

201306018A

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25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26（2014）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25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26（2014）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詳細な検討	1-2
2. 注入型骨移植法 （ヒト骨形成細胞シート注入による人工骨への骨形成能の付与	1-2
3. ヌードラット大腿骨偽関節モデルへの細胞シート注入移植	1-2
4. 細胞シート注入を行った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	1-3
5. ヒツジ骨形成細胞シートの骨形成評価	1-3
6. 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の詳細検討結果	1-3
2. 注入型骨移植法による人工骨への骨形成能の付与の結果	1-4
3. ヌードラット大腿骨偽関節モデルへの細胞シート注入移植の結果	1-4
D. 考察	1-4
E. 研究発表	1-5
F. 知的財産の出願・登録状況	1-6
G. 参考文献	1-7

### II. 分担研究報告

#### 2. ヒト骨髄間葉系幹細胞を用いた細胞シート作製条件の追加検討 上羽智之

A. 研究目的	2-1
B. 研究方法	2-1
1. ヒト骨髄細胞	2-1
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）	2-2
5. 移植標本の骨形成能の評価	2-2
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）	2-3
3.	細胞シートの骨形成能の生化学的検討結果	2-3
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形成細胞シート作製 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	2-5
H.	参考文献	2-5
I.	図	2-6

### 3.偽関節モデルにおける骨形成細胞シート注入移植による骨形成および骨癒合促進

清水隆昌

A.	研究目的	3-1
B.	研究方法	3-2
1.	ヒト骨形成細胞シートの作製方法	3-2
2.	注入型骨移植法による人工骨への骨形成能の付与	3-2
3.	ヌードラット大腿骨偽関節モデルへの細胞シート注入移植	3-2
4.	倫理面での配慮	3-2
C.	研究結果	3-3
1.	注入型骨移植法による人工骨への骨形成能の評価（組織像）	3-3
2.	注入型骨移植法による人工骨への骨形成能の評価（生化学的評価）	3-3
3.	注入型骨移植法によるヌードラット大腿骨偽関節部への 骨形成能の評価	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.ヒト骨形成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

森田有亮

A.	研究目的	4-1
----	------	-----

B.	研究方法	4-1
1.	ラット大腿骨を用いた力学試験方法	4-1
2.	偽関節モデルの作製	4-2
3.	細胞シート注入を行ったヌードラット偽関節モデルの力学的評価	4-2
4.	$\mu$ CT に撮影による偽関節の評価方法	4-2
5.	力学試験結果の統計学的検討	4-2
6.	倫理面での配慮	4-2
C.	研究結果	4-3
1.	$\mu$ CT 撮影による評価結果	4-3
2.	細胞シート注入を行ったヌードラット偽関節モデルの力学的評価の結果	4-3
D.	考察	4-3
E.	結論	4-3
F.	研究発表	4-3
G.	知的財産の出願・登録状況	4-4
H.	参考文献図	4-4
I.	図	4-5

5. ヒツジ骨髄間葉系幹細胞で作製した骨形成細胞シートの骨形成能 赤羽学

A.	研究目的	5-1
B.	研究方法	5-1
1.	ヒツジ骨髄間葉系細胞の培養	5-2
2.	ヒツジ骨形成細胞シート作製	5-2
3.	ヒツジ骨形成細胞シートの骨形成能の評価 (in vitro での検討)	5-2
4.	移植標本の骨形成能の評価	5-2
5.	測定結果の統計学的検討	5-2
6.	倫理面での配慮	5-2
C.	研究結果	5-2
1.	in vitro での細胞シート作製結果	5-2
2.	生体内での細胞シートの骨形成能の検討結果 (組織像)	5-3
3.	細胞シートの骨形成能の生化学検討結果	5-3
D.	考察	5-3
E.	結論	5-3
F.	研究発表	5-4
G.	知的財産の出願・登録状況	5-4
H.	参考文献	5-4
I.	図	5-6

Ⅲ. 研究発表に関する一覧表・・・・・・・・・・・・・・・・・・6-1

Ⅳ. 研究発表に関する参考資料・・・・・・・・・・・・・・・・・・7

## 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て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、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点で独創性が高い。

期待できる成果は、偽関節症の治療成績が飛躍的に向上し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）にも応用できると考えられ、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。

