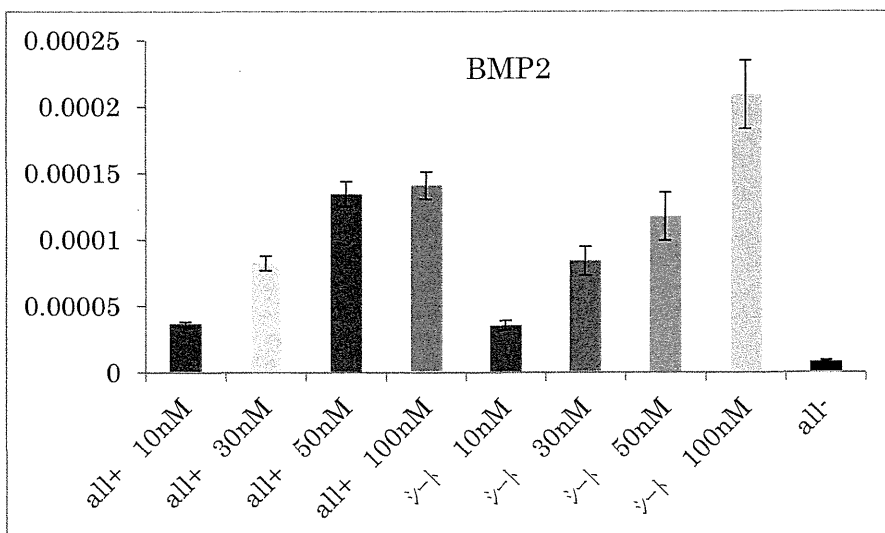
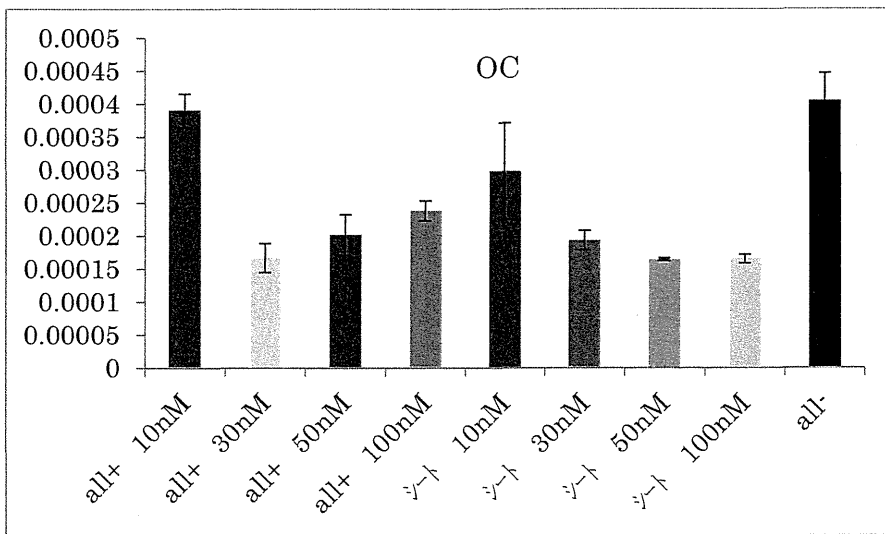
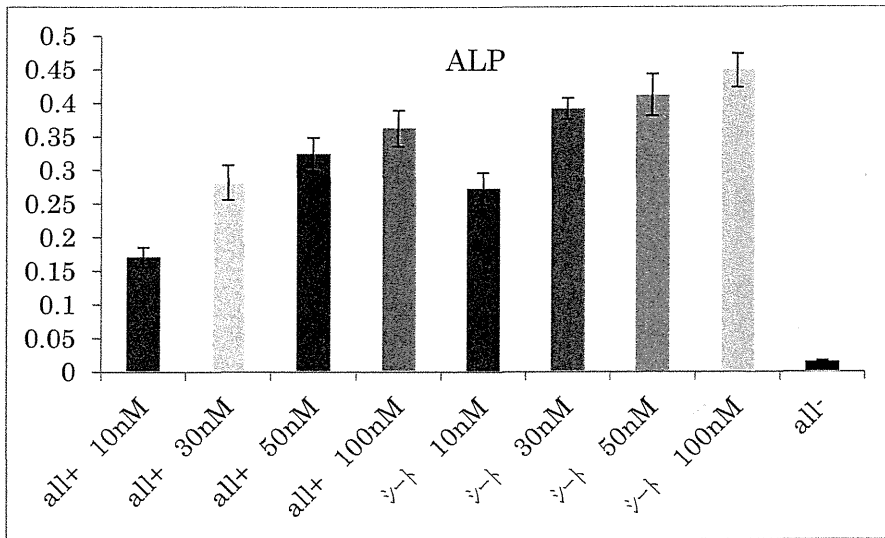


