

201206017A

厚生労働科学研究費補助金
(再生医療実用化研究事業)

難治性骨折（偽関節）に対するヒト骨髄細胞シート
を用いた低侵襲治療手技の開発に関する研究

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 上羽 智之

(奈良県立医科大学 整形外科学講座)

平成25（2013）年3月

厚生労働科学研究費補助金
(再生医療実用化研究事業)

難治性骨折（偽関節）に対するヒト骨髄細胞シート
を用いた低侵襲治療手技の開発に関する研究

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 上羽 智之

(奈良県立医科大学 整形外科学講座)

平成25（2013）年3月

目次

I. 総括研究報告

1. 難治性骨折（偽関節）に対するヒト骨髄細胞シートを用いた低侵襲治療手技の開発に関する研究 上羽智之

- A. 研究目的・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・1-1
- B. 研究方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・1-2
 - 1. 細胞シート作製条件の検討・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・1-2
 - 2. ノードラット大腿骨偽関節モデルの作製・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・1-2
 - 3. 細胞シート注入法の確立・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・1-2
 - 4. 倫理面での配慮・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・1-3
- C. 研究結果・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・1-3
 - 1. 細胞シート作製条件・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・1-3
 - 2. ノードラット大腿骨偽関節モデルの作製・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・1-3
 - 3. 細胞シート注入法の確立・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・1-3
- D. 考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・1-4
- E. 研究発表・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・1-4
- F. 知的財産の出願・登録状況・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・1-4
- G. 参考文献・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・1-4

II. 分担研究報告

2. ヒト骨髄間葉系幹細胞を用いた骨芽細胞シート作製の培養条件の検討 赤羽学

- A. 研究目的・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・2-1
- B. 研究方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・2-2
 - 1. ヒト骨髄間葉系細胞・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・2-2
 - 2. 細胞シート作製条件の検討（in vitro での検討）・・・・・・・・・・・・2-2
 - 3. 細胞シート作製条件の検討（in vitro での検討）・・・・・・・・・・・・2-2
 - 4. 細胞シートの骨形成能の評価（in vitro での検討）・・・・・・・・・・・・2-3
 - 5. 移植標本の骨形成能の評価・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・2-3
 - 6. 測定結果の統計学的検討・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・2-3
 - 7. 倫理面での配慮・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・2-3
- C. 研究結果・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・2-3
 - 1. in vitro での細胞シート作製条件の検討結果・・・・・・・・・・・・2-3
 - 2. 生体内での細胞シートの骨形成能の検討結果（組織像）・・・・・・・・・・2-4
 - 3. 細胞シートの骨形成能の生化学的検討結果・・・・・・・・・・・・2-4

D.	培養条件の検討結果	2-4
1.	ヒト骨髄間葉系幹細胞を用いた骨芽細胞シート作製における細胞培養条件	2-4
E.	考察	2-4
F.	研究発表	2-5
G.	知的財産の出願・登録状況	2-6
H.	参考文献	2-7
I.	図	2-8

3. 生体内における細胞シートの骨形成能および細胞シートの注入法 上羽智之

A.	研究目的	3-1
B.	研究方法	3-2
1.	ヒト骨芽細胞シートの作製方法	3-2
2.	ヒト骨芽細胞シート注入法の検討	3-2
3.	注入型骨移植法（ヒト骨芽細胞シート注入）による人工骨への骨形成能の付与	3-2
4.	皮下への注入型骨移植法による骨形成能の評価 スキャフォールドフリー ヒト骨芽細胞シートの注入移植による骨形成能の評価	3-3
5.	倫理面での配慮	3-3
C.	研究結果	3-3
1.	レントゲン撮影による骨形成評価	3-3
2.	組織像による新生骨形成の評価	3-3
D.	考察	3-3
E.	研究発表	3-4
F.	知的財産の出願・登録状況	3-4
G.	参考文献	3-4
H.	図	3-6

4. ノードラット大腿骨偽関節モデルの確立 上羽智之

A.	研究目的	4-1
B.	研究方法	4-2
1.	ノードラット偽関節モデルの作製	4-2
2.	移植標本の骨形成能の評価	4-2
3.	移植標本の骨形成能の評価	4-2
4.	3点曲げ力学的評価による偽関節の確認	4-2
C.	研究結果	4-3

1.	レントゲン画像による骨形成の維持的評価	4-3
2.	組織像	4-3
3.	力学試験結果	4-3
D.	考察	4-3
E.	研究発表	4-4
F.	知的財産の出願・登録状況	4-4
G.	参考文献	4-5
H.	図	4-6

5. ヒト細胞シート移植後のヌードラット大腿骨偽関節部の力学的評価方法の検討

森田有亮

A.	研究目的	5-1
B.	研究方法	5-2
1.	ラット大腿骨を用いた力学試験方法の検討	5-2
2.	偽関節モデルの作製	5-2
3.	ヌードラット偽関節モデルの3点曲げ試験による力学的評価	5-2
4.	μ CT撮影による偽関節の評価方法の検討	5-2
5.	力学試験結果の統計学的検討	5-2
6.	倫理面での配慮	5-3
C.	研究結果	5-3
1.	μ CT撮影による偽関節の評価結果	5-3
2.	偽関節モデルの3点曲げ試験による力学的評価の結果	5-3
D.	考察	5-3
E.	結論	5-3
F.	研究発表	5-3
G.	知的財産の出願・登録状況	5-4
H.	参考文献	5-4
I.	図	5-5

III. 研究発表に関する一覧表

IV. 研究発表に関する参考資料

厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）
代表者総括報告書

難治性骨折（偽関節）に対するヒト骨髄細胞シートを用いた低侵襲治療手技の開発に関する研究

研究代表者 上羽智之 奈良県立医科大学 整形外科 医員

研究要旨

本研究の目的は難治性骨折（偽関節症）に対する低侵襲治療法を確立することである。本研究課題では、我々が動物実験で確立してきた細胞シートを scaffold free で注入移植し新生骨形成を得る「注入型骨移植法」の手技を、将来ヒト骨髄細胞を用いた臨床例に応用できるように発展させるための基礎研究を行う。

一般的に、偽関節臨床例に対しては骨移植術と強固な再内固定が行われており、近年は低出力超音波法も併用され成績が向上している。しかし、中には長期間骨癒合が得られず日常生活に支障をきたす症例もある。低侵襲でしかも既存の治療法と併用できる新たな骨癒合促進手技が確立されれば、難治性骨折（偽関節症）の治療成績は飛躍的に向上するため、社会的ニーズは高い。

