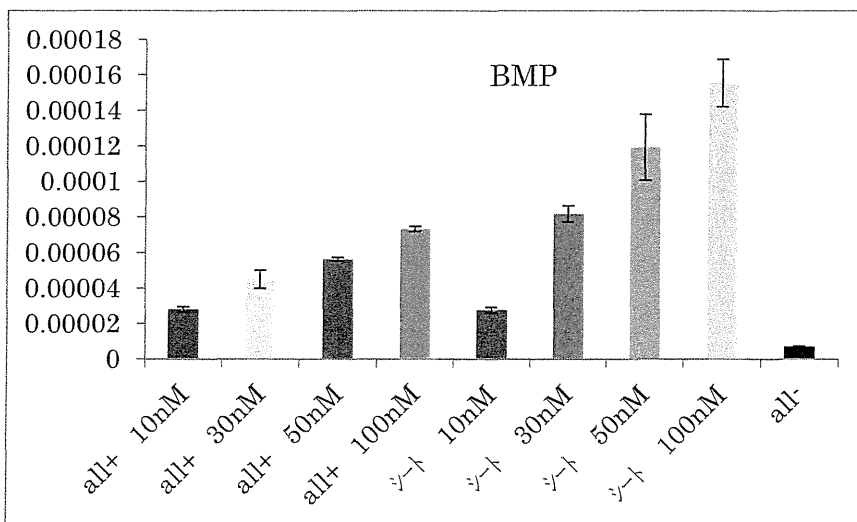
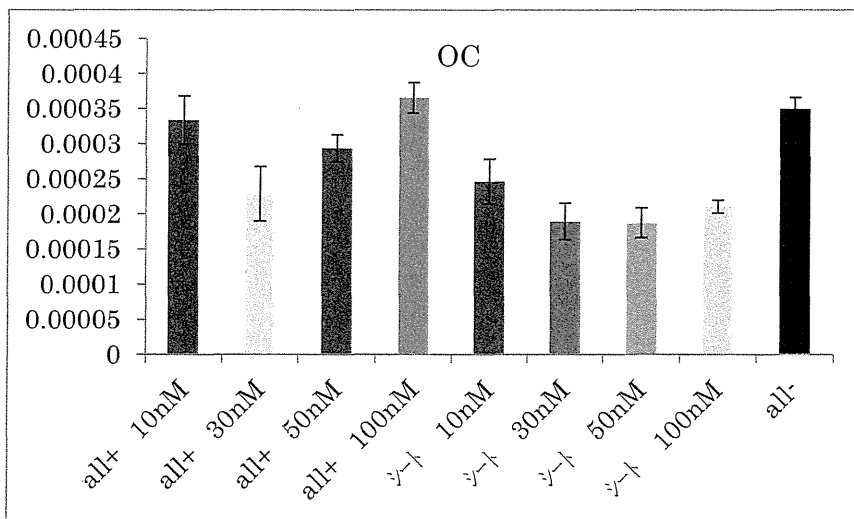
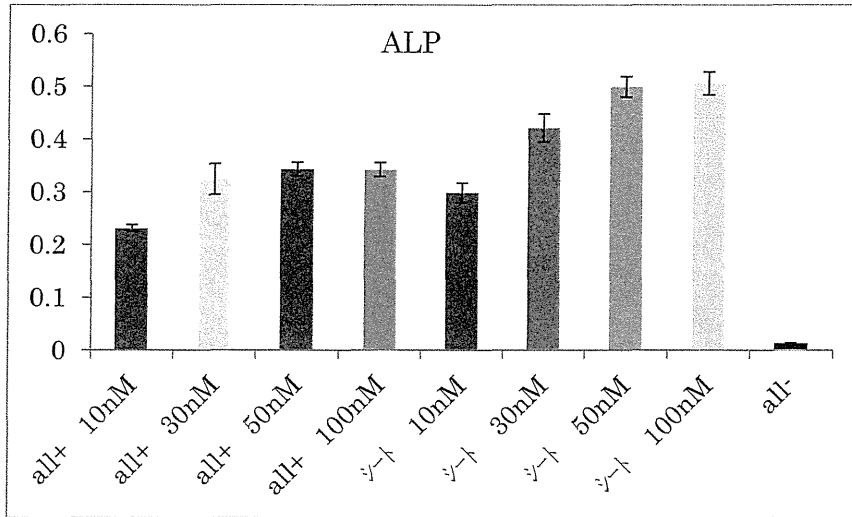
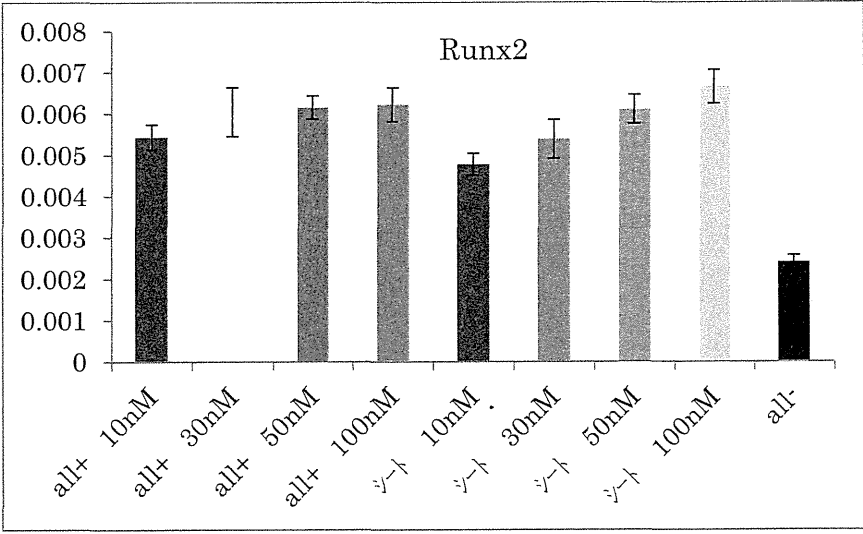
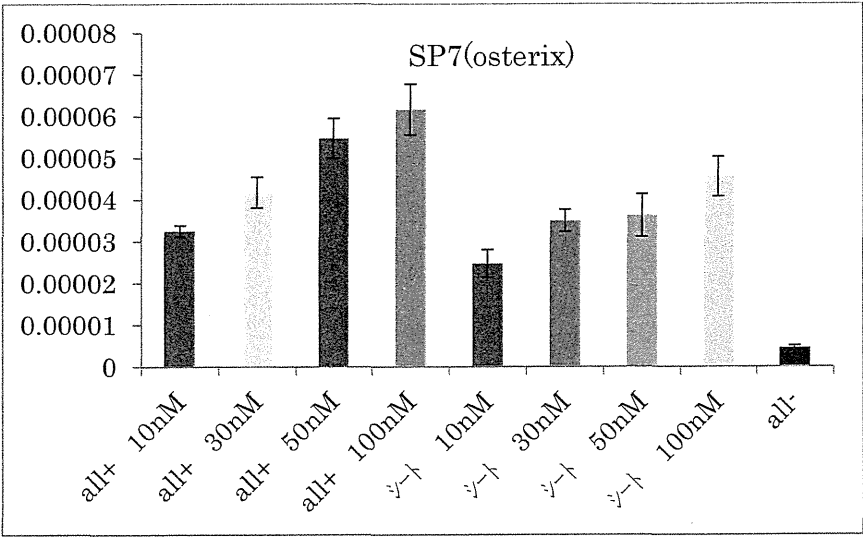