● 細胞播種濃度 $1.0 \times 10^4 \text{ cell/cm}^2 (n=4)$



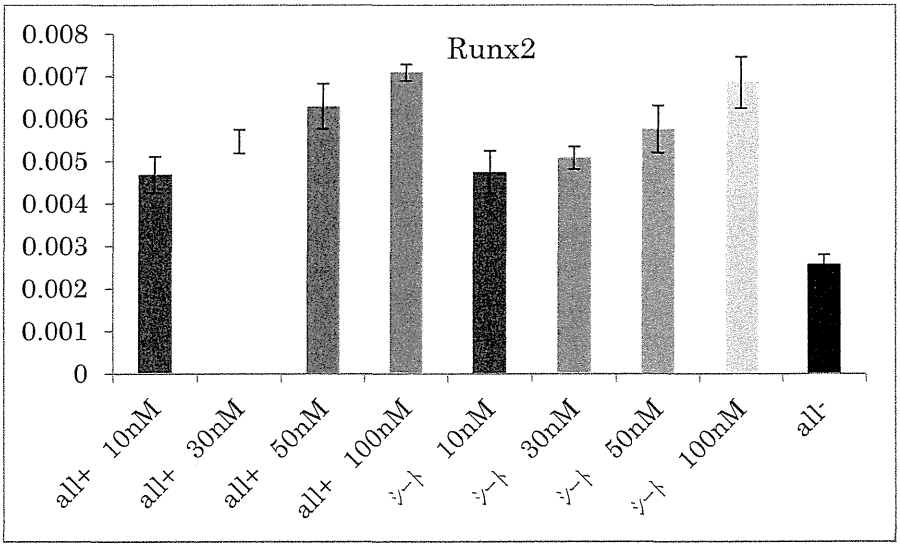
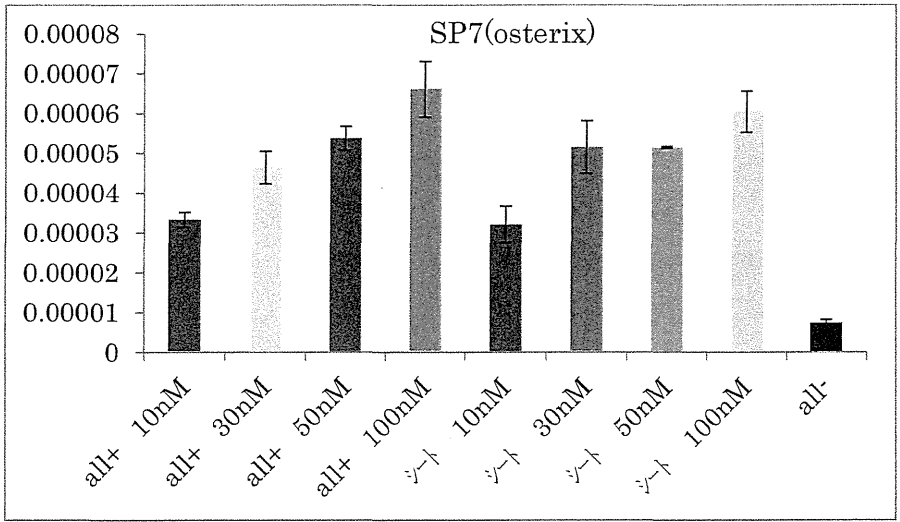
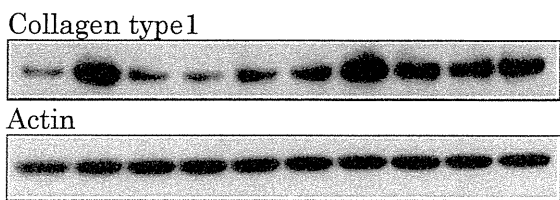
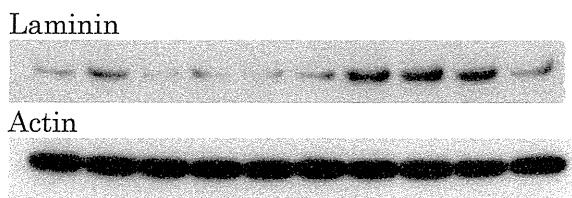
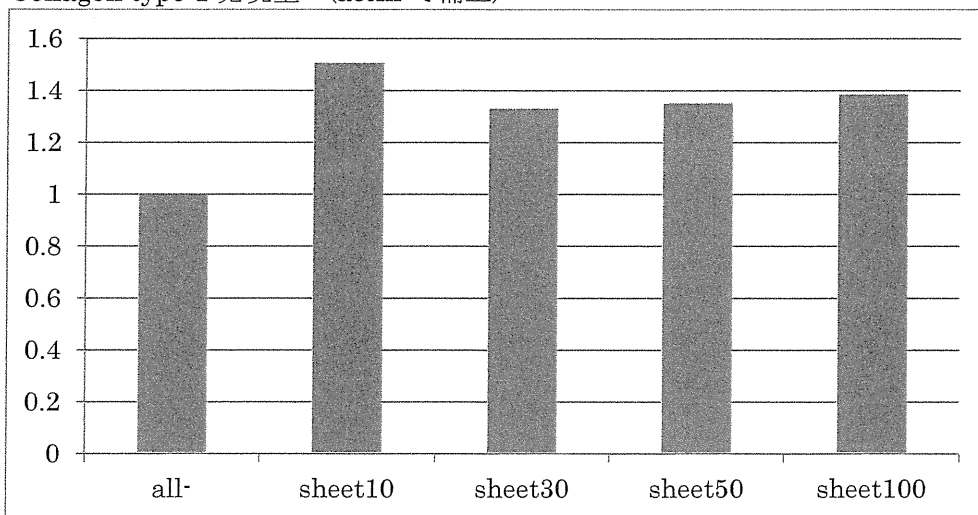


