

を受講し、実験動物の扱いなどの動物実験に関する規則を学ばなくてはならない。奈良県立医科大学と本研究を行う研究代表者と分担者は、当該大学の動物実験施設利用者説明会を受講し種々の動物実験を行っており、動物実験に関する規約に準じて行うことに慣れているため動物の扱いに関しては問題がない。

また、本分担研究は奈良県立医科大学で作製した偽関節モデルラットの大腿骨を摘出し搬送してきたものの力学試験を行うため、直接動物や患者から得た骨髄細胞を扱うものではない。

C. 研究結果

C. 1. μ CT 撮影による評価結果

図2に注入群の μ CT画像を示す。術後12週において骨切り部周囲に新生骨の形成を認めたものの、骨切り部の良好な骨癒合を認めなかった。また、オープン群においても同様の傾向が観察された。

通常のレントゲン撮影よりも正確に骨折部の状態が把握できることが明らかとなった。

C. 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

図3に3点曲げ試験より得られた両群の最大曲げ荷重を示す。オープン群の最大曲げ荷重は 0.64 ± 0.36 Nであり、注入群の最大曲げ荷重は 0.86 ± 0.40 Nと、有意差は見られなかった。また、正常大腿骨の最大曲げ荷重は 136.0 ± 14.4 Nであり、本研究での両群の力学的強度の値は非常に小さい値であったが、細胞シート注入による骨癒合が力学的強度により評価可能であった。

本研究ように作製したラット大腿骨用

の専用ジグを用いることで、比較的小さなサンプルであり、またその治癒状態が弱い状態であっても測定結果が得られることが判明した。

D. 考察

μ CT撮影により骨切り部での良好な骨癒合を認められず、3点曲げ試験によって得られた注入群の力学強度は正常大腿骨と比べて有意に低い値となった。しかし、非常に小さい値ではあったものの、オープン群と注入群とで力学的強度の差がないことが評価でき、ヌードラットを用いて大腿骨に作製した偽関節の力学試験を実施する手技および専用ジグが確立されたと考えられる。

今回作製したラット大腿骨用の専用ジグを用いることで、比較的小さなサンプルであってもばらつきが少ない測定結果が得られることが判明した。今後、本研究課題を行っていくうえで力学試験結果は重要な指標の一つであるため、本分担研究が目的とする実験は達成できたと考えられる。

E. 結論

μ CT撮影および力学試験より、ヌードラット大腿骨に作製した偽関節モデルの力学試験評価法が確立された。

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. 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.

2. 清水隆昌、川手健次、赤羽学、森田有亮、面川庄平、田中康仁 注入型骨移植を用いた偽関節治療における生体力学的考察 整形・災害外科 第55巻、11号、1289-1292、2012

図1 専用ジグによる3点曲げ試験(力学的評価)

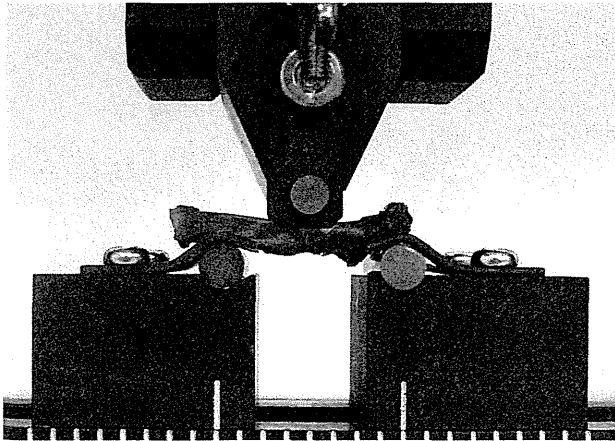
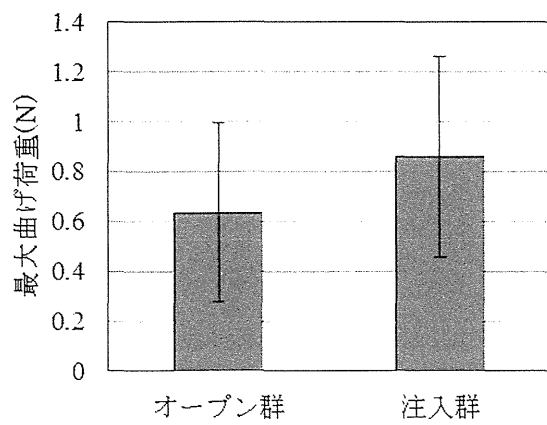