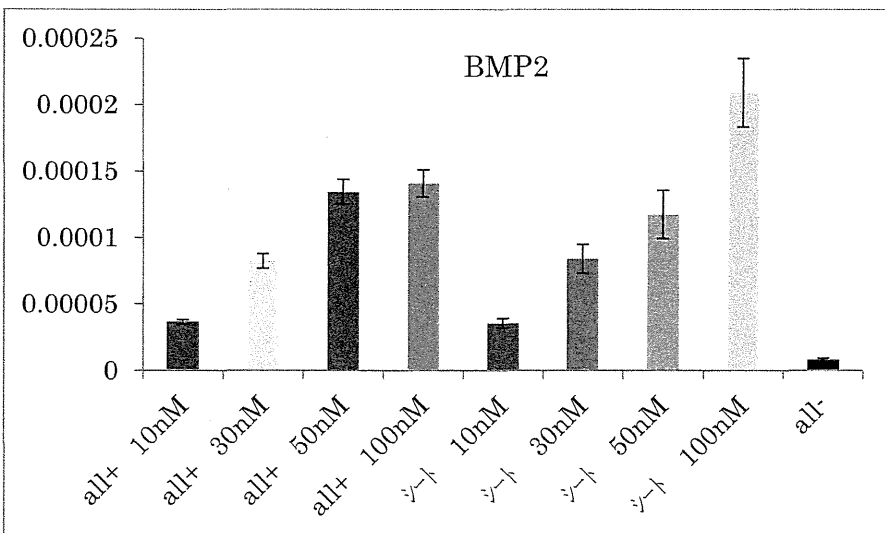
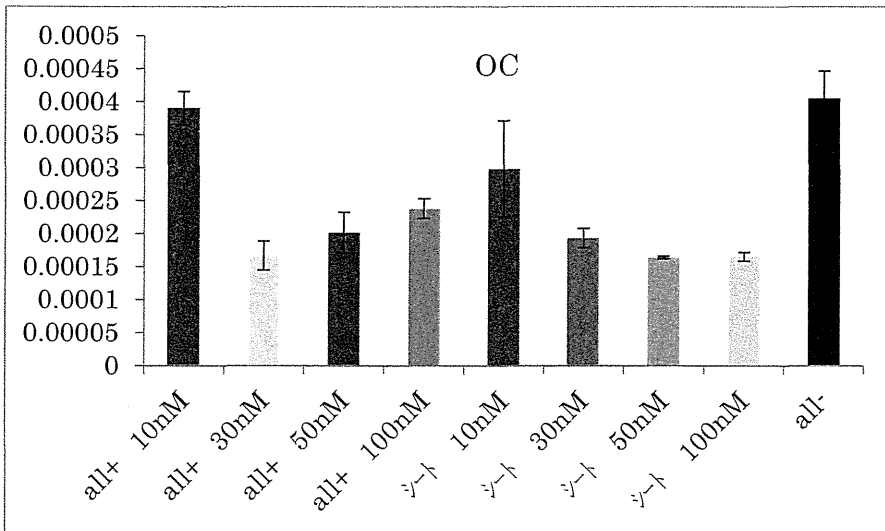
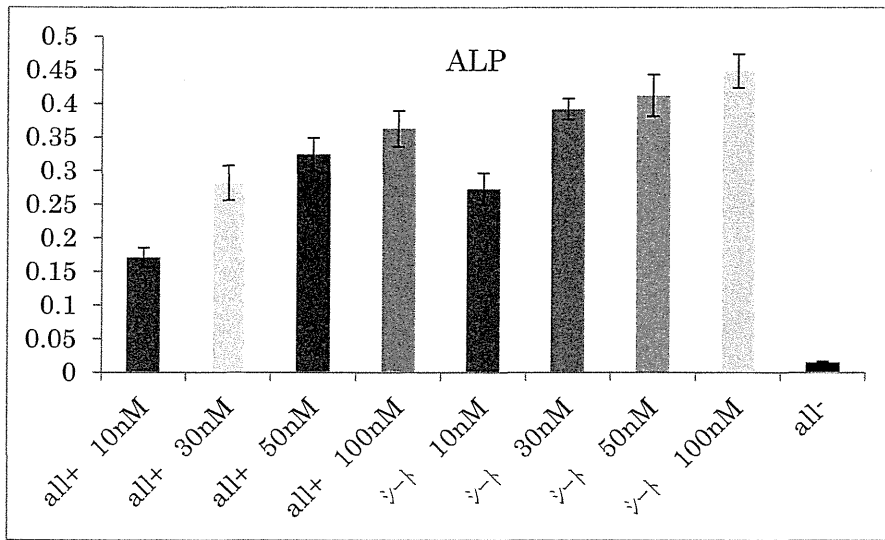
図2 骨形成マーカーの遺伝子発現量 (*In vitro*)

● 細胞播種濃度 $0.5 \times 10^4 \text{ cell/cm}^2$ (n=4)





