

(4) iPS 細胞誘導因子の遺伝子導入

RetroNectin(TaKaRa)を用いてレトロウイルスベクターを患者由来皮膚線維芽細胞に感染させ、iPS 細胞誘導因子群の遺伝子を導入した。20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に調整した RetroNectin 溶液をノントリート 6well プレートに 2mL/well 添加、4°C に一晚静置する事で RetroNectin 固定化プレートを作製した。

RetroNectin 溶液を除去後、(1)で作製したレトロウイルスベクター溶液を、DMEM 培地を用いて 30 倍に希釈し、RetroNectin 固定化プレートに添加した。32°C、2,000 \times g の条件でプレートを 2 時間遠心し、溶液中のレトロウイルスを RetroNectin 固定化プレートに吸着させた。ウイルス溶液の除去と 1.5% HSA/PBS での洗浄の後、 1×10^5 cells/well の細胞数で患者由来繊維芽細胞をプレートに播種し、遺伝子導入を行った。播種約 24 時間後の細胞を回収、同様の操作で作製した RetroNectin 固定化・レトロウイルス吸着プレートに播き直すことで、さらに再び遺伝子導入を行った。

(5) iPS 細胞誘導

iPS 細胞誘導因子の遺伝子を導入したヒト皮膚線維芽細胞を、STO 細胞(ATCC)上に播種し、霊長類 ES 細胞培地(ReproCELL)を用いて培養する事で、iPS 細胞の誘導培養を行った。細胞培養用 100mm シャーレに 0.1%ゼラチン溶

液を添加、室温で 30 分間静置する事で、ゼラチンの固定化を行った。ゼラチン固定化シャーレにマイトマイシン C 処理(最終濃度 12 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 協和発酵工業)で培養上清に添加後、2 時間 15 分以上培養を施した STO 細胞を

1.5×10^6 cells/dish で播種し、一晚培養する事でフィーダー細胞を準備した。(4)の遺伝子導入 6 日後の細胞を回収し、 1×10^5 cells/dish で STO 細胞上に播種した。培養 24 時間後に上清を霊長類 ES 細胞用培地に交換、以降 2 日ごとに培地を交換し、遺伝子導入 35 日後まで培養を継続する事で iPS 細胞誘導を行った。

(6) iPS 細胞のクローン化

iPS 細胞コロニーをピックアップし、ES 細胞様の外観を示したクローンの拡大培養を試みた。(5)の誘導培養を実施したシャーレから実体顕微鏡での観察下、単一の iPS 細胞コロニーをピペットマンやシリンジを用いて分取し、数回のピペッティングによる細分化後、ゼラチン固定か 24well プレートにあらかじめ用意したフィーダー細胞上に播種した。以降約 24 時間ごとに、ES 細胞培養用培地を用いて培養上清を交換し、7~10 日ごとに継代を実施する事で拡大培養を行った。その過程で ES 細胞様の形態を示す 6 クロニーを選別した。iPS 細胞の継代方法は、上清の除去と PBS 洗浄の後、霊長類 ES 細胞培養用培地を添加、先に剥離するフィーダー

細胞を除去し、ES 細胞培養用培地添加後、残った iPS 細胞をセルスクレーパーで剥がした、iPS 細胞懸濁液を回収し、ピペッティングによる細分化後、6 well プレートに用意した新たなフィーダー細胞上に播種し直した。しかし、これらの iPS 細胞株は、一般的な iPS 細胞と比較して増殖速度が著しく低かったため、継代の際に細胞死を抑制する Rho 結合キナーゼ ROCK の阻害剤 Y27632(WAKO)の使用を試みた。継代の前に培養上清を 10 μ M の ROCK 阻害剤 Y-27632 を含む iPS 細胞培養用培地に交換、1 時間以上培養した後、上記の方法で継代を行った。iPS 細胞コロニーのピックアップから数えて 81 日間の培養を行った。

(7) ALP 染色

(6)で選別した iPS 細胞クローン 3 株 (No.2、No.4、No.6)について、TRACP&ALP double stain kit(TaKaRa)を用いた ALP 染色を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針(平成 16 年度 12 月 28 日)に従い、島根大学医の倫理委員会および産業技術総合研究所の倫理委員会の承認を得た後、行っている。書面によるインフォームド・コンセン

トを取得後に検体を採取して、使用している。提供された臍帯は、(1)再生医療、(2)血液疾患、(3)患者数の少ない難治性疾患の治療方法の開発や創薬を目指した研究、ならびに臍帯の保存技術の開発、バンキングを目指した研究等、医学の発展を目指した研究に使用する事を、臍帯を提供して頂く妊婦に説明し、同意を得ている。また、患者由来 iPS 細胞も病態解明、治療法の開発のための使用することを患者の親権者に説明して同意を得ている。

C. 研究結果

1. 臍帯由来間葉系幹細胞の細胞特性

(1) uMSC の ALP 活性および ALP の発現

陽性コントロールである ALP 発現株である H-HOS と同程度に ALP 発現が認められた(図 1A)。また、CD44 の発現は H-HOS よりも発現レベルが高かった(図 1B)。ALP 免疫染色でも uMSC は呈色が得られた (図 2)。

(2) uMSC の骨分化能および骨分化後の ALP 活性

基礎培地において、uMSC が骨芽細胞に分化したところ、石灰化能および ALP 活性を認めた(図 3B、図 4)。骨分化促進剤(RA, CyA, FK506, VD3, SB+LiCl, SB, BMP-2)、骨分化阻害剤(LiCl)で検討したところ、石灰化能は

FK506, VD3, BMP-2 で認められ、ALP 活性化はすべての薬剤で認められた (図 3B, 図 4)。しかし、uMSC のロット間の差が認められた。(図 3B, 図 4)。

(3) 遊走能

Boyden chamber assay において、uMSC と骨髄由来 MSC は、同じ割合で遊走能が認められた (図 5)。

2. 患者由来 iPS 細胞の樹立

One step リアルタイム RT-PCR 解析結果より、取得したレトロウイルスベクター溶液は 2.55×10 copies/mL の RNA Titer を示し、感染試験に適するウイルス溶液が取得できた事を確認した(表 1)。また、マイコプラズマ陰性も確認した。