図3 細胞外基質の発現量の評価 (Western blotting)



Collagen type 1 発現量 (actin で補正)



Laminin 発現量 (actin で補正)

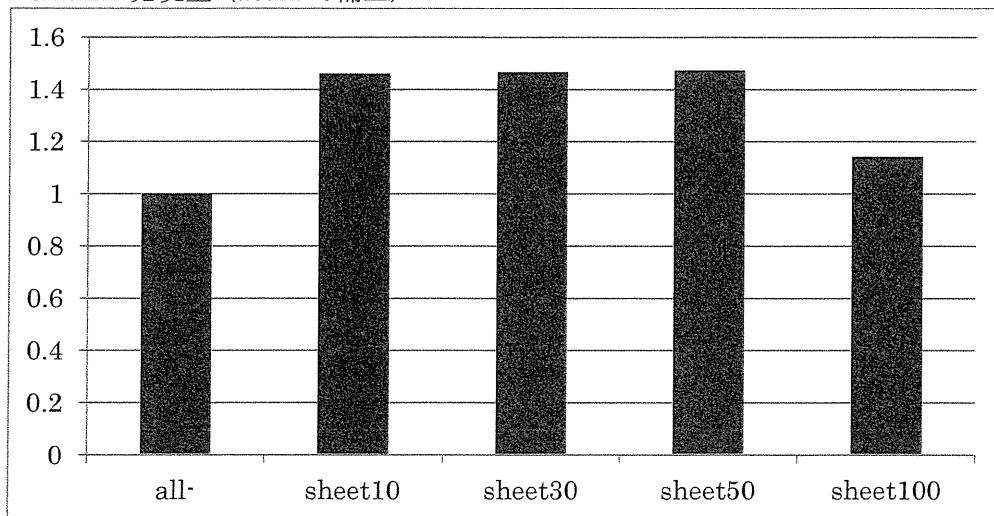
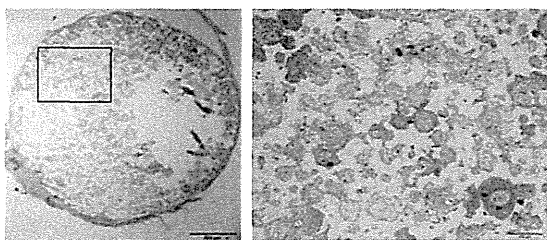
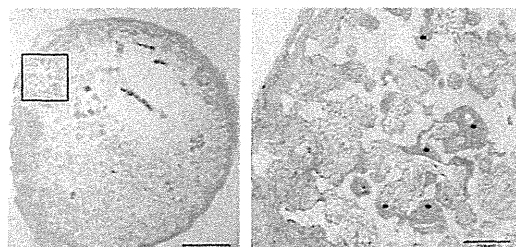


