

201306018B

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24～25年度 総合研究報告書

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24～25年度 総合研究報告書

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. 総合研究報告書

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.	市販ヒト骨髄間葉系幹細胞を用いた研究の方法	1-2
1.	市販ヒト骨髄間葉系幹細胞による骨形成細胞シート作製条件の検討	
2.	ヒト骨形成細胞シート注入法の確立	
2.	ヌードラット大腿骨偽関節モデルの作製	1-3
3.	初期培養で得たヒト骨髄細胞を用いた研究	1-3
1.	初期培養で得たヒト骨髄細胞による骨形成細胞シート作製条件の検討	
2.	ヒト骨形成細胞シート注入型骨移植法による人工骨への骨形成能の付与	
3.	ヌードラット大腿骨偽関節モデルへのヒト骨形成細胞シート移植	
4.	ヒツジ骨髄細胞を用いた研究	1-4
1.	ヒツジ骨形成細胞シートの作製	
2.	ヒツジ骨形成細胞シートの骨形成能評価	
5.	倫理面での配慮	1-4
C.	研究結果	1-5
1.	市販ヒト骨髄間葉系幹細胞を用いた細胞シート作製条件	1-5
2.	細胞シート注入による骨形成の結果	1-5
3.	ヌードラット大腿骨偽関節モデルの確立	1-5
4.	ヒト骨髄細胞の初期培養細胞を用いた骨形成細胞シート作製条件	1-5
5.	初期培養細胞で作製したヒト骨形成細胞シートの人工骨への注入	1-6
6.	ヌードラット大腿骨偽関節でのヒト骨形成細胞シートの骨形成能評価結果	1-6
7.	ヌードラット大腿骨偽関節へのヒト骨形成細胞シート注入による骨形成の結果	1-6
8.	ヒツジ骨形成細胞シート作製結果	1-6
D.	考察	1-7
E.	研究発表	1-8
F.	知的財産の出願・登録状況	1-8
G.	参考文献	1-9
H.	図	1-11

1. in vitro での細胞シート作製条件の検討結果	3-3
2. 生体内での細胞シートの骨形成能の検討結果 (組織像)	3-3
3. 細胞シートの骨形成能の生化学的検討結果	3-3
D. 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	3-4
E. 考察	3-4
F. 研究発表	3-5
G. 知的財産の出願・登録状況	3-5
H. 参考文献	3-5
I. 図	3-7

4.ヌードラット大腿骨偽関節モデルの確立

田中康仁

A. 研究目的	4-1
B. 研究方法	4-2
1. ヌードラット偽関節モデルの作製	4-2
2. 移植標本の骨形成能の評価	4-2
3. 移植標本の骨形成能の評価	4-2
4. 3点曲げ力学的評価による偽関節の確認	4-2
C. 研究結果	4-3
1. レントゲン画像による骨形成の経時的評価	4-3
2. 組織像	4-3
3. 力学試験結果	4-3
D. 考察	4-3
E. 研究発表	4-3
F. 知的財産の出願・登録状況	4-4
G. 参考文献	4-4
H. 図	4-6

5.骨形成細胞シート注入移植による生体内における骨形成および

偽関節モデルの骨癒合促進

清水隆昌

A. 研究目的	5-1
B. 研究方法	5-2
1. 市販のヒト骨髄間葉系幹細胞を用いた研究の方法	5-2
1. ヒト骨形成細胞シート注入法の検討	
2. ヒト骨形成細胞シート注入法の検討	
3. 注入型骨移植法による人工骨への骨形成能の付与	

