

200906022A

別添1

厚生労働科学研究費補助金

再生医療実用化研究事業

「3次元再生軟骨・骨組織における安全性と有効性の確立」に関する研究

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 高戸 毅

平成22(2010)年 5月

目 次

I. 総括研究報告	
「3次元再生軟骨・骨組織における安全性と有効性の確立」に関する研究	1
高戸 毅	
II. 分担研究報告	
1. 「臨床試験の企画・支援」に関する研究	4
荒川 義弘	
2. 「3次元骨の製造およびデータ収集」に関する研究	6
鄭 雄一	
3. 「3次元皮下軟骨の製造およびデータ収集」に関する研究	8
星 和人	
4. 「3次元関節軟骨の臨床支援」に関する研究	10
吉川 秀樹	
5. 「3次元関節軟骨の製造およびデータ収集」に関する研究	11
中村 憲正	
6. 「再生組織の製造管理・支援」に関する研究	13
名井 陽	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	14
IV. 研究成果の刊行物・別刷	15

厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）  
 (総括・分担) 研究報告書

「3次元再生軟骨・骨組織における安全性と有効性」に関する研究

研究代表者 高戸 毅 東京大学大学院医学系研究科 教授

研究要旨

本研究は、3次元再生軟骨、TEC再生関節軟骨、PRP複合3次元骨の医師主導治験を実施し、この再生組織を産業化することを最終目標として、治験開始に必要な品質および安全性の確認（厚生労働省への確認申請）を行い、確認申請承認を受けることを目的としている。そのため平成21年度には、厚生労働省の指針に基づき、安全性・有効性のデータを収集した。

3次元再生軟骨では、第一に、足場素材（ポリ乳酸多孔体、PLLA）の製造方法を確定し、抽出方法確認試験、細胞毒性試験、細胞を用いる復帰突然変異試験、を行った。すべてGLP準拠で行い、安全であることを確認した。また、細胞の安全性試験として培養後の染色体検査（G band）を行ったところ、安全であると思われた。また、細胞プロセッシングセンターにおける製造体制を検討し、治験薬GMP準拠となるよう設備、体制を整備した。さらに、ビーグルを用いた自家軟骨細胞移植の実験を行い、3次元形状や力学強度など、生体軟骨に遜色ないという結果を得た。

TEC再生関節軟骨では、自動培養装置による間葉系幹細胞の培養（ウシ胎児血清使用）では4週間で100mgの組織から最大 $2 \times 10^7$  cellsの増幅が可能であった。また、TECの安全性を確認するため、軟寒天培養・発熱性試験・急性全身毒性試験・刺激性/皮内反応試験・血液適合試験・細胞毒性試験を委託にて行い、良好な結果を得た。

PRP複合3次元骨に関しては、テトラポッド型顆粒状人工骨を、健常人静脈血から調製したPRP（platelet rich plasma）中に浸漬しPRP複合3次元骨を得た。PRP複合3次元骨による細胞増殖活性への効果を調査し、有効性を確認した。PRP複合3次元骨をラット大腿骨欠損モデルへと埋植し、骨新生の増加を確認した。

研究分担者氏名・所属研究機関名・職名

荒川 義弘・東京大学・准教授  
 鄭 雄一・東京大学・教授  
 星 和人・東京大学・特任准教授  
 吉川 秀樹・大阪大学・教授  
 中村 憲正・大阪大学・招聘教授  
 名井 陽・大阪大学・准教授

A. 研究目的

本研究は、3次元再生軟骨、TEC再生関節軟骨、PRP複合3次元骨の医師主導治験を実施し、この再生組織を産業化することを最終目標として、治験開始に必要な品質および安全性の確認（厚生労働省への確認申請）を行い、確認申請承認を受けることを目的としている。

B. 研究方法

3次元再生皮下軟骨の医師主導治験を実施するにあたり、必要な安全性試験のうち、特に重要な足場素材に対する安全性試験を行った。まず、足場素材（ポリ乳酸多孔体、PLLA）

の製造方法を *in vitro* および *in vivo* の実験で確定し、そのプロトコールにしたがって製造した PLLA の抽出方法確認試験、細胞毒性試験、細胞を用いる復帰突然変異試験、を行った。細胞の安全性試験として培養後の染色体検査（G band）を行った。有効性に関しては、ビーグルを用いた自家軟骨細胞移植の実験系を用い、採取した耳介軟骨細胞を用いて 3 次元再生皮下軟骨を作製し、同一個体に皮下移植する実験系を用い、生体内 3 次元形状や生体内力学強度などを評価した。

TEC 再生関節軟骨では、自動培養装置を用いて、安定的に TEC を供給できる自動培養技術を開発した。合わせて、TEC の安全性を確認するため、軟寒天培養・発熱性試験・急性全身毒性試験・刺激性/皮内反応試験・血液適合試験・細胞毒性試験を委託にて行った。

PRP複合3次元骨では、テトラポッド型顆粒状人工骨に5%トレハロース表面処理を行い、健常人静脈血から採取し調製したPRPを含む培地中にこの人工骨を浸漬し、PRP複合3次元骨を作製した。マウス骨芽様細胞株（MC3T3-E1）にPRP複合3次元骨を添加し、

細胞増殖活性をCell counting kit-8 (同仁化学) を用いて評価した。次にラット大腿骨骨幹端に円筒状欠損 (直径 2mm, 深さ 2.5 mm) を作製して、PRP複合3次元骨を埋植し、1週間後に $\mu$ -CT (SMX-90CT, 島津) を撮影することによって骨新生促進効果を評価した。採材した骨欠損部をプランクリュクロ法によって脱灰した後、組織切片を作製しHE染色 (ヘマトキシリン・エオシン染色) して組織学的に評価することも試みた。ウサギ及びイヌに大腿骨欠損 (ウサギ: 大腿骨遠位, 直径 5 mm, 深さ 8 mm, イヌ: 大腿骨内側顆, 直径 10 mm, 貫通性) を作製して、PRP複合3次元骨を評価するための骨欠損モデルを作製した。イヌ骨欠損モデルに関しては、骨欠損部の最大圧縮強度を測定機 (3365, INSTRON) を用いて測定した。

(倫理面への配慮)

本研究の動物実験プロトコールに関しては、国の「動物の保護及び管理に関する法律」及び東京大学、大阪大学の大学動物実験実施規則、動物実験実施マニュアルに従い、動物愛護の観点に十分留意して行った。

### C. 研究結果

3次元再生皮下軟骨では、*in vitro*および*in vivo*の実験で確定した足場素材 (ポリ乳酸多孔体、PLLA) の製造方法に従い製造したPLLAに関して、抽出方法確認試験、細胞毒性試験、細胞を用いる復帰突然変異試験、GLP準拠で行い、安全性を確認した。また、細胞の安全性に関して、培養後の染色体検査 (G band) を実施し、安全であることを確認した。製造安全性を確立するため、細胞プロセッシングセンターにおける製造体制を検討し、治験薬GMP準拠となるよう設備、体制を整備した。また、有効性を評価するため、ビーグルを用いた自家軟骨細胞移植の実験を上記プロトコールに基づき行った。採取した耳介軟骨細胞を用いて3次元再生皮下軟骨を作製し、同一個体に皮下移植する実験系で、3次元形状や力学強度などを評価し、生体軟骨に遜色ないという結果を得た。なお、これらの安全性ならびに有効性を示すデータに関しては独立行政法人医薬品医療機器総合機構 (PMDA) からの参加もあるスーパー特区薬事等相談会において助言していただき、審査に必要な項目を検討した。

TEC再生関節軟骨では、自動培養装置による間葉系幹細胞の培養 (ウシ胎児血清使用) では4週間で100mgの組織から最大 $2 \times 10^7$  cellsの増幅が可能であった。ヒト培養軟骨 (TEC) の安全性試験を行い、軟寒天を用いた安全性評価試験 (陰性、発熱性試験 (ウサギ) 陰性、急性全身毒性試験 (マウス) 陰性、刺激性/皮内反応試験 (ウサギ) 中等度の刺激性という結果が得られた。