本研究の特色は、骨形成能をもつ細胞シートを偽関節部に注入移植し、骨癒合を促進させる点である。細胞シート注入は X 線透視下に偽関節部を確認し、scaffold free で行う（X 線透視下注入型骨移植）ため、scaffold による弊害がなく、低侵襲で既存の治療法にも併用できるという利点があり、偽関節が完成する前の状態（遷延治癒等）にも早期から応用できる点で独創性が高い。

期待できる成果は、難治性骨折（偽関節症）の治療成績が飛躍的に向上すると同時に、患者負担が軽減できる点である。本研究は、得られた成果を他疾患（骨壊死症や先天性下腿偽関節症等）にも応用でき、社会に還元できる運動器再生医療技術の早期臨床応用を目指す革新的治療技術開発を目指した研究である。

初年度はヒト骨髄細胞を用いて、細胞シート作製に適した培養条件を見つけ出し、その骨形成能を免疫不全動物（ヌードラット）で検証した。また今後利用する偽関節モデルヌードラットを作製した。次年度は、ヌードラットの大腿骨に作製した偽関節に対して、ヒト骨髄細胞シートを用いた X 線透視下注入型骨移植を行い、効果を検証する。

A. 研究目的

我々はこれまでの動物実験により未分化骨髄間葉系幹細胞（以下 MSC）から骨形成能を有する細胞シートを作製する方法を考案している¹⁻³。本研究ではヒト MSC で作製した細胞シート移植で、難治性骨折（偽関節）の治療が可能であるか免疫不全動物を用いて検証する。細胞シートを X 線透視下に偽関節部に注入し骨癒合を得る低侵襲な治療法を

確立する。我々はラットを用いた動物実験で、骨芽細胞シートを scaffold free で移植し、新生骨が得られることを確認し「注入型骨移植法」を確立し報告してきた^{4,5}。

H24 年度の本研究課題では、ヒト骨髄細胞シートの効率的な作製方法を検討し、その骨形成能の評価を免疫不全動物（ヌードラット）で行う。次年度ヌードラット大腿骨の偽関節にヒト細胞シートを注入するためにヌードラッ

ト大腿骨に偽関節を安定的に作製する手技を確立する。また、確立した方法で作製したヒト細胞シートを注入することで骨形成が得られるかを検証する。

B. 研究方法

B. 1. 細胞シート作製条件の検討

本研究では、ヒト骨髄細胞を Lonza 社から購入し研究をおこなった。ヒト MSC を T75 フラスコ (75cm² culture flask, Falcon, BD) で 2 週間初期培養後、35 mm 培養皿 (Falcon 35-3001, BD) にデキサメサゾン、アスコルビン酸添加培地で 14 日間培養した。播種する細胞数 (1×10⁴cell/cm² あるいは 0.5×10⁴cell/cm²) とデキサメサゾン濃度 (10 nM あるいは 100 nM) をそれぞれの組み合わせで検討し、細胞シート作製に適した条件を見出すこととした。

アスコルビン酸添加量は従来通りの 82 μg/ml とし、培養液の交換は 2 あるいは 3 日ごとに行なった。

In vitro で検討した 2 つの条件で細胞シートを作製し、それらを人工骨 (スーパーポア、直径 5 mm・高さ 2 mm の円盤状 β-リン酸 3 カルシウム β-TCP : ペンタックス社) と組み合わせて、ヌードラットの背部皮下に移植し、生体内での骨形成能の検討を行なった。細胞シートは、*In vitro* での条件検索の結果を受けて、細胞数を 0.5×10⁴cell/cm² とし、10cm ディッシュ (100 mm ディッシュ ; Falcon, BD) を用いてデキサメサゾン濃度を 10 nM と 100 nM の 2 種類で作製した。採取した細胞シートで人工骨を包むようにして作製した細胞シート・人工骨複合体をヌードラットの背部皮下に移植し、2 か月で標本を摘出し、組織学および生化学的に骨形成量を評価した。

B. 2. ヌードラット大腿骨偽関節モデルの作製

本研究では、12 週齢の雄ヌードラット (Fischer344 ラット ; F344/N Jcl-rnu/rnu) を用いた。

右大腿外側に皮膚切開し大腿骨に進入した。大腿骨の骨幹部中央をボーンソーで骨切りした後、大腿骨の転子部から顆部に付着する筋群を骨膜とともに大腿骨から剥離した後、大腿骨から全周性に切除する。さらに大腿骨骨髄も転子部から顆部まで注射針で十分に搔爬、洗浄し、骨折部の固定は K-wire (径 0.8mm) を用いた髓内釘固定を行い、これを偽関節群とした。一方、健側の大腿骨を対照群とし、比較検討を行った。評価はレントゲン、組織学および力学的に行なった。

B. 3. 細胞シート注入法の確立

7 週齢ヌードラット背部皮下へあらかじめ人工骨 (スーパーポア、直径 5 mm・高さ 2 mm の円盤状 β-リン酸 3 カルシウム β-TCP : ペンタックス社) を移植し、生体内の骨形成の検討を行なった。移植した人工骨に 10 cm 培養皿で作製したヒト骨芽細胞シートを注入移植した。さらに 6cm 培養皿で作製した細胞シートを 1 つの人工骨に対して 2 枚注入移植した。注入法は 1ml 注射器にヒト MSC から作製したヒト骨芽細胞シートを吸入しシリンジ内に充填し、0.5ml の PBS を注射器で吸引し細胞シートと混和させた。14G アンギオキャスを注射器に装着しヌードラット背部皮下へ刺入する。アンギオキャスの外筒だけ皮膚に刺したまま残し、内針とともに注射器をいったん取り除く。内針を注射器から取り外し、皮膚に刺したままの外筒に注射器を装着後、ゆっくりシリンジを加圧し、ヒト骨芽細胞シートを皮下へ注入移植した。

移植後 2 カ月で標本を摘出しレントゲン、組織学的に骨形成を評価した。

B. 4. 倫理面での配慮

本研究は市販されているヒト骨髄間葉系幹細胞を使用し、作製した骨芽細胞シートはヌードラットに移植しているため、倫理的な問題は少ない。動物実験に関しては、「動物実験施設利用者説明会」をすでに受講しており、本学の動物実験に関する規約に準じて行った。