2.	ヒト骨髄初期培養細胞を用いた研究の方法	5-3
1.	ヒト初期培養骨髄細胞による骨形成細胞シートの作製方法	
2.	注入型骨移植法による人工骨への骨形成能の付与	
3.	ヌードラット大腿骨偽関節モデルを用いた研究の方法	5-3
1.	ヌードラット偽関節モデルの作製	
2.	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	
4.	倫理面での配慮	5-4
C.	研究結果	5-4
1.	市販ヒト骨髄間葉系幹細胞から作製した細胞シート注入の結果	5-4
2.	ヒト骨髄初期培養細胞を用いた注入型骨移植法による人工骨内の骨形成	5-4
3.	ヌードラット大腿骨偽関節モデルへのヒト骨形成細胞シート注入移植	5-4
D.	考察	5-4
E.	研究発表	5-5
F.	知的財産の出願・登録状況	5-5
G.	参考文献	5-5
H.	図	5-7

6. ヒト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方法の検討

森田有亮

A.	研究目的	6-1
B.	研究方法	6-1
1.	ラット大腿骨を用いた力学試験方法	6-2
2.	偽関節モデルの作製	6-2
3.	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	6-2
4.	μ CT撮影による偽関節の評価方法の検討	6-2
5.	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	6-2
6.	力学試験結果の統計学的検討	6-3
7.	倫理面での配慮	6-3
C.	研究結果	6-3
1.	偽関節モデルの μ CT撮影による評価結果	6-3
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 μ CT撮影による偽関節の評価結果	6-3
3.	偽関節モデルの3点曲げ試験による力学的評価の結果	6-3
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力学的評価の結果	6-3
D.	考察	6-4
E.	結論	6-4

F.	研究発表	6-4
G.	知的財産の出願・登録状況	6-4
H.	参考文献	6-4
I.	図	6-5
7.	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	7-1
B.	研究方法	7-1
1.	ヒツジ骨髄間葉系細胞の培養	7-2
2.	ヒツジ骨形成細胞シート作製	7-2
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)	7-2
4.	移植標本の骨形成能の評価	7-2
5.	測定結果の統計学的検討	7-2
6.	倫理面での配慮	7-2
C.	研究結果	7-2
1.	in vitro での細胞シート作製結果	7-2
2.	生体内での細胞シートの骨形成能の検討結果 (組織像)	7-3
3.	細胞シートの骨形成能の生化学検討結果	7-3
D.	考察	7-3
E.	結論	7-3
F.	研究発表	7-4
G.	知的財産の出願・登録状況	7-4
H.	参考文献	7-4
I.	図	7-6
III.	研究発表に関する一覧表	8-1
IV.	研究発表に関する参考資料	9

厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）
総合研究報告書

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骨形成細胞シートを 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た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。一般に偽関節治療は骨移植と強固な固定が必要であり、手術侵襲が大きいため患者の負担は大きい。また、骨癒合が得られるまでに長期を要する場合もあるため日常生活にも支障をきたす症例がある。低侵襲で早期に骨癒合が得られる手技が確立できれば偽関節治療の治療成績は向上する。

初年度は使用する細胞の条件を一定に保つことが重要であると判断し、市販（Lonza 社）されているヒト骨髄間葉系幹細胞を用いて、ヒト骨髄間葉系幹細胞で骨形成細胞シート作製条件の検討をおこなった。また、ヌードラット大腿骨偽関節モデルの作製をおこなった。播種する細胞密度の検討では従来動物実験で用いてきた細胞密度よりも少ない細胞数で骨形成が得られることが明らかとなった。デキサメタゾン濃度は 10nM で播種する方が 100nM で播種するよりオステオカルシン分泌量は多かった。