- 細胞播種濃度 $1.0 \times 10^4 \text{ cell/cm}^2 (n=4)$



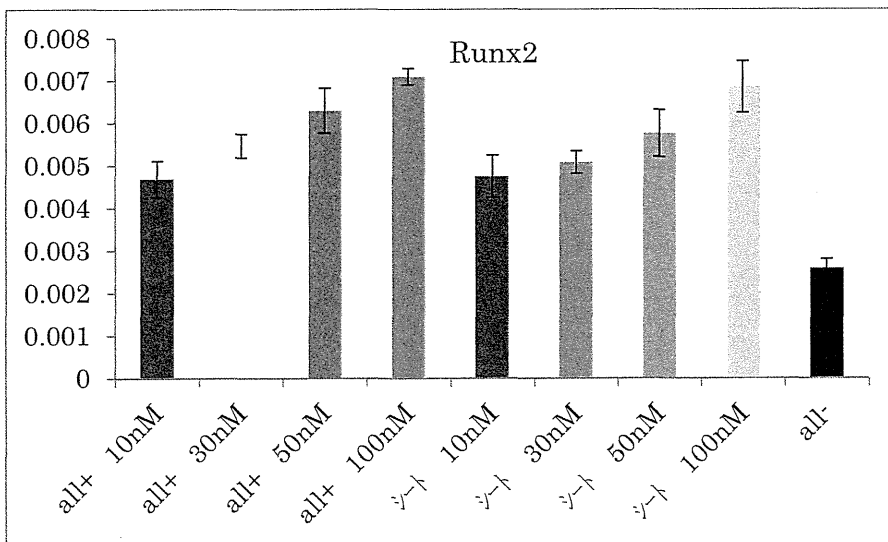
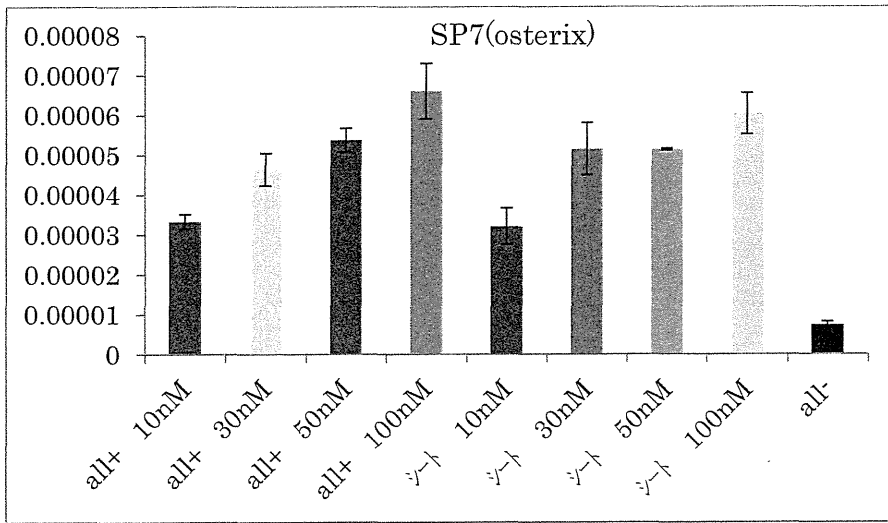
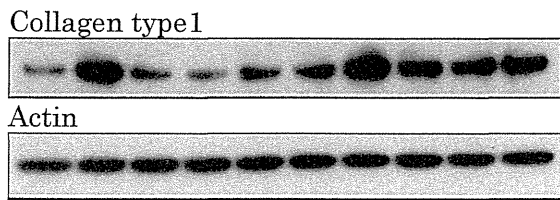
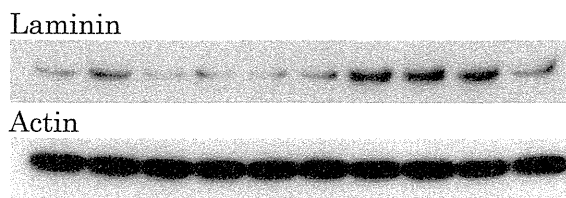
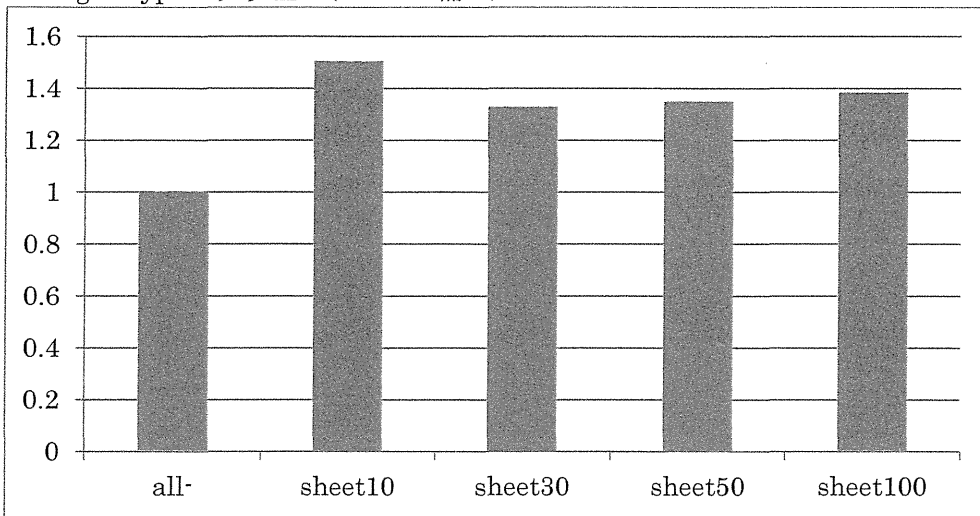


図3 細胞外基質の発現量の評価 (Western blotting)



Collagen type 1 発現量 (actin で補正)



Laminin 発現量 (actin で補正)

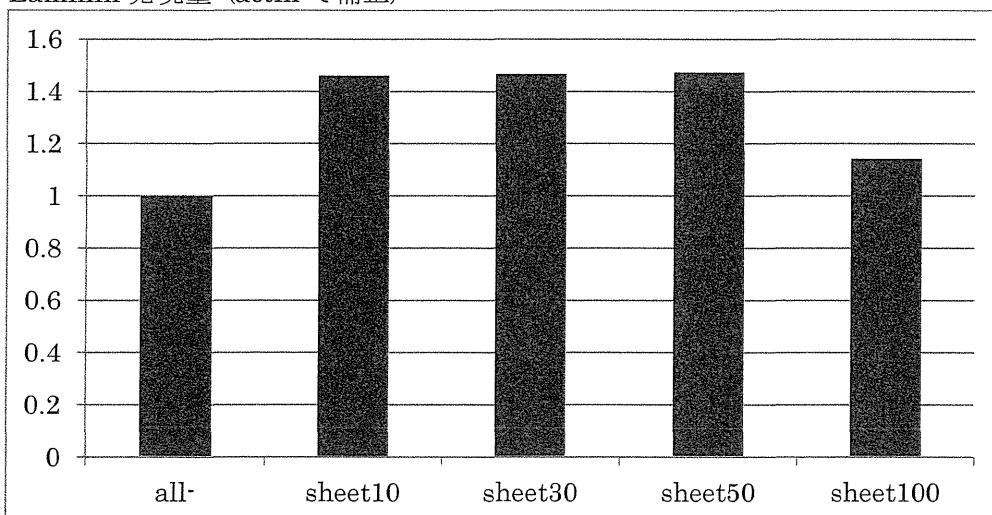
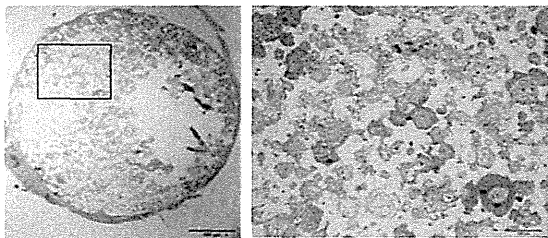
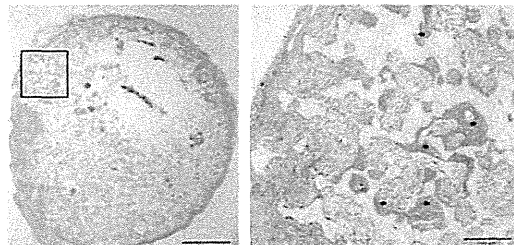