C. 研究結果

C. 1. 細胞シート作製条件

In vitro で細胞シートを作製時のデキサメタゾン濃度を $10\mu\text{M}$ と $100\mu\text{M}$ とを比較すると、デキサメタゾン $10\mu\text{M}$ のほうが $100\mu\text{M}$ よりもオステオカルシン分泌量が多い。播種細胞密度を $1\times 10^4\text{cell}/\text{cm}^2$ と $0.5\times 10^4\text{cell}/\text{cm}^2$ とを比較すると、オステオカルシンの増加する傾向はほぼ同じであった。*In vivo* で βTCP と細胞シートを組み合わせた組織像では、デキサメタゾンの濃度によらず、いずれも良好な骨形成が見られた。摘出した βTCP と細胞シートの組み合わせでは、 βTCP 単独で移植したものより ALP およびオステオカルシンのいずれも高値を示した。デキサメタゾンの濃度で比較すると 10nM で作製した細胞シートとの組み合わせのほうが 100nM で作製した細胞シートとの組み合わせより高い値を示した。

以上により培養条件は播種細胞密度： $0.5\times 10^4\text{cell}/\text{cm}^2$ 、デキサメタゾン濃度： 10nM 、アスコルビン酸濃度： $82\mu\text{g}/\text{ml}$ で21日間の2次培養が好ましいと考えられる。

C. 2. ニードラット大腿骨偽関節モデルの作製

経時的なレントゲン像で、偽関節群は術後12週まで骨性架橋は認められなかった。組織像でもレントゲン像と同様に偽関節群では骨折部の骨性架橋を認めなかった。骨折部には繊維性組織が介在しており、骨切り後12週では骨切り部の皮質骨の萎縮を認めた。また μCT 画像でも骨切り部周囲に新生骨を認めず、骨切り部の骨癒合を認めなかった。

3点曲げ試験による力学試験では、偽関節の最大曲げ荷重は健側群と比べて有意に低かった。以上によりヌードラットの大腿骨に安定して偽関節を作製する手技を確立できた。

C. 3. 細胞シート注入法の確立

注入移植後2か月目に摘出した βTCP のレントゲン像では、注入移植した細胞シートによって形成された新生骨によると考えられる人工骨周囲の石灰化は明らかでなかった。

組織像ではデキサメタゾンの濃度による骨形成の差は認められず、いずれも良好な骨形成が確認できた。また、 10cm 培養皿や 6cm 培養皿で作製した細胞シートを注入移植しても、人工骨内に良好な骨形成が認められた。細胞播種密度を $0.5\times 10^4\text{cell}/\text{cm}^2$ とし、デキサメタゾンの濃度による骨形成の差を比較したが、組織像からは両群（デキサメタゾン濃度を 10nM あるいは 100nM ）に大きな差はなく、いずれも良好な骨形成が確認できた。細胞シートの大きさによる比較も行ったが、 6cm 培養皿で作製した細胞シートを注入しても、人工骨内に良好な骨形成が認められた。

D. 考察

我々はこれまでにラットの細胞を用いて、骨髄培養細胞をシート状に培養した「骨芽細胞シート」を作製し、注入による移植で異所性に骨形成を認め、また皮下に移植した人工骨へ細胞シートを注入すると、人工骨周囲に骨形成を認めたことを報告している^{4,5}。

本研究では、ヒト骨髄間葉系幹細胞を用いて細胞シートを作る条件を検討したところ、ラットなどの実験動物とは異なる条件であることが判明した。その条件で作製した細胞シートと人工骨を組み合わせてヌードラットに移植すると、明らかな骨形成が認められた。また、注入による細胞シートの移植でも人工骨内部に骨形成が認められた。しかし、いずれもラットなど実験動物で見られた人工骨周囲の骨形成は認められなかった。これは、本研究では10 cmディッシュを用いて作製した骨芽細胞シート1枚を人工骨と組み合わせて免疫不全動物（ヌードラット）の皮下に移植ため、通常の動物実験で用いる自家移植モデルと条件が異なることも少なからず影響していると考えられる。また、注入という行為が細胞シート自体にダメージを与えてしまうために、細胞活性が低下している可能性があるため、注射針の径を大きくするなど注入方法について、今後検討する必要があると考える。

今回の実験により、ヌードラット大腿骨偽関節モデルが確立できた。この偽関節モデルを使用することによりヒト骨芽細胞シート移植による骨癒合の効果を評価することが可能となると考えられる。今回作製したヌードラット大腿骨偽関節モデルは、今後の偽関節治療開発に有用であり、scaffold freeで偽関節部へ骨芽細胞シートを注入し骨形成が得られるかの検討が必要である。

E. 研究発表

1. 論文発表 なし

2. 学会発表

上羽智之、赤羽学、清水隆昌、中野健一、倉智彦、川手健次、田中康仁 老齢ラットにおける骨芽細胞シートの有用性 第32回整形外科バイオマテリアル研究会 2012年12月1日 東京慈恵会医科大学

内原好信、赤羽学、上羽智之、清水隆昌、倉智彦、藤間保晶、川手健次、田中康仁 培養骨芽細胞シートを用いた放射線照明白家処理骨の骨形成 第27回日本整形外科学会基礎学術集会 2012年10月26-27日 名古屋国際会議場

清水隆昌、赤羽学、上羽智之、森田有亮、粥川陽介、藤間保晶、面川庄平、城戸顕、川手健次、田中康仁 細胞シートを用いた注入型骨移植による偽関節治療 第11回日本再生医療学会総会 2012年6月13-14日 パシフィコ横浜

F. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし

2. 実用新案登録 なし

3. その他 なし

G. 参考文献

1. Akahane M, Nakamura A, Ohgushi H, Shigematsu H, Dohi Y, Takakura Y. Osteogenic matrix sheet-cell transplantation using osteoblastic cell sheet resulted in bone formation without scaffold at an ectopic site-. J Tissue Eng Regen Med. 2(4):196-201, 2008.
2. Hideki Shigematsu, Manabu Akahane, Yoshiko Dohi, Akifumi Nakamura, Hajime Ohgushi, Tomoaki Imamura and Yasuhito Tanaka. Osteogenic Potential and Histological Characteristics of Mesenchymal Stem Cell Sheet/Hydroxyapatite Constructs. The Open Tissue Eng Regen Med Journal, 2009 Oct;2: 63-70.
3. 上羽智之、赤羽学、重松秀樹、内原好信、清水隆昌、城戸颯、藤間保晶、川手健次、今村知明、田中康仁 培養細胞シートを用いた培養人工骨の骨形成 Orthopaedic Ceramic Implants 2009, 29:15-18
4. Manabu Akahane, Hideki Shigematsu, Mika Tadokoro, Tomoyuki Ueha, Tomohiro Matsumoto, Yasuaki Tohma, Akira Kido, Tomoaki Imamura and Yasuhito Tanaka : Scaffold-free cell injection results in bone formation. J Tissue Eng Regen Med. 2010; 4: 404-411.
5. M. Akahane, T. Ueha, T. Shimizu, H. Shigematsu, A. Kido, S. Omokawa, K. Kawate, T. Imamura, Y. Tanaka : Cell Sheet Injection as a Technique of osteogenic Supply. Int J of Stem Cells. Vol. 3, No. 2, 2010.

厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）
分担研究報告書

ヒト骨髄間葉系幹細胞を用いた骨芽細胞シート作製の培養条件の検討

分担研究者 赤羽 学 奈良県立医科大学 健康政策医学講座 准教授

分担研究者 城戸 顕 奈良県立医科大学 整形外科 学内講師

研究協力者 清水隆昌 奈良県立医科大学 整形外科 医員

研究要旨

骨髄間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cells; MSCs) は、デキサメサゾン、アスコルビン酸、 β グリセロリン酸を添加した培地で骨分化誘導を行うことで、骨芽細胞に分化させることが可能である。我々はこれまでに、ラットやラビットなどの実験動物を用いて、培養細胞をシート状に培養した「骨芽細胞シート」を作製し、その骨形成能を検証してきた。本研究課題では、将来の臨床応用を見据えた研究として、ヒト骨髄間葉系幹細胞を用いて、骨芽細胞シートを作製する培養条件の検討を行った。

本研究では、2種類のヒト細胞を用いて研究を行った。一つは、市販のヒト骨髄間葉系幹細胞である Lonza 社のヒト骨髄間葉系幹細胞であり、もう一つは患者から同意のもとに提供を受けた骨髄細胞である。まず、Lonza 社のヒト骨髄間葉系幹細胞を用いて、ヒト細胞の培養に適した条件の検討を行い、その後骨芽細胞シート作製条件の検討を行った。播種する細胞密度の検討では、従来動物実験で用いてきた細胞密度よりも少ない細胞数でも十分骨形成が得られることが明らかとなった。細胞シート作製時に骨芽細胞へと分化を誘導するが、それに用いるデキサメサゾン濃度は従来動物実験で用いていた濃度で（デキサメサゾン濃度：10 nM）で骨形成マーカーであるオステオカルシン分泌量の増加が見られた。以上のことから、ヒト骨髄間葉系幹細胞を用いて硬組織再生を目指す際の細胞シート作製（骨芽細胞シート）条件は、播種細胞密度： $0.5 \times 10^4 \text{ cell/cm}^2$ 、デキサメサゾン濃度：10 nM、アスコルビン酸濃度：82 $\mu\text{g/ml}$ で21日間の2次培養が好ましいと考えられる。

この条件で作製したヒト骨芽細胞シートを免疫不全動物（ヌードラット）に移植したところ、明らかな新生骨形成が見られた。今後はより大きな細胞シートを作製して細胞シート移植時に特徴的な骨形成パターンが見られるかの検討も必要であると考えられる。また、今回の検討では人工骨に組み合わせて生体に移植したが、偽関節部への骨芽細胞シートのみ移植（スキャフォールドフリーでの骨芽細胞シート移植）でも骨形成が得られるか、壊死骨と組み合わせた場合にも十分な新生骨形成が得られるかなどの検討も必要であると考えられる。

A. 研究目的

間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cells; MSCs) は骨髄内をはじめ様々な

部位に存在し、デキサメサゾン、アスコルビン酸、 β グリセロリン酸を添加した標準培地で骨分化誘導を行うことで、骨芽細胞に分化させることが可能

である¹⁻³。我々はこれまでに、ラットやラビットなどの実験動物を用いて、培養骨髄細胞と人工骨を組み合わせた「培養人工骨」の作製方法を報告してきた^{4,5}。さらに、培養細胞をシート状に培養した「骨芽細胞シート」を作製し、その骨形成能を検証してきた⁶⁻⁸。

H24年度の本研究課題では、将来の臨床応用を見据えた研究として、ヒト骨髄間葉系幹細胞を用いて、骨芽細胞シートを作製する培養条件の検討を行った。

B. 研究方法

B. 1. ヒト骨髄間葉系細胞

本研究では、2種類のヒト細胞を用いて研究を行った。一つは、市販のヒト骨髄間葉系幹細胞である Lonza 社の細胞であり、もう一つは手術患者から同意のもとに提供を受けた骨髄細胞である。

本研究課題で用いた Lonza 社の市販ヒト骨髄細胞は、20歳の女性の細胞であり、2010年8月に凍結保存された細胞 (PT-2501、0F3853) である。

また患者から提供された細胞は、後で述べるような倫理的配慮を行い、奈良県立医科大学倫理委員会であらかじめ承認を得たうえで、患者に目的を説明し同意を得た方から手術中に採取した骨髄細胞である。

B. 2. 細胞シート作製条件の検討 (*In vitro* での検討)

まず、Lonza のヒト骨髄間葉系幹細胞を用いて、ヒト細胞の培養に適した条件の検討を行った。その後、骨芽細胞シート作製条件の検討を行った。

動物モデルにおける細胞シート作製は、 1×10^4 cell/cm² の細胞密度で播種

した細胞を通常用いる培養ディッシュ (35mmディッシュ; Falcon 35-3001, BD) にデキサメサゾン、アスコルビン酸添加培地で、21日間培養後、スクレーパー (住友ベークライト MS-93100) で機械的に細胞を回収し細胞シートとして採取する。

本研究では、培養に用いるディッシュの種類やスクレーパーは動物実験と同じものを使用することとし、播種する細胞数 (1×10^4 cell/cm² あるいは 0.5×10^4 cell/cm²) とデキサメサゾン濃度 (10 nM あるいは 100 nM) をそれぞれの組み合わせで検討し、細胞シート作製に適した条件を見出すこととした (n = 4)。

アスコルビン酸添加量は従来通りの 82 μg/ml とし、培養液の交換は2あるいは3日ごとに行なった⁸。

B. 3. 細胞シート作製条件の検討 (*In vitro* での検討)

In vitro で検討した2つの条件で細胞シートを作製し、それらを人工骨 (スーパーパーポア、直径 5 mm・高さ 2 mm の円盤状 β 円リン酸 3 カルシウム β 円 TCP: ペンタックス社) と組み合わせて、ヌードラットの背部皮下に移植し、生体内での骨形成能の検討を行った。細胞シートは、*In vitro* での条件検索の結果を受けて、細胞数を 0.5×10^4 cell/cm² とし、10cm ディッシュ (100 mm ディッシュ; Falcon, BD) を用いてデキサメサゾン濃度を 10 nM と 100 nM の2種類で作製した。図1に実験条件の組み合わせを示す。