次年度は同意を得て採取した患者の骨髄細胞を用いて、細胞シート作製に適した培養条件を詳細に検討し、その骨形成能を免疫不全動物（ヌードラット）で確認した。また初年度に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、骨癒合促進効果を検証した。さらに大型動物であるヒツジを用いて細胞シートの作製と細胞シート移植による骨形成に関する実験を実施した。ヒト細胞シートの作製条件は市販の骨髄間葉系幹細胞と同様に $0.5 \times 10^4 \text{ cell/cm}^2$ で細胞を播種して作製しても十分骨形成が得られることが明らかとなった。デキサメタゾン濃度は高いほど骨形成マーカーの mRNA 発現が高かった。Western blotting 法では、デキサメタゾン濃度が低い方が細胞外基質の値が高いことが判明した。以上のことから、ヒト骨形成細胞シート作製条件は細胞播種濃度： $0.5 \times 10^4 \text{ cell/cm}^2$ 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判断した。この条件で作製した細胞シートを人工骨と組み合わせて皮下移植すると良好な骨形成が得られたが、ヌードラット大腿骨偽関節に直視下で移植あるいは、注入移植したところ、いずれも十分な骨癒合は得られなかった。その一方で、ヒツジ骨髄細胞で作製した細胞シートを人工骨と組み合わせて移植したモデルで十分な骨形成を得ることができたため、骨形成細胞シートによって骨形成を促進させることがヒトにおいても期待できる。

A. 研究目的

我々はこれまで動物実験で骨髄間葉系幹細胞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。本研究ではヒト骨髄細胞で作製した細胞シートを用いて、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て検証した。本研究課題は、偽関節部に細胞シートを X 線透視下に注入移植し骨癒合を得られる低侵襲な手技を確立することである。そのために、初年度にヌードラット大腿骨に偽関節を安定的に作製する手技を確立し、次年度に偽関節部に細胞シートを注入することで骨形成が得られるかを検証した。

また、これまではラットやラビットでの動物実験で細胞シートの有用性について報告してきたが、大動物では実施していなかったため、ヒツジを用いて骨形成細胞シートの骨形成能評価に関する実験を行った。

B. 研究方法

B. 1. 市販ヒト骨髄間葉系幹細胞を用いた研究の方法

B. 1. 1. 市販ヒト骨髄間葉系幹細胞による骨形成細胞シート作製条件の検討

本研究で使用した細胞は、Lonza 社で市販された 20 歳女性の骨髄間葉系幹細胞である。骨髄間葉系幹細胞を T75 フラスコ (75cm² culture flask, Falcon, BD) で 2 週間初期培養した後、2 次培養をおこないヒト骨形成細胞シートを作製した。

ヒト骨形成細胞シート作製における播種細胞密度とデキサメサゾン濃度の条件検索は 35 mm 培養皿 (35mm ディッシュ; Falcon 35-3001, BD) で検討した。細胞播種数は 1×10⁴cell/cm² あるいは 0.5×10⁴cell/cm²、デキサメサゾン濃度は 10nM あるいは 100nM の組み合わせで培養をおこなった。アスコルビン酸添

加量は 82 μg/ml とし培養液の交換は 2 ~ 3 日ごとにおこなった。骨形成能の評価を骨形成マーカーであるアルカリフォスファターゼ (ALP) 活性と培養液中の分泌オステオカルシン (OC) 量の定量をおこなった。また ALP と OC の mRNA 発現をリアルタイム PCR 法で定量した。

作製した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。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 0.5×10⁴cell/cm² 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 10nM と 100nM の 2 種類で作製した。移植後 2 カ月で標本を摘出し、組織学および生化学的に骨形成量を評価した。

B. 1. 2. ヒト骨形成細胞シート注入法の確立

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、生体内の骨形成の検討を行った。移植した人工骨に 100mm ディッシュ (100mm ディッシュ; Falcon, BD) で作製したヒト細胞シートを注入移植した。さらに 60 mm 培養皿で作製した細胞シートを 1 つの人工骨に対して 2 枚注入移植した。注入法は 1ml 注射器にヒト MSC から作製したヒト骨形成細胞シートを吸入しシリンジ内に充填し、0.5ml の PBS 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、ヒト骨形成細胞シートを皮下へ注入移植した。

移植後 2 カ月で標本を摘出しレントゲンと組織で骨形成を評価した。

B. 2. ヌードラット大腿骨偽関節モデルの作製

ヒト骨形成細胞シートの偽関節部における骨形成能評価のために、12 週齢の雄ヌードラット (Fischer344 ラット; F344/N Jcl-rnu/rnu) を用いて大腿骨偽関節モデルを確立した。