図4 生体内での細胞シートの骨形成能の検討結果（組織像）

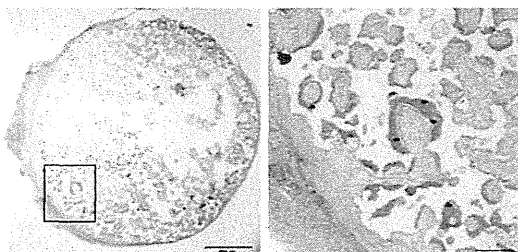
Dex:10nM



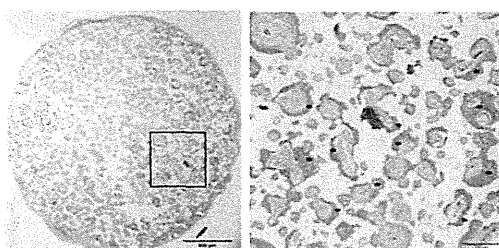
Dex:30nM



Dex:50nM

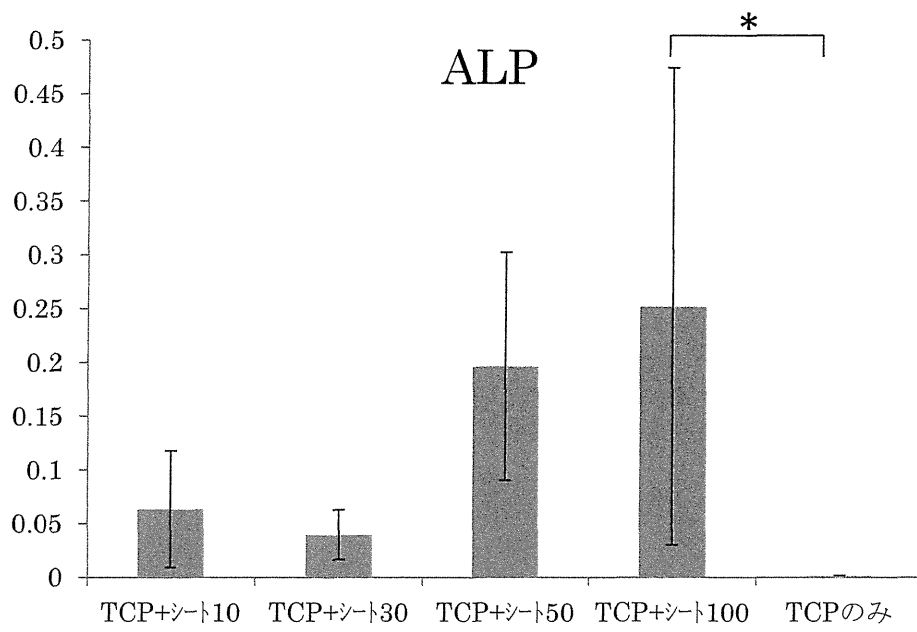


Dex:100nM

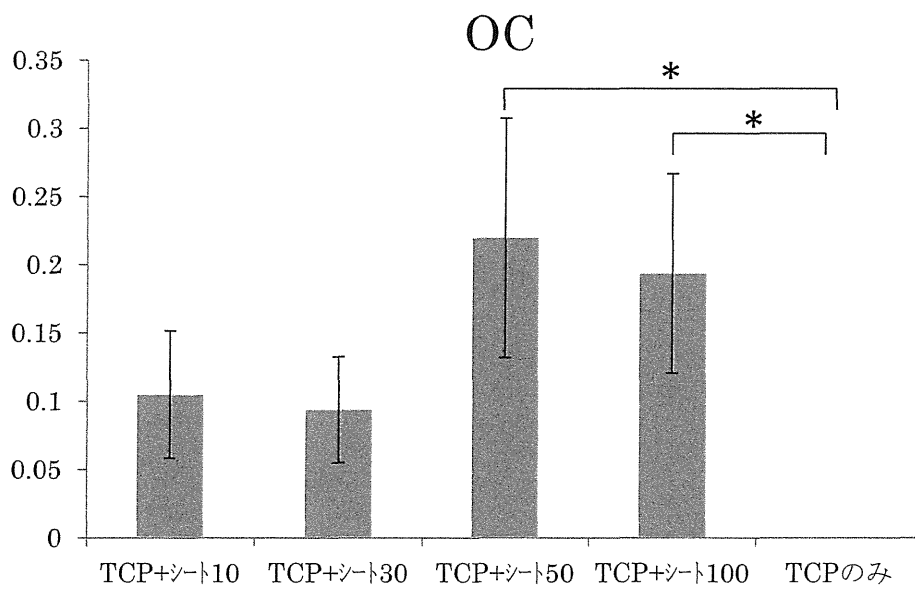


Dex: デキサメサゾン濃度

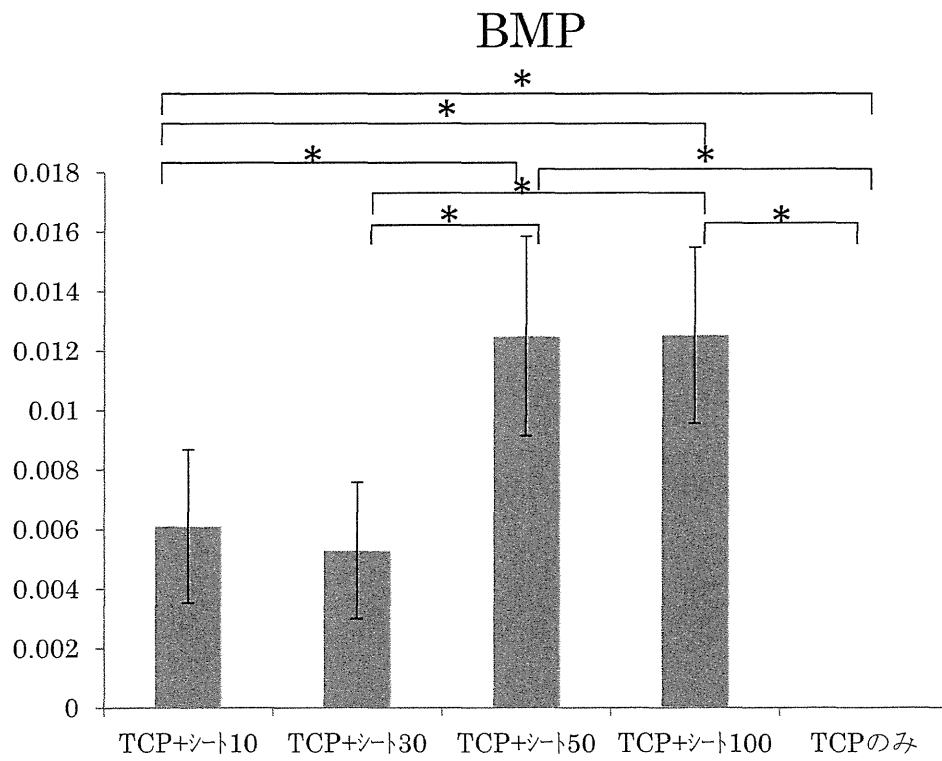
図5 骨形成マーカー発現量 (*In vivo*)