患者由来皮膚繊維芽細胞からの iPS 細胞様コロニーを計 21 個ピックアップし、拡大培養を試みたところ、6 クローンが iPS 細胞様コロニーの外観を示した(図 6)。しかし、クローン No.1 と No.5 については継代を重ねるごとに増殖速度が低下し、増殖が停止した。クローン No.2、No.3、No.4 については未分化能が維持できず、ES 細胞様の外観のコロニーが消失し、分化したと思われる細胞のみとなった。クローン No.6 については一定の増殖速度を示し、ES 細胞様の外観を示すコロニーが生育し続けた。しかし、iPS 細胞様の外観を示し

ているにも関わらず、通例 5~7 日ごとに 3~6 倍に増殖する iPS 細胞が、7~9 日で約 1.5 倍程度の増殖しか認められなかった。

ALP 染色において、全てのクローンについて呈色反応が確認できず陰性を確認した(図 7)。

D. 考察

1. 臍帯由来間葉系幹細胞の細胞特性

uMSC は、骨分化や遊走能において、骨髄由来 MSC との著しい差は見られなかった。しかし、接着因子である CD44 が H-HOS 細胞よりも発現量が多いことから、*in vivo* での生着能が高い可能性がある。また、骨分化能に関してはロット間での差が大きかった。このことは、骨髄由来 MSC の培養条件で骨芽細胞へ分化させたことが原因かもしれない。したがって、uMSC が十分に骨分化する条件を詳細に検討する必要がある。しかし、骨髄由来 MSC もロット間 (個人間) で差があることが報告されている。さらに、FK506, VD3, BMP2 が、ALP の発現および骨の石灰化を増強させることが明らかとなった。これらのことから、*in vivo* でもロット間の差が大きいかどうか、あるいは薬剤における骨分化の影響があるかどうかを検討することが重要であると思われる。

2. 患者由来 iPS 細胞の樹立

今回患者由来の皮膚繊維芽細胞から iPS 細胞を樹立することに成功した。しかし、iPS 細胞様コロニーが多数見られるものの、増殖および未分化能維持が乏しい結果が示された。また、ALP 染色は今回作成した iPS 細胞ではすべて陰性であった。これらの結果は、ALP 染色が陽性反応を示す事が iPS 細胞の確認試験として用いられているが、今回の iPS 細胞は低ホスファターゼ症患者由来の細胞（先天的に ALP 遺伝子が変異しており、ALP の発現がみられない）から作製されたものであり、ALP の発現が iPS 細胞の増殖および未分化能の維持に重要な役割を果たしているかもしれない。今後、iPS 細胞の長期的な維持、および樹立までの増殖能の保持を経時的に検討していき、また、正常健康人から樹立した iPS 細胞の ALP をノックダウンすることによって、これらの機序を明らかにしていく必要がある。

E. 結論

今回の検討では、uMSC が骨髄由来 MSC よりも接着能が高いが、遊走能や骨分化は変わらないことが明らかとなった。したがって、ALP 正常かつ HLA が一致した臍帯血移植を行った後に、同一ドナーからの uMSC を骨髄内に移植することで臨床効果が高くなる可能性が示唆された。今後、これらを明ら

かにするために in vivo での効果を検討する必要がある。また、疾患特異的 iPS 細胞の樹立に成功したことで、本疾患の障害部位である骨、中枢神経、肺などの細胞に分化させて、それぞれの機能解析を行い、病態解明を進めていくことが重要であると思われた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表：

- 1) Taketani T, Kanai R, Abe M, Mishima S, Tadokoro M, Katsube Y, Yuba S, Ogushi H, **Fukuda S**, Yamaguchi S. Therapy-related Ph + leukemia after both bone marrow and mesenchymal stem cell transplantation for hypophosphatasia *Pediatr Int.* 2013 Jun;55(3):e52-5.
- 2) Taketani T, Onigata K, Kobayashi H, Mushimoto Y, **Fukuda S**, Yamaguchi S. Clinical and genetic aspects of hypophosphatasia in Japanese patients. *Arch Dis Child.* 2013 Nov 25. doi:10.1136/archdischild-2013-305037.

2. 学会発表 :

1) Taketani T, Mihara A, Oyama C, Tanabe Y, Kanai R, Fukuda S, Yamaguchi S, Katsube Y, Oda Y, Tadokoro M, Sasao M, Yuba S, Ohgushi H. Ex Vivo Expanded Allogeneic Mesenchymal Stem Cells (MSCs) Improved Osteogenesis in Patients with severe Hypophosphatasia- Three case reports of MSC infusions followed by bone marrow transplantation-. 2nd Joint Meeting of the International Bone and Mineral Society and The Japanese Society for Bone and Mineral Research (President; Hank Kronenberg and Masaki Noda), Kobe, May 28-Jun 1, 2013

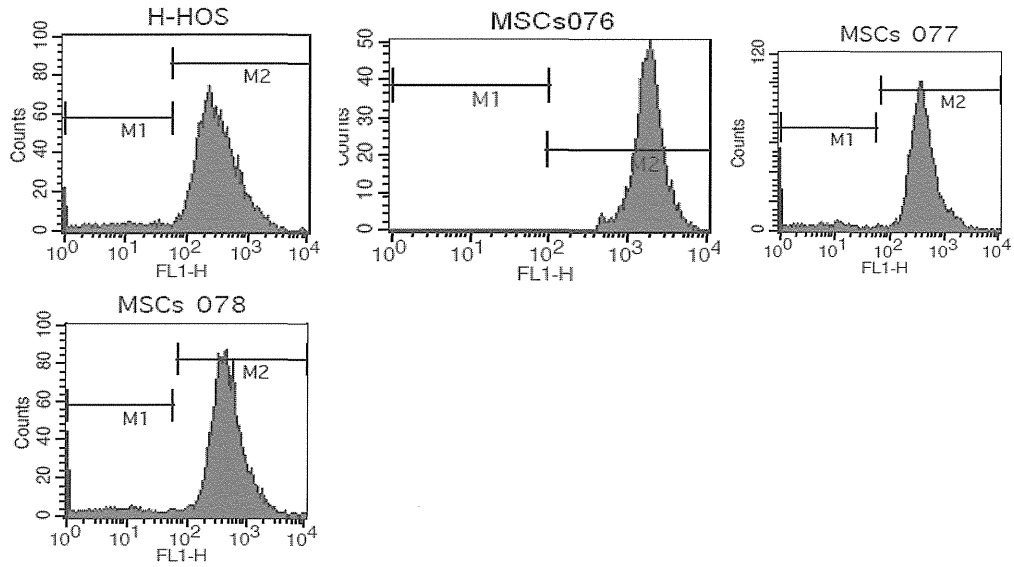
2) Taketani T, Hattori M, Katsube Y, Oda Y, Tadokoro M, Sasao M, Yuba S, Ohgushi H, Abe M, Hirade T, Fukuda S, Yamaguchi S. The functional analysis of TNSALP mutants in Hypophosphatasia with Japanese patients. 10th ALPS meeting(president Hieo Orimo), Tokyo, July 27, 2013