採取した細胞シートで人工骨を包むようにして作製した細胞シート・人工骨複合体をヌードラットの背部皮下に移植した (n = 4)。ヌードラットは7週齢の雄を使用した。図2にヌードラットへの移植のモデル図を示す。

移植後2か月で標本を摘出し、組織

学的小および生化学的に骨形成量を評価した。

B. 4. 細胞シートの骨形成能の評価 (*In vitro*での検討)

本研究における細胞シート移植の目的は硬組織再生であるため、骨形成能が高いことが目的にかなうものであると考え、*In vitro*でそれぞれの培養条件で作製した骨芽細胞シートの骨形成能を評価した。

骨形成マーカーであるアルカリフォスファターゼ (ALP) とオステオカルシンの mRNA 発現をリアルタイム PCR で定量し、さらに培養液中の分泌オステオカルシン量の定量を行った。

リアルタイム PCR 用のプライマーは、Applied Biosystems 社の TaqMan® Gene Expression Assays キットを使用して行った (ALP:Hs01029144、OC :Hs01587814、GAPDH : Hs02758991)。

分泌オステオカルシンの定量は、ELIZAキット (Takara MK128) を使用して定量した。

B. 5. 移植標本の骨形成能の評価

移植後 2 か月で標本を摘出し、組織学的小および生化学的に骨形成量を評価した。

摘出標本を 2 日間ホルマリン固定し、数日間脱灰した後、 β -TCP の円盤状面に平行にサンプル中央で組織切片を作製し、H-E (ヘマトキシリン・エオジン) 染色を行い組織学的に骨形成の確認を行った。生化学的評価として、アルカリフォスファターゼ (ALP) 活性の測定とオステオカルシン含有量の測定を行った。

B. 6. 測定結果の統計学的検討

それぞれの実験群の測定結果を比較するために、SPSS (IBM SPSS

Statistics Ver. 20) を用いて、ANOVA テストを行い、その後の検定を Bonferoni で実施し各群の比較を行った。p < 0.05 で統計学的有意差の検定を行った。

B. 7. 倫理面での配慮

本研究では、2 種類のヒト骨髄細胞を用いた研究を行った。一つは市販されているヒト骨髄間葉系幹細胞であるが、もう一つは手術患者から提供を受けた骨髄細胞である。

患者から提供を受けるヒト細胞を用いた研究に関しては、本学の倫理委員会に申請し承認をうけた後に行った。研究に協力していただく方々に骨髄細胞採取方法やその合併症などについての十分な説明を行い、理解していただいた上での書面による同意を得ており (インフォームド Consent)、協力者の人権や個人情報の取り扱いおよび提供していただいた細胞を扱う上での生命倫理には十分に慎重に配慮した。

なお本研究課題では、作製した骨芽細胞シートはヌードラットに移植してその骨形成能を評価するため、骨髄細胞の提供に協力していただいた患者自身に何らかの健康被害をもたらすことはない。

C. 研究結果

C. 1. *In vitro*での細胞シート作製条件の検討結果

図 3 にヒト骨髄間葉系幹細胞を用いて作製した骨芽細胞シートの外観を示す。スクレーパーではがしても細胞シートとしての形態は保持されており、ピンセットでつまんでスキュフォールドフリーで移植することも可能である。

図4に、*In vitro*でのそれぞれの培養条件下で測定された分泌オステオカルシン量の継時的結果を示す。デキサメサゾン濃度を10nMと100nMを比較すると、デキサメサゾン10nMの方が100nMよりもオステオカルシン分泌量が多い。通常、骨分化誘導を行った群（デキサメサゾン、アスコルビン酸、 β グリセロリン酸添加培地での培養）とほぼ同等量のオステオカルシンが測定されていた。播種細胞密度を $1 \times 10^4 \text{cell/cm}^2$ と $0.5 \times 10^4 \text{cell/cm}^2$ とを比較すると、オステオカルシンの増加する傾向はほぼ同じであった。

C. 2. 生体内での細胞シートの骨形成能の検討結果（組織像）

図5に、移植後2カ月で摘出したサンプルの組織像を示す。*In vitro*で細胞播種密度を $0.5 \times 10^4 \text{cell/cm}^2$ とすると選択していたので、デキサメサゾン濃度による骨形成の差を比較したが、組織像からは両群（デキサメサゾン濃度を10nMあるいは100nM）に大きな差はなく、いずれも良好な骨形成が確認できた。

C. 3. 細胞シートの骨形成能の生化学的検討結果

図6に移植後2カ月で摘出したサンプルのアルカリフォスファターゼ（ALP）活性の測定とオステオカルシン含有量測定結果を示す。

β -TCPのみを移植した対照群に比べて、デキサメサゾン濃度を10nMと100nMで作製した骨芽細胞シートを組み合わせた β -TCPのアルカリフォスファターゼ活性値は統計学的に有意に高かった。このことから両群で複合体内に骨形成が認められていると考えられた。しかし、デキサメサゾン濃度を10nMで作製した骨芽細胞シートを β -TCPに

組み合わせた群のほうが、デキサメサゾン濃度100nMで作製したシート群に比べてアルカリフォスファターゼ活性値は高かった。

オステオカルシン含有量も、アルカリフォスファターゼ活性値と同様の傾向を示したが、デキサメサゾン濃度を10nMと100nMの比較では、その差はさらに大きくなっていった。

D. 培養条件の検討結果

D. 1. ヒト骨髄間葉系幹細胞を用いた骨芽細胞シート作製における細胞培養条件

以上のことから、ヒト骨髄間葉系幹細胞を用いて硬組織再生を目指す際の細胞シート作製（骨芽細胞シート）条件は、播種細胞密度： $0.5 \times 10^4 \text{cell/cm}^2$ 、デキサメサゾン濃度：10nM、アスコルビン酸濃度： $82 \mu\text{g/ml}$ で21日間の2次培養が好ましいと考えられる。