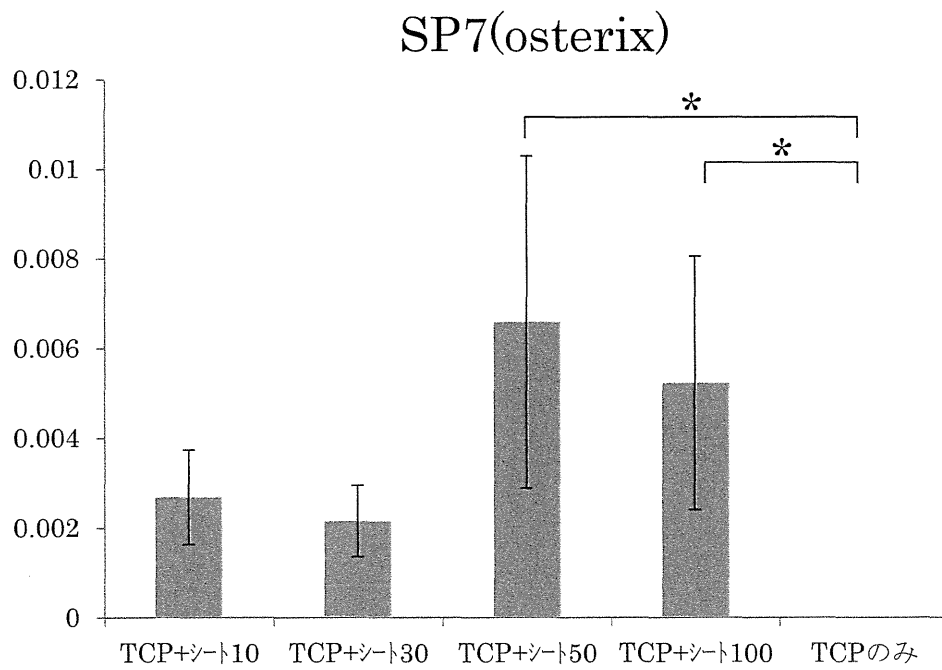
n=4 *P<0.05



n=4 *P<0.05

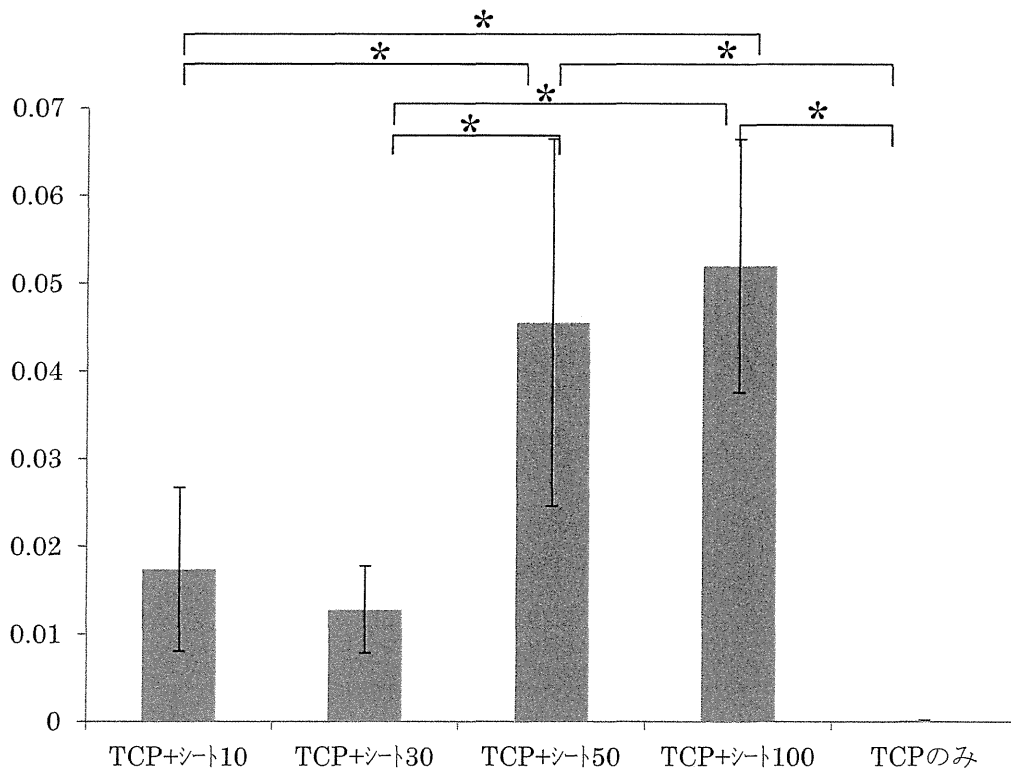


n=4 *P<0.05



n=4 *P<0.05

Runx2



n=4 *P<0.05

分担研究報告書

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

研究分担者 清水隆昌 奈良県立医科大学 整形外科 医員

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 田中康仁 奈良県立医科大学 整形外科 教授

研究要旨

我々はこれまでにラットを用いた動物実験で、骨形成細胞シートを 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と期待できる。

本研究では、患者から提供された骨髄細胞を用いて作製したヒト骨形成細胞シートの注入で、生体内で骨形成が得られるか検証した。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し、新生骨形成が得られるかを組織学的に観察するとともに、1 か月後に摘出し生化学的にも評価をおこなった。組織標本では、人工骨の気孔内に骨形成を認め、リアルタイム PCR 法でも骨形成マーカーの mRNA 発現量が、人工骨単独で移植した群と比べるとシートを注入した群で上昇していた。以上のことから、ヒト骨形成細胞シート注入による「注入型骨移植法」が、ラット等の動物細胞と同様に可能であることが示された。

本研究では、過年度に確立したヌードラット大腿骨偽関節モデルを用い、注射器で偽関節部へ骨形成細胞シートを注入し、骨癒合が得られるかを経時的レントゲン評価に加え、12 週間後に大腿骨を摘出し組織学的に評価した。レントゲンでは明らかな骨癒合は得られず、組織学的にも偽関節部に軟部組織が介在し骨癒合は得られなかった。今回の検討では、人工骨へヒト細胞シートを注入移植し骨形成を認めたが、偽関節部への scaffold free でのヒト骨形成細胞シート注入移植では骨形成および骨癒合は得られなかった。今後は、骨癒合が得られなかった原因として細胞シート自体の問題であるのか、ヒト細胞を免疫不全動物に移植したモデルの問題であるのか検討する必要がある。

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」として確立し、報

告してきた^{4,5}。

本研究課題では患者から提供をうけた骨髄細胞で骨形成細胞シートを作製し、皮下に移植した人工骨へ注射器を使って注入することで骨形成が得られるかを検証し、ヒトでも注入型骨移植が可能であることを明らかにする。

ヌードラット背部皮下へあらかじめ移植していた人工骨に細胞シートを注入移植することで、異所性に骨形成が

得られるかを検証する。また平成 24 年度確立したヌードラット大腿骨偽関節モデルに細胞シートを注入移植し骨形成および骨癒合が得られるかを検討した。

B. 研究方法

B. 1. ヒト骨形成細胞シートの作製方法

本研究で使用したヒト骨髄細胞は、38 歳男性の腸骨より採取した骨髄細胞である。細胞シート作製は、本研究の分担研究の一つとして検討をおこない決定した条件で作製した。

骨髄細胞を T75 フラスコ (75cm² culture flask, Falcon, BD) で 2 週間初期培養後、10 cm 培養皿 (100 mm ディッシュ; Falcon 35-3003, BD) に 0.5×10^4 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 (AsaP: 82µg/ml) とデキサメタゾン (Dex : 50nM) を添加し培養を行った。2 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、ヒト骨形成細胞シートを採取した。

B. 2. 注入型骨移植法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 2mm 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、生体内でのヒト骨形成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、14G 注射針をつけた注射器を使用しヒト骨形成細胞シートを注入移植した。

移植後 1 カ月で標本を摘出し 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。

また、生化学的評価としてリアルタイム PCR 法で骨形成マーカーの mRNA 発現量を測定した。リアルタイム PCR 用のプライマーは、Applied Biosystems 社の TaqMan® Gene Expression Assays キットを使用して行った (ALP: Hs01029144 m1、OC: Hs01587814 g1、BMP2: Hs00154192 m1、SP7 : Hs01866874 s1、Runx2 : Hs00231692 m1、GAPDH: Hs02758991 g1)。

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ヤフォールドフリーで、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 2・4・8・12 週でレントゲン撮影した。骨癒合状態を評価するため組織像の評価を行った。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 (n=4)。

B. 4. 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. 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）

図 1 に移植後 1 カ月で摘出したサンプルの組織像を示す。人工骨内に良好な骨形成が確認できた。注入した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。

