingrowth and residual microhardness of porous block hydroxyapatite implants in humans. *J Oral Maxillofac Surg* 56: 1297-301, 1998