患者から同意のもとに提供された骨髄細胞を用いた研究でもLonza社の細胞を使用した場合とほぼ同様の結果が得られた。

E. 考察

我々はこれまでにラットやラビットなどの実験動物を用いて、骨髄培養細胞をシート状に培養した「骨芽細胞シート」を作製し、その骨形成能を報告してきた⁶⁻⁸。培養細胞の浮遊液を人工骨に組み合わせた「培養人工骨」は、生体に移植すると4週間には人工骨気孔内に新生骨形成が見られる。骨芽細胞シートを組み合わせただけでなく人工骨表面にも新生骨の形成が見られる。これは骨芽細胞シート移植の特徴的骨形成である

ことを報告している⁷⁾。

今回、本研究ではヒト骨髄間葉系幹細胞を用いて細胞シートを作る条件を検討したところ、ラットなどの実験動物における条件と異なることが判明した。その条件で作製したヒト骨芽細胞シートを人工骨に組み合わせてヌードラットに移植したところ、明らかな骨形成が人工骨内に認められた。我々はこれまでにヒト骨髄間葉系幹細胞の浮遊液を人工骨に組み合わせて免疫不全動物に移植し骨形成を評価したことがあるが、その標本に比べても骨形成量は多い印象であった。これは細胞シートを組み合わせたことが浮遊液を組み合わせたことよりもより多くの細胞を人工骨に搭載できることによると考えられる。

しかし、本研究で得られた組織像では人工骨気孔内の骨形成所見だけであり、人工骨表面での骨形成は見られなかった。これは、本研究では10 cmディッシュを用いて作製した骨芽細胞シート1枚を人工骨と組み合わせて免疫不全動物（ヌードラット）の皮下に移植するため、通常の動物実験で用いる自家移植モデルと条件が異なることも少なからず影響していると考えられる。

今後、人工骨に搭載する細胞量を増やすことで、従来の骨芽細胞シート移植後の骨形成の特徴がみられるかの検討は必要であると考えられる。あるいは、複数の顆粒状人工骨をヒト骨芽細胞シートで包み込むようなモデルで人工骨間を骨性に架橋できるかを評価するモデルも検討する。

しかし、通常よりも少ない細胞数でも十分な骨形成が見られたことは、硬組織再生における骨芽細胞シートの有用性を示すものであるとも言える。

次年度は、10 cmディッシュも使用し、これまでの動物実験で得られていた特徴的な骨形成がヒト骨芽細胞シートでも起こるかの検討は必要であると考え

られる。さらに、一般的な細胞シートの作製方法である温度応答性培養ディッシュを使用して、本研究で得られた結果と同様の結果が得られるかの検討は今後必要であろうと考える。我々が用いた細胞シート作製法はスクレーパーを使用する機械的な採取方法であるため、採取時の細胞に対するダメージがあることも懸念される。温度応答性ディッシュを使用する場合でも、培養中に骨芽細胞への分化を誘導するステップは重要であろうと推測する。つまり、機械的に細胞シートを採取するか温度応答性ディッシュを利用して採取するかだけでなく、ヒト骨髄間葉系幹細胞を分化させずに細胞シートを作るか分化誘導を行う培養条件で細胞シートを作製するかが非常に重要であろうと考える。この点は、今後検討を要する点である。

また、今回の検討では人工骨に組み合わせて生体に移植したが、偽関節部への骨芽細胞シートのための移植でも骨形成が得られるか、壊死骨と組み合わせた場合にも十分な新生骨形成が得られるかなどの検討も必要であると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表 なし

2. 学会発表

清水隆昌、赤羽学、面川庄平、小島康宣、村田景一、中野健一、川手健次、田中康仁 冷凍保存骨髄間葉系幹細胞由来細胞シートの骨形成評価 第32回整形外科バイオマテリアル研究会 2012年12月1日 東京慈恵会医科大学

上羽智之、赤羽学、清水隆昌、中野

健一、倉智彦、川手健次、田中康仁
老齡ラットにおける骨芽細胞シートの有用性 第 32 回整形外科バイオマテリアル研究会 2012 年 12 月 1 日 東京慈恵会医科大学

中野健一、村田景一、清水隆昌、赤羽学、藤間保晶、小島康宣、仲西康頭、面川庄平、川手健次、田中康仁
骨芽細胞シート移植を併用した血管柄付き人工骨作製 第 32 回整形外科バイオマテリアル研究会 2012 年 12 月 1 日 東京慈恵会医科大学

谷掛洋平、中島弘司、林宏治、加藤宣伸、藤間保晶、大串始、土肥祥子、赤羽学、高澤伸、川手健次、田中康仁
Fibronectin をコートした β TCP の骨形成能 第 27 回日本整形外科学会基礎学術集会 2012 年 10 月 26-27 日 名古屋国際会議場

藤間保晶、土肥祥子、大串始、谷掛洋平、高澤伸、赤羽学、田中康仁
骨髄由来間葉系細胞搭載人工骨の骨形成能に対するポリ ADP リボースポリメラーゼ阻害剤の影響 第 27 回日本整形外科学会基礎学術集会 2012 年 10 月 26-27 日 名古屋国際会議場

清水隆昌、赤羽学、森田有亮、面川庄平、小島康宣、村田景一、中野健一、上羽智之、藤間保晶、川手健次、田中康仁
骨芽細胞シートを用いたラット大腿骨偽関節治癒過程の特徴 第 27 回日本整形外科学会基礎学術集会 2012 年 10 月 26-27 日 名古屋国際会議場

内原好信、赤羽学、上羽智之、清水隆昌、倉智彦、藤間保晶、川手健次、

田中康仁 培養骨芽細胞シートを用いた放射線照明白家処理骨の骨形成 第 27 回日本整形外科学会基礎学術集会 2012 年 10 月 26-27 日 名古屋国際会議場

稲垣有佐、上松耕太、赤羽学、小川宗宏、藤間保晶、倉智彦、粥川陽介、森田有亮、川手健次、田中康仁
骨形成細胞シートによる家兔移植健骨孔間治療の促進 第 27 回日本整形外科学会基礎学術集会 2012 年 10 月 26-27 日 名古屋国際会議場

中野健一、村田景一、清水昌隆、赤羽学、藤間保晶、小島康宣、仲西康頭、面川庄平、川手健次、田中康仁
骨芽細胞シート移植を併用した血管柄付き人工骨作製 第 27 回日本整形外科学会基礎学術集会 2012 年 10 月 26-27 日 名古屋国際会議場

清水隆昌、赤羽学、上羽智之、森田有亮、粥川陽介、藤間保晶、面川庄平、城戸頭、川手健次、田中康仁
細胞シートを用いた注入型骨移植による偽関節治療 第 11 回日本再生医療学会総会 2012 年 6 月 13-14 日 パシフィコ横浜