図2 注入群の μ CT画像



図3 3点曲げ試験の結果



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

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 城戸 顕 奈良県立医科大学 整形外科 講師

分担研究者 清水隆昌 奈良県立医科大学 整形外科 医員

研究要旨

過年度は、ラットおよびヒト骨髄間葉系幹細胞(Mesenchymal stem cells; MSCs)から骨形成細胞シートを作製し、骨形成能を検証したところ、ラットと同様にヒト MSCs でも十分な骨形成が得られた。しかし、ヒト骨形成細胞シートを用いた実験ではヌードラットへ移植しての評価であったため、将来骨形成細胞シート移植を臨床応用するには、大動物を用いた実験が必要である。そこで本年度は、大動物としてヒツジを用いた実験を行った。ヒツジの MSCs を採取し、これまでと同様の培養方法で骨形成細胞シートの作製が可能か、人工骨と組み合わせて移植する場合の骨形成能はどの程度かを検証した。播種細胞密度およびシート作製に係る培養条件は過年度のヒト MSCs での条件と同じで行ったところ、ヒツジでも骨形成細胞シートの作製は可能であり、スクレーパーで細胞シートとして採取が可能であった。ヒツジ骨形成細胞シートと人工骨(β -TCP:スーパーポア)と組み合わせて、ヒツジの皮下に移植後2週で、人工骨内に新生骨形成が見られた。アルカリフォスファターゼ活性も対照群に比べ有意に増加していた。

本年度の研究と過年度の研究結果から、通常用いる培養ディッシュに MSCs を播種し、デキサメサゾンとアスコルビン酸添加培地で2週間培養を行うことで、スクレーパーで骨形成細胞シートが採取できることが判明した。大動物(ヒツジ)でもラット、ラビットおよびヒト MSCs と同じく、骨形成が得られたため、我々の細胞シート作製方法が骨再生医療において有用であると考えられる。

A. 研究目的

間葉系幹細胞(Mesenchymal stem cells; MSCs)は骨髄内をはじめ様々な部位に存在し、デキサメサゾン、アスコルビン酸、 β 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¹⁻³。

過年度は、ラットやラビットなどの実験動物および市販のヒト MSCs 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行ったところ、ラットと同様にヒト MSCs でも十分な骨形成が得られた。しかし、ヒト骨形成細胞シートを用いた実験ではヌー

ドラットへ移植しての評価であったため、将来骨形成細胞シート移植を臨床応用するには、大動物を用いた実験が必要である。

そこで H25 年度は、大動物としてヒツジを用いた実験を行った。ヒツジの MSCs を採取し、これまでと同様の培養方法で骨形成細胞シートの作製が可能か、人工骨と組み合わせて移植する場合の骨形成能はどの程度かを検証した。

B. 研究方法

B. 1. ヒツジ骨髄間葉系細胞の培養

本研究では、のヒツジを用いて研究を行った。全身麻酔化に骨髄細胞を前肢から注射針で採取し、初期培養を行った。初期培養は、15% FBS 含有 MEM を 15 ml 入れた T-75 フラスコ (Falcon, BD) を用いて行い、14 日後にトリプシン処理して MSCs を採取した。

B. 2. ヒツジ骨形成細胞シート作製

ヒツジ骨髄間葉系幹細胞を用いて、骨形成細胞シートを作製する条件は、過年度に検討したヒト細胞の培養に適した条件と同じ条件で行った。

0.2×10^4 細胞/cm² の細胞密度でヒツジ MSCs を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 μg/ml とし、培養液の交換は 2 あるいは 3 日ごとに行った⁴⁷。