H. 知的財産権の出願・登録状況

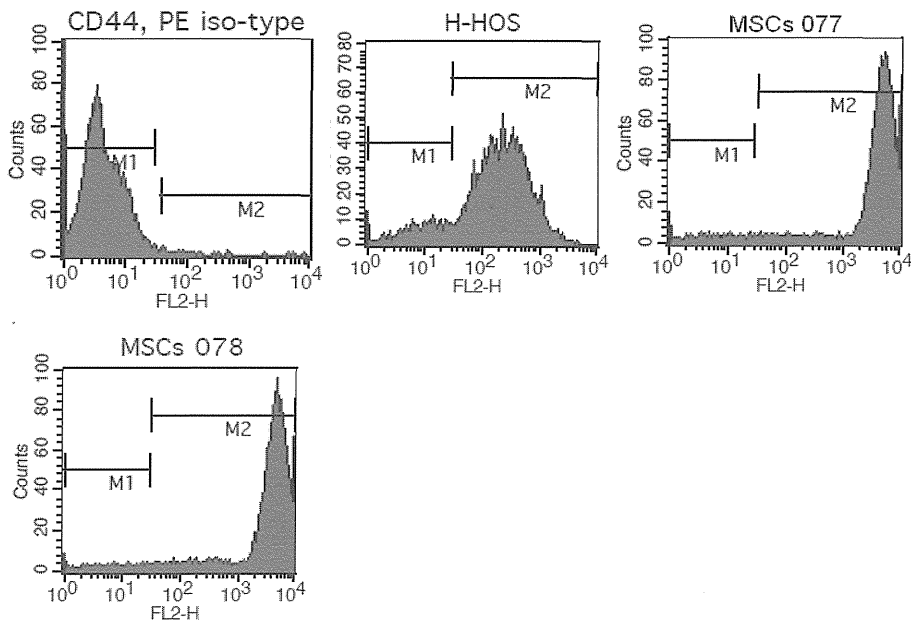
1. 特許所得 : なし
2. 実用新案登録 : なし
3. その他 : なし

図 1. 臍帯由来間葉系幹細胞の発現解析

A. ALP の発現



B. CD44 の発現



M1:死細胞または未発現領域 M2:抗体発現領域

図 2. 臍帯由来間葉系幹細胞の ALP 免疫染色

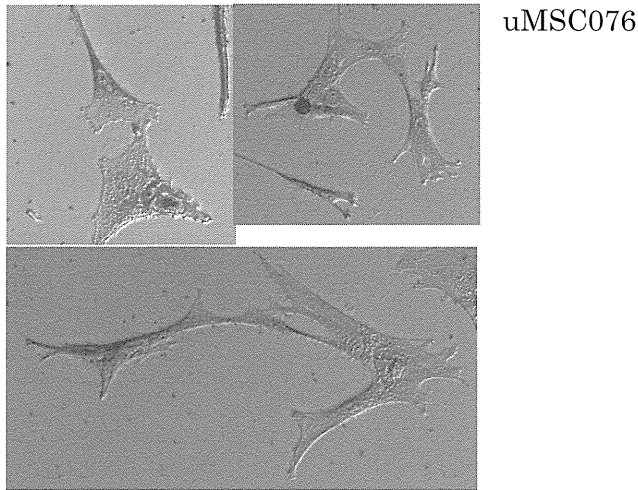
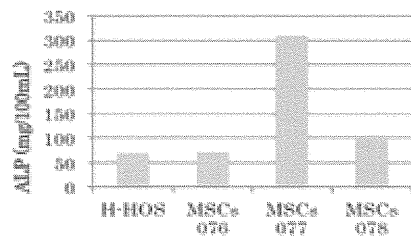