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

H. 参考文献

1. Ohgushi H, Dohi Y, Katuda T, et al. In vitro bone formation by rat marrow cell culture. *J Biomed Mater Res* 32: 333-340, 1996.
2. Ohgushi, H. and Caplan, A. I. (1999) Stem cell technology and bioceramics: From cell to gene engineering. *Journal of Biomedical Materials Research*, 48, 913-927.
3. Sonal, R., Jackson, J. D., Brusnahan, S. K., O' Kane, B. J. and Sharp, J. G. (2012) Characterization of a mesenchymal stem cell line that differentiates to bone and provides niches supporting mouse and human hematopoietic stem cells. *Stem Cell Discovery*, 2, 5-14.
4. Kawate K, Yajima H, Ohgushi H, et al. Tissue-engineered approach for the treatment of steroid-induced osteonecrosis of the femoral head: transplantation of autologous mesenchymal stem cells cultured with β -tricalcium phosphate ceramics and free vascularized fibula. *Artif Organs* 30: 960-962, 2006.
5. Manabu Akahane, Tomoyuki Ueha, Yoshiko Dohi, Takamasa Shimizu, Yasuaki Tohma, Akira Kido, Kenji Kawate, Tomoaki Imamura, Yasuhito Tanaka. Secretory osteocalcin as a non-destructive osteogenic marker of tissue engineered bone. *J Orthop Sci*. 2011 Sep;16(5):622-628.
6. Akahane M, Nakamura A, Ohgushi H, Shigematsu H, Dohi Y, Takakura Y. Osteogenic matrix sheet-cell transplantation using osteoblastic cell sheet resulted in bone formation without scaffold at an ectopic site-. *J Tissue Eng Regen Med*. 2(4):196-201, 2008.
7. Hideki Shigematsu, Manabu Akahane, Yoshiko Dohi, Akifumi Nakamura, Hajime Ohgushi, Tomoaki Imamura and Yasuhito Tanaka. Osteogenic Potential and Histological Characteristics of Mesenchymal Stem Cell Sheet/Hydroxyapatite Constructs. *The Open Tissue Eng Regen Med Journal*, 2009 Oct;2: 63-70.
8. 上羽智之、赤羽学、重松秀樹、内原好信、清水隆昌、城戸颯、藤間保晶、川手健次、今村知明、田中康仁 培養細胞シートを用いた培養人工骨の骨形成 *Orthopaedic Ceramic Implants* 2009, 29:15-18