過年度は、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すとともに、骨形成能を評価するために免疫不全動物（ヌードラット）の大腿骨偽関節モデルを確立したが、本年度はその偽関節モデルに対して、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、効果を検証した。合わせて、将来のヒト骨髄細胞シートの臨床応用を検討する上で重要な大動物（ヒツジ）を用いた実験も行って、大動物（ヒツジ）でも骨髄細胞から良好な骨形成能をもつ細胞シートが作製できることを確認した。

#### A. 研究目的

我々はこれまでに実施した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<sup>1-3</sup>。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た実験や大動物を用いた実験で検証す

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、骨形成細胞シートを 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」として報告している<sup>4,5</sup>。

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するための免

疫不全動物モデル（大腿骨偽関節モデル）の作製を行った。

本年度はその偽関節モデルに対して、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、効果を検証した。合わせて、将来のヒト骨髄細胞シートの臨床応用を検討する上で重要な大動物（ヒツジ）を用いた実験も行って、大動物（ヒツジ）でも骨髄細胞から良好な骨形成能をもつ細胞シートが作製できることを確認した。

## B. 研究方法

### B. 1. 細胞シート作製条件の詳細な検討

過年度は市販のヒト細胞を Lonza 社から購入し研究をおこなった。そこで、本年度は同意を得た患者から提供を受けたヒト骨髄細胞を用いてヒト骨形成細胞シート作製条件を過年度よりも詳細に検討した。

ヒト MSC を T75 フラスコ（75cm<sup>2</sup> culture flask, Falcon, BD）で2週間初期培養後、35mm 培養皿（Falcon 35-3001, BD）を用いてデキサメサゾン、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（1×10<sup>4</sup>cell/cm<sup>2</sup>あるいは0.5×10<sup>4</sup>cell/cm<sup>2</sup>）とデキサメサゾン濃度を10,30,50あるいは100μMの組み合わせで検討し、細胞シート作製に適した条件を過年度よりも詳細に検討した。アスコルビン酸添加量は従来通りの82μg/mlとし、培養液の交換は2あるいは3日ごとに行った。

細胞外基質の評価（collagen type1・laminin）を行うためそれぞれの培養条件で培養した細胞からタンパク抽出を行い、電気泳動後 western blotting をおこなった。

次いで、*in vivo*での骨形成能の詳細な評価を行った。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<sup>4</sup>cell/cm<sup>2</sup>とし、100mm ディッシュ（100mmディッシュ;Falcon, BD）を用いてデキサメサゾン濃度を10・30・50・100nMの4種類で作製した。それぞれの細胞シートを人工骨（スーパーポア、直径5mm・高さ2mm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った。組み合わせ方は、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・人工骨複合体作り、複合体として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. 注入型骨移植法（ヒト骨形成細胞シート注入）による人工骨への骨形成能の付与

7週齢ヌードラットを用いて、生体内でのヒト骨形成細胞シート注入移植による骨形成能の検討を行った。

あらかじめヌードラットの背部皮下へ移植しておいた人工骨（スーパーポア、直径5mm・高さ2mmの円盤状β-TCP：ペンタックス社）に対して、14G注射針をつけた注射器を使用し、X線透視下にヒト骨形成細胞シートを注入移植した。

注入移植後1か月で、標本を摘出し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おこなった。

### B. 3. ヌードラット大腿骨偽関節モデルへの細胞シート注入移植

過年度に確立したヌードラットの大腿骨偽関節モデルを使用して細胞シート注入移植の効果を評価した。右大腿骨偽関



節部にスキャフォールドフリーで、X線透視下にヒト骨形成細胞シートの注入移植を行い、偽関節部の骨形成および骨癒合の検討を行った。注入方法は大腿骨を挟んで前後に1枚ずつ移植した。術後レントゲン撮影し、骨癒合状態を評価するために組織像の確認を行った。

注入移植後12週で大腿骨を摘出し、2日間ホルマリン固定し、数日間脱灰処理をおこなったのち、偽関節部が観察できるように大腿骨骨軸に平行にスライスし、中央で組織切片を作製しH-E染色をおこない、組織学的に骨形成および骨癒合の評価を行った。