B. 3. ヒツジ骨形成細胞シートの骨形成性能の評価 (*in vivo* での検討)

採取したヒツジ骨形成細胞シートで人工骨 (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) を包むようにして作製した細胞シート・人工骨複合体を、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)。

組織学的評価を n = 2、生化学的評価を n = 3 で行った。組織評価用の細胞シートは 10 cm 培養ディッシュで、生化学的評価用の細胞シートは 6 cm 培養ディッシュで作製したものを使用した。

B. 4. 移植標本の骨形成能の評価

移植後 2 週で標本を摘出し、組織学的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、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. 5. 測定結果の統計学的検討

それぞれの実験群の測定結果を比較するために、SPSS (IBM SPSS Statistics Ver. 20) を用いて、student-t テストを行った。p < 0.05 で統計学的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」を受講し、実験動物の扱いなどの動物実験に関する規則を学ばなくてはならない。奈良県立医科大学で本研究を行う研究代表者と分担者は、当該大学の動物実験施設利用者説明会を受講し種々の動物実験を行っており、動物実験に関する規約に準じて行うことに慣れているため動物の扱いに関しては問題がない。

C. 研究結果

C. 1. *in vitro* での細胞シート作製結果

ヒツジでは、ヒトやラットに比べ細胞の増殖が早いいため、細胞シート作製は 6 日間程度で可能であった。また、分化に係る日

数を十分に確保するためにラットやヒトと同様に 14 日間培養するためには、培養ディッシュを表面加工されたもの(プライマリア Falcon , BD)にすれば可能であることが明らかとなった。

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 1 に移植後 2 週で摘出したサンプルの組織像を示す。組織像で良好な骨形成が確認できた。

デキサメサゾン濃度は、10、30、50 および 100nMのいずれの条件でも骨形成は人工骨気孔内に確認できたが、50 および 100nMデキサメサゾン濃度で作製した骨形成細胞シートによる骨形成量が多い印象であった。

C. 3. 細胞シートの骨形成能の生化学的検討結果

図 2 に移植後 2 週で摘出したサンプルの ALP 活性の測定結果を示す。

β -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 β -TCP の ALP 活性値は統計学的に有意に高かった ($p < 0.05$)。このことから細胞シート/人工骨複合体内に骨形成が認められていると考えられた。

D. 考察

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、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、その骨形成性能を報告してきた⁴⁻¹⁰。骨形成細胞シートを組み合わせた場合には、人工骨気孔内だけでなく人工骨表面にも新生骨の形成が見られ、これは骨形成細胞シート移植の特徴的骨形成であることを報告している。

過年度には、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における条件と異なるものの、ヒト骨形成細胞シートを人工骨に組み合わせ移植すると、良好な骨形成が認められた。

しかし、ヒト骨形成細胞シートを人工骨と組み合わせて移植する場合には、レシピエントは免疫不全動物(ヌードラット)であるため、将来の骨形成細胞シートの臨床応用を考慮すると大動物を用いた検証実験が必要となる。

そこで本年度は、ヒツジを用いた実験を行った。ヒトで想定されるケースと同様に、骨髄細胞を注射針で採取し(全身麻酔下にヒツジ前肢から)初期培養を行った。骨形成細胞シート作製に要する日数は、ラットやヒトよりも早く通常用いる培養皿では 6 日程度で完了したが、プライマリア培養ディッシュを使用すれば 14 日間剥がれることなく培養しスクレーパーで細胞シートとして採取できた。このことから、ヒト MSCs を用いるケースでも、増殖が早いことが想定されるケース(若年者等)では、使用する培養ディッシュを考慮する必要があると考えられた。

ヒツジの骨髄細胞から作製した骨形成細胞シートでも十分な骨形成が確認できた。これまで小動物での検証が中心であったが、本研究結果から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. 結論