図4 生体内での細胞シートの骨形成能の検討結果（組織像）

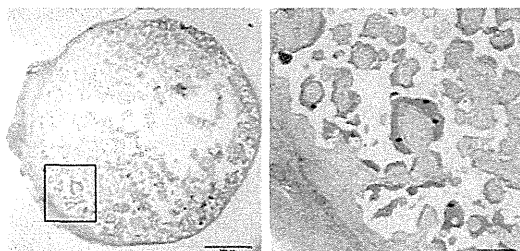
Dex:10nM



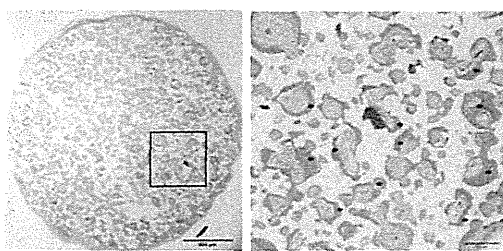
Dex:30nM



Dex:50nM

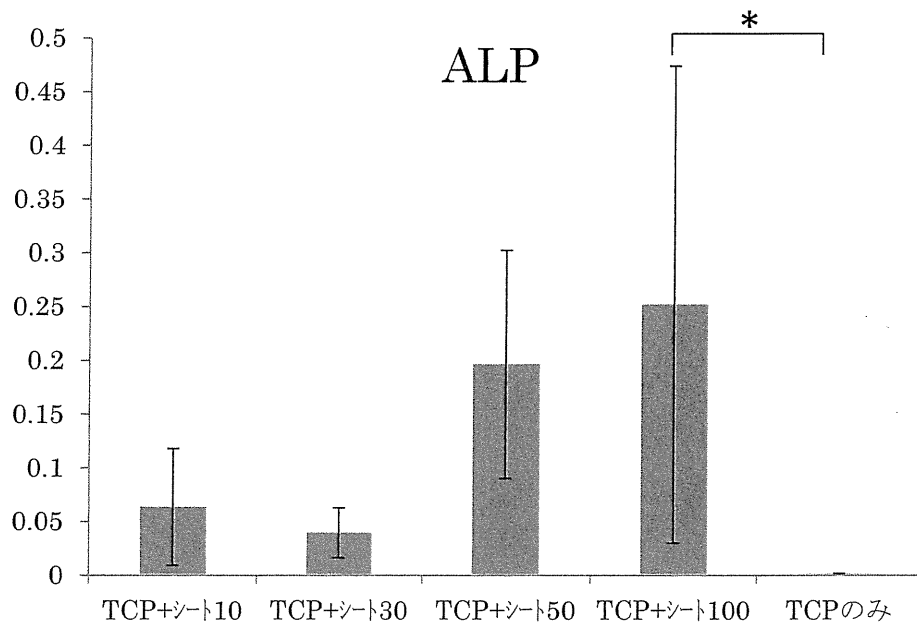


Dex:100nM

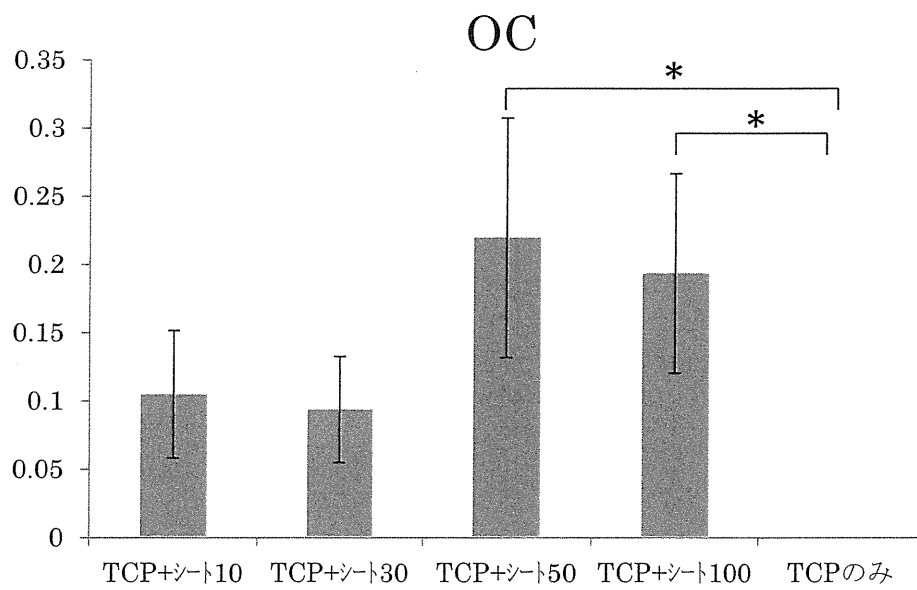


Dex: デキサメサゾン濃度

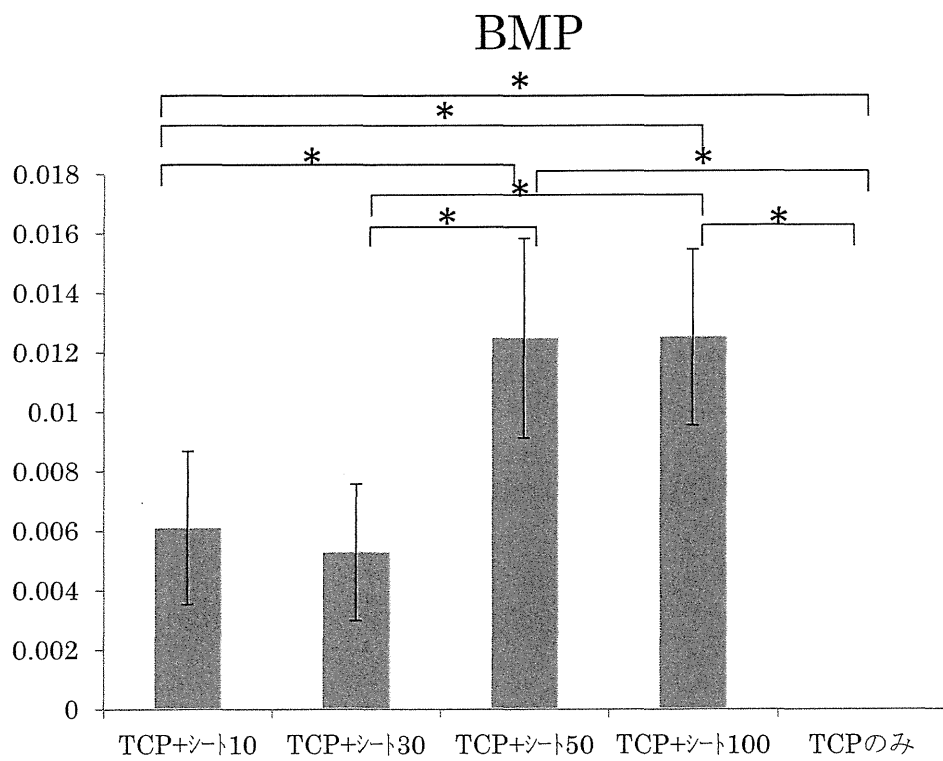
図5 骨形成マーカー発現量 (*In vivo*)