右大腿外側に皮膚切開し大腿骨に進入し、大腿骨の骨幹部中央をボーンソーで骨切りした後、大腿骨の転子部から顆部に付着する筋群を骨膜とともに大腿骨から剝離後、大腿骨から全周性に切除する。さらに大腿骨骨髄も転子部から顆部まで注射針で十分に搔爬、洗浄し、骨折部の固定は K-wire (径 0.8mm) を用いた髄内釘固定を行い、これを偽関節群とした。健側の大腿骨を対照群とし、比較検討を行った。評価はレントゲン、組織学および力学的に行った。

B. 3. 初期培養で得たヒト骨髄細胞を用いた研究

B. 3. 1. 初期培養で得たヒト骨髄細胞による骨形成細胞シート作製条件の検討

平成 25 年度の研究では、27 歳女性の腸骨より採取した骨髄細胞を使用し、前年度に市販ヒト骨髄細胞で得られた細胞シート作製の条件を詳細に確認した。T75 フラスコ (75cm² culture flask, Falcon, BD) で 2 週間初期培養後、35 mm 培養皿 (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日間培養した。播種する細胞数 (1×10^4 cell/cm² あるいは 0.5×10^4 cell/cm²) とデキサメサゾン濃度 (10・30・50・100nM) をそれぞれの組み合わせで前年度よりも詳細に検討し、細胞シート作製に適した条件を検索した。

アスコルビン酸添加量は従来通りの 82 μ g/ml とし、培養液の交換は 2 あるいは 3 日ごとに行った。

In vitro で検討した 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。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 0.5×10^4 cell/cm² とし、100 mm 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。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、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。

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 (Runx2) と Osterix の mRNA 発現をリアルタイム PCR で定量した。

B. 3. 2. ヒト骨形成細胞シート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移植した人工骨 (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) に対して、細胞シートの注入移植をおこなった。

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 量を測定した。

B. 3. 3. ヌードラット大腿骨偽関節モデルへのヒト骨形成細胞シート移植

初年度は、12 週齢ヌードラット偽関節モデルの偽関節部に細胞シート移植をおこない、偽関節部における市販ヒト骨髄細胞から作製したヒト骨形成細胞シートの骨形成能の評価をおこなった。

偽関節部を直視下に、大腿骨を挟んで前後に 1 枚ずつヒト骨形成細胞シートの移植をおこなった。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に 12 週で大腿骨を摘出し H-E 染色による組織学的評価をおこなった (n=2)。力学的評価として 3 点曲げ試験をおこなった (n=4)。

次年度は、12 週齢ヌードラット大腿骨偽関節にスキャフォールドフリーで初期培養細胞から作製したヒト骨形成細胞シートの注入移植をおこい、偽関節の経過を観察した。

注入方法は大腿骨を挟んで前後に 1 枚ずつ注入した。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に 12 週で大腿骨を摘出し H-E 染色による組織学的評価をおこなった (n=2)。力学的評価として 3 点曲げ試験をおこなった (n=4)。

B. 4. ヒツジ骨髄細胞を用いた研究

B. 4. 1. ヒツジ骨形成細胞シート の作製

2 歳オスヒツジの上腕骨頭より骨髄細胞を採取し、初期培養後、10 cm 培養皿に細胞播種濃度： 0.2×10^4 cell/cm² デキサメタゾン濃度：50 nM、アスコルビン酸濃度：82 μ g/ml で 6 日間培養し細胞シートを作製した。培養液の交換は 2 あるいは 3 日ごとにおこなった。

B. 4. 2. ヒツジ骨形成細胞シート の骨形成能評価

ヒツジ骨形成細胞シートで人工骨 (β -TCP:スーパーポア) 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)。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。

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 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、アルカリフォスファターゼ (ALP) 活性の測定をおこなった。

B. 5. 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細胞シートは免疫不全動物へ移植して、生体内での骨形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. 市販ヒト骨髄間葉系幹細胞を用いた細胞シート作製条件