PRP複合3次元骨では、テトラポッド型顆粒状人工骨 (TB: Tetrabone) を5%トレハロースに浸漬し、人工骨の表面を処理した (PRP複合3次元骨)。表面処理を施していない人工骨と表面処理をした人工骨を共にPlate rich plasma (PRP) を含む培地中に浸漬し、浸漬した人工骨及び浸漬した後の培地を用いて、MC3T3-E1細胞の増殖活性を測定した。その結果、PRP複合3次元骨を使用すると、表面処理を施していない人工骨を用いた場合に比べて、細胞増殖が有意に亢進していることが明らかとなった。次に、ラット大腿骨に円筒状の欠損を作製し、ラット骨欠損モデルを得た。ラット骨欠損モデルに人工骨を埋植して1週間飼育後、安楽殺した。 $\mu$ CTによって骨新生の程度を評価したところ、表面処理をしていない人工骨を使用した場合と比較して、PRP複合3次元骨を埋植した個体において豊富な骨新生を確認した。骨欠損部を採材して脱灰した後、組織切片を染色して新生骨が形成された部位を組織学的に調べた。その結果、新生骨形成領域は、PRP複合3次元骨を用いた条件において有意に上昇していた。ウサギ大腿骨の遠位に直径 5 mm, 深さ 8 mmの円筒状欠損を作製し、人工骨を埋植して現在経過観察中である。さらにイヌ大腿骨の内側顆に外側に向けて直径 10 mmの貫通性円筒状欠損を作製した。自然経過を観察するために、8週間飼育した後、最大圧縮強度を測定したところ、正常な骨に比べて、圧縮強度は78%にまで減少したままであった。

### D. 考察

われわれは、3次元再生軟骨、TEC再生関節軟骨、PRP複合3次元骨の医師主導治験を実施し、この再生組織を産業化することを最終目標としている。そのため、同再生組織の安全性・有効性のエビデンス (GLP準拠) および製造体制 (GMP準拠) を確立し、治験開始に必要な品質および安全性の確認 (厚生労働省への確認申請) を行い、確認申請承認を受けることを目指している。そのためには、厚生労働省の指針「ヒト (自己) 由来細胞や組織を加工した医薬品又は医療機器の品質及び安全性の確保について」(薬食発第 0208003 号平成 20 年 2 月 8 日) に基づき、安全性・有効性のデータ収集することは必須である。

平成 21 年度に、3次元再生軟骨組織における安全性・有効性のデータを収集したことにより、今後さらに、医師主導治験を実施するための確認申請への準備が加速される。医師主導治験を実施すれば、3次元再生軟骨組織安全性・信頼性が確保され、加速的な開発や円滑な企業主導治験への移行が可能となる。それによって、再生医療の発展に大きく貢献でき、大きな医学的、社会的意義を提供できると考えられる。

TEC再生関節軟骨では、TEC作成のソースとなる滑膜間葉系幹細胞は自動培養装置で効率よく増殖することが明らかとなった。本結果は自家細胞を用いたTEC作成のための工程期間の大幅な短縮に貢献するものであり、今後の臨床応用に向けた更なる改良が期待される。また安全性試験の結果は今後のPMDA審査への資料として提出予定である。

PRP複合3次元骨では、現在まで、ハイドロキシアパタイトなどから成る人工骨とPRPとを複合した骨再生療法は、期待されるほどの治療効果を上げていない。この理由として、PRP中に含まれるTGF- $\beta$ やFGFといった成長因子が、人工骨表面に吸着され、放出されないことが原因として考えられている。我々は、人工骨表面をトレハロースで処理をすることによって、PRPの有効成分の吸着を抑制し、放出を促進する人工骨の作製を試みた。PRP含有培地に浸漬した表面処理人工骨及び浸漬後の残余の培地を用いた実験から、マウス骨芽細胞の増殖活性は有意に上昇した。この結果は、PRPの有効成分の人工骨への吸着がトレハロースの表面処理により抑制され、かつ人工骨からのPRPの有効成分の徐放が適切になされたことを示唆している。さらに、ラット骨欠損モデルを用いたin vivo解析によって、トレハロース表面処理が骨新生促進効果を示すことが明らかとなった。この結果により、PRP複合3次元骨の骨欠損部への臨床応用の可能性が示唆された。

#### E. 結論

再生軟骨組織に用いる足場素材及び細胞の安全性を、GMP準拠で確認した。また、細胞プロセッシングセンターにおける製造体制を検討し、治験薬GMP準拠となるよう設備、体制を整備した。さらに、ビーグルを用いた自家軟骨細胞移植の実験で、有効性を示した。

TEC再生関節軟骨に関しては、滑膜間葉系幹細胞の増殖を従来比（牛血清使用時）で数倍亢進させる無血清培地の開発に成功した。また、安全性試験として軟寒天培養・発熱性試験・急性全身毒性試験・刺激性/皮内反応試験・血液適合試験・細胞毒性試験を行い、良好な結果を得た。

PRP複合3次元骨の骨芽細胞増殖活性上昇効果及びラット骨欠損における骨新生促進効果を示されたことにより、臨床応用の可能性が示された。

#### F. 健康危機情報

特記事項なし。

#### G. 研究発表

##### <論文発表>

1. Nakajima K, Komiyama Y, Hojo H, Ohba S, Yano F, Nishikawa N, Aburatani H, Takato T, Chung U. Enhancement of bone formation ex vivo and in vivo by a helioxanthin-derivative. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;395:502-508.
2. Tanaka Y, Yamaoka H, Nishizawa S, Nagata S, Ogasawara T, Asawa Y, Fujihara Y, Takato T, Hoshi K. The optimization of porous polymeric scaffolds for chondrocyte-atelocollagen based tissue-engineered cartilage. *Biomaterials* 2010;31:4506-16.
3. Yamaoka H, Tanaka Y, Nishizawa S, Asawa Y, Takato T, Hoshi K. The application of atelocollagen gel in combination with porous scaffolds for cartilage tissue engineering and its suitable conditions. *J Biomed Mater Res A* 2010;93:123-32.

##### <学会発表>

1. 星 和人, 高戸 毅. 生分解性ポリマー足場素材を用いた3次元再生軟骨の研究開発. 第9回日本再生医療学会総会 2010年3月18日 広島.
2. 藤原 夕子, 岩田 くみ子, 小笠原 徹, 高戸 毅, 星 和人. 軟骨再生過程で軟骨細胞に発現する Fas ligand の機能解析. 第9回日本再生医療学会総会 2010年3月18日 広島.
3. 浅輪 幸世, 根本 淳司, 中川 匠, 藤原 夕子, 高戸 毅, 星 和人. ヒト関節軟骨細胞の表面マーカーと基質産生の相関解析. 第9回日本再生医療学会総会 2010年3月18日 広島.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
特に無し
2. 実用新案登録  
特に無し
3. その他  
特に無し

厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）  
 （総括・分担）研究報告書

「臨床試験の企画・支援」に関する研究

研究分担者 荒川 義弘 東京大学医学部附属病院准教授

研究要旨 本研究は、3次元再生組織の医師主導治験を実施し、この再生組織を産業化することを最終目標として、治験開始に必要な品質および安全性の確認（厚生労働省への確認申請）を行い、確認申請承認を受けることを目的としている。そのため平成21年度には、3次元再生組織の医師主導治験を実施するにあたり、必要な安全性試験、有効性試験の項目を検討した。

A. 研究目的

本研究は、3次元再生軟骨の医師主導治験を実施し、この再生組織を産業化することを最終目標として、治験開始に必要な品質および安全性の確認（厚生労働省への確認申請）を行い、確認申請承認を受けることを目的としている。

B. 研究方法

3次元再生組織の医師主導治験を実施するにあたり、必要な安全性試験、有効性試験の項目を検討した。

C. 研究結果

臨床安全性試験に関しては、足場素材に対する安全性試験が重要であると思われた。足場素材（ポリ乳酸多孔体、PLLA）の安全性試験に関しては、抽出方法確認試験、細胞毒性試験、細胞を用いる復帰突然変異試験、などが必要と思われた。

細胞の安全性試験に関しては、培養後の染色体検査（G band）が必要と思われた。

有効性に関しては、ビーグルなどを用いた自家細胞移植の実験系を用い、組織再生、機能再建、などの評価が必要と思われた。

なお、これらの安全性ならびに有効性を示すデータに関しては独立行政法人医薬品医療機器総合機構（PMDA）からの参加もあるスーパー特区薬事等相談会において助言していただき、これらの助言と合わせ、審査に必要な項目を検討した。