C. 2. 注入型移植法による人工骨への骨形成能の評価（生化学的評価）

図 2 に移植後 1 カ月で摘出した標本のリアルタイム PCR 法による mRNA 発現量の測定結果を示す。

β -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することで、人工骨に骨形成が認められていると考えられた。

C. 3. 注入型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

図 3 に経時的なレントゲン像の結果を示す。術後 12 週まで偽関節部には明らかな骨形成や骨癒合は得られなかった。

図 4 に術後 12 週で摘出した大腿骨の組織像を示す。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

我々はこれまでにラットやラビットの細胞を用いて、骨形成能を有する細胞シートを作製する方法を考案し、皮下へ細胞シートを注入することによって異所性の骨形成を認めることを確認している^{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、細胞シートを注入すると、人工骨周囲に骨形成を認めることも報告している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（ β -TCP）周囲に注入し、人工骨気孔内に骨形成が見られた。また、骨形成能の評価として、リアルタイム PCR 法による mRNA 発現量を定量評価した。 β -TCP 単独で移植した対照群と比べ、細胞シートを注入移植した群の骨形成マーカーの mRNA 量は有意に高値であった。つまり、細胞シートの注入移植により人工骨に骨形成能を付与することができたことから、ヒト骨形成細胞シートを用いた「注入型骨移植」は可能であると考えられた。

しかし、ヌードラット偽関節モデルに細胞シート注入移植をおこなっても、レントゲンおよび組織学的に骨形成および骨癒合は確認できなかった。これは様々な要因が考えられる。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たため、細胞活性の低下をきたし偽関節という厳しい環境下で骨形成が得られなかった可能性がある。また細胞シート自体の骨形成能が偽関節に対して骨癒合させるほどの骨形成能を有していない可能性も考えられる。今回偽関節に対して 2 枚の細胞シートを注入移植したが、2 枚では骨癒合できるだけの細胞数が少なく、骨形成する前に吸収された可能性も考えられる。

またレシピエント側の問題もあるか

と思われる。ヌードラットは免疫不全動物のため炎症系サイトカインの発現が抑制されている。そのため、骨形成にも少なからず影響がある可能性がある。今回の結果では注入による人工骨への骨形成能の付与は可能であったため、免疫不全動物に作製した偽関節部という局所環境が細胞シートを用いた移植モデルとして好ましくなかったのかもしれない。

今後、ヌードラットの偽関節に対して骨癒合を得ることが出来なかったことに対しては、細胞シートの枚数を増やすことや、何らかの骨形成因子の追加投与や注入移植法の改善など、骨形成細胞シートを用いた「注入型骨移植」に併用できる手技の検討も必要と考える。

E. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

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

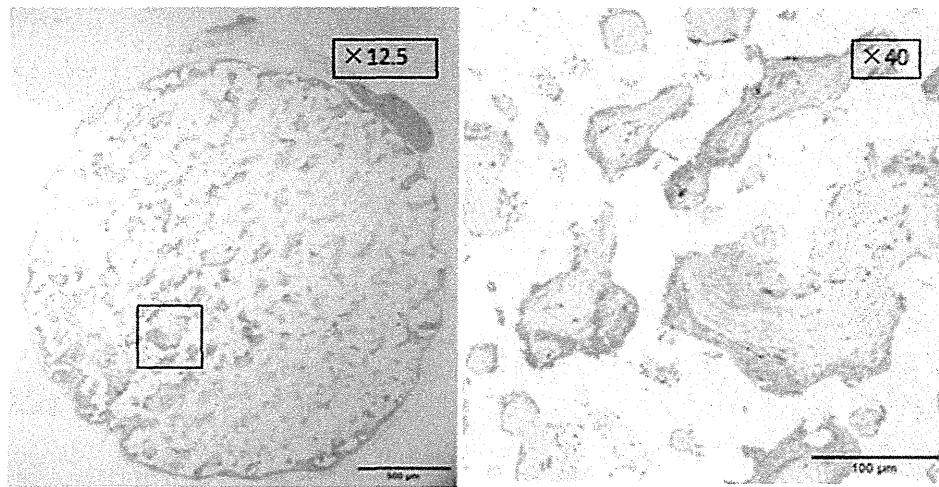
G. 参考文献

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.
6. M. Akahane, T. Ueha, T. Shimizu, Yusuke Inagaki, Akira Kido, Tomoaki Imamura, Kenji Kawate,

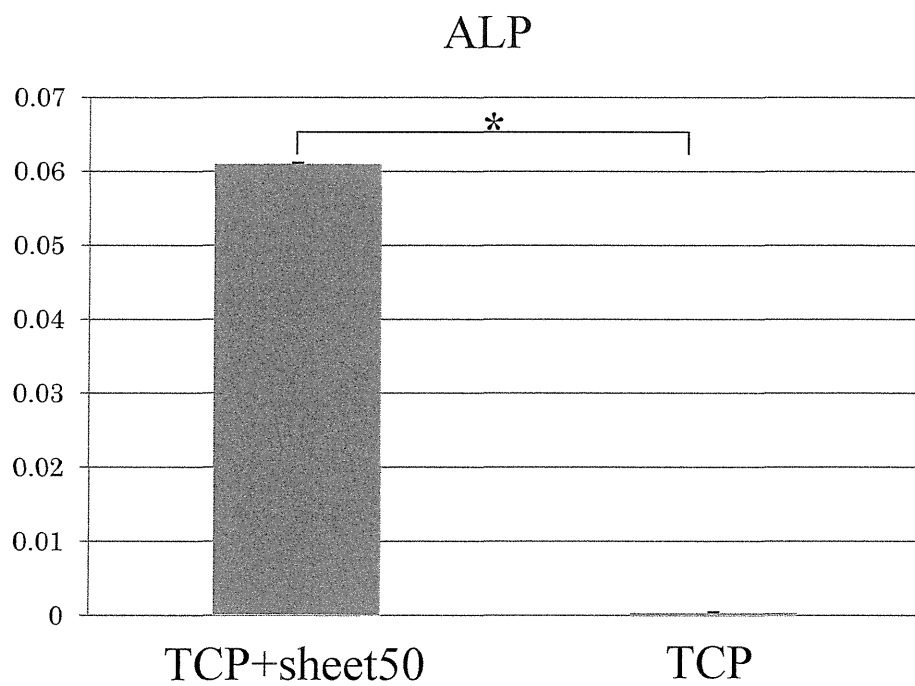
Yasuhito Tanaka. Increased osteogenesis with hydroxyapatite constructs combined with serially-passaged bone7.

marrow-derived mesenchymal stem cells. Stem Cell Discovery 2, 133-140, 2012.