図 3. 臍帯由来間葉系幹細胞の ALP 活性

A. ロット別



B. 骨分化誘導後の ALP 活性測定

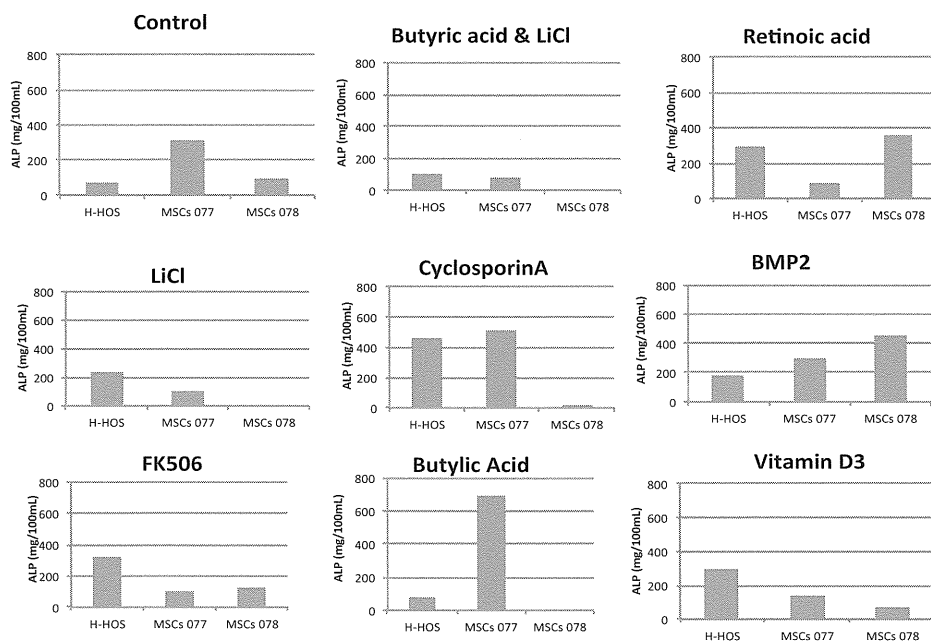


図 4. 臍帯由来間葉系幹細胞の骨分化誘導のカルセリンによる石灰化

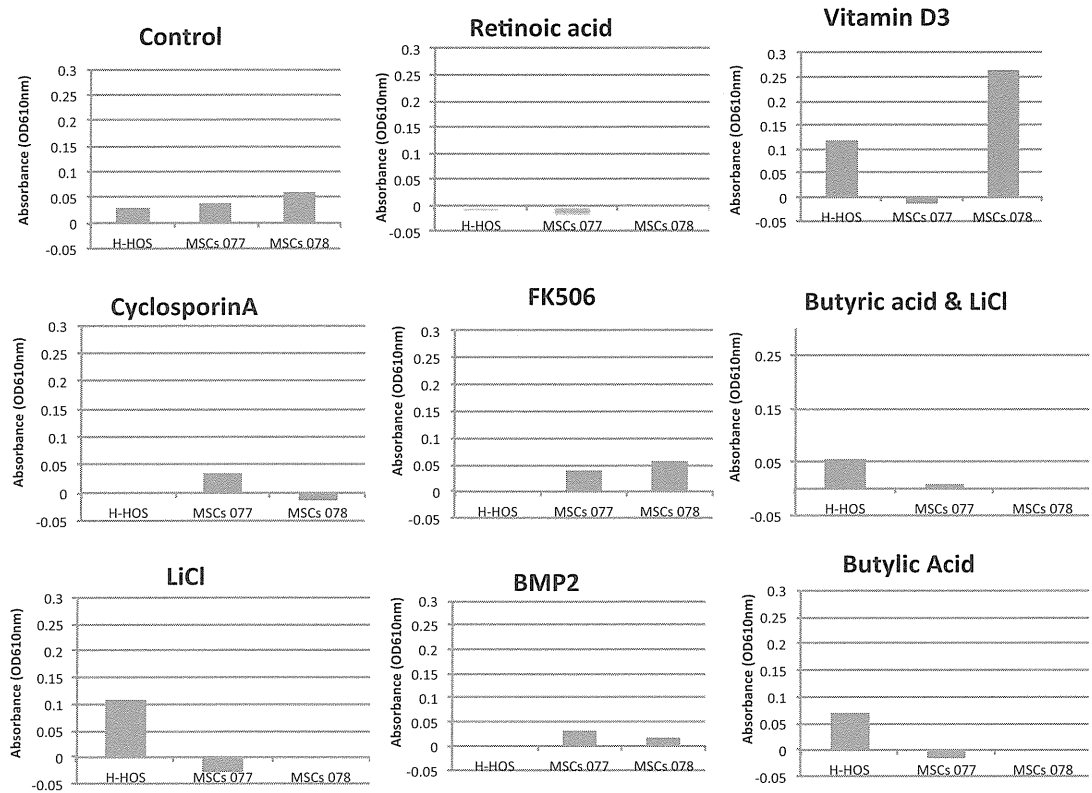
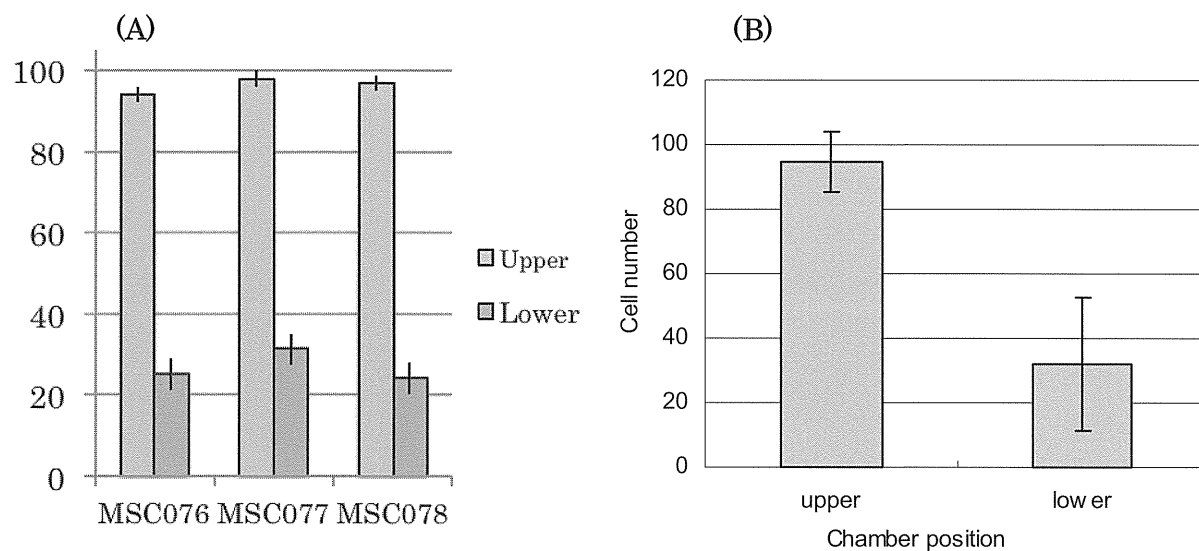


図 5. 遊走能



(A)uMSC のロット別遊走能の比較。ボイデンチャンバーを用いて Upper chamber position および Lower chamber position の細胞数をカウントした。

(B)骨髄由来 MSC の遊走能の比較。uMSC 同様、各 chamber position でセルカウントした。細胞数は百分率で示し、 1×10^5 cells/mL でセットした細胞を 100 とした。

図 6. 選別した iPS 細胞クローンの顕微鏡写真 (40 倍)