#### B. 4. 細胞シート注入を行った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

偽関節部の力学的強度が細胞シート注入により正常大腿骨に近づいたかを検討するために、術後12週後に万能試験機(EZ-graph, SHIMADZU)を用いて3点曲げ試験を行った。図1に示すように、採取した大腿骨を3点曲げ試験用のジグ上に設置して試験を行った。押し込み速度は、10mm/minuteとした。

#### ・B. 5. ヒツジ骨形成細胞シートの骨形成評価

大動物でもラットやラビット、ヒト骨髄細胞を用いた場合と同じく骨形成細胞シートが作製できるか、また生体移植後に骨形成が起こるかを検証するため、オスのヒツジを用いて実験を行った。

ヒツジ骨形成細胞シートを作製する条件は、播種細胞数を $0.2 \times 10^4$ 細胞/cm<sup>2</sup>の細胞密度とし、通常用いる培養ディッシュ(Falcon, BD, USA)に播種し、デキサメサゾン、アスコルビン酸添加培地で、14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した。デキサメサゾン濃度は50nM、アスコルビン酸添加量は従来通りの82 $\mu$ g/mlとし、培養液の交換は2あるいは3日ごとに行った。

採取したヒツジ骨形成細胞シートと人工骨(スーパーポア、直径5mm・高さ2mmの円盤状 $\beta$ -TCP:ペンタックス社)を組み合わせ、細胞シート・人工骨複合体を作ったのちに、ヒツジ(骨髄細胞を採取した個体)の背部皮下に移植した(n=5)。組み合わせ方はヒト骨形成細胞シート移植と同様の方法を用いた。

移植後2週で標本を摘出し、組織学および生化学的に骨形成を評価した。

組織用の摘出標本は2日間ホルマリン固定し、数日間脱灰した後、 $\beta$ -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、骨形成マーカーの一つであるアルカリフォスファターゼ(ALP)活性の測定を行った。

#### B. 6. 倫理面での配慮

本研究は本学の倫理委員会に申請し承認を受けた後、患者から提供を受けた骨髄細胞を使用しておこなった。本研究では、ヒト骨髄細胞から作製する骨形成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. 細胞シート作製条件の詳細検討結果

*In vitro*でのそれぞれの培養条件下

でおこなった PCR 法で測定された ALP・オステオカルシン・BMP2・SP7 (osterix)・Runx2 の mRNA 発現量の結果を示す。ALP・BMP2・SP7・Runx2 の発現はデキサメタゾン濃度依存的に上昇が見られた。

通常の骨分化誘導を行った群 (all+群: デキサメタゾン、アスコルビン酸、 $\beta$  グリセロリン酸添加培地での培養) はシート群と同様の傾向が見られ、ほぼ同等の mRNA 発現が見られた。

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、それぞれの mRNA 発現量はほぼ同じ傾向であった。

以上の結果から、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 (骨形成細胞シート) 条件は、播種細胞密度:  $0.5 \times 10^4 \text{ cell/cm}^2$ 、デキサメタゾン濃度: 50 nM、アスコルビン酸濃度: 82  $\mu\text{g/ml}$  で、14 日間の 2 次培養が好ましいと考えられる。

過年度に行った培養条件の検討と異なるヒト細胞を用いて実験を行ったが、得られた至適な培養条件としては同様であった。

### C. 2. 注入型骨移植法による人工骨への骨形成能の付与の結果

ヒト骨形成細胞シートを人工骨に対して注入移植後 1 カ月で摘出したサンプルの組織像では、人工骨内に良好な骨形成が確認できた。注入したヒト骨形成細胞シートによる新生骨形成であると考えられる。

$\beta$ -TCP 単独で移植した対照群と比べ、骨形成マーカー (ALP・OC・BMP・SP7・Runx2) の mRNA 発現量は統計学的に有意に高値であった。このことから、細胞シートを皮下に移植した人工骨に注入移植した場合でも、注入型骨移植による骨形成が認められていると考えられた。

### C. 3. ノードラット大腿骨偽関節モデルへの細胞シート注入移植の結果

ノードラット大腿骨偽関節モデルに対し、ヒト骨形成細胞シートの注入移植した後に経時的に撮影したレントゲン像では、術後 12 週まで偽関節部には明らかな骨形成や骨癒合の所見は得られなかった。