D. 考察

われわれは、3次元再生組織の医師主導治験を実施し、この再生組織を産業化することを最終目標としている。産業化には薬事承認が必要であり治験を実施する必要がある。治験開始には、確認申請承認を受けなければならない。そのため、同再生組織の安全性・有効性のエビデンス（GLP 準拠）および製造体制（GMP 準拠）を確立し、治験開始に必要な品質および安全性の確認（厚生労働省への確認申請）を行う必要がある。

確認申請には、厚生労働省の指針「ヒト（自己）由来細胞や組織を加工した医薬品又は医療機器の品質及び安全性の確保について」（薬食発第0208003号平成20年2月8日）に基づき、安全性・有効性のデータ収集することが必須である。本年度は、3次元再生軟骨組織における安全性・有効性のデータを収集したことにより、今後さらに、医師主導治験を実施するための確認申請への準備が加速されると思われる。医師主導治験を実施し、3次元再生軟骨組織安全性・信頼性が確保されるよう、臨床研究の側面から引き続き、企画、支援を行う。

<p>E. 結論  3次元再生組織の医師主導治験を実施するにあたり、必要な安全性試験、有効性試験の項目を検討した。引き続き、臨床研究の側面から、企画、支援を行う。</p> <p>F. 健康危機情報  総括研究報告書参照。</p> <p>G. 研究発表  &lt;論文発表&gt;  1. 荒川義弘：はじめにーハイレベルの臨床研究基盤構築を目指してー。短期集中連載「欧州臨床試験の最前線ーUHCTアライアンス-EFPIA Japan共同欧州施設訪問から学ぶー」（荒川義弘企画）、医薬ジャーナル46(2), 71-72 (2010)  2. 野崎浩二、渡部歌織、荒川義弘：欧州における国際連携の現状と臨床試験の推進策。短期集中連載「欧州臨床試験の最前線ーUHCTアライアンス-EFPIA Japan共同欧州施設訪問から学ぶー」（荒川義弘企画）、医薬ジャーナル46(2), 73-79 (2010)</p> <p>&lt;学会発表&gt;  1. 荒川義弘：東大病院における研究者主導臨床試験の支援体制整備。第1回日本臨床試験研究会学術集会 2010. 1. 22 (東京)。  2. 荒川義弘：臨床研究における倫理審査委員会の役割。日本病院薬剤師会治験セミナー。2010. 1. 16 (東京)、2010. 2. 13 (大阪)。  3. 荒川義弘：東京大学医学部附属病院での治験の実施体制。みえ治験医療ネット第7回治験推進シンポジウム。2010. 1. 28 (三重大学、津)。  4. 荒川義弘：医療機関における国際共同治験実施上の課題。第6回医薬品評価フォーラム。2010. 2. 15 (東京)。  5. 荒川義弘：Trials and Ethics. 先端創薬科学講座セミナーコース。(財)薬学振興会 2010. 3. 5 (東大病院)。  6. 荒川義弘：臨床研究の問題点と研究者主導臨床試験の支援。(シンポジウム3)日本におけるトランスレーショナルリサーチの方法論、問題点。第47回日本臨床分子医学会学術集会。2010. 4. 11 (東京フォーラム)。</p>	<p>H. 知的財産権の出願・登録状況  1. 特許取得  特に無し  2. 実用新案登録  特に無し  3. その他  特に無し</p>
--	---

「3次元骨の製造およびデータ収集」に関する研究

研究分担者 鄭 雄一 東京大学大学院工学系研究科（医学系研究科兼任）教授

研究要旨 テトラポッド型顆粒状人工骨を、健常人静脈血から調製したPRP（platelet rich plasma）中に浸漬しPRP複合3次元骨を得た。PRP複合3次元骨による細胞増殖活性への効果を調査し、有効性を確認した。PRP複合3次元骨をラット大腿骨欠損モデルへと埋植し、骨新生の増加を確認した。現在、人工骨をウサギ及びイヌに埋植し、解析を進めている。

A. 研究目的

PRP3次元骨の有効性・安全性に関するエビデンスを揃え、建造体制を確立することを目的とする

B. 研究方法

テトラポッド型顆粒状人工骨に5%トレハロース表面処理を行い、健常人静脈血から採取し調製したPRPを含む培地中にこの人工骨を浸漬し、PRP複合3次元骨を作製した。

マウス骨芽様細胞株（MC3T3-E1）にPRP複合3次元骨を添加し、細胞増殖活性をCell counting kit-8（同仁化学）を用いて評価した。次にラット大腿骨骨幹端に円筒状欠損（直径 2mm, 深さ 2.5 mm）を作製して、PRP複合3次元骨を埋植し、1週間後に $\mu$ -CT（SMX-90CT, 島津）を撮影することによって骨新生促進効果を評価した。採材した骨欠損部をプランクリュクロ法によって脱灰した後、組織切片を作製しHE染色（ヘマトキシリン・エオシン染色）して組織学的に評価することも試みた。

ウサギ及びイヌに大腿骨欠損（ウサギ：大腿骨遠位, 直径 5 mm, 深さ 8 mm, イヌ：大腿骨内側顆, 直径 10 mm, 貫通性）を作製して、PRP複合3次元骨を評価するための骨欠損モデルを作製した。イヌ骨欠損モデルに関しては、骨欠損部の最大圧縮強度を測定機（3365, INSTRON）を用いて測定した。

（倫理面への配慮）

本研究の動物実験プロトコールに関しては、国の「動物の保護及び管理に関する法律」及び東京大学動物実験実施規則、東京大学動物実験実施マニュアルに従い、動物愛護の観点に十分留意して行った。

C. 研究結果

テトラポッド型顆粒状人工骨（TB: Tetrabone）を5%トレハロースに浸漬し、人工骨の表面を処理した（PRP複合3次元骨）。表面処理を施していない人工骨と表面処理をした

人工骨と共にPlate rich plasma（PRP）を含む培地中に浸漬し、浸漬した人工骨及び浸漬した後の培地を用いて、MC3T3-E1細胞の増殖活性を測定した。その結果、PRP複合3次元骨を使用すると、表面処理を施していない人工骨を用いた場合に比べて、細胞増殖が有意に亢進していることが明らかとなった（図1）。

次に、ラット大腿骨に円筒状の欠損を作製し、ラット骨欠損モデルを得た。ラット骨欠損モデルに人工骨を埋植して1週間飼育後、安楽殺した。 $\mu$ CTによって骨新生の程度を評価したところ、表面処理をしていない人工骨を使用した場合と比較して、PRP複合3次元骨を埋植した個体において豊富な骨新生を確認した（図2）。骨欠損部を採材して脱灰した後、組織切片を染色して新生骨が形成された部位を組織学的に調べた。その結果、新生骨形成領域は、PRP複合3次元骨を用いた条件において有意に上昇していた（図3）。

ウサギ大腿骨の遠位に直径 5 mm, 深さ 8 mm の円筒状欠損を作製し、人工骨を埋植して現在経過観察中である（図4）。さらにイヌ大腿骨の内側顆に外側に向けて直径 10 mmの貫通性円筒状欠損を作製した（図5）。自然経過を観察するために、8週間飼育した後、最大圧縮強度を測定したところ、正常な骨に比べて、圧縮強度は78%にまで減少したままであった。

D. 考察

現在まで、ハイドロキシアパタイトなどから成る人工骨とPRPとを複合した骨再生療法は、期待されるほどの治療効果を上げていない。この理由として、PRP中に含まれるTGF- $\beta$ やFGFといった成長因子が、人工骨表面に吸着され、放出されないことが原因として考えられている。我々は、人工骨表面をトレハロースで処理をすることによって、PRPの有効成分の吸着を抑制し、放出を促進する人工骨の作製を試みた。

PRP含有培地に浸漬した表面処理人工骨及び浸漬後の残余の培地を用いた実験から、マウス骨芽様細胞の増殖活性は有意に上昇し



た。この結果は、PRPの有効成分の人工骨への吸着がトレハロースの表面処理により抑制され、かつ人工骨からのPRPの有効成分の徐放が適切になされたことを示唆している。さらに、ラット骨欠損モデルを用いたin vivo解析によって、トレハロース表面処理が骨新生促進効果を示すことが明らかとなった。この結果により、PRP複合3次元骨の骨欠損部への臨床応用の可能性が示唆された。