大動物(ヒツジ)でもラット、ラビットおよびヒト MSCs と同じく骨髄細胞を用いて骨形成細胞シートを作製することができ、生体への移植後に良好な骨形成が得られた。我々がこれまで研究を行ってきた骨形成細胞シートが骨再生医療において有用であると考え

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

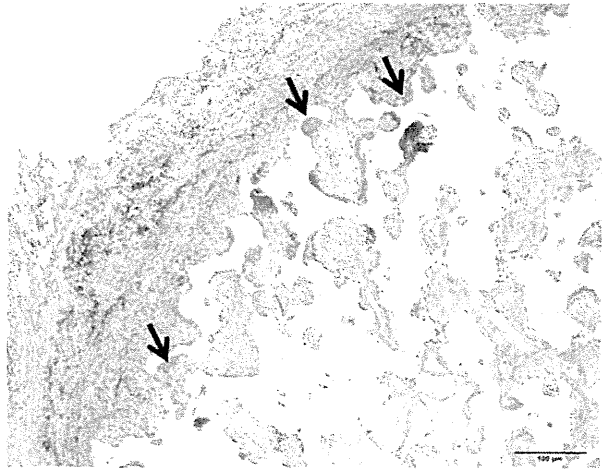
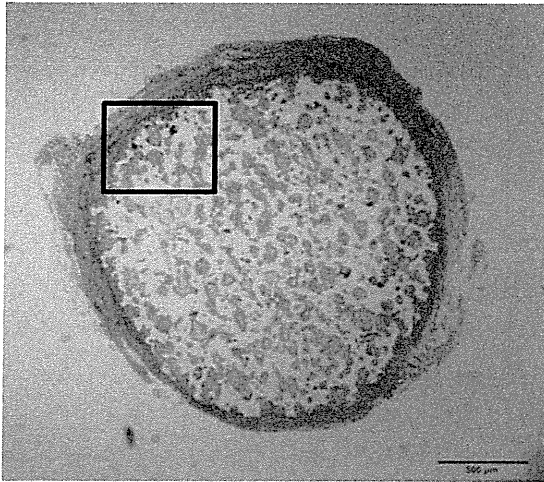
- Ohgushi H, Dohi Y, Katuda T, et al. In vitro bone formation by rat marrow cell culture. *J Biomed Mater Res* 32: 333-340, 1996.
- Ohgushi, H. and Caplan, A.I. (1999) Stem cell technology and bioceramics: From cell to gene engineering. *Journal of Biomedical Materials Research*, 48, 913-927.
- Sonal, R., Jackson, J.D., Brusnahan, S.K., O' Kane, B. J. and Sharp, J.G. (2012) Characterization of a mesenchymal stem cell line that differentiates to bone and provides niches supporting mouse and human hematopoietic stem cells. *Stem Cell Discovery*, 2, 5-14, 2012.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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
- 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, 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.
10. 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 生体内での細胞シートの骨形性能の検討結果（組織像）