術後 12 週で摘出した大腿骨の組織像でも、レントゲン像と同様に偽関節部は骨癒合が得られておらず、線維性組織が介在していた。

### D. 考察

我々はこれまでに、骨髄培養細胞をシート状に培養した「骨形成細胞シート」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、ラットを用いた動物実験で報告している<sup>4,5</sup>。

本研究では、ヒト骨髄間葉系幹細胞を用いて骨形成細胞シートを作る条件を前年度よりも詳細に検討した。前年度は市販のヒト骨髄細胞を使用した実験であったのに対し、本年度は同意を得た患者から提供を受けたヒト骨髄細胞を用いて詳細に検討した点が異なる。将来の臨床応用を考えるうえで、実際に患者から提供された骨髄細胞を用いて詳細に検討したことは、重要な結果と言える。

者から提供された骨髄細胞を用いて詳細に検討した条件で作製した細胞シートをあらかじめノードラットの皮下に移植しておいた人工骨に注入移植すると、人工骨内部に明らかな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

て作製した骨形成細胞シート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。注入という行為がヒト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。今後は、注射針を用いた注入方法以外に、専用のデバイスを作製し、径を大きくするなど注入時に細胞シートにダメージを与えない新たな方法について検討する必要があると考える。

本年度は大動物での検証も必須であると考え、ヒツジの骨髄細胞から作製した骨形成細胞シートを用いた実験も並行して行った。組織切片で、十分な量の骨形成が確認できた。

これまで小動物での検証が中心で研究を進めてきたが、本研究結果を総合すると、ヒトや大動物でも小動物と同様の培養条件で骨形成細胞シートが作製でき、人工骨と組み合わせて移植する場合だけでなく、注入移植を行った場合でも骨形成が得られることが判明した。将来の臨床応用を検討する上で重要な結果を得ることができた。

## E. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

1 Kenichi Nakano, Keiichi Murata, Takamasa Shimizu, Manabu Akahane, Shohei Omokawa, Yasuhito Tanaka. Osteogenesis of Vascularized Tissue-Engineered Bone Scaffold The68th Annual Meeting of the American Society for

Surgery of the Hand 2013/10/3-5  
San Francisco, USA

2 中野健一、村田景一、清水隆昌、上羽智之、吉良務、赤羽学、面川庄平、川手健次、田中康仁 血管柄付き人工骨への血管誘導能および骨形成能の付与-骨芽細胞シートを用いて- 第33回整形外科バイオマテリアル研究会 2013/12/7 奈良ホテル(奈良)

3 中野健一、村田景一、清水隆昌、赤羽学、小島康宣、仲西康顕、吉良務、大西正宣、面川庄平、川手健次、田中康仁

血管柄付き人工骨作製における骨芽細胞シートの有用性 第20回奈良・横浜・京都バイオメカカンファレンス 2013/12/21

奈良県立医科大学(奈良)

4 吉良務、赤羽学、清水隆昌、中野健一、小泉宗久、川手健次、田中康仁

簡便な細胞シートの保存および輸送条件の検討 第33回整形外科バイオマテリアル研究会 2013/12/7

奈良ホテル(奈良)

5 倉知彦、赤羽学、清水隆昌、加藤優喜、森田有亮、上羽智之、内原好信、藤間保晶、川手健次、田中康仁

凍結保存骨髄間葉系幹細胞由来細胞シートの注入移植による骨形成能の評価 第28回日本整形外科学会基礎学術集会 2013/10/17-18

幕張メッセ、国際会議場(千葉)

6 清水隆昌、赤羽学、森田有亮、上羽智之、稲垣有佐、面川庄平、村田景一、小島康宣、藤間保晶、川手健次、田中康仁

大腿骨偽関節に対する骨芽細胞シートによる治療 第28回日本整形外科学会基礎学術集会 2013/10/17-18 幕張メッセ、国

際会議場（千葉）

7 赤羽学、清水隆昌、上羽智之、  
稲垣有佐、倉知彦、内原好信、中野健  
一、藤間保晶、川手健次、今村知明、  
田中康仁

簡便な細胞シート輸送条件の  
検討 第 28 回日本整形外科学会基礎  
学術集会 2013/10/17-18 幕張メ  
ッセ、国際会議場（千葉）

8 吉良務、清水隆昌、赤羽学、面  
川庄平、小島康宣、村田景一、中野健  
一、仲西康顕、藤間保晶、川手健次、  
田中康仁

間葉系幹細胞シートの皮弁に  
対する影響の検討 第 28 回日本整  
形外科学会基礎学術集会  
2013/10/17-18 幕張メッセ、国  
際会議場（千葉）