#### E. 結論

PRP複合3次元骨の骨芽細胞増殖活性上昇効果及びラット骨欠損における骨新生促進効果が示されたことにより、臨床応用の可能性が示された。

#### F. 健康危機情報

総括研究報告書参照。

#### G. 研究発表

<論文発表>

1. Nakajima K, Komiyama Y, Hojo H, Ohba S, Yano F, Nishikawa N, Aburatani H, Takato T, Chung U. Enhancement of bone formation ex vivo and in vivo by a helioxanthin-derivative. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;395:502-508.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
特に無し
2. 実用新案登録  
特に無し
3. その他  
特に無し

(図)

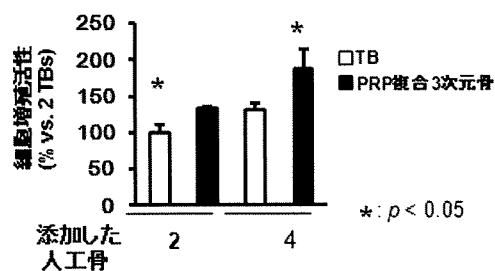


図1 人工骨の細胞増殖活性

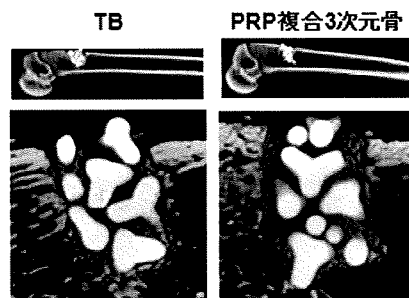


図2 ラット骨欠損モデルにおける新生骨形成 ( $\mu$ -CT画像)

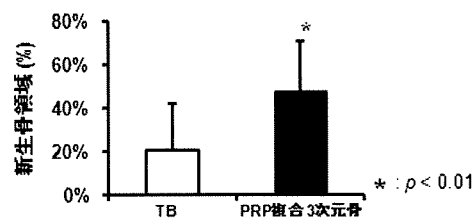


図3 組織画像を用いて定量した新生骨形成領域

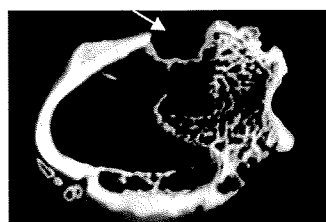


図4  $\mu$ -CT 画像におけるウサギ骨欠損モデル (矢印: 欠損部)



図5 イヌ骨欠損モデル (上: X線画像, 下:  $\mu$ -CT画像, 矢印: 欠損部)

「3次元皮下軟骨の製造およびデータ収集」に関する研究

研究分担者 星 和人 東京大学大学院医学系研究科 特任准教授

**研究要旨** 本研究は、3次元再生軟骨の医師主導治験を実施し、この再生組織を産業化することを最終目標として、治験開始に必要な品質および安全性の確認（厚生労働省への確認申請）を行い、確認申請承認を受けることを目的としている。そのため平成21年度には、厚生労働省の指針に基づき、安全性・有効性のデータを収集した。第一に、足場素材（ポリ乳酸多孔体、PLLA）の製造方法を確定し、抽出方法確認試験、細胞毒性試験、細胞を用いる復帰突然変異試験、を行った。すべてGLP準拠で行い、安全であることを確認した。また、細胞の安全性試験として培養後の染色体検査（G band）を行ったところ、安全であると思われた。また、細胞プロセッシングセンターにおける製造体制を検討し、治験薬GMP準拠となるよう設備、体制を整備した。さらに、ビーグルを用いた自家軟骨細胞移植の実験を行い、3次元形状や力学強度など、生体軟骨に遜色ないという結果を得た。

A. 研究目的

本研究は、3次元再生軟骨の医師主導治験を実施し、この再生組織を産業化することを最終目標として、治験開始に必要な品質および安全性の確認（厚生労働省への確認申請）を行い、確認申請承認を受けることを目的としている。

B. 研究方法

3次元再生皮下軟骨の医師主導治験を実施するにあたり、必要な安全性試験のうち、特に重要な足場素材に対する安全性試験を行った。まず、足場素材（ポリ乳酸多孔体、PLLA）の製造方法を *in vitro* および *in vivo* の実験で確定し、そのプロトコールにしたがって製造した PLLA の抽出方法確認試験、細胞毒性試験、細胞を用いる復帰突然変異試験、を行った。細胞の安全性試験として培養後の染色体検査（G band）を行った。有効性に関しては、ビーグルを用いた自家軟骨細胞移植の実験系を用い、採取した耳介軟骨細胞を用いて3次元再生皮下軟骨を作製し、同一個体に皮下移植する実験系を用い、生体内3次元形状や生体内力学強度などを評価した。

（倫理面への配慮）

本研究の動物実験プロトコールに関しては、国の「動物の保護及び管理に関する法律」及び東京大学動物実験実施規則、東京大学動物実験実施マニュアルに従い、動物愛護の観点に十分留意して行った。

C. 研究結果

*In vitro* および *in vivo* の実験で確定した足場素材（ポリ乳酸多孔体、PLLA）の製造方法に従い製造した PLLA に関して、抽出方法確認試験、細胞毒性試験、細胞を用いる復帰突然変異試験、GLP準拠で行い、安全性を確認した。

また、細胞の安全性に関して、培養後の染色体検査（G band）を実施し、安全であることを確認した。製造安全性を確立するため、細胞プロセッシングセンターにおける製造体制を検討し、治験薬GMP準拠となるよう設備、体制を整備した。また、有効性を評価するため、ビーグルを用いた自家軟骨細胞移植の実験を上記プロトコールに基づき行った。採取した耳介軟骨細胞を用いて3次元再生皮下軟骨を作製し、同一個体に皮下移植する実験系で、3次元形状や力学強度などを評価し、生体軟骨に遜色ないという結果を得た。

なお、これらの安全性ならびに有効性を示すデータに関しては独立行政法人医薬品医療機器総合機構（PMDA）からの参加もあるスーパー特区薬事等相談会において助言していただき、審査に必要な項目を検討した。

D. 考察

われわれは、3次元再生軟骨の医師主導治験を実施し、この再生組織を産業化することを最終目標としている。そのため、同再生組織の安全性・有効性のエビデンス（GLP準拠）および製造体制（GMP準拠）を確立し、治験開始に必要な品質および安全性の確認（厚生労働省への確認申請）を行い、確認申請承認を受けることを目指している。そのためには、厚生労働省の指針「ヒト（自己）由来細胞や組織を加工した医薬品又は医療機器の品質及び安全性の確保について」（薬食発第0208003号平成20年2月8日）に基づき、安全性・有効性のデータ収集することは必須である。平成21年度に、3次元再生軟骨組織における安全性・有効性のデータを収集したことにより、今後さらに、医師主導治験を実施するための確認申請への準備が加速される。

医師主導治験を実施すれば、3次元再生軟骨組織安全性・信頼性が確保され、加速的な開発や円滑な企業主導治験への移行が可能となる。それによって、再生医療の発展に大きく貢献でき、大きな医学的、社会的意義を提供できると考えられる。

#### E. 結論

再生軟骨組織に用いる足場素材及び細胞の安全性を、GMP準拠で確認した。また、細胞プロセッシングセンターにおける製造体制を検討し、治験薬GMP準拠となるよう設備、体制を整備した。さらに、ビーグルを用いた自家軟骨細胞移植の実験で、有効性を示した。

#### F. 健康危機情報

総括研究報告書参照。

#### G. 研究発表

##### <論文発表>

1. Tanaka Y, Yamaoka H, Nishizawa S, Nagata S, Ogasawara T, Asawa Y, Fujihara Y, Takato T, Hoshi K. The optimization of porous polymeric scaffolds for chondrocyte-atelocollagen based tissue-engineered cartilage. *Biomaterials* 2010;31:4506-16.
2. Yamaoka H, Tanaka Y, Nishizawa S, Asawa Y, Takato T, Hoshi K. The application of atelocollagen gel in combination with porous scaffolds for cartilage tissue engineering and its suitable conditions. *J Biomed Mater Res A* 2010;93:123-32.