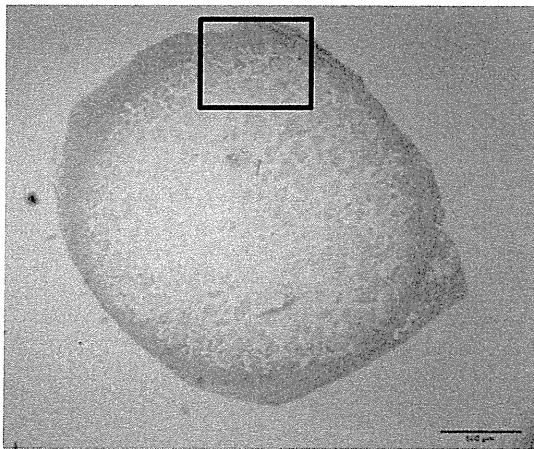
A. デキサメサゾン：10nM

左図の枠内の拡大写真



B. デキサメサゾン：30nM

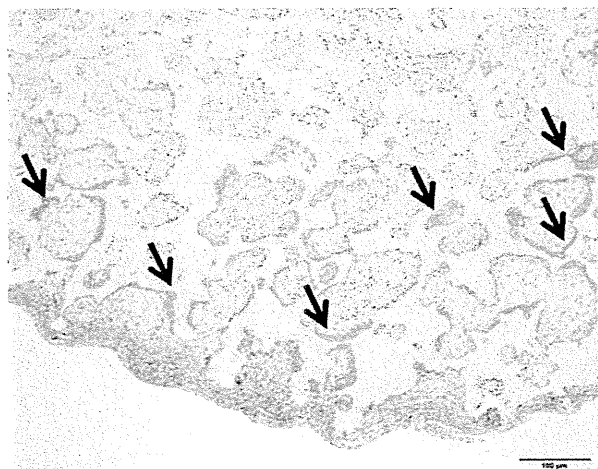
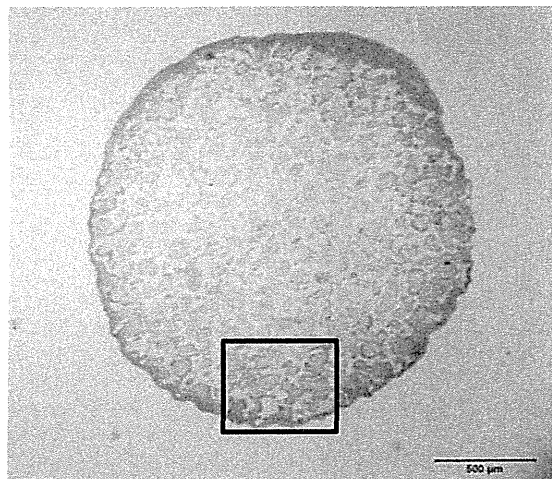
左図の枠内の拡大写真



矢印は新生骨を示す

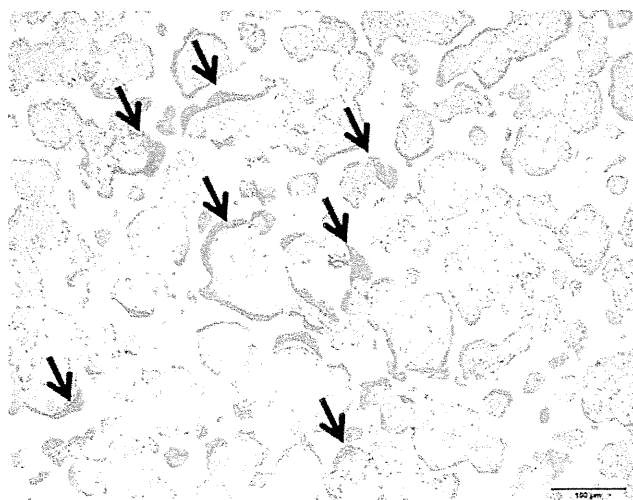
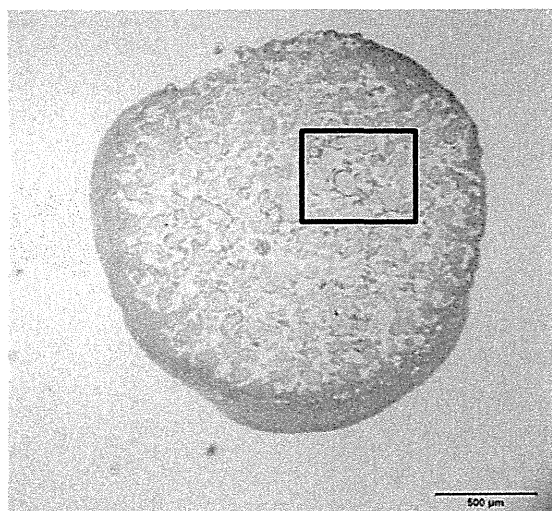
C. デキサメサゾン : 50nM

