

**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**

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

研究代表者 上羽智之 奈良県立医科大学 整形外科 医員

研究分担者 赤羽 学 奈良県立医科大学 健康政策医学講座 准教授

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

我々はこれまでにラットを用いた動物実験で、骨芽細胞シートを scaffold free で注入移植することで、新生骨が得られることを確認し「注入型骨移植法」として報告している。本手技は scaffold free で注入を行うため scaffold による弊害がなく、低侵襲で実施でき、既存の治療法に併用できるため、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。

本研究ではヒト骨髄間葉系幹細胞(Human Mesenchymal stem cells; hMSCs)を用いた骨芽細胞シート作製の培養条件の検討にて確立した培養条件で作製したヒト細胞シートが、生体内で骨形成が得られるかどうかを検証した。ラットを用いた動物実験で注入による細胞シートの移植法を考案し検証してきたが、ヒト細胞シートを生体内に注入によって移植をすることで骨形成が得られることを検討した。

ヌードラット背部皮下へあらかじめ円盤状人工骨（ β -リン酸3カルシウム： β -TCP）を移植しておき、注射器で人工骨の表面へ細胞シートを注入することで、骨形成が得られるかを組織学的に検討した。ヒト細胞シートを注入することにより人工骨の気孔内に骨形成を認めた。これによって、ヒト骨芽細胞シート注入による「注入型骨移植法」が、これまで行ってきた動物細胞と同様に可能であることが示唆された。

今回の検討では、人工骨へヒト細胞シートを注入移植したが、今後は、偽関節部への scaffold free でのヒト骨芽細胞シート注入移植でも骨形成および骨癒合が得られるかの検討も必要である。

A . 研究目的

我々はこれまでに、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。さらに、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」として確立し、報告してきた^{4,5}。

本研究課題ではヒト MSC で作製した

骨芽細胞シートが生体内で骨形成能を有するのか検証する。H24 年度の本研究課題では、ヒト細胞シートを用いた X 線透視下注入型骨移植法の基礎的主義を確立するために、まず免疫不全動物（ヌードラット）の背部皮下に注入移植することにより、異所性に新生骨形成が得られるかを検討することを目的とする。

B . 研究方法

B . 1 . ヒト骨芽細胞シート の 作製 方法

本研究で使用したヒト MSC は、Lonza 社から購入した市販のヒト骨髄細胞である。ヒト MSC (P3) を T75 フラスコ (75cm² culture flask, Falcon, BD) でリバイブ 9 日後、6cm 培養皿 (60 mm ディッシュ; Falcon 35-3002, BD) と 10 cm 培養皿 (100 mm ディッシュ; Falcon 35-3003, BD) にそれぞれ 0.5 × 10⁴ cell/cm² の細胞密度で播種した。2 次培養期間中にアスコルビン酸 (VC:82µg/ml) とデキサメタゾン (Dex) を添加し培養を行った。Dex の濃度は、10 nM と 100 nM の 2 種類の条件とした。3 週間培養を行いコンフルエントに達した後スクレーパー (住友ベークライト MS-93100) を用いてヒト骨芽細胞シートを採取した。

ヒト骨芽細胞シート作製の条件は、本研究課題の分担研究の一つとして検討を行っているが、皮下に細胞シートと人工骨を組み合わせてその骨形成能を検討した結果と相反する傾向が見られないかを本研究でも検討するために、デキサメサゾン濃度をあらためて 2 種類で細胞シートの作製を行い、それぞれ骨形成能を評価した。

B . 2 . ヒト骨芽細胞シート注入法の検討

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 PBS (Gibco, Invitrogen, USA) 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 (内径 1.73 mm 外径 2.1 mm 内針 16G) 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する。

図 1 は、外筒だけ皮膚に刺したまま残したアンギオキャスの外筒内に、注射器を装着しヒト骨芽細胞シートを注入する際の写真である。細胞シートがシリンジ内にとどまることがあるので、PBS を混和させることで、注入するヒト骨芽細胞シートを余ることなく押し出す効果がある。

B . 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

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、生体内でのヒト骨芽細胞シートによる骨形成の検討を行った。あらかじめ皮下に移植しておいた人工骨に、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 培養皿で作製したヒト骨芽細胞シートを、1 つの人工骨に対して 2 枚注入移植した。