##### <学会発表>

1. 星 和人, 高戸 毅. 生分解性ポリマー足場素材を用いた3次元再生軟骨の研究開発. 第9回日本再生医療学会総会 2010年3月18日 広島.
2. 藤原 夕子, 岩田 くみ子, 小笠原 徹, 高戸 毅, 星 和人. 軟骨再生過程で軟骨細胞に発現する Fas ligand の機能解析. 第9回日本再生医療学会総会 2010年3月18日 広島.
3. 浅輪 幸世, 根本 淳司, 中川 匠, 藤原 夕子, 高戸 毅, 星 和人. ヒト関節軟骨細胞の表面マーカーと基質産生の相関解析. 第9回日本再生医療学会総会 2010年3月18日 広島.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
特に無し
2. 実用新案登録  
特に無し
3. その他  
特に無し

「3次元関節軟骨の臨床支援」に関する研究

研究分担者 吉川 秀樹 大阪大学大学院医学系研究科 教授

研究要旨

- ① ヒト滑膜間葉系幹細胞由来三次元人工組織（TEC）の安全性試験の統括を行った。  
軟寒天を用いた安全性評価試験 陰性  
陽性の対照群として設定した Hela 細胞では軟寒天中に腫瘍性コロニーの形成を確認したが、培養軟骨群では確認できなかった。  
発熱性試験（ウサギ） 陰性  
培養軟骨を投与したウサギにおいて、体温の上昇が見られなかった。  
急性全身毒性試験（マウス）  
培養軟骨を投与したマウスにおいて、一般状態、体重、病理解剖結果に毒性は見られなかった。  
刺激性/皮内反応試験（ウサギ） 中等度の刺激性  
培養軟骨を投与したウサギにおいて、投与後の体重減少及び投与部位に紅斑及び浮腫が見られた。
- ② 染色体解析（平成22年度実施）のための資料収集を行った。

A. 研究目的

3次元軟骨・骨再生組織の安全性・有効性のエビデンス（GLP準拠）および製造体制（GMP準拠）を確立することを目的とし、そのデータ収集を行う。

B. 研究方法

TECの安全性を確認するため、軟寒天培養・発熱性試験・急性全身毒性試験・刺激性/皮内反応試験・血液適合試験・細胞毒性試験を委託にて行う。併せて染色体試験実施のための評価項目の検討を行う。

（倫理面への配慮）

本研究の動物実験プロトコールに関しては、国の「動物の保護及び管理に関する法律」及び大阪大学動物実験実施規則、大阪大学動物実験実施マニュアルに従い、動物愛護の観点に十分留意して行った。

C. 研究結果

ヒト培養軟骨（TEC）の安全性試験に係る請負業務

軟寒天を用いた安全性評価試験 陰性  
発熱性試験（ウサギ） 陰性  
急性全身毒性試験（マウス） 陰性  
刺激性/皮内反応試験（ウサギ） 中等度の刺激性

D. 考察

安全性試験の結果は今後のPMDA審査への資料として提出予定である。

E. 結論

安全性試験

軟寒天培養・発熱性試験・急性全身毒性試験・刺激性/皮内反応試験・血液適合試験・細胞毒性試験を行い、良好な結果を得た。

F. 健康危機情報

総括研究報告書参照。

G. 研究発表

<論文発表>  
特になし  
<学会発表>  
特になし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
特になし
2. 実用新案登録  
特になし
3. その他  
特になし

「3次元関節軟骨の製造およびデータ収集」に関する研究

研究分担者 中村 憲正 大阪大学床医工学融合研究教育センター 招聘教授

研究要旨

- ① 自動培養装置による間葉系幹細胞の培養（ウシ胎児血清使用）では4週間で100mgの組織から最大  $2 \times 10^7$  cells の増幅が可能であった。
- ② ヒト滑膜間葉系幹細胞由来三次元人工組織（TEC）の安全性試験の統括を行った。  
軟寒天を用いた安全性評価試験 陰性  
陽性の対照群として設定した HeLa 細胞では軟寒天中に腫瘍性コロニーの形成を確認したが、培養軟骨群では確認できなかった。  
発熱性試験（ウサギ） 陰性  
培養軟骨を投与したウサギにおいて、体温の上昇が見られなかった。  
急性全身毒性試験（マウス）  
培養軟骨を投与したマウスにおいて、一般状態、体重、病理解剖結果に毒性は見られなかった。  
刺激性/皮内反応試験（ウサギ） 中等度の刺激性  
培養軟骨を投与したウサギにおいて、投与後の体重減少及び投与部位に紅斑及び浮腫が見られた。

A. 研究目的

3次元軟骨・骨再生組織の安全性・有効性のエビデンス（GLP準拠）および製造体制（GMP準拠）を確立することを目的とし、そのデータ収集を行う。

B. 研究方法

自動培養装置を用いて、安定的にTECを供給できる自動培養技術を開発する。合わせて、TECの安全性を確認するため、軟寒天培養・発熱性試験・急性全身毒性試験・刺激性/皮内反応試験・血液適合試験・細胞毒性試験を委託にて行う。

（倫理面への配慮）

本研究の動物実験プロトコールに関しては、国の「動物の保護及び管理に関する法律」及び大阪大学動物実験実施規則、大阪大学動物実験実施マニュアルに従い、動物愛護の観点に十分留意して行った。

C. 研究結果

- ① 自動培養装置による間葉系幹細胞の培養（ウシ胎児血清使用）では4週間で100mgの組織から最大  $2 \times 10^7$  cells の増幅が可能であった。
- ② ヒト培養軟骨（TEC）の安全性試験に係る請負業務  
軟寒天を用いた安全性評価試験 陰性  
発熱性試験（ウサギ） 陰性  
急性全身毒性試験（マウス） 陰性  
刺激性/皮内反応試験（ウサギ） 中等度の刺激性

D. 考察

TEC 作成のソースとなる滑膜間葉系幹細胞は自動培養装置で効率よく増殖することが明らかとなった。本結果は自家細胞を用いた TEC 作成のための工程期間の大幅な短縮に貢献するものであり、今後の臨床応用に向けた更なる改良が期待される。また安全性試験の結果は今後のPMDA 審査への資料として提出予定である。

E. 結論

1. 滑膜間葉系幹細胞の増殖を従来比（牛血清使用時）で数倍亢進させる無血清培地の開発に成功した。

2. 安全性試験

軟寒天培養・発熱性試験・急性全身毒性試験・刺激性/皮内反応試験・血液適合試験・細胞毒性試験を行い。良好な結果を得た。

F. 健康危機情報

総括研究報告書参照。

G. 研究発表

<論文発表>

特になし

<学会発表>

特になし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特に無し

2. 実用新案登録

特に無し

3. その他

特に無し

「再生組織の製造管理・支援」に関する研究

名井 陽 大阪大学医学部附属病院未来医療センター 准教授

研究要旨

自動培養装置による間葉系幹細胞の培養（ウシ胎児血清使用）では 4 週間で 100mg の組織から最大  $2 \times 10^7$  cells の増幅が可能であった。さらに無血清培地を用いた培養によりウシ胎児血清使用時に比較して数倍の増殖亢進効果を持つことを確認した。

A. 研究目的

3次元軟骨・骨再生組織の安全性・有効性のエビデンス（GLP準拠）および製造体制（GMP準拠）を確立することを目的とし、そのデータ収集を行う。

B. 研究方法

自動培養装置を用いて、安定的にTECを供給できる自動培養技術を開発する。合わせて、間葉系幹細胞の効率的な増幅のための無血清培地の役割を検討する。

（倫理面への配慮）

本研究の動物実験プロトコールに関しては、国の「動物の保護及び管理に関する法律」及び大阪大学動物実験実施規則、大阪大学動物実験実施マニュアルに従い、動物愛護の観点に十分留意して行った。

C. 研究結果

- ③ 自動培養装置による間葉系幹細胞の培養（ウシ胎児血清使用）では 4 週間で 100mg の組織から最大  $2 \times 10^7$  cells の増幅が可能であった。
- ④ 無血清培地はウシ胎児血清に比して数倍の間葉系幹細胞増殖促進効果を確認した。

D. 考察

TEC 作成のソースとなる滑膜間葉系幹細胞は自動培養装置、および無血清培地の使用下で効率よく増殖することが明らかとなった。本結果は自家細胞を用いた TEC 作成のための工程期間の大幅な短縮に貢献するものであり、今後の臨床応用に向けた更なる改良が期待される。