左図の枠内の拡大写真



D. デキサメサゾン : 100nM

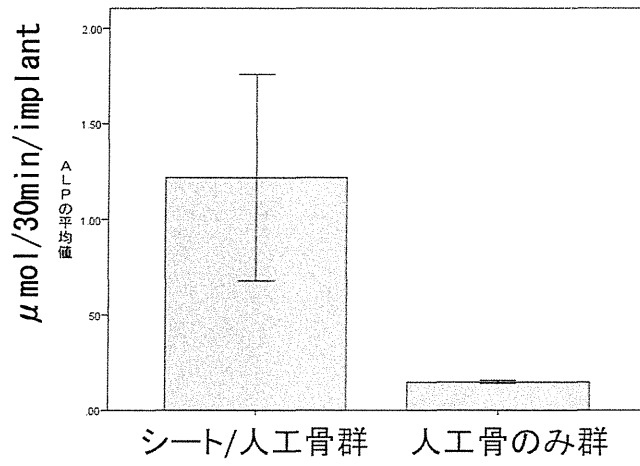
左図の枠内の拡大写真



矢印は新生骨を示す

図2 生体内での細胞シートの骨形性能の検討結果（生化学的評価）

アルカリフォスファターゼ活性



Ⅲ. 研究発表に関する一覧表

・論文

	発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	頁	出版年
1	Yusuke Inagaki, Kota Uematsu, Manabu Akahane, Yusuke Morita, Munehiro Ogawa, Tomoyuki Ueha, Takamasa Shimizu, Tomohiko Kura, Kenji Kawate and Yasuhito Tanaka.	Osteogenic Matrix Cell Sheet Transplantation Enhances Early Tendon Graft to Bone Tunnel Healing in Rabbits.	BioMed Research International	84292	8	2013
2	T. Shimizu, M. Akahane, T. Ueha, A. Kido, S. Omokawa, Y. Kobata, K. Murata, K. Kawate, Y. Tanaka.	Osteogenesis of cryopreserved osteogenic matrix cell sheets.	Cryobiology	66 (3)	326-332.	2013
3	Manabu Akahane, Tomoyuki Ueha, Takamasa 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(4)	133-140	2012
4	清水隆昌、川手健次、赤羽学、森田有亮、面川庄平、田中康仁	注入型骨移植を用いた偽関節治療における生体力学的考察	整形・災害外科	55巻、11号	1289-1292	2012

・学会発表

	発表者氏名	演題	学会名	日付	場所
1	Kenichi Nakano, Keiichi Murata, Takamasa Shimizu, Manabu Akahane, Shohei Omokawa, Yasuhito Tanaka.	Osteogenesis of Vascularized Tissue-Engineered Bone Scaffold	The 68th 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	2013/4/18-1 9	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	2013/4/18-1 9	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 ートによる家兔 移植腱骨孔間 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）

15	倉知彦、赤羽学、清水隆昌、藤間保晶、川手健次、田中康仁	冷凍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）
16	稲垣有佐、上松耕太、赤羽学、森田有亮、藤間保晶、小川宗宏、上羽智之、清水隆昌、倉知彦、川手健次、田中康仁	骨形成細胞シートによる移植腱骨孔間治癒の促進	第19回横浜・京都・奈良バイオメカニクスカンファレンス	2012/12/22	奈良県立医科大学（奈良）
17	藤間保晶、大串始、土肥祥子、谷掛洋平、岩田栄一郎、高澤伸、赤羽学、田中康仁	再生医療技術による組織構築～薬剤を用いた骨移植法の基礎的研究～成能の評価	第19回横浜・京都・奈良バイオメカニクスカンファレンス	2012/12/22	奈良県立医科大学（奈良）
18	倉知彦、赤羽学、清水隆昌、上羽智之、内原好信、藤間保晶、川手健次、田中康仁	冷凍保存骨髄間葉系幹細胞由来細胞シートによる骨形成能の評価	第19回横浜・京都・奈良バイオメカニクスカンファレンス	2012/12/22	奈良県立医科大学（奈良）