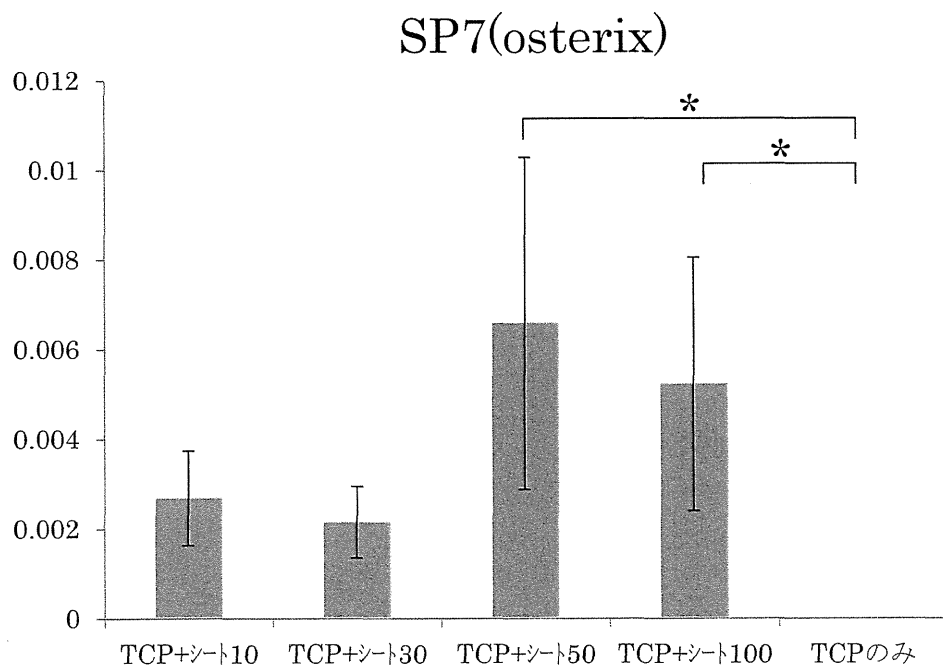
n=4 *P<0.05



n=4 *P<0.05

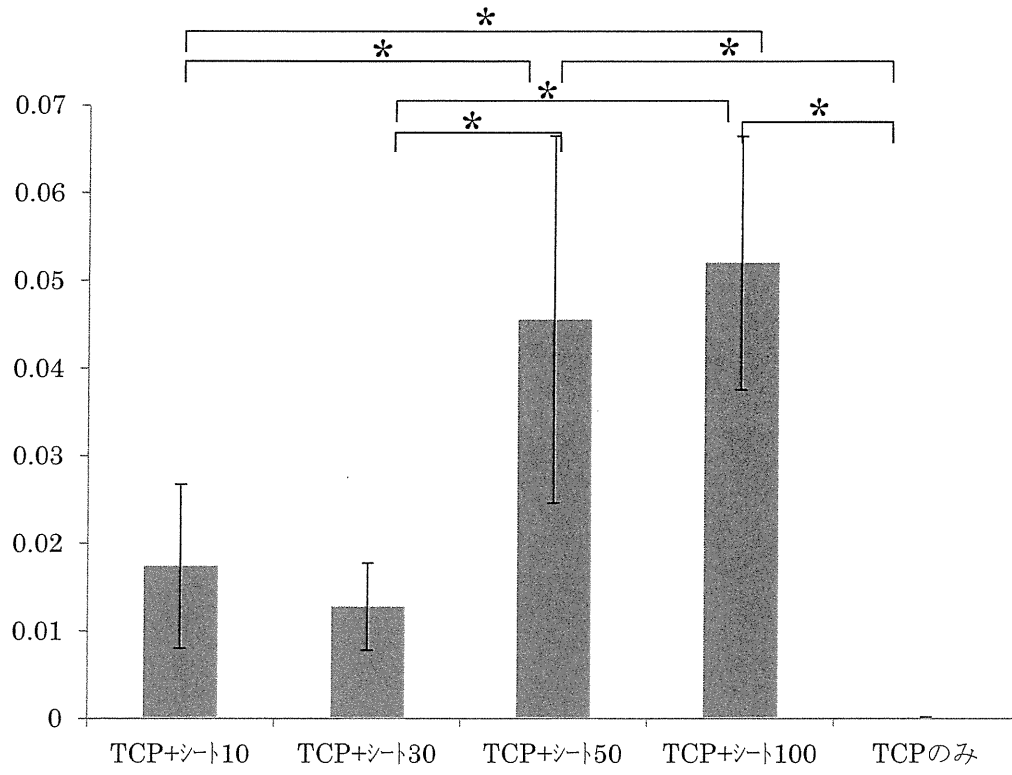


n=4 *P<0.05



n=4 *P<0.05

Runx2



n=4 *P<0.05

厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）
研究代表者分・分担研究報告書

ヌードラット大腿骨偽関節モデルの確立

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 清水隆昌 奈良県立医科大学 整形外科 医員

研究要旨

骨折の治療法は近年進歩し、骨癒合率は比較的に向いているが、現在においても骨癒合を得られず偽関節となる症例が少なからず存在する。偽関節に陥ると、痛みのため患者のADLは低下し、それに伴いQOLが非常に損なわれる。