E. 結論

1. 滑膜間葉系幹細胞の増殖を従来比（牛血清使用時）で数倍亢進させる無血清培地の開発に成功した。
2. 無血清培地はウシ胎児血清に比して数倍の間葉系幹細胞増殖促進効果を認めた。

F. 健康危機情報

総括研究報告書参照。

G. 研究発表

<論文発表>  
特になし  
<学会発表>  
特になし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
特になし
2. 実用新案登録  
特になし
3. その他  
特になし

## 研究成果の刊行に関する一覧表

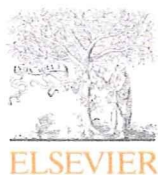
## 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
なし							

## 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Nakajima K, Komiya Y, Hojo H, Ohba S, Yano F, Nishikawa N, Aburatani H, Takato T, Chung U.	Enhancement of bone formation ex vivo and in vivo by a helioxanthin-derivative	Biochem Biophys Res Commun	395	502-508	2010
Tanaka Y, Yamaoka H, Nishizawa S, Nagata S, Ogasawara T, Asawa Y, Fujihara Y, Takato T, Hoshi K.	The optimization of porous polymeric scaffolds for chondrocyte-atelocollagen based tissue-engineered cartilage	Biomaterials	31	4506-16	2010
Yamaoka H, Tanaka Y, Nishizawa S, Asawa Y, Takato T, Hoshi K	The application of atelocollagen gel in combination with porous scaffolds for cartilage tissue engineering and its suitable conditions	J Biomed Mater Res A	93	123-32	2010
荒川義弘	はじめにーハイレベルの臨床研究基盤構築を目指してー. 短期集中連載「欧州臨床試験の最前線ーUHCTアライアンスーEFPIA Japan共同欧州施設訪問から学ぶー」(荒川義弘企画)	医薬ジャーナル	46	71-72	2010
野崎浩二、 渡部歌織、 荒川義弘	欧州における国際連携の現状と臨床試験の推進策. 短期集中連載「欧州臨床試験の最前線ーUHCTアライアンスーEFPIA Japan共同欧州施設訪問から学ぶー」(荒川義弘企画)	医薬ジャーナル	46	73-79	2010





## Enhancement of bone formation *ex vivo* and *in vivo* by a helioxanthin-derivative

Keiji Nakajima<sup>a,b,1</sup>, Yusuke Komiyama<sup>a,b,1</sup>, Hironori Hojo<sup>b</sup>, Shinsuke Ohba<sup>a,b</sup>, Fumiko Yano<sup>a,b</sup>, Naoko Nishikawa<sup>c</sup>, Hiroyuki Aburatani<sup>c</sup>, Tsuyoshi Takato<sup>a</sup>, Ung-il Chung<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> Division of Sensory and Motor System Medicine, Faculty of Medicine, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan

<sup>b</sup> Center for Disease Biology and Integrative Medicine, Faculty of Medicine, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan

<sup>c</sup> Genome Science Division, Research Center for Advanced Science and Technology, The University of Tokyo, 4-6-1 Komaba, Meguro-ku, Tokyo 153-8904, Japan

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 29 March 2010

Available online 9 April 2010

#### Keywords:

Bone regeneration

Small compound

Endochondral bone formation

Intramembranous bone formation

Helioxanthin-derivative

### ABSTRACT

To effectively treat serious bone defects using bone-regenerative medicine, a small chemical compound that potentially induces bone formation must be developed. We previously reported on the osteogenic effect of 4-(4-methoxyphenyl)pyrido[4,3:4,5]thieno[2,3-b]pyridine-2-carboxamide (TH), a helioxanthin-derivative, *in vitro*. Here, we report on TH's osteogenic effects *ex vivo* and *in vivo*. TH-induced new bone formation in both calvarial and metatarsal organ cultures. A novel monitoring system of osteoblastic differentiation using MC3T3-E1 cells revealed that TH was released from  $\alpha$ -TCP bone cement and this release continued for more than one month. Lastly, the implantation of the  $\alpha$ -TCP carrier containing TH into defects in mouse skull resulted in increased new bone areas within the defects after 4 weeks. A TH-containing scaffold may help establish a more efficient bone regeneration system.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

### 1. Introduction

There are two distinct modes of osteogenesis. The first is intramembranous bone formation, during which mesenchymal cells condense and directly differentiate into osteoblasts to deposit bone matrix [1]. The second is endochondral bone formation, during which a cartilage mold is first formed from mesenchymal condensations, and then is replaced by bone and bone marrow. During endochondral bone formation, undifferentiated mesenchymal cells condense at a place where a future skeleton will form and roughly assume the future configuration. Then, cells in the core differentiate into chondrocytes. The chondrocytes in the middle stop proliferating, start enlarging, and become hypertrophic. The hypertrophic chondrocytes further differentiate, mature to mineralize their surrounding matrix, and undergo apoptosis. At the same time, perichondrial cells adjacent to the mineralized hypertrophic chondrocytes turn into osteoblasts to form a bone collar, which is the precursor of cortical bone. The mineralized cartilaginous matrix is invaded by vascular tissues and degraded by chondroclasts, which are closely related or identical to osteoclasts. Osteoblasts coming in with vascular tissues deposit bone matrix onto the degraded mineralized cartilaginous matrix to form the primary spongiosa, the precursor of trabecular bone. During this process, the hypertrophic chondrocytes play essential roles by inducing

osteogenesis and angiogenesis in adjacent tissues [1,2]. The bones of the limb, such as the femur, tibia, and metatarsus are formed through endochondral bone formation, while calvarial and maxillary bones are formed through intramembranous bone formation.

The treatment of serious bone defects, such as trauma, disease, and developmental abnormalities, remains a great challenge, and bone-regenerative medicine is expected to provide a novel treatment for these defects [3]. The local transplantation of autologous multipotent cells has been widely used for bone regeneration [3,4]. For sufficient and timely bone formation, however, the current system requires the addition of exogenous signaling factors including BMPs [5], Hedgehogs [6], Runx2 [7], transforming growth factors (TGFs) [8], fibroblast growth factors (FGFs) [9], and vascular endothelial growth factors (VEGFs) [10]. These factors were locally applied using direct protein delivery or viral gene delivery.

Direct protein delivery, however, generally suffers from protein instability and inadequate post-translational modifications of the recombinant protein [11]. For example, although BMPs have been studied extensively for bone regeneration, a large amount of BMP is required, and BMP-containing devices fail in a certain percentage of cases, raising concerns over cost and safety [12–14]. As Franceschi et al. pointed out, this may be a consequence of its short biological half-life [15]. As for viral gene delivery, its clinical use is severely limited due to the potential risk of immunogenic responses and difficulties in manipulation and mass production.

Thus, there is a clear need to develop small chemical compounds that directly or indirectly induce bone formation. If we are able to identify such small compounds, we may be able to broaden the sources of cells for transplantation and thereby

\* Corresponding author. Fax: +81 3 5841 1428.

E-mail address: [tei@bioeng.t.u-tokyo.ac.jp](mailto:tei@bioeng.t.u-tokyo.ac.jp) (U.-i. Chung).

<sup>1</sup> These authors contributed equally to this work.

establish a more efficient bone regeneration system. There are a limited number of reports on such anabolic agents that effectively increase bone formation. Statins [16], TAK-778 [17], and isoflavone derivatives [18,19] were reported to stimulate osteogenic differentiation, but their osteogenic activity was shown only in specific cell types including osteoblastic cells and stem cells.

By screening the small compound library of Takeda Chemical Industries, TH was found to induce alkaline phosphatase (ALP) activity in MC3T3-E1 cells. In a previous report, we confirmed that TH-induced osteoblastic differentiation *in vitro* [20]. The present study was designed to investigate TH's osteogenic effect in *near-in vivo* and *in vivo* settings.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Reagents

4-(4-Methoxyphenyl)pyrido[4,3:4,5]thieno[2,3-b]pyridine-2-carboxamide (TH) was synthesized and provided by Takeda Chemical Industries (Osaka, Japan).

### 2.2. Cell culture

The MC3T3-E1 cells were obtained from the Riken Cell Bank (Tsukuba, Japan). The MC3T3-E1 cells were maintained in 10% FBS/ $\alpha$ MEM.