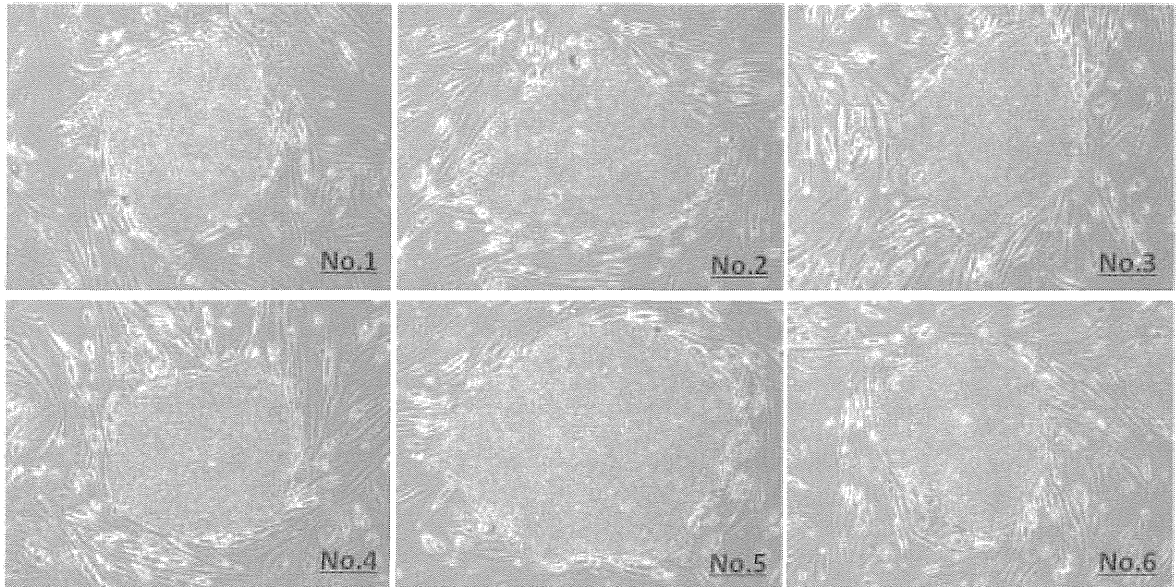
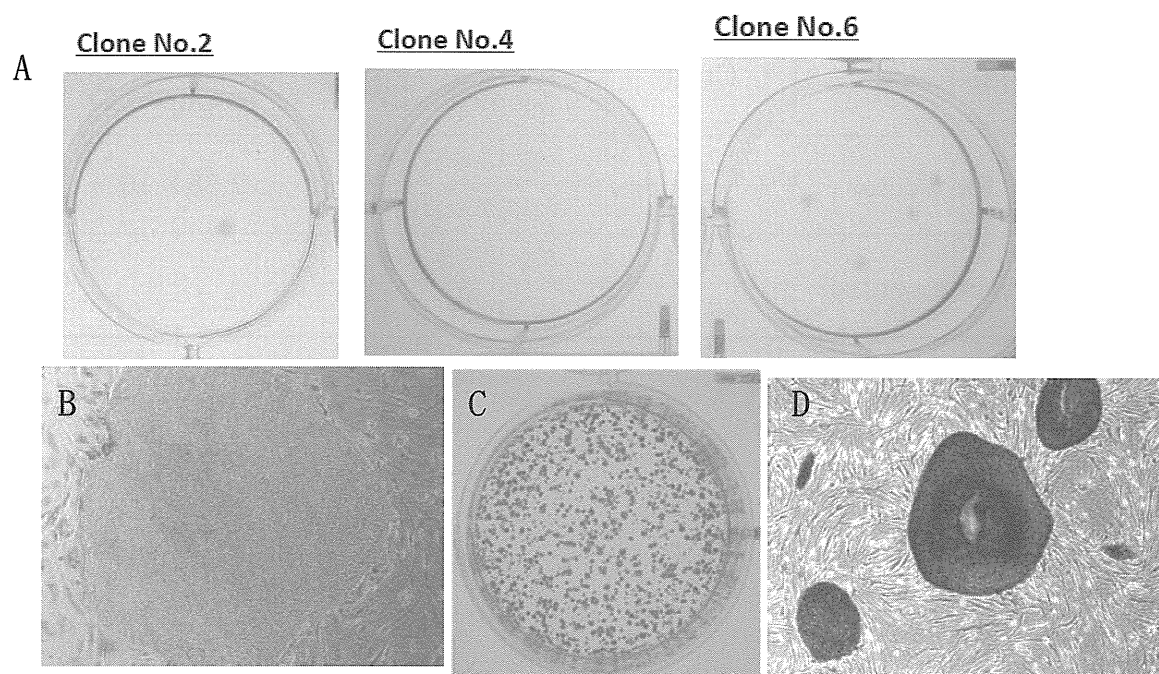


図 7. アルカリホスファターゼ染色



A: アルカリホスファターゼ染色後の 6well プレート写真

B: アルカリホスファターゼ染色後の iPS 細胞コロニーの光学顕微鏡写真(クローン No.6, 40 倍)

C: 一般的な iPS 細胞株のアルカリホスファターゼ染色後の 6well プレート写真

D: 一般的な iPS 細胞株のアルカリホスファターゼ染色後の iPS 細胞コロニーの光学顕微鏡写真(40 倍)

表 1 組換えレトロウイルスベクターの RNA コピー数

Sample name	Ct 値	RNA copy No. (copies/mL)	RNA copy No.平均 (copies/mL)
All-in-One Vector	17.52	2.43×10^{10}	2.55×10^{10}
	17.38	2.67×10^{10}	
Non template control	34.91	検出限界以下	-
	35.43	検出限界以下	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

発表者氏名		書籍名	出版社	ページ	出版年
大串始、赤羽学	間葉系幹細胞を用いた種々骨再生	骨形成最前線	エヌ・テ イーエヌ	217-226	2013
大串始	再生医療技術の実用化における環境整備	Web Journal	アクトラ イム	7-10	2013