IV. 研究発表に関する参考資料

添付資料参照

IV. 研究発表に関する参考資料

添付資料参照

一般演題 1 組織再生 1

07 簡便な細胞シートの保存および輸送条件の検討

¹奈良県立医科大学医学部整形外科、²奈良県立医科大学医学部健康政策医学講座、

³奈良県立医科大学人工関節・骨軟骨再生医学講座

○吉良 務(きら つとむ)¹、赤羽 学²、清水 隆昌¹、中野 健一¹、小泉 宗久¹、
川手 健次³、田中 康仁¹

【背景】我々は骨芽細胞シートが偽関節治療や壊死骨再生等の骨組織再生に有用であることを報告してきた。将来的に細胞シートによる骨組織再生を広く普及させるためには、細胞シートを簡便な方法で保存・輸送することが必要となる。

【目的】輸送を目的とした細胞シート保存条件の検討を行ったので報告する。

【方法】7週齢F 344 ラットの大腿骨から採取した骨髄間葉系幹細胞を6cm 径培養皿に 1×10^4 cell/cm² で播種した。二次培養を14日間デキサメサゾン・アスコルビン酸添加培地で行い、細胞シートを採取した。細胞シート1枚当たり10mlの培養液を入れた密閉チューブを用いて、6、12、24時間の保存を行った。保存温度は、37℃と室温(約22℃)の2条件とした。保存後、円盤状β TCPと組み合わせてラット皮下に移植した。4週後、組織像とオステオカルシン量で骨形成を評価した。対照群は新鮮シート(保存なし)とし、各群n=5とした。

【結果】細胞シートは、37℃群と室温群ともに保存後もその形態を維持していたが、保存時間とともに収縮する傾向が見られた。組織像では全群で骨形成がみられた。オステオカルシン量は、37℃群、室温群ともに新鮮群に比べて有意な低下は見られなかった。

【考察】従来の輸送方法として、凍結保存や低温下(4℃)での輸送がある。最近では細胞シート輸送のための装置が開発されているが、比較的大型で高価な装置である。細胞シートによる骨組織再生を普及させるためには、細胞培養センター(CPC)を持たない医療機関への輸送も必要となるため、より簡便な保存・輸送方法が望まれる。本研究結果から、細胞シートを培養液とともに密閉チューブに入れて保存すれば室温でも輸送が行え、骨組織再生に利用できる可能性が示唆された。今後はより少ない培養液量での検討も必要であると考えられる。

シンポジウム2 人工骨は自家骨を超えられるか

34 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—

¹ 奈良県立医科大学整形外科、² 市立奈良病院四肢外傷センター、³ 奈良県立医科大学健康政策医学、
⁴ 奈良県立医科大学人工関節骨軟骨再生医学

○中野 健一 (なかの けんいち)¹、村田 景一²、清水 隆昌¹、上羽 智之¹、
吉良 務¹、赤羽 学³、面川 庄平¹、川手 健次⁴、田中 康仁¹

【目的】我々は第32回本会において、培養骨髄由来間葉系幹細胞 (MSCs) から作製した高い骨形成能と血管誘導能を有する骨芽細胞シートを用いることで、血管柄付き人工骨 (vascularized tissue-engineered bone:VTEB) が作製可能であること報告した。今回、VTEB 作製における骨芽細胞シートの有用性を検討した。

【方法】11週齢 Fischer344 ラットの大腿動静脈を拳上し、径6mm、長さ10mm、気孔率75%の β TCP (Superpore®:PENTAX) に作製した側溝 (幅2mm) に組み合わせた。人工骨に血管束のみ組み合わせた群を control 群、細胞浮遊液搭載型人工骨に血管束を組み合わせた群を cell 群、人工骨と血管束の間に骨芽細胞シートを充填したものを sheet 群とした (各群 n=16)。術後2、4週でサンプルを摘出し、組織像および、real time PCR で ALP、OC、VEGF-A の mRNA 発現量を測定し比較検討を行った。