移植後 2 カ月で標本を摘出し 2 日間ホルマリン固定し、2 日間脱灰後 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、組織学のおよびレントゲン撮影によって骨形成を評価した。

B . 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

7 週齢ヌードラット背部皮下へスキャフォールドフリーで、ヒト骨芽細胞シートの注入移植を行い、生体内でのヒト骨芽細胞シートのみによる骨形成の検討を行った。

B. 5. 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、倫理的に問題となることはない。本研究では、ヒト骨髄細胞から作製する骨芽細胞シートは免疫不全動物へ移植して、生体内での骨形成性能の評価に用いるため、直接患者あるいは細胞提供者に健康被害が発生することはない。

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. レントゲン撮影による骨形成評価

移植後 2 か月目に摘出した人工骨をレントゲン撮影した。レントゲンでは、人工骨はその輪郭がはっきりとしているものの、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像は明らかではなかった(図 2)。

C. 2. 組織像による新生骨形成の評価

図 3 に移植後 2 カ月で摘出したサンプルの組織像を示す。細胞播種密度を $0.5 \times 10^4 \text{ cell/cm}^2$ 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、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やラビ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、その高い骨形成能を利用したいろいろな使用方法の可能性を報告してきた。細胞シートの注入による移植では、皮下のような異所性への移植であっても新生骨形成を認め、細胞シートの高い骨形成能によると考えられる^{4, 5}。

また、あらかじめ皮下に移植しておいた人工骨に対し、骨芽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⁵。

今回、ヒト骨髄細胞で作製した細胞シートを皮下にあらかじめ移植しておいた人工骨周囲に注入し、人工骨気孔内に骨形成が見られた。しかし、人工骨表面には骨形成は見られなかった。これは注入という行為が細胞シート自体にダメージを与えたために、細胞活性の低下を招いた可能性が大きいと考えられ、その結果全体としての骨形成量が減少し、人工骨気孔内のみで骨形成が確認できたのではないかと考えられる。現在は市販の注射針を利用してはいるが、注射針の径を大きしたものなどを使用した注入方法についても再度検討する必要があると考える。

ほかの理由として継代培養によるヒト MSC の骨形成能の低下の可能性も考えられる。これまでの動物実験での検討では、数代にわたる継代培養を繰り返すことで、骨形成能は著明に低下していた⁶。今後は、継代数が少ないヒト MSC を用いた研究やあらためて市販の

ヒト骨髄細胞を購入し、細胞ソースを変えて同様の検討をする必要があると考えられる。また、注入移植後2カ月経過してサンプルの摘出を行ったため、形成された骨組織が吸収されてしまった可能性も考えられる。人工骨に対するヒト骨芽細胞シート注入では、2か月後のサンプルでも人工骨内に新生骨形成が認められており、スキャフォールドフリーでの注入移植の影響による可能性も考えられる。本研究課題が目指す「X線透視下注入型骨移植」法は、X線で骨折部・偽関節部を確認して正確にその部位に注入するため、スキャフォールドフリー皮下移植とは条件が異なり、骨折部や偽関節部に存在する自家骨がスキャフォールドとなり注入した骨芽細胞シートが維持され、形成された骨組織も維持されるのではないかと考える。来年度は、この点に着目した検討を実施する予定である。

細胞シートの注射と異なり、細胞浮遊液の注入では、注入された細胞が流出する可能性がある。移植した場にとどまりその後新生骨の形成をもたらす点に関しては、骨芽細胞シートを用いることの有用性を示す点であると考ええる。

今後は 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。また、新たにヒト骨芽細胞の注入用に太い注射針を作製することも必要ではないかと考えられる。