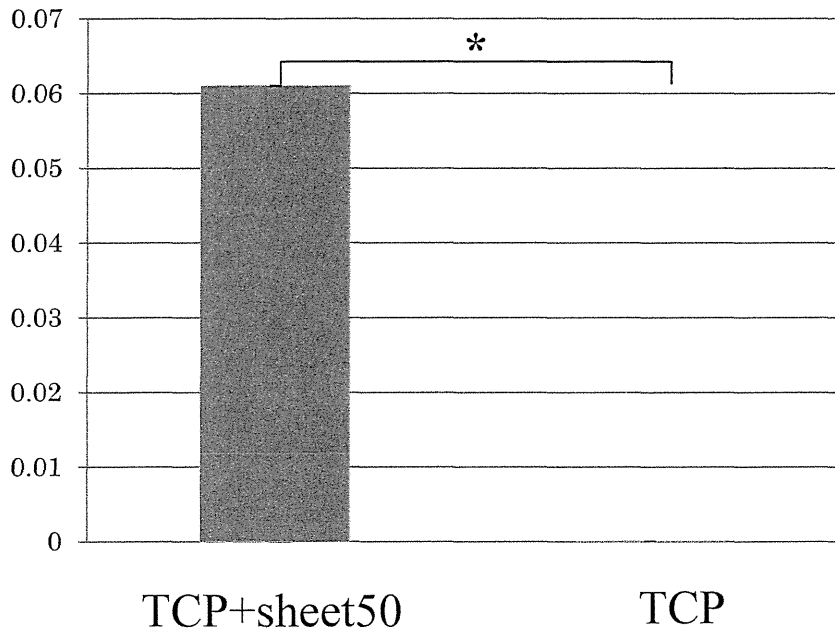
- ・ 図1 注入型移植法による人工骨への骨形成能付与の評価結果（組織像）



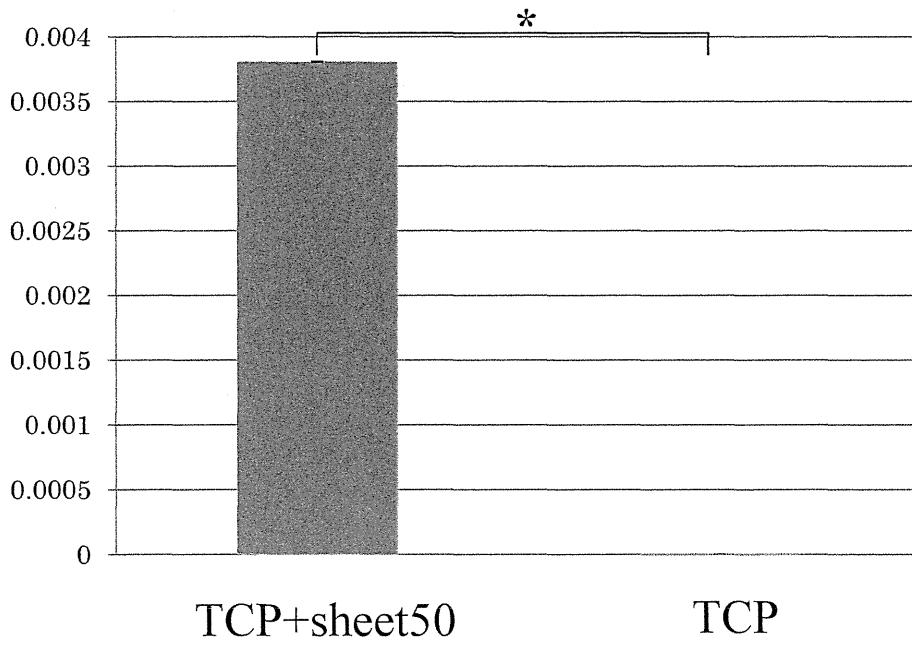
- ・ 図2 注入型移植法による人工骨への骨形成能付与の評価結果（生化学的）



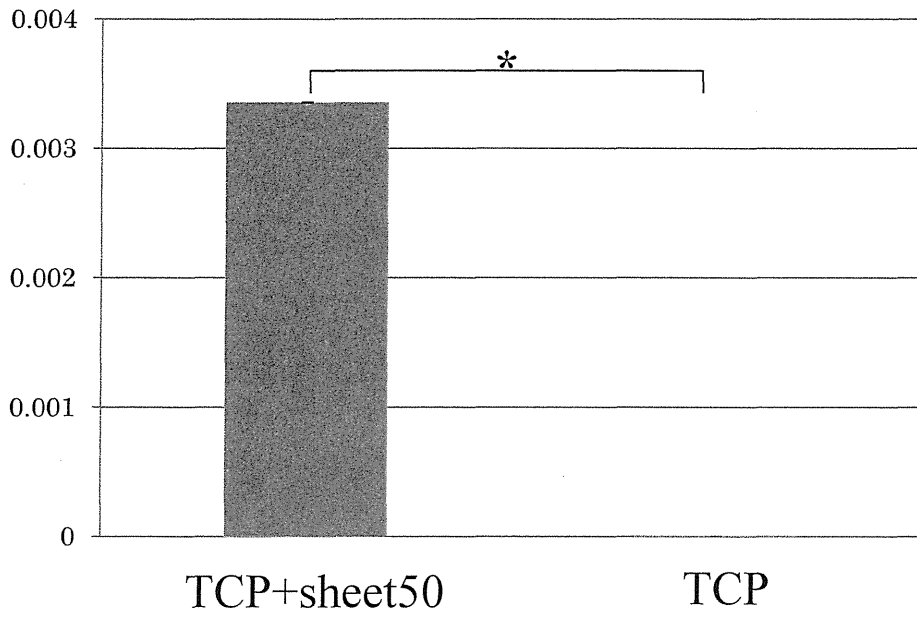
OC



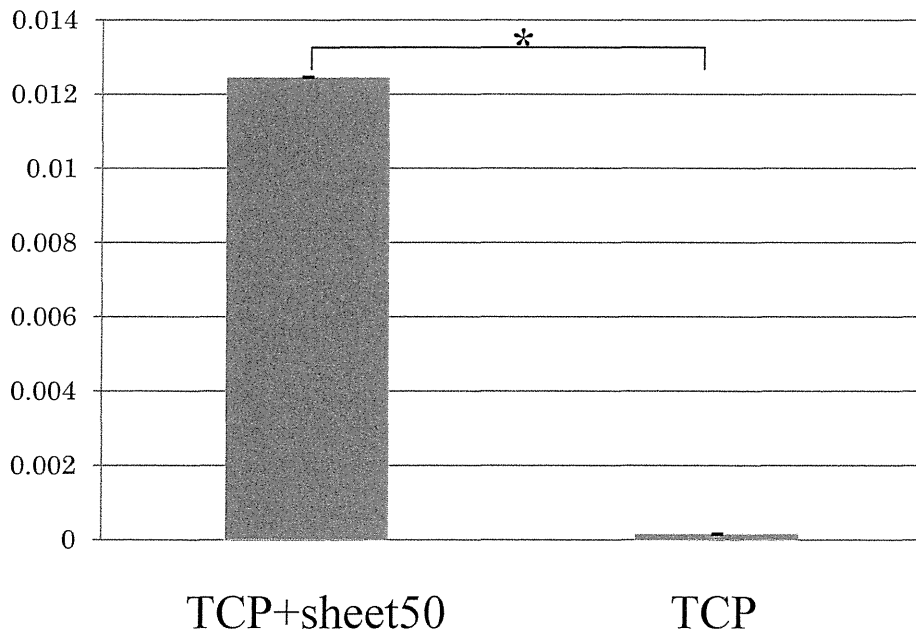
BMP2



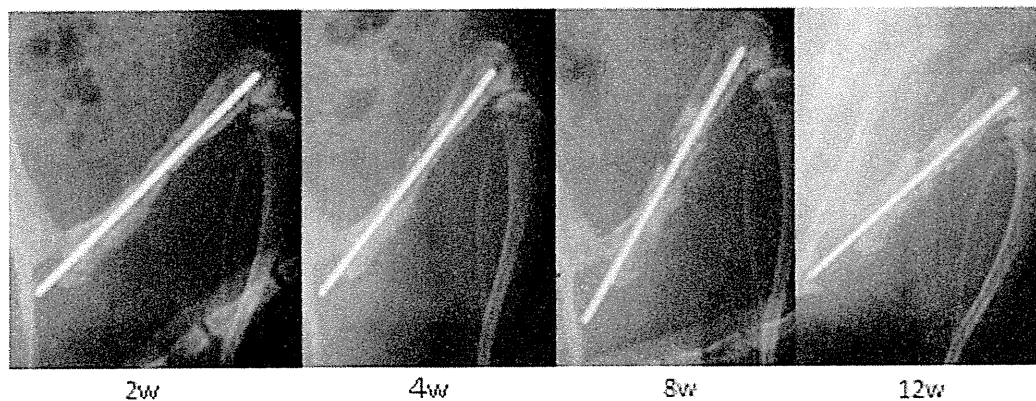
SP7



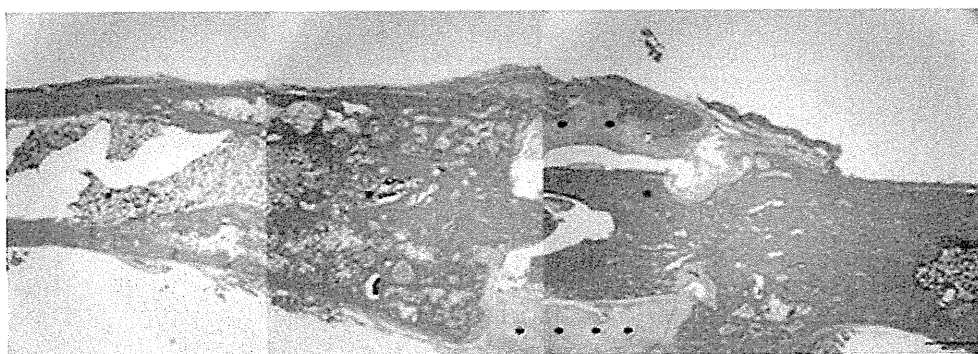
Runx2



・ 図3 ノードラット大腿骨偽関節部における注入型骨移植のレントゲン結果



・ 図4 ノードラット大腿骨偽関節部における注入型骨移植の組織像



・ 軟部組織の介在

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

研究分担者 森田有亮 同志社大学 生命医科学部 教授

研究分担者 川手健次 奈良県立医科大学 人工関節・骨軟骨再生医学講座 教授

研究分担者 清水隆昌 奈良県立医科大学 整形外科 医員

研究要旨

本研究課題では、ヌードラットを用いて作製した大腿骨偽関節モデルに対し、ヒト骨髄細胞から作製したヒト骨形成細胞シート移植により骨癒合を得ることができるか検討しているが、本分担研究では骨形成の指標として力学的強度を用いることで細胞シート移植による骨癒合を検討した。

ヌードラットの大腿骨は非常に小さいため、万能試験機（EZ-graph）を用いてどのような評価方法が効果的であるか検討したところ、3点曲げ試験で力学的評価を行うのが効果的であることが判明した。 μ CT撮影によって作製したサンプルの偽関節骨切り部での骨形成を確認した後にサンプルの力学試験を行い、細胞シートを直接移植した群と注射器により注入した群の力学強度の測定結果を比較したところ、その強度には差がないことが確認された。

偽関節モデルにおける骨形成の評価指標の一つとして、力学試験は重要である。臨床においても、骨強度の回復によって荷重負荷が可能となるため、力学試験による正確な骨強度の測定は、偽関節における骨癒合促進研究では重要な評価指標となると考えられる。ラット大腿骨のような小さなサンプルであっても、3点曲げ試験を行うことでその力学的強度の測定が可能であったことから、今後の研究を進めるうえで、重要な定量評価方法が確立できた。

A. 研究目的

偽関節治療では自家骨を用いた手術が標準であるが、健常骨の採取が必要であり患者負担が大きい。そこで本研究課題では、自家骨移植に代わる治療法を確立すべく基礎研究を行っている。ヒト未分化骨髄間葉系幹細胞（MSC）から骨形成能を有するヒト骨形成細胞シートを効果的に作製する条件を検討し、偽関節部に移植し骨癒合を促進させるが、その評価方法の一つとして力学試験は欠くことができない評価方法である。