9 中野健一、村田景一、清水隆昌、  
上羽智之、吉良務、赤羽学、面川庄平、  
川手健次、田中康仁

血管柄付き人工骨作製におけ  
る骨芽細胞シートの有用性 第 28 回  
日本整形外科学会基礎学術集会  
2013/10/17-18 幕張メッセ、国  
際会議場（千葉）

10 稲垣有佐、赤羽学、上松耕太、  
藤間保晶、小川宗宏、上羽智之、清水  
隆昌、田中寿典、川手健次、田中康仁

骨髄間葉系幹細胞の骨形成に  
対する低酸素環境の影響 第 28 回  
日本整形外科学会基礎学術集会  
2013/10/17-18 幕張メッセ、国  
際会議場（千葉）

11 内原好信、赤羽学、森田有亮、  
中崎真太郎、上羽智之、清水隆昌、倉  
知彦、藤間保晶、川手健次、田中康仁

培養骨芽細胞シートによる放  
射線照射自家処理骨の骨形成 第 28 回

日本整形外科学会基礎学術集会  
2013/10/17-18 幕張メッセ、国  
際会議場（千葉）

12 赤羽学、清水隆昌、面川庄平、  
今村知明、田中康仁

細胞シート輸送をめざした保  
存条件の検討 第 56 回日本手外科学会  
学術集会 2013/4/18-19 神戸国  
際会議場  
（兵庫）

13 中野健一、村田景一、赤羽学、  
面川庄平、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 56 回  
日本手外科学会学術集会  
2013/4/18-19 神戸国際会議  
場  
（兵庫）

14 稲垣有佐、上松耕太、赤羽学、  
小川宗宏、川手健次、田中康仁

骨形成細胞シートによる家兎  
移植腓骨孔間治癒の促進 第 120  
回中部日本整形外科災害外科学会・学  
術集会 2013/4/5-6 ホテルアバロ  
ーム紀の国（和歌山）

## 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.

## 分担研究報告書

### ヒト骨髄間葉系細胞を用いた細胞シート作製条件の追加検討

研究代表者 上羽智之 奈良県立医科大学 整形外科 医員

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

#### 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、 $\beta$ 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「骨形成細胞シート」を作製し、その骨形成能を検証してきた。平成24年度に市販のヒトMSC (Lonza社) を使用して、効率よく細胞シートを作製する条件を検討すると同時に、患者から提供された骨髄細胞でも細胞シートが作製できることを確認した。本研究では、引き続き患者から提供された骨髄細胞で安定して骨形成細胞シートができるか、さらに細かい条件設定で検証をおこなった。

播種する細胞密度の検討では、昨年度と同様に従来の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な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高い濃度であるほど骨形成マーカーの分泌量の増加が見られた。細胞外基質はデキサメサゾンの濃度が低い方が高値であった。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 (ヒト骨形成細胞シート) 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:  $50 \mu\text{M}$ 、アスコルビン酸濃度:  $82 \mu\text{g/ml}$  で14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形成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。

#### A. 研究目的

詳細に追加して行った。

骨髄間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cells; MSCs) は多分化能を有し、デキサメサゾン、アスコルビン酸、 $\beta$ 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<sup>1-4</sup>。

我々はこれまでに、骨髄培養細胞をシート状に培養した「骨形成細胞シート」を作製し、その骨形成能を検討してきた<sup>5-9</sup>。

当該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、患者から提供された骨髄細胞を用いて、骨形成細胞シートを作製する培養条件の検討を

#### B. 研究方法

##### B. 1. ヒト骨髄細胞

本研究では、手術患者から同意のもとに提供を受けた骨髄細胞を用いて研究をおこなった。

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、ヒト細胞の培養に適した条件の検討を行った。その後、細胞シート作製条件の検討を行った。本研究で使用したヒト骨髄細胞は27歳女性の腸骨より採取した骨髄細胞である。