### 2.3. Metatarsal organ culture

All animal experiments were performed according to the protocol approved by the Animal Care and Use Committee of the University of Tokyo. Embryonic metatarsals were dissected and cultured as described previously [21]. The second, third, and fourth metatarsals from each embryonic (E15.5) hindlimb were dissected under sterile conditions. Each metatarsal was cultured in 1 mL of MEM (Invitrogen) supplemented with 50  $\mu$ g/ml ascorbic acid, 1 mM  $\beta$ -glycerophosphate, and 0.25% fetal bovine serum in the presence or absence of TH. These metatarsals were cultured at 37 °C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> incubator for 7 days. Von Kossa staining was performed as described previously [22].

### 2.4. Calvarial organ culture

Four-day-old mice were euthanized by CO<sub>2</sub> inhalation. Calvariae were excised, and cut along the sagittal suture. Each half was placed on a stainless steel grid in a 24-well tissue culture plate containing high-glucose Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Sigma–Aldrich), 10% fetal bovine serum (FBS, Sigma–Aldrich), and 1% penicillin/streptomycin (Sigma–Aldrich) (10% FBS/DMEM). Each calvaria was cultured in the presence or absence of TH. Calvariae remained in culture for 1 day before treatment. Two weeks after treatment, Calvariae were fixed in 10% neutral-buffered formalin solution for 12 h and decalcified with 10% EDTA for 48 h. Tissue samples were then processed, paraffin-embedded, sectioned, and stained with H&E [22].

### 2.5. Osteogenic induction by TH-containing $\alpha$ -TCP carrier *in vitro*

To investigate the release profile of TH from the  $\alpha$ -TCP carrier, a carrier with or without TH was placed into a culture insert and left in the MC3T3-E1 culture. Cells were seeded in 12-well plates and maintained in  $\alpha$ -MEM containing 10% FBS and 1% penicillin/streptomycin (10% FBS/ $\alpha$ -MEM) for 24 h before stimulation. The culture medium was changed to DMEM containing 10% FBS and 1% penicillin/streptomycin at the onset of stimulation and changed every

3 days during the experiment. The carriers were transferred to a new plate on the 10th day, and the cultured plate was fixed for ALP staining. This transfer was repeated four times to estimate the profile of TH's release period. ALP staining was performed as described previously [22]; the incubation time was 15–45 min. Images were taken by a light-field microscope (Axioskop 2, Carl Zeiss) and processed by image analysis software (Axiovision, Carl Zeiss). For Quantification, 5 microscopic sites were chosen from each well. ALP positive area was determined by ImageJ (Rasband, W.S., ImageJ, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, 1997–2009.) and expressed as average value of the experimental group.

Data were expressed as means  $\pm$  standard deviation. Statistical significance was evaluated using ANOVA and Student's *t*-test for comparison.  $p < 0.05$  was interpreted to denote statistical significance.

To explore the retention of osteogenic induction stimulated by TH-containing carriers, MC3T3-E1 cells were stimulated transiently by TH. The cells were prepared and maintained as described above during the experiment. After the first 10-day culture, the carriers were removed. The plate was fixed on the 10th, 20th or 30th day thereafter, and retention of osteogenic induction was monitored by ALP staining.

### 2.6. Treatment of mouse calvarial critical-sized defect by TH-containing $\alpha$ -TCP carriers

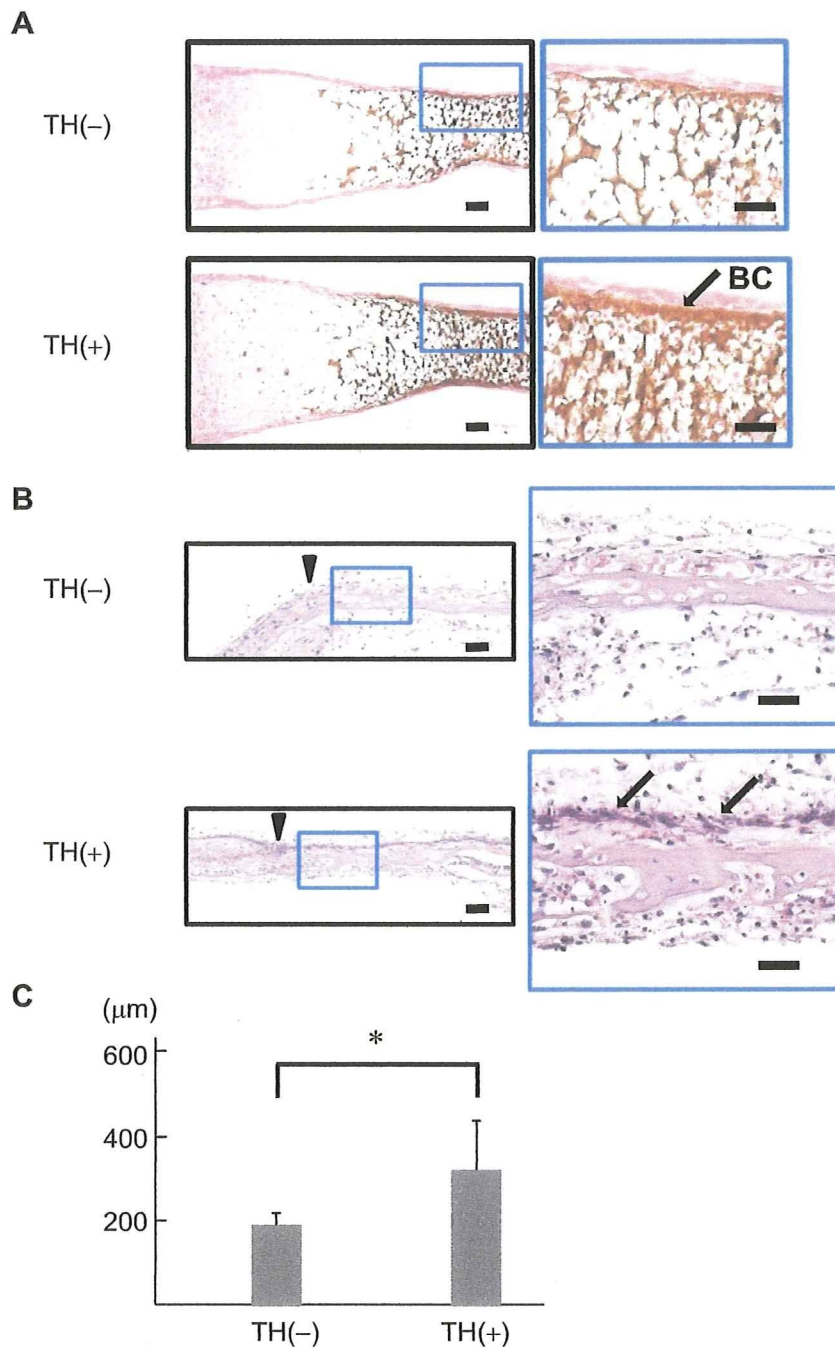
TH (1 mg or 0.1 mg/site) was manually mixed with calcium phosphate cement (Biopex-R; Mitsubishi Pharma Co., Osaka, Japan). For solidification, 233  $\mu$ L of the solution was mixed with 1.0 g of the powder, and placed in a mold to make a tablet measuring 4 mm in diameter and 1 mm in thickness. Mice were anesthetized with ketamine/xylazine (80 and 5 mg/kg) solution through intraperitoneal injection. A round craniotomy defect (4 mm in diameter) was manually created as described before [23]. A solidified carrier was placed to cover the defects. Four weeks after implantation, the mice were euthanized and the calvariae were fixed in 10% neutral-buffered formalin solution, then processed into paraffin blocks as described previously [22]. For histological analysis, consecutive specimens were obtained, and the specimens at the centers of the defects were stained with H&E.

## 3. Results

### 3.1. Osteogenic induction by TH in metatarsal and calvarial organ cultures

To examine the osteogenic effect of TH in a *near-in vivo* setting, we used a metatarsal organ culture as an example of endochondral bone formation and calvarial organ culture as an example of intramembranous bone formation. Metatarsal organ culture was performed in the presence of TH at 10<sup>-6</sup> M for 7 days. Histological analysis using Von Kossa staining revealed that TH enhanced bone collar formation (Fig. 1A).