本分担研究の目的は、ヒトMSCで作製したヒト骨形成細胞シート移植による難治性骨折（偽関節）の治療の有効性を評価するための適切な力学試験方法を検討することである。免疫不全動物としてヌードラットを用い、大腿骨に作製した偽関節モデルに対して、ヒト骨形成細胞シートを移植した大腿骨の力学的強度を測定できる方法を確立する。

B. 研究方法

B. 1. ラット大腿骨を用いた力学試験

方法

ヌードラットの大腿骨は小さく、これで力学試験方法の検討を行うと費用がかさむため、まず通常のラットの大腿骨を用いて、小さなサンプルにおける力学試験方法の検討を過年度に実施したところ、ラット大腿骨専用の3点曲げ試験用ジグを作製すれば、力学的強度を測定できることが判明している。

そこで、本年度は昨年度に作製した専用ジグを用いて、我々がこれまでに確立しているヌードラット大腿骨偽関節モデル^{1,2}におけるヒト骨形成細胞シートの骨形成能評価を実施した。

B. 2. 偽関節モデルの作製

過年度に確立したヌードラット大腿骨偽関節モデル作製方法は、ヌードラットの大腿部において外側侵入で筋間から大腿骨に達し、転子部から顆部まで骨膜を切除した。femoral medial circumflex artery から大腿骨へ入る枝を血管鉗で切離し、infra genicular artery を顆部で切離した。大腿骨骨幹部をボーンソーで骨切りを行った後、髓腔内を18G針でリーミングを行った。このとき髓腔内を生食20mlで洗浄した。顆部から頸部に向けて0.8mmのキルシュナー鋼線を挿入することで骨折部を固定した。

作製した偽関節モデルにヒトMSCによる細胞シートを注入し術後12週後に大腿骨を摘出し、専用ジグを用いてその力学的強度を測定した。細胞シートを注射器により偽関節部に注入した注入群と、直接的に細胞シートを偽関節部に移植したオープン群の力学的強度を測定した。

B. 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

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。曲げ破壊時の最大曲げ荷重によって、注入群とオープン群とを比較した。

B. 4. μ CT 撮影による偽関節の評価方法

X線 μ CT装置(SMX-160CT-AV3, SHIMADZU)を用いて、作製した偽関節周囲の骨形成を評価した。骨切り部周辺の骨形成を評価するため、12週において μ CT撮影を行い、その所見から偽関節であることを確認し、力学試験を行った結果と合わせて、注入群とオープン群とを比較した。

X線 μ CT撮影の結果を加味することで偽関節モデルにおける骨切り部での骨癒合が明確に確認できる。そのうえで両群を比較することで、より精度の高い比較ができることが分かった。

B. 5. 力学試験結果の統計学的検討

注入群とオープン群の力学試験結果を比較するために、SPSS(IBM SPSS Statistics Ver. 20)を用いて、student t-testを行い、 $p < 0.05$ で有意差の検定を行った。

B. 6. 倫理面での配慮

奈良県立医科大学では、共同研究施設である「総合研究棟動物実験室」を利用するにあたり、「動物実験施設利用者説明会」