

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 検リン酸 3 カルシウム -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 0.5×10⁴cell/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 -リン酸 3 カルシウム -TCP : ペンタックス社) を移植し、生体内の骨形成の検討を行った。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 TCP 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 TCP と細胞シートの組み合わせでは、TCP 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 10 nM で作製した細胞シートとの組み合わせのほうが 100 nM 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： 10 nM 、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 . ヌ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 TCP 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、 10 cm 培養皿や 6 cm 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 10 nM あるいは 100 nM ）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、 6 cm 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100mm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

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

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、城戸顕、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.