In vitro で細胞シートを作製時のデキサメサゾン濃度を 10nM と 100nM とを比較すると、デキサメサゾン 10nM のほうが 100nM よりもオステオカルシン分泌量が多い。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、オステオカルシンの増加する傾向はほぼ同じであった。

In vivo で β -TCP と細胞シートを組み合わせた組織像では、デキサメサゾンの濃度によらず、いずれも良好な骨形成が見られた(図1)。

抽出した β -TCP と細胞シートの組み合わせでは、 β -TCP 単独で移植したものより ALP およびオステオカルシンのいずれも高値を示した。デキサメサゾンの濃度で比較すると 10nM で作製した細胞シートとの組み合わせのほうが 100nM で作製した細胞シートとの組み合わせより高い値を示した。

以上により培養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：10nM、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。

図 2 に作製した骨形成細胞シートの外観を示す。スクレーパーではがしても細胞シートとしての形態は保持されており、ピンセットでつまんで人工骨に組み合わせ移植することやスキヤフォールドフリーで移植することも可能であるため、ハンドリングは容易であった。

C. 2. 細胞シート注入による骨形成の結果

細胞播種密度を $0.5 \times 10^4 \text{cell/cm}^2$ とし、デキサメサ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（デキサメサゾン濃度を 10nM あるいは 100nM）に大きな差はなく、いずれも良好な骨形成が確認できた。また、10 cm 培養皿や 6cm 培養皿で作製した細胞シートを注入移植しても、人工骨内に良好な骨形成が認められた(図3)。

しかし、抽出した β -TCP のレントゲン像では、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は明らかでなかった。

C. 3. ヌードラット大腿骨偽関節モデルの確立

経時的なレントゲン像で、偽関節群は術後 12 週まで骨性架橋は認められなかった。組織像でもレントゲン像と同様に偽関節群は骨折部の骨性架橋を認めなかった。骨折部には繊維性組織が介在しており、骨切り後 12 週では骨切り部の皮質骨の萎縮を認めた。

また μCT 画像でも骨切り部周囲に新生骨を認めず、骨切り部の骨癒合を認めなかった。

3 点曲げ試験による力学試験では、偽関節の最大曲げ荷重は健側群と比べて有意に低かった。以上によりヌードラットの大腿骨に安定して偽関節を作製する手技を確立できた。

C. 4. ヒト骨髄細胞の初期培養細胞を用いた骨形成細胞シート作製条件

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 量はデキサメサ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: デキサメサゾン、アスコルビン酸、 β 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 では、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 50nM の方が高かった。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く、ハンドリングが容易であろうと推測できた。

人工骨に細胞シートを組み合わせヌードラット大腿骨皮下へ移植後 2 カ月で摘出した組織像ではいずれの条件でも人工骨内に骨形成が認められたが、デキサメタゾン濃度が高い方が良好な骨形成が認められた (図 4)。人工骨と細胞シートを組み合わせ 2 か月後摘出したサンプルの mRNA 量は人工骨単独群より有意に高値であり、デキサメタゾン濃度が高いほうが高値であった。

以上により培養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：50nM、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。

C. 5. 初期培養細胞で作製したヒト骨形成細胞シートの人工骨への注入

注入移植後 1 か月目に摘出した β -TCP の組織像では人工骨内に骨形成を認めた。

摘出した標本のリアルタイム PCR 法による mRNA は 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) は統計学的に有意に高値であった。

C. 6. ヌードラット大腿骨偽関節でのヒト骨形成細胞シートの骨形成能評価結果

経時的なレントゲン像で、偽関節部

は術後 12 週まで骨性架橋は認められなかった。組織像でもレントゲン像と同様に偽関節部は骨性架橋を認めず、線維性組織が介在していた。3 点曲げ試験による力学試験では、細胞シートを移植した群と偽関節モデルでは、偽関節の最大曲げ荷重に差は認められなかった。