【結果】組織像では、移植後2週においてすべての群で人工骨内部にわずかな新生血管を認め、control 群および cell 群で骨形成は認めず、sheet 群で血管束周囲に骨形成を認めた。移植後4週において control 群および cell 群で人工骨内にわずかな新生血管を認めたが、cell 群では人工骨周縁に骨形成を認めた。一方、sheet 群では血管束から人工骨内へ放射状に旺盛な骨形成および新生血管を認めた。術後2週の mRNA 発現量は ALP、OC は cell 群、sheet 群ともに control 群と比較し高値を示した ($p < 0.001$) が、VEGF-A は cell 群が control 群および sheet 群よりも高値を示した ($p < 0.01$)。術後4週の mRNA 発現量は全項目で sheet 群が control 群および cell 群より高値を示した ($p < 0.001$)。

【考察】細胞浮遊液を搭載した人工骨と比較し、骨芽細胞シートを人工骨と組み合わせることで血管束周囲に旺盛な血管新生と骨形成が認められた。血管束を骨芽細胞シートが取り巻くことで人工骨内に骨形成能と血管誘導能の両方を促すことが可能であると考えられることから、VTEB 作製における骨芽細胞シートの有用性が示された。さらに、本方法により人工骨中心部から血管新生が促進されることから、さまざまな形状や大きさの VTEB が作製可能となり、骨欠損治療に対する有用な治療法となることが期待できると考えている。

1-5-9

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

倉 知彦¹ 赤羽 学² 清水 隆昌¹ 加藤 優喜³
森田 有亮³ 上羽 智之¹ 内原 好信¹ 藤間 保晶¹
川手 健次⁴ 田中 康仁¹

【目的】われわれは培養骨髄由来の間葉系幹細胞(MSCs)を用いて、骨形成能をもつ細胞シートの有用性を報告してきた。今回、凍結保存した細胞シートの細胞活性と骨形成能を評価した。

【方法】7週齢ラットの太腿骨から骨髄を採取し、初期培養で獲得したMSCsを培養皿に播種後、デキサメサゾン・アスコルビン酸添加培地で二次培養を行い細胞シートを作製した。細胞シートの凍結は、凍結処理容器を用いて-85°Cに緩速凍結処理し、24時間後液体窒素で保存した。解凍は、37°C恒温槽で急速解凍とした。比較は凍結保存した細胞シート(凍結群)と凍結保存しない作製直後の細胞シート(新鮮群)の2群にて行った。両群細胞シートの細胞活性をCell Counting Kit-8を用いて測定した。さらに同系ラットの背部皮下に両群細胞シートを注入移植した(n=5)。移植4週後に摘出し、X線像および組織像、アルカリフォスファターゼ(ALP)およびオステオカルシン(OC)mRNA発現の定量、ELISA法を用いたOC定量を行った。また、ラット太腿骨骨欠損モデルに凍結保存シート(凍結群)を移植し、6週後に力学試験を行い非移植群と比較した(n=6)。

【結果】細胞活性は凍結群では新鮮群の約7割であった。注入移植の摘出標本では、両群ともX線像で石灰化を認め、組織像でも骨組織を認めた。形成された骨組織のサイズは凍結群でやや小さかった。mRNA発現に有意差はなかったが、OC定量は有意に新鮮群で高値を示した。力学試験では、非移植群と比較し凍結群で有意に高かった(p<0.05)。

【考察と結論】われわれは新鮮細胞シートの注入移植で壊死骨や偽関節部に骨形成能を付与できることを報告している。本結果より、新鮮細胞シートと同様に、凍結保存細胞シートでも骨形成能を付与することができると思われる。一度の採取と培養操作で細胞シートを複数作製後保存し、必要時に解凍して注入を行うことができるため、凍結保存細胞シートは臨床医療において非常に有用と考える。

利益相反：無

¹奈良医大整形 ²奈良県立医科大学健康政策医学 ³同志社大学生命医科学部医工学学科 ⁴奈良県立医科大学人工関節骨軟骨再生医学講座