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

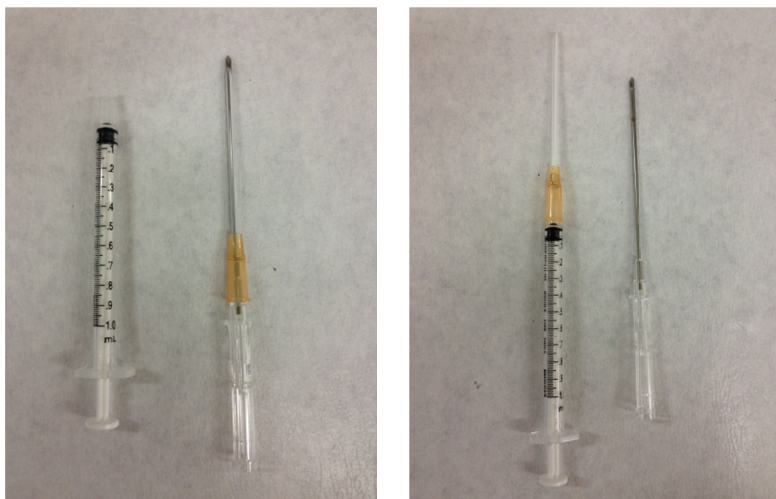
G . 参考文献

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.
 6. M.Akahane, T.Ueha, T.Shimizu, Yusuke Inagaki, Akira Kido, Tomoaki Imamura, Kenji Kawate, Yasuhito Tanaka. Increased osteogenesis with hydroxyapatite constructs combined with serially-passaged bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cell Discovery* 2, 133-140, 2012.

図1 ノードラットへ骨芽細胞シート注入移植法

A 骨芽細胞シートの注入に使用した注射針とシリンジ



B ノードラットの背部皮下への注入

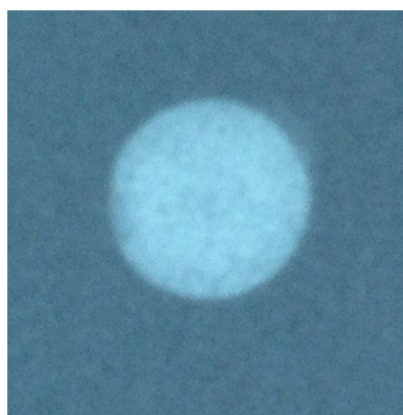


図2 摘出した人工骨のレントゲン写真

A 注入型骨移植を行った摘出人工骨（10 cm培養皿で細胞シート作製）

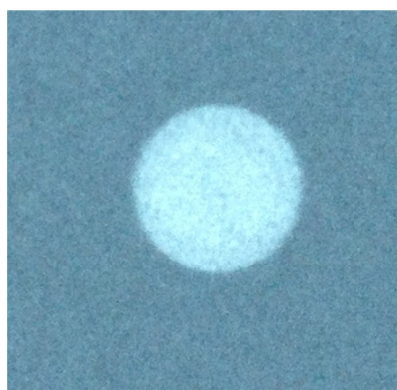


(Dex 100nM)

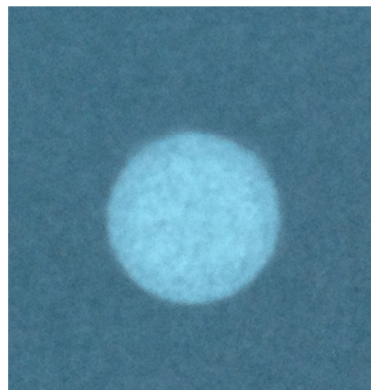


(Dex 10nM)

B 注入型骨移植を行った摘出人工骨（6cm 培養皿で細胞シート作製）



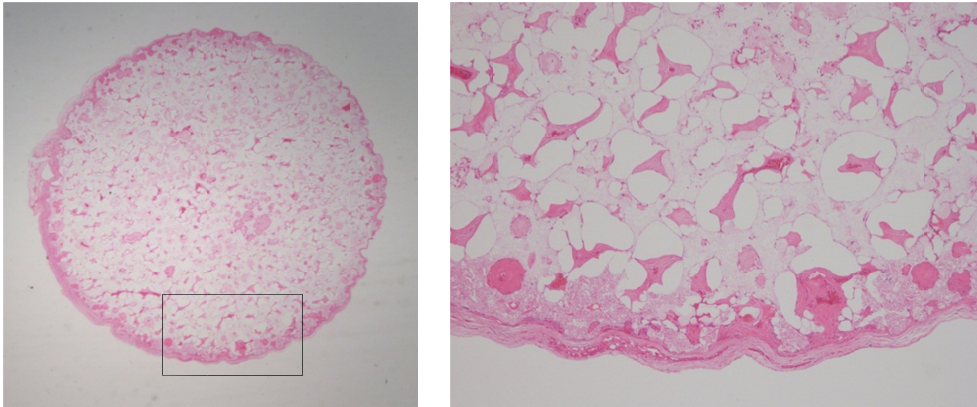
(Dex 10nM)