図1 培養条件の検討の組み合わせ

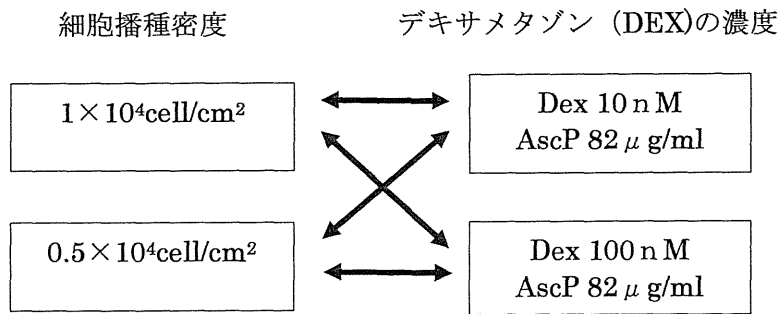


図2 ヌードラットへの移植実験のイメージ図

β -TCP (PENTAX)にヒト細胞シートをラップし7週齢ヌードラット背部皮下へ移植

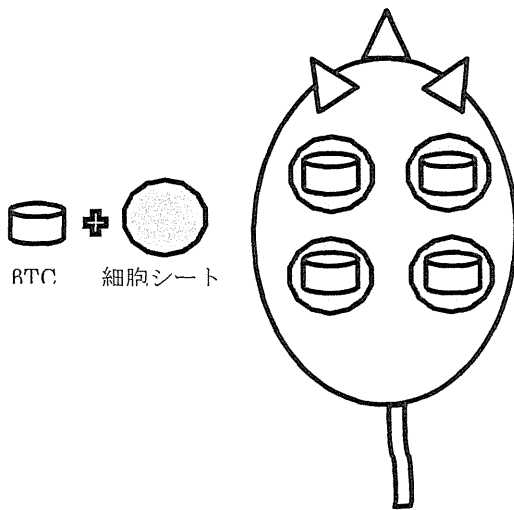


図3 ヒト骨髓間葉系幹細胞から作製したヒト骨芽細胞シート

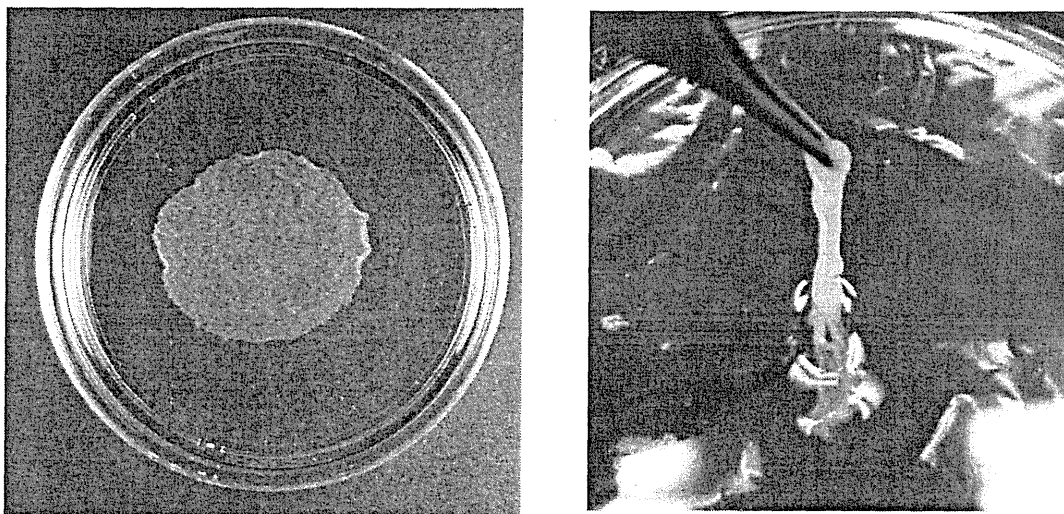
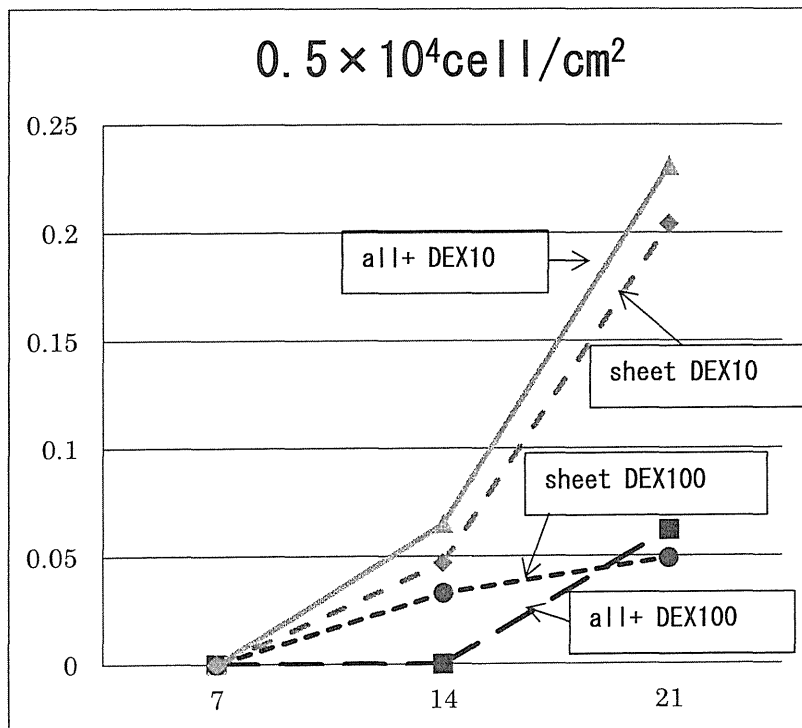
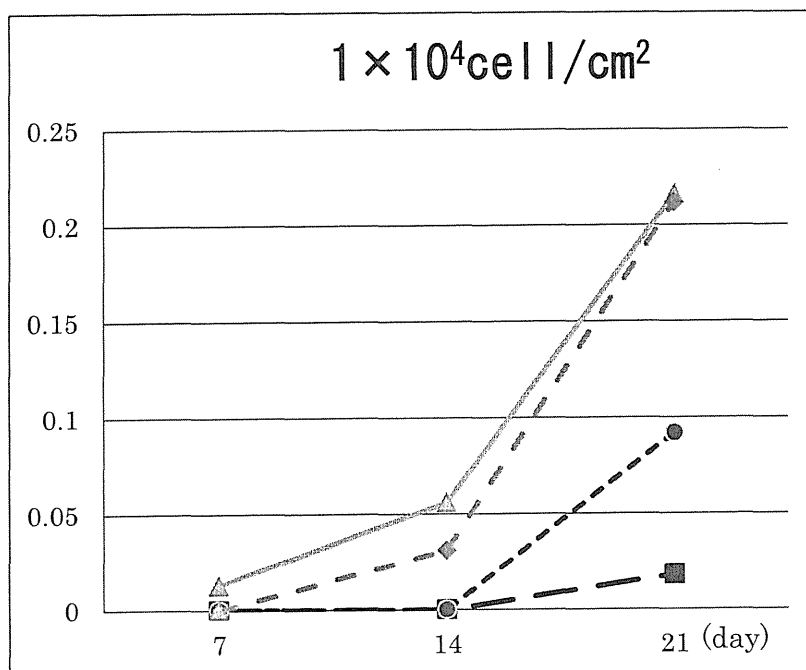


図4 分泌オステオカルシン量の継時的変化 (*In vitro*)

A. 低細胞密度での播種



B. 高細胞密度での播種

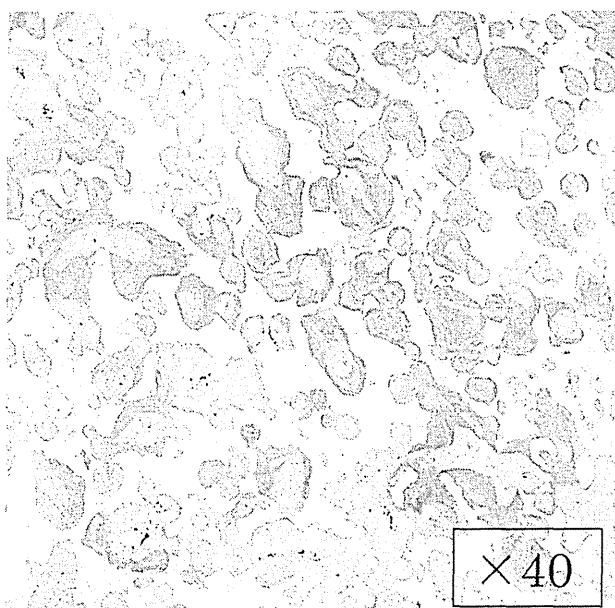
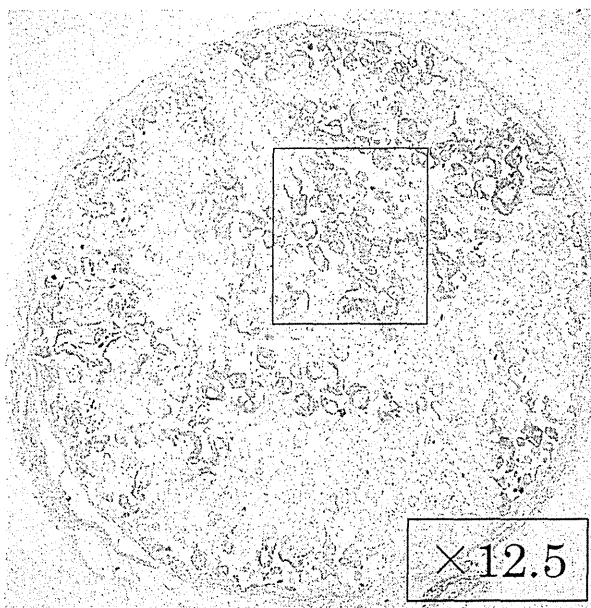


all+ : DEX+ AscP+ β GP、
 sheet: DEX+ AscP (骨芽細胞シート)
 DEX10: デキサメサゾン 10nM、
 DEX 100 : デキサメサゾン 100nM

図5 生体内での細胞シートの骨形成能の検討結果（組織像）

A. デキサメサゾン：10nM

B. 左図の枠内の拡大写真



C. デキサメサゾン：100nM

D. 左図の枠内の拡大写真