C. 7. ヌードラット大腿骨偽関節へのヒト骨形成細胞シート注入による骨形成の結果

大腿骨偽関節部に細胞シートを注入移植したが経時的なレントゲンでは偽関節部を架橋する骨形成は認めなかった。注入後 12 週の組織像でも偽関節部に線維組織の介在を認めた。力学試験でもシート注入群は偽関節群と比較して差は認めなかった。

C. 8. ヒツジ骨形成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く、ヒツジ骨形成細胞シート作製は 6 日間程度で可能であった。

分化にかか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、培養皿を表面加工されたもの (プライマリア Falcon, BD, USA) にすれば可能であることが明らかとなった。デキサメタゾン濃度は、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 デキサメタ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。生化学的評価では、 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の細胞を用いて、骨形成能を有する「骨形成細胞シート」を作製し、その有用性を報告してきた。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報告している⁴⁹。

本研究では、ヒト骨髄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とは異なる条件であることが判明した。その条件で作製したヒト骨形成細胞シートを人工骨に組み合わせてヌードラットに移植したところ人工骨内に骨形成が見られた。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。また、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ため、注射針の径を大きくするなど注入方法について、今後検討する必要があると考える。

より臨床にそったかたちで検討するため、患者腸骨より採取したヒト骨髄細胞を用いた実験もおこなった。骨形成細胞シートを作製する条件では、デキサメタゾン濃度が高いほど骨形成マーカーは高い値を示したが、細胞外基質はデキサメタゾン濃度が低い方が高値を示した。これは実際の取り扱いでもデキサメタゾン濃度が高い方が破損しやすくハンドリングが困難であった。

市販の細胞である骨髄間葉系幹細胞と患者腸骨より採取した骨髄細胞から骨形成細胞シート作製条件は異なっていた。患者腸骨から採取した骨髄細胞には様々な分化した細胞が含まれていることも関係している可能性がある。決定した条件で細胞シートを作製し、大腿骨偽関節部に直視下・注入の方法で移植をおこなったが偽関節部に骨癒合は得られなかった。原因としては細胞シートの骨形成能が偽関節部を癒合させるほどの骨形成能を有していない可能性が考えられる。また、免疫不全動物を使っているために、偽関節部での骨形成機構がうまく働いていない可能性もある。偽関節部を骨癒合させるには、細胞シートの枚数を増やして移植したり、骨形成能を高めるために新たに何らかの骨形成因子を加えたりする必要があると考える。

その一方で、ヒツジを用いた実験ではヒツジ骨形成細胞による骨形成が確認できた。ヒツジを用いた大動物実験は、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、プライマリア培養皿を使用すれば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、使用する培養皿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組織学的および生化学的評価で、十分な骨形成が確認できたため、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。

本研究課題によって、将来のヒト骨形成細胞シートの臨床応用への有用な

成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

清水隆昌、赤羽学、面川庄平、小島康宣、村田景一、中野健一、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骨形成評価 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

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

中野健一、村田景一、清水隆昌、赤羽学、藤間保晶、小島康宣、仲西康顕、面川庄平、川手健次、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

谷掛洋平、中島弘司、林宏治、加藤宣伸、藤間保晶、大串始、土肥祥子、赤羽学、高澤伸、川手健次、田中康仁 Fibronectinをコートした β TCPの骨形成能 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

藤間保晶、土肥祥子、大串始、谷掛

洋平、高澤伸、赤羽学、田中康仁 骨髄由来間葉系細胞搭載人工骨の骨形成能に対するポリADPリボースポリメラーゼ阻害剤の影響 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、森田有亮、面川庄平、小島康宣、村田景一、中野健一、上羽智之、藤間保晶、川手健次、田中康仁 骨芽細胞シートを用いたラット大腿骨偽関節治癒過程の特徴 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

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

稲垣有佐、上松耕太、赤羽学、小川宗宏、藤間保晶、倉智彦、粥川陽介、森田有亮、川手健次、田中康仁 骨形成細胞シートによる家兎移植骨孔間治療の促進 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

中野健一、村田景一、清水昌隆、赤羽学、藤間保晶、小島康宣、仲西康顕、面川庄平、川手健次、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、城戸颯、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. 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. 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. 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.