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
弓場俊輔、竹谷健	間葉系幹細胞を用いた先天性骨代謝疾患の治療	血液フロンティア	23	487-493	2013
Taketani T, Kanai R, Abe M, Mishima S, Tadokoro M, Katsube Y, Yuba S, Ohgushi H, Fukuda S, Yamaguchi S	Therapy-related Ph+ leukemia after both bone marrow and mesenchymal stem cell transplantation for hypophosphatasia	Pediatr Int	55	e52-55	2013
Taketani T, Onigata K, Kobayashi H, Mushimoto Y, Fukuda S, Yamaguchi S	Clinical and genetic aspects of hypophosphatasia in Japanese patients	Arch Dis Child		doi: 10.1136/ archdisc hild-201 3-305037	2013
Haghparast SM, Kihara T, Shimizu Y, Yuba S, Miyake J.	Actin-based biomechanical features of suspended normal and cancer cells	J Biosci Bioeng	116	380-385	2013
Yagyuu T, Kirita T, Hattori K, Tadokoro M, Ohgushi H	Unique and reliable rat model for the assessment of cell therapy: bone union in the rat mandibular symphysis using bone marrow stromal cells.	J Tissue Eng Regen Med.		doi: 10.1002/ term.16 74.	2012
Teraoka K, Kato T, Hattori K, Ohgushi H	Evaluation of the capacity of mosaic-like porous ceramics with designed pores to support osteoconduction	J Biomed Mater Res A	101	3571-3579	2013

Ishimine H, Yamakawa N, Sasao M, Tadokoro M, Kami D, Komazaki S, Tokuhara M, Takada H, Ito Y, Kuno S, Yoshimura K, Umezawa A, Ohgushi H, Asashima M, Kurisaki A	N-Cadherin is a prospective cell surface marker of human mesenchymal stem cells that have high ability for cardiomyocyte differentiation	Biochem Biophys Res Commun.	438	753-759	2013
Mizuta N, Hattori K, Suzawa Y, Iwai S, Matsumoto T, Tadokoro M, Nakano T, Akashi M, Ohgushi H, Yura Y	Mesenchymal stromal cells improve the osteogenic capabilities of mineralized agarose gels in a rat full- thickness cranial defect model	J Tissue Eng Regen Med.	7	51-60	2013
Ohgushi H	Osteogenically differentiated mesenchymal stem cells and ceramics for bone tissue engineering	Expert Opin Biol Ther.	14	197-208	2014

IV. 研究成果の刊行物・別刷

第4節 間葉系幹細胞を用いた種々骨再生医療

大隈病院／独立行政法人産業技術総合研究所 大串 始 奈良県立医科大学 赤羽 学

1 はじめに

間葉系幹細胞は、英語では mesenchymal stem cell であり、頭文字を取って略語として MSC (複数形として MSCs) と表記される。数多く臨床応用されている間葉系幹細胞は骨髄から得られることが多い。骨髄には間質細胞 (stromal cell) が存在し、微少環境を構築して同じ骨髄に含まれる造血系細胞の維持・増殖をサポートしている。骨髄に存在する間葉系幹細胞は間質細胞に含まれると考えられる。間質細胞は英語では marrow stromal cell であり、略語として MSC と表記される。

このように、間葉系幹細胞も間質細胞も略語では同じ MSC となる。厳密には両者は区別されるべきかと思われるが、間質細胞は浮遊系の血液系細胞と異なり、培養により培養皿に接着する細胞である。この点に関して、本稿で述べる間葉系幹細胞は採取した骨髄を培養皿に静置し、培養皿に接着する細胞を増殖した細胞群である。すなわち、細胞のプレパレーションから見て、本稿における間葉系幹細胞 (MSC) は間質細胞と同義と捉えられる。なお、間葉系幹細胞には幹細胞としての言葉が付加されている。幹細胞とは、自己増殖能と種々の分化細胞への分化能である多分化能を有するとされている。間葉系幹細胞の分化能が限定的であることから、間葉系幹細胞と呼ばずに、間葉系細胞 (mesenchymal cell) と表現される場合もある。しかし、MSC が骨あるいは軟骨への分化能を持つのみならず、この 10 年ほどの研究により神経系の細胞や肝細胞などへ分化する能力を有することが報告されている。実際、筆者らも MSC がこれらの種々分化能力を持つこと報告し、MSC の多分化能を確証している。以上より、本稿では間葉系“幹”細胞 (MSC) という言葉を用い、筆者らの臨床応用に関する MSC 研究を最近の成果を踏まえて概説する。

2 間葉系幹細胞 (MSC) の骨分化能

MSC の骨・軟骨分化に関する研究はロシアの Friedenstein やイギリスの Owen 女史などの先駆的な業績がある¹⁾。これらの報告においては、細胞を保持する diffusion chamber という小さなチャンバーの中に MSC を密封し生体内へ移植する方法、あるいは腎臓の皮膜内へ MSC を移植する方法等を用いて、移植した部位での骨・軟骨の形成を組織学的に検証している。これらの研究により、間葉系幹細胞が生体内への移植により骨・軟骨への分化能を有することが実証された。しかし、臨床応用、特に整形外科や口腔外科領域における臨床応用を考えると、これらの方法論

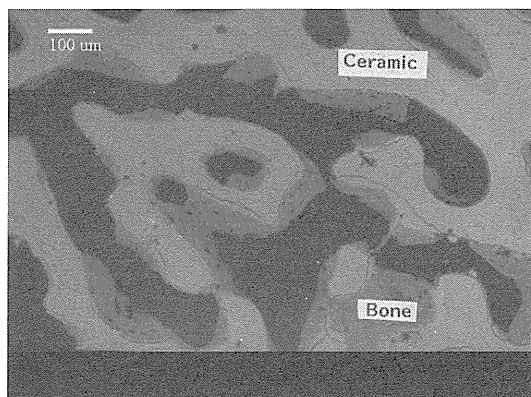


図1 ハイドロキシアパタイトセラミックとラット骨髄の複合体の皮下移植4週後の走査電顕像

白色のセラミック（Ceramic）に接して灰色の新生骨（Bone）が形成される。文献4）の図より許可を得て転載

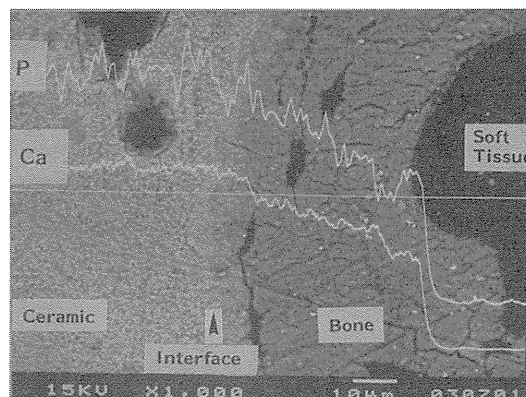


図2 図1の拡大像

セラミック（Ceramic）と新生骨（Bone）の界面（Interface）には軟部組織（Soft tissue）の介在は見られず、セラミックと骨が直接接している。このことは、界面でカルシウム（Ca）とリン（P）の高いカウントが連続していることから確認できる。文献4）の図より許可を得て転載