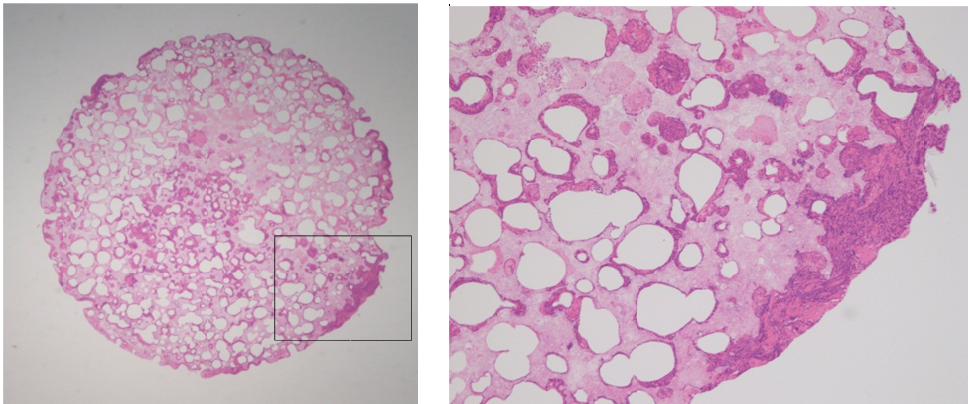
(Dex 100nM)

図3 注入移植による細胞シートの骨形成能の検討結果（組織像）

A 10 cm細胞シートを注入した人工骨の組織像

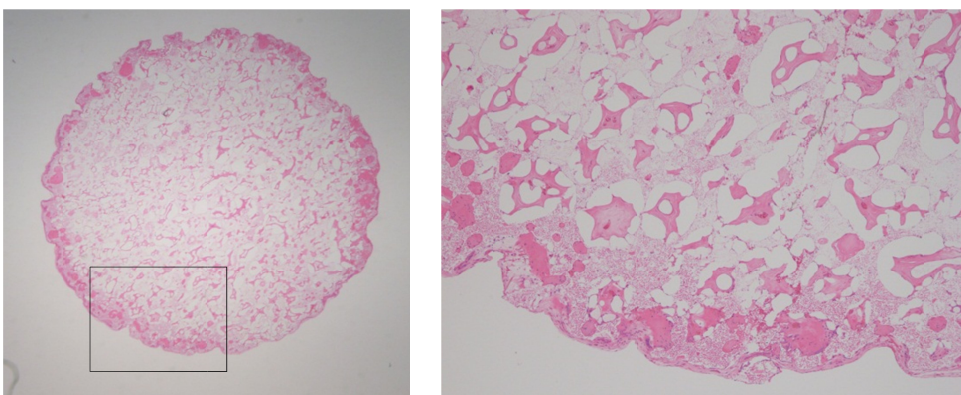


(Dex 10nM で細胞シート作製)

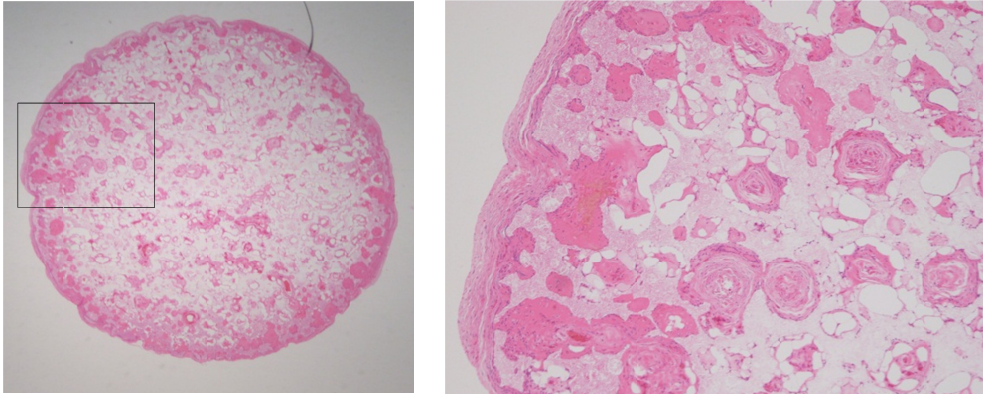


(Dex 100nM で細胞シート作製)

B 6 cm細胞シートを注入した人工骨の組織像



(Dex 10nM で細胞シート作製)



(Dex 100nM で細胞シート作製)

|