Calvarial organ culture was performed in the presence of TH at 10<sup>-6</sup> M for 14 days. Histological analysis using H&E staining revealed that TH also enhanced the ossification of cortical bone and increased the number of osteoblast-like cells (Fig. 1B). We measured bone width near the suture of calvaria as an anatomic landmark (Fig. 1B). This quantitative analysis revealed that bone width in the TH-group was larger than that of the control group (Fig. 1C). These data suggest that TH has an osteogenic effect on both endochondral bone formation and intramembranous bone formation in a *near-in vivo* setting.

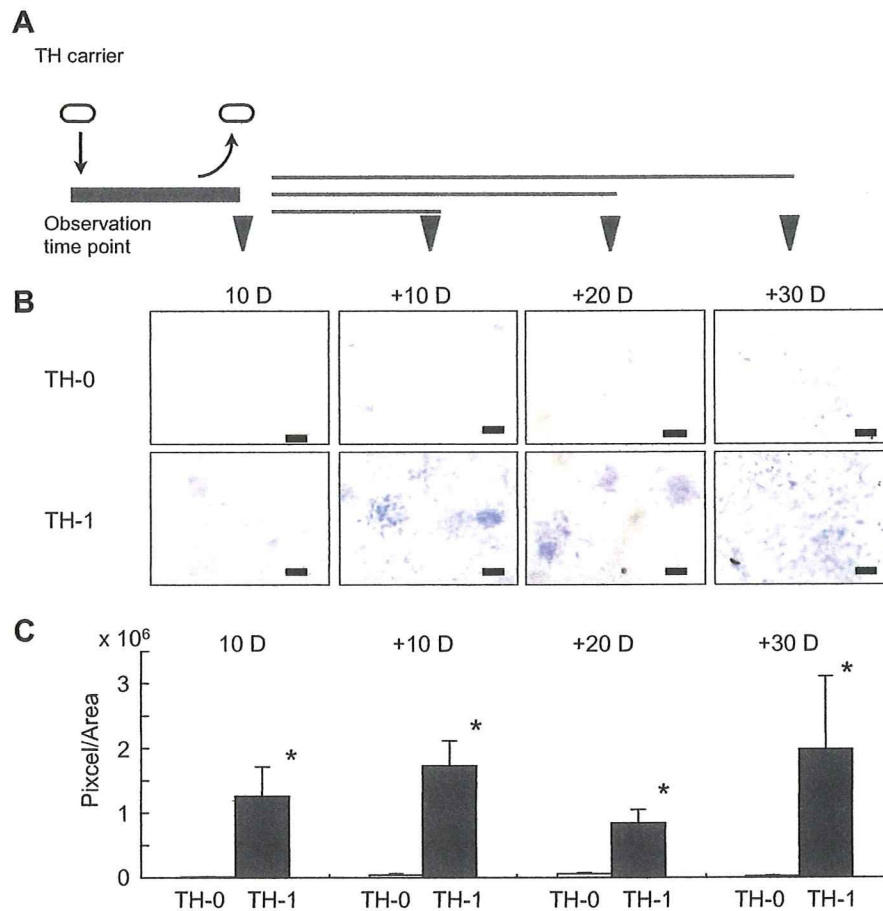


**Fig. 1.** Osteogenic induction of metatarsal and calvarial organ cultures by TH. We treated metatarsal organ culture with TH at  $10^{-6}$  M and then cultured them for 7 days. (A) Von Kossa staining of metatarsal organ cultures. BC = bone collar. We also treated calvarial organ cultures with TH at  $10^{-6}$  M and then cultured them for 14 days. (B) Hematoxylin and eosin (H&E) staining of calvarial organ cultures. Arrows show the positions of osteoblast-like cells (Ob). The sutures of calvaria are indicated by arrowheads. (C) Quantitative analysis of (B). Bone width was determined by histomorphometric analyses near the suture ( $*p < 0.05$ ). Representative images are shown ( $n = 5$ ); bar, 200  $\mu\text{m}$ .

### 3.2. Osteogenic induction by $\alpha$ -TCP carrier containing TH in MC3T3-E1 cells

To prepare for the investigation of the osteogenic effect of TH *in vivo*, we used  $\alpha$ -TCP bone cement as a carrier ( $\alpha$ -TCP carrier), which is commercially available and already used in clinical settings. To evaluate the release of TH from the  $\alpha$ -TCP carrier, MC3T3-E1 cells were cultured with the  $\alpha$ -TCP carrier containing 1 mg TH (TH-1) or no TH (TH-0) for 10 days (Fig. 2A). The osteoblastic differentiation of MC3T3-E1 cells was monitored by ALP

activity. ALP activity was increased in the culture with TH-1 but not in the culture with TH-0 (Fig. 2B and C). To analyze the retentivity of the TH-induced osteogenic effect in MC3T3-E1 cells, the TH-1 and TH-0 carriers were removed from the culture at 10 days after treatment and cells continued to be cultured for 10, 20, and 30 days. The cells stimulated with TH-1 sustained ALP activity for up to 30 days (Fig. 2B). These data suggest that TH can be released from  $\alpha$ -TCP bone cement and that TH's osteogenic effect may be sustained for as long as 30 days.



**Fig. 2.** Retentivity of osteogenesis induced by TH *in vitro*. The release of TH from  $\alpha$ -TCP carrier and the retentivity of osteogenic induction were assessed. MC3T3-E1 cells were transiently treated with TH-0 or TH-1 for only 10 days to induce osteogenesis. The culture was continued for up to 30 days without TH-0 or TH-1 to evaluate retentivity (upper panel). ALP staining at each time point is shown (lower panel). Bold line, stimulation period; arrowheads, observation time points. Representative images are shown ( $n = 3$ ); bar, 400  $\mu$ m. (C) Quantification of ALP activity. Average with standard deviation is expressed. Statistical significance to TH-0 is expressed in asterisks;  $p < 0.05$ .

### 3.3. Temporal release profile of TH from $\alpha$ -TCP carrier

To examine the temporal release profile of TH from the  $\alpha$ -TCP carrier, we established an *in vitro* monitoring system for its release (Fig. 3A). In this system, MC3T3-E1 cells were cultured for 10 days with an  $\alpha$ -TCP carrier containing TH. The carrier was transferred into newly prepared MC3T3-E1 cells every 10 days, and the osteogenic induction by TH was monitored by ALP activity.  $\alpha$ -TCP carriers containing 0.1 mg TH (TH-0.1) and 1 mg TH (TH-1) increased ALP activity at 10 days, while that containing no TH (TH-0) did not. The osteogenic induction by the TH-0.1 carrier and that by the TH-1 carrier were observed for up to 40 days (Fig. 3B and C). These data suggest that TH is gradually released from the  $\alpha$ -TCP carrier, and that the release continued for more than one month.

### 3.4. Osteogenic induction by $\alpha$ -TCP carrier containing TH in mouse calvarial critical-sized defect

To investigate TH's bone-regenerative effect *in vivo*, we used a mouse calvarial critical-sized defect as a bone defect model. A round craniotomy defect (4 mm in diameter) was created in mouse calvarial bone, and then TH-1 and TH-0 carriers were implanted into the defect site [23]. Four weeks after implantation, cortical bone formation was assessed by H&E staining. Because substantial spontaneous bone regeneration occurred at 8 weeks, but not at 4 weeks, we chose to evaluate the induction of bone formation

within 4 weeks after surgery [24]. All 5 defects implanted with TH-1 carrier showed bone tissues that substantially covered the defect site (Fig. 4A and D), marrow cavity formation (Fig. 4B and E), and enriched fibrous tissue adjacent to the carrier surface (Fig. 4C and F), whereas none of these were observed in the 5 defects of the TH-0 carrier group. These data suggest that TH is able to regenerate bone as quickly as 4 weeks *in vivo*.

### 3.5. The molecular targets of TH

In a previous study, we confirmed that TH upregulated the mRNA expression of BMPs [20]. To identify molecular targets of TH, we performed microarray analysis, which confirmed that TH upregulated SMAD signaling (Supplementary Fig. 1).

## 4. Discussion

The present study had three major findings. First, TH has an osteogenic effect on both endochondral bone formation and intramembranous bone formation in a *near-in vivo* setting. Second, TH is gradually released from the  $\alpha$ -TCP carrier, and the release continues for more than one month. Third, TH is able to regenerate bone as quickly as 4 weeks *in vivo*.

TH has an osteogenic effect on both endochondral bone formation and intramembranous bone formation in a *near-in vivo* setting. Statins, drugs widely used to lower serum cholesterol, also