を用いることはできない。筆者らは1989年に、当時すでに臨床応用されていたリン酸カルシウムセラミックを細胞担体として用いることに注目した。骨髄細胞を個々の細胞にまで分散、あるいは骨髄からMSCを増殖した後にこのセラミック担体と複合化し、既存の骨のない皮下という移植しやすい部位に移植した。結果として、効率良くセラミック内に新生骨形成を検出することができ、骨髄細胞そのものやMSCが生体内への移植により骨分化能を有することを証明した²⁾（図1, 2）。用いた担体が臨床応用されている生体適合性材料であり、また骨髄組織でなく、分離した骨髄細胞や骨髄由来MSCを用いて新生骨形成能を証明したことは、細胞レベルでの骨形成が可能であることを実証し、MSCを用いる骨再生治療へ向けての飛躍を示したと自負している。実際、その後の筆者らの研究を踏まえて、後述のように2000年に世界に先駆けて間葉系幹細胞が組み込まれたセラミック人工関節による関節症の治療が行われた³⁾。

3 MSCを用いた種々骨再生治療の方法論（生体材料の視点より）

3.1 MSCの骨形成の様式

発生段階の骨形成には軟骨形成を介する内軟骨性骨化と軟骨形成を介さない膜性骨化の2つの様式がある。上記のように筆者らはMSCを用いて生体内での骨形成研究を数多く行い、この骨形成は膜性骨化の様式であることを明らかにしてきた⁴⁾。すなわち、MSCが前骨芽細胞への分化を経て骨芽細胞へ分化し、この骨芽細胞により直接骨形成を営むのである（図3）。生じた骨組織はセラミックス表面と強固に結合することが判明した⁴⁾（図2）。また、筆者らはMSCの生体内移植でなく、生体外の細胞培養操作によりMSCが*in vitro*で骨形成（この骨形成を筆者らは再生培養骨と呼称している）を生じる方法論も確立している⁵⁾。この骨形成も培養によって、MSCが骨芽細胞へ分化し、その骨芽細胞により骨基質を培養皿表面に形成するという膜性骨化

の様式である。これらの軟骨形成を介さない骨形成は骨再生医療では有利である。後述のように、筆者らは種々生体材料上で再生培養骨構築を行い、種々患者の骨欠損部への移植を行っている。この場合、軟骨組織の形成が介在すると、その部分での機械特性の弱点が生じると想定され、骨形成が膜性骨化の様式での生じるのは臨床的に見ても重要である。

3.2 種々生体材料を用いる骨再生

我々はセラミックを含む種々生体材料に MSC を播種して、あらかじめ *in vitro* での骨形成を生じさせ（再生培養骨形成）、その後生体内へ移植するという骨再生医療技術を開発

してきた。この方法を用いるには種々のセラミック上での *in vitro* の骨形成が効率良く形成されるかの検証が必要である。例えば、細胞培養に用いる培養皿の表面は plasma 処理をされていることが多く細胞との親和性が高い。この培養皿での MSC による骨形成は上記の様に膜性骨化の様式で骨形成を営み、その骨組織は通常の生体に存在する骨組織に生化学的あるいは物理化学的にも匹敵することを報告している⁶⁾。このように、再生培養骨は生体の骨と同様であり、患者自身の MSC からの再生培養骨は自家骨に匹敵しうると考えられ、臨床応用への展開が十分に考えられた。しかし、培養皿は生体適合性材料ではなく、培養皿に構築された再生培養骨を培養皿と一緒に移植することはできない。その点、生体適合性材料、すなわち種々セラミック上での再生培養骨形成を生じるなら、これら培養骨/セラミックがそのまま移植可能となる。しかし、このような *in vitro* の骨組織が果たして種々のセラミックの上でも形成され、さらに生体内への移植後においてさらなる新生骨を生じるかの疑問がある。この点に関して、ヒト MSC を用いてハイドロキシアパタイトセラミックあるいはリン酸三カルシウムセラミック上での *in vitro* 骨形成（再生培養骨形成）を行い（図4）、その後ヌードラット皮下に移植したところ、新生骨形成が見られ、さらにその新生骨が再生培養骨由来であることも証明している⁷⁾（図5）。すなわち、これらのセラミックを再生培養骨の基盤として臨床応用されることがわかり、実際の骨再生の臨床に用いられている³⁾⁸⁾⁹⁾。

さて、以上述べたように、筆者らは MSC をあらかじめ種々生体材料で *in vitro* の骨形成を構築し、患者に移植する再生医療を行っている。すなわち、生体材料と細胞の複合化による骨再生医療である。生体材料は種々の材料があるが、それらを用いるには対象とする骨疾患によって異なる。volume のある骨形成を必要とし、さらに比較的機械特性を重要視しない疾患においては多孔体のリン酸カルシウムセラミックを用いている。用いたセラミックが生体内で最終的に吸収され、移植されたセラミックが残存しないことが要求される疾患においては、リン酸三カルシウムセラミックを用いている（図6）。また、多大な荷重がかかる部位で高い機械特性を必要とす