動物モデルにおける細胞シート作製は、 $1 \times 10^4$ 細胞/cm<sup>2</sup>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、14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骨形成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( $1 \times 10^4$ cell/cm<sup>2</sup>あるいは $0.5 \times 10^4$ cell/cm<sup>2</sup>)とデキサメサゾン濃度を10・30・50・100nM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82μg/mlとし、培養液の交換は2あるいは3日ごとに行った<sup>6</sup>。

図1に実験条件の組み合わせを示す。

## B. 3. 細胞シート作製条件の検討 (*in vivo* での検討)

骨形成細胞シートは、*in vitro*での条件検索の結果を受けて、細胞数を $0.5 \times 10^4$ cell/cm<sup>2</sup>とし、100mmディッシュ(100mmディッシュ;Falcon, BD)を用いてデキサメサゾン濃度を10・30・50・100nMの4種類で作製した。4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5mm・高さ2mm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った。

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た(n=4)。ヌードラットは7週齢の雄を使用した。

移植後2か月で標本を摘出し、組織学および生化学的に骨形成を評価した。

## 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形成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)・オステオカルシン(OC)・BMP2、転写因子であるSP7(Runx2)とOsterixのmRNA発現をリアルタイムPCRで定量した。リアルタイムPCR用のプライマーは、Applied Biosystems社のTaqMan® Gene Expression Assaysキットを使用した(ALP: Hs01029144 ml、OC: Hs01587814 g1、BMP2: Hs00154192 ml、SP7: Hs01866874 s1、Runx2: Hs00231692 ml、GAPDH: Hs02758991 g1)。

細胞外基質の評価(collagen type1・laminin)を行うためそれぞれの培養条件で培養した細胞からタンパク抽出を行い、電気泳動後western blottingをおこなった。

## 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、組織学および生化学的に骨形成を評価した。

摘出標本を2日間ホルマリン固定し、

数日間脱灰した後、 $\beta$ -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、骨形成マーカーであるアルカリフォスファターゼ（ALP）・オステオカルシン（OC）・BMP2、転写因子である SP7（Osterix）と Runx2 の mRNA 発現をリアルタイム PCR で定量した。

## B. 6. 倫理面での配慮

本研究では、手術患者から同意を得て提供を受けた骨髄細胞で研究をおこなった。

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、作製した骨形成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 2 に、*In vitro*でのそれぞれの培養条件下でおこなった PCR 法で測定された ALP・オステオカルシン・BMP2・SP7・Runx2 の mRNA 量の結果を示す。ALP・BMP2・SP7・Runx2 の発現はデキサ

メタゾン濃度依存的に上昇が見られた。

通常 of 骨分化誘導を行った群（all+群：デキサメサゾン、アスコルビン酸、 $\beta$ グリセロリン酸添加培地での培養）はシート群と同様の傾向が見られ、ほぼ同等量の mRNA 発現が見られた。

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、それぞれの mRNA 発現量はほぼ同じ傾向であった。

細胞外基質の western blotting は、collagen1 はデキサメタゾン濃度で差は認めなかったが、Laminin はデキサメタゾン 50 nM と 100 nM の比較では 50 nM の方が高かった（図 3）。

実際作製したシートはデキサメタゾン濃度が低い方が丈夫で裂けにくかったため、ハンドリングが容易であろうと推測できた。

### 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 4 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。組織像からは 10 nM では一部のみ人工骨内に骨形成を認めたが、デキサメタゾン濃度が高い方が人工骨内に良好な骨形成が認められた。

### C. 3. 細胞シートの骨形成能の生化学的検討結果

図 5 に移植後 2 カ月で摘出したサンプルの ALP・オステオカルシン・BMP2・SP7・Runx2 の mRNA 発現量の結果を示す。

$\beta$ -TCP のみを移植した対照群に比べて、骨形成細胞シートを組み合わせた  $\beta$ -TCP の mRNA 発現量は高かった。このことから  $\beta$ -TCP・骨形成細胞シート群で複合体内に骨形成が認められていると考えられた。mRNA 発現量は濃度が高