7. Manabu Akahane, Tomoyuki Ueha, Yoshiko Dohi, Takamasa Shimizu, Yasuaki Tohma, Akira Kido, Kenji Kawate, Tomoaki Imamura,

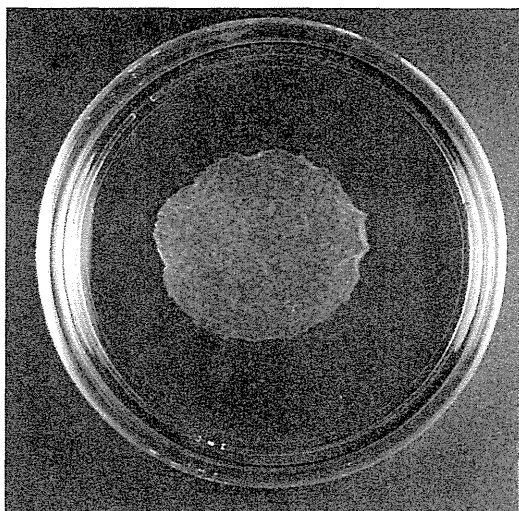
Yasuhito Tanaka. Secretory osteocalcin as a non-destructive osteogenic marker of tissue engineered bone. J Orthop Sci. 2011 Sep;16(5):622-628.

8. 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.

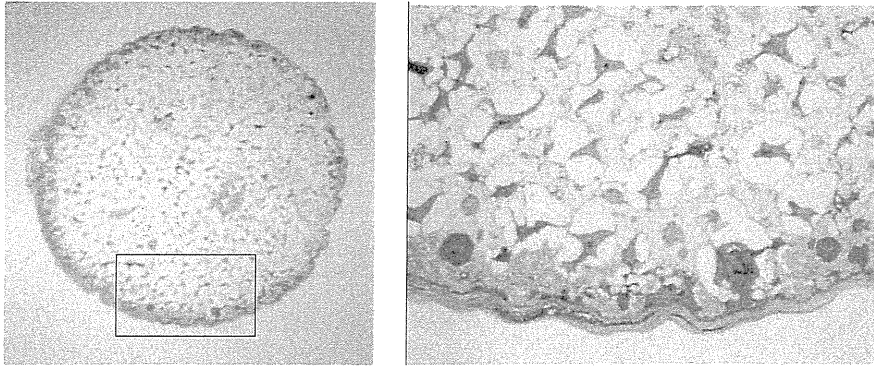
9. 清水隆昌、川手健次、赤羽学、森田有亮、面川庄平、田中康仁 注入型骨移植を用いた偽関節治療における生体力学的考察 整形・災害外科 第55巻、11号、1289-1292、2012