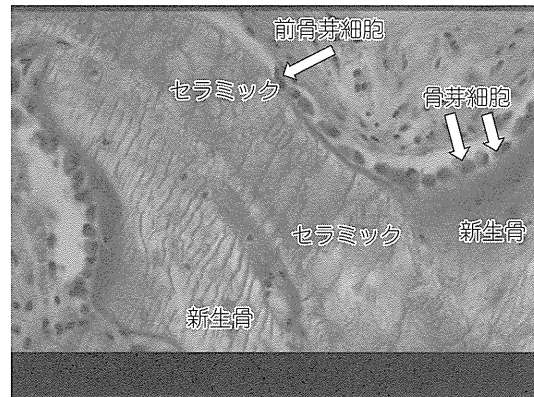
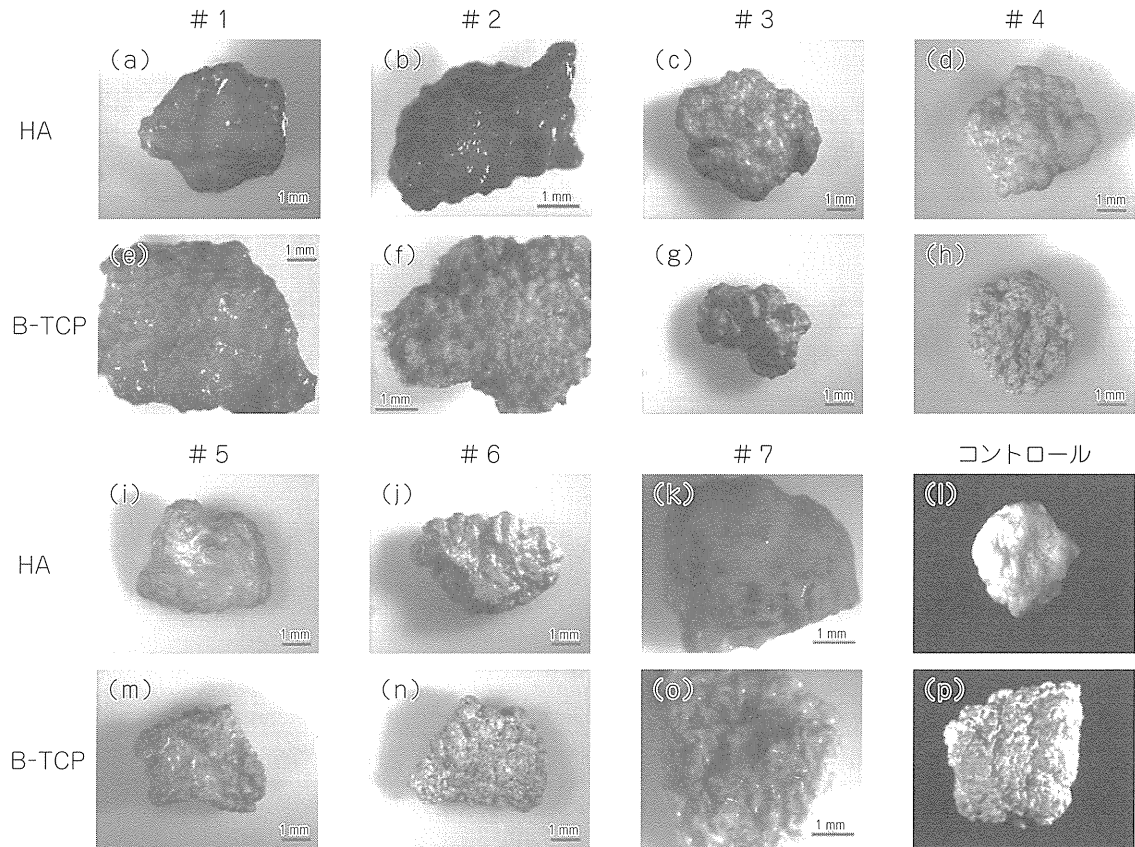


図3 ハイドロキシアパタイトセラミックとラット骨髄の複合体の皮下移植4週後の非脱灰組織像

セラミックに接して間葉系細胞から分化した前骨芽細胞を思われる細胞が出現し、引き続いて骨形成が生じる。文献4)の図より許可を得て転載



※口絵参照

図4 ヒト間葉系幹細胞の多孔体セラミック上での再生培養骨形成

7例（#1～#7）のヒト骨髄から培養増殖した間葉系幹細胞（MSC）を多孔体のハイドロキシアパタイトセラミック（HA）あるいはリン酸三カルシウム（ β -TCP）上に播種し、骨分化条件で二次培養を行い、アルカリフォスファターゼ染色を行う。症例によっては染色が弱いものもあるが、明らかにMSCを播種していないコントロールに比して高い活性を認め、再生培養骨が形成されているのがわかる。文献7）の図より許可を得て転載

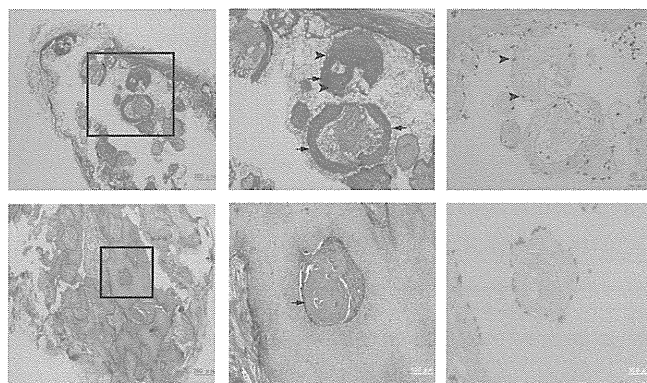


図5 再生培養骨のヌードマウス皮下への移植

図4で見られる#2の症例の培養骨をヌードラットの皮下に移植して8週で摘出。上段はハイドロキシアパタイトセラミック上での培養骨、下段はリン酸三カルシウムセラミック上での培養骨。左端図は脱灰組織で真中図は拡大像、赤く染まる新生骨がセラミックの気孔内に見られる。右端図はヒトのマーカであるAluのin situ hybridizationで、陽性細胞（ドナー細胞）が茶色に染まっている。文献7）の図より許可を得て転載

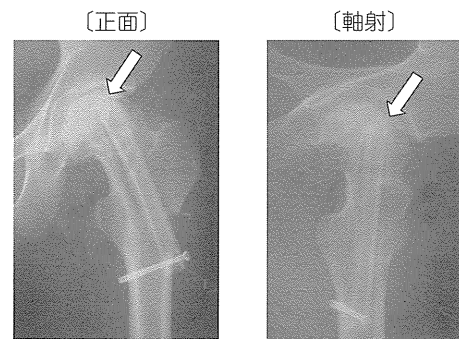


図6 大腿骨頭骨壊死症例に対する再生培養骨移植

本症例では血管柄付き腓骨移植と矢印に見られる培養骨移植を行った。この症例に対する再生治療では、生体吸収性のリン酸三カルシウム（ β -TCP）セラミック上での培養骨形成を行う。文献9）の図より許可を得て転載