いデキサメタゾンで作製したシートとの組み合わせの方が高い傾向であった。BMP2 と Runx2 はデキサメタゾン濃度を 50 nM と 100 nM で作製した細胞シートは 10 nM・30 nM で作製した細胞シートより有意に高値であった。

#### 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形成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(骨形成細胞シート)条件は、播種細胞密度: $0.5 \times 10^4 \text{cell/cm}^2$ 、デキサメタゾン濃度: 50 nM、アスコルビン酸濃度:  $82 \mu\text{g/ml}$  で 14 日間の 2 次培養が好ましいと考えられる。

過年度に行った培養条件の検討と異なるヒト細胞を用いて実験を行ったが、培養条件としては同様であった。

#### E. 考察

平成 24 年度は市販の骨髄間葉系幹細胞を用いて骨形成細胞シート作製の培養条件の検討をおこなったところ、ラットなどの実験動物や市販の骨髄間葉系幹細胞の条件と異なることが判明した。今年度はより臨床に近い形での詳細な検討を行うために、患者から同意を得て採取した骨髄細胞を用いて細胞シートを作る条件を再度詳細に検討したところ、ヒト骨髄細胞から骨形成細胞シートを作るために好ましいと考えられる培養条件は平成 24 年度に得られた結果と異なり、細胞播種密度を  $0.5 \times 10^4 \text{cell/cm}^2$ 、デキサメタゾン濃度を 50 nM、アスコルビン酸濃度:  $82 \mu\text{g/ml}$  で 14 日間の 2 次培養が好ましいと判明した。

今回の検討ではデキサメタゾン濃度を 4 つの条件で設定し骨形成能をリア

ルタイム PCR 法で検討すると、*In vitro* ではデキサメタゾン濃度を高くすれば骨形成能は高くなることが判明した。また細胞外基質の評価として western blotting 法を用いて確認したところ、デキサメタゾン濃度を 100 nM とすると laminin が他の条件と比較して低値となった。実際、デキサメタゾン濃度を 100 nM で細胞シートを作製しスクレーパーで培養皿周囲からはがす時に比較的容易に破れてしまい、その取扱いが難しかった。

細胞播種密度は  $0.5 \times 10^4 \text{cell/cm}^2$  と  $1.0 \times 10^4 \text{cell/cm}^2$  で比較すると骨形成能に大きな差は認めなかったため、より少ない細胞数で培養可能な  $0.5 \times 10^4 \text{cell/cm}^2$  の細胞密度での播種が良いと判断した。

細胞播種密度を  $0.5 \times 10^4 \text{cell/cm}^2$  として 4 つのデキサメタゾン濃度で作製した細胞シートと人工骨を組み合わせヌードラット皮下へ移植したところ、生体内でも生体外 (*In vitro*) と同様の傾向を示しデキサメタゾン濃度が高い方が骨形成能は高い値を示した。細胞シートのハンドリングのしやすさはデキサメタゾン濃度が 50 nM 以下では容易に破れることはなく取扱いが容易であるため、骨形成能を考慮し最終的にデキサメタゾン濃度を 50 nM と決定した。

昨年度の実験ではデキサメタゾン濃度を 10 nM と 100 nM の 2 条件だけであったので、今年度は条件をさらに細かく設定した。また市販の細胞は純粋な骨髄間葉系幹細胞であるが、患者から採取した細胞は骨髄細胞であり、細胞の中には様々に分化した細胞が存在していると考えられ、これらも条件決定に影響を与えた可能性がある。

患者から採取した骨髄細胞から間葉系幹細胞を抽出し培養をおこなう方が良いかは議論のあるところだが、今回使用した実験モデルはより実際の臨床

にそくしたものであると思われる。

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、偽関節部への骨形成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

なし

## 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. 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  $\beta$ -tricalcium phosphate ceramics and free vascularized fibula. *Artif Organs* 30: 960-962, 2006.

3. 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.
4. 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
5. Nakamura A, Akahane M, Shigematsu H, Tadokoro M, Ohgushi H, Dohi Y, Imamura T, Tanaka Y. Cell sheet transplantation of cultured mesenchymal stem cells enhances bone formation in a rat nonunion model. *Bone*. 2010 Feb;46(2): 418-424.
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. 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.
8. 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.
9. 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 培養条件の検討の組み合わせ