・ 図1 ヒト骨髄間葉系幹細胞から作製したヒト骨形成細胞シート

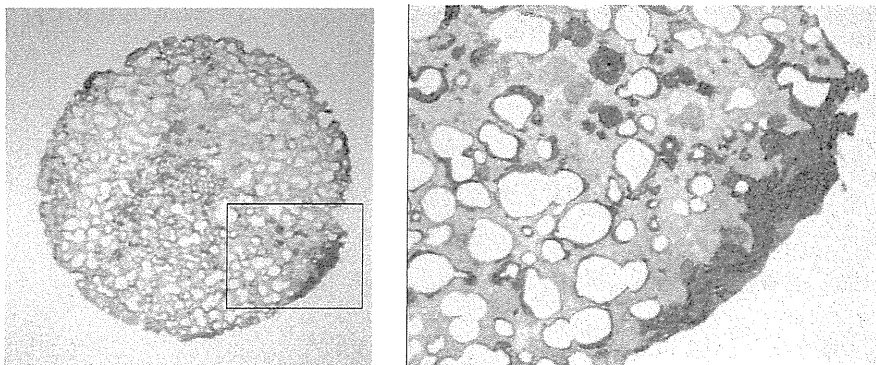


・図2 注入移植による細胞シートの骨形成能の検討結果（組織像）

A 100mm細胞シートを注入した人工骨の組織像

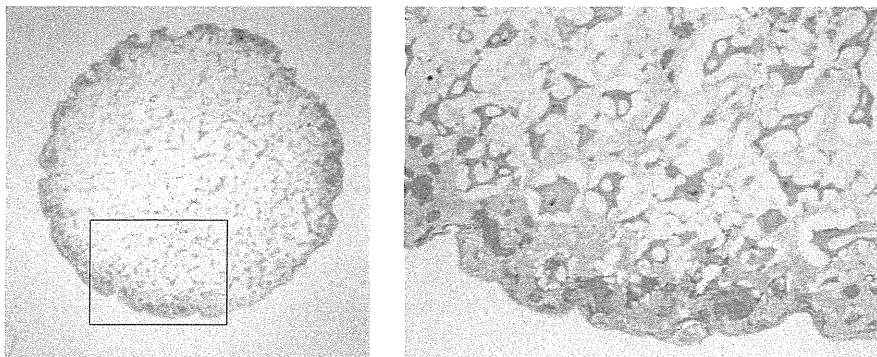


(Dex 10nM で細胞シート作製)

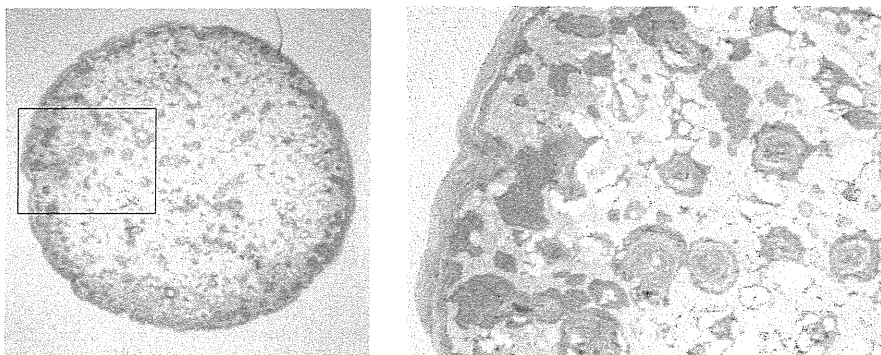


(Dex 100nM で細胞シート作製)

B 60mm細胞シートを注入した人工骨の組織像



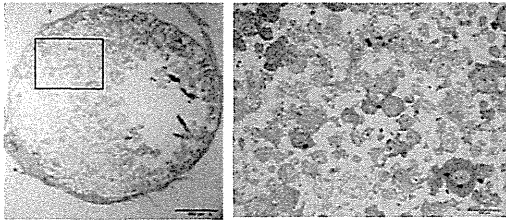
(Dex 10nM で細胞シート作製)



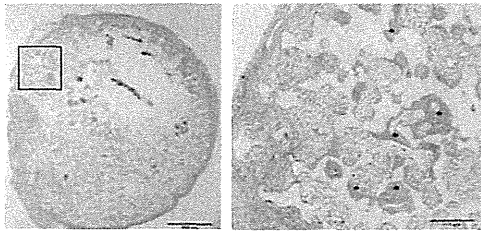
(Dex 100nM で細胞シート作製)

図3 生体内での細胞シートの骨形成能の検討結果（組織像）

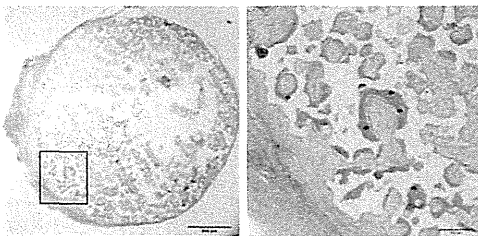
Dex:10nM



Dex:30nM



Dex:50nM



Dex:100nM