偽関節に対する治療は、骨折部に介在する癒痕組織を切除した後、骨折部に生じた骨欠損の大きさに合わせて海綿骨移植が行われるが、一度生物学的活性を失い偽関節に陥ると、living bone ではない海綿骨移植のみでは骨癒合を得られない可能性が高まる。このような状態に陥ると、複数回の手術を行っても骨癒合が得られず、骨折部周囲の組織は損傷され、感染などの合併症併発も危惧される。骨折部を骨形成能が残存している部位まで切除および搔爬を行うと、大きな骨欠損が生じる。

一般的に、骨欠損部が6cm以上を超えると海綿骨移植では骨癒合が得られにくいとされ、このような場合はliving boneである血管柄付き骨移植術などが必要となり、手技的に難易度が増すことになる。このような状況に陥る前に、新しい方法で、骨折部または偽関節部の骨癒合が得られれば、患者のADL改善につながり、临床上も非常に有用性が高い。

本研究では、ヒト骨形成細胞シートの臨床応用を視野に入れた研究をするために、臨床に近い偽関節モデルをヌードラットの大腿骨で作製し、今後のヒト細胞を用いた研究を効率よく進めるための基礎研究を目的としている。生物学的活性を有したヒト由来の骨形成細胞シートを注入し、偽関節部位の骨癒合が得られるかを検討するための偽関節モデルである為、偽関節モデル作製後、自然経過で骨癒合が起こらず、ある程度の経過観察期間(本研究では骨切り後12週間)に、確実に偽関節となるモデルを作製することを目的とする。

今回の実験から、確実にヌードラット大腿骨偽関節が作製できる方法が確立できた。この偽関節モデルを使用することで、ヒト骨芽細胞シート移植による骨癒合の効果を評価することができると考えられ、ヒト骨形成細胞によって骨癒合を得られることを証明することが可能となると考えられる。

A. 研究目的

これまでも実験動物を用いた偽関節モデルは報告されている。しかし、中・大型の動物が主であり、ラットにおける偽関節モデルは必ずしも十分なものが確立されているとは言えない。ヒト骨髄細胞を用いて、硬組織再生の研究、特に偽関節も

モデルに対する骨癒合の研究を進めるうえで、免疫不全動物であるヌードラットの偽関節モデルは重要である。ヌードマウスやスキッドマウスも免疫不全動物として広く用いられているが、大腿骨は非常に小さく、骨折や骨壊死のモデルを研究する上では扱いにくい。そこで、本研究では通常のラットとほぼ同じサイズで免疫不全動物

であるヌードラットを用いて大腿骨の偽関節モデルを作製することを目的として、実験を行った。

ラット大腿骨偽関節モデルは様々なものが報告されているが、髄内釘を用いた方法は簡便で有用性が高い。偽関節を作製するために骨折部の骨膜の熱処理が一般的に行われているが¹、個体間で均一な骨膜の熱処理を行うことは手技的に困難である。また、骨折治癒には周囲の間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cells; MSCs) が骨芽細胞などに分化し骨癒合を促す必要があるが²、この MSCs の供給源として、骨膜³、骨髄⁴、周囲の筋肉⁵、周囲の血管⁶などが挙げられる。

骨膜のみを処理するモデルでは、骨膜を除くその他の部位から MSCs が供給される可能性が存在するため、骨折部が経過によって確実に偽関節となるとは言い難く、また実際の臨床で遭遇する骨形成能を失った偽関節にならない可能性も考えられる。

今回我々は、骨膜を熱処理する代わりに、骨膜と周囲の筋肉組織を含めて広範囲に骨折部の軟部組織を切除したうえ、さらに大腿骨骨髄の搔爬を追加する骨折部を作製することで、簡便で再現性の高いヌードラット大腿骨偽関節モデルの作製を行った。

B. 研究方法

B.1. ヌードラット偽関節モデルの作製

本研究では、11 週齢の雄ヌードラット (Fischer344 ラット; F344/N Jcl-rmu/ rmu) を用いた。

右大腿外側に皮膚切開し大腿骨に進入した。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した後、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 (図 1)。

一方、健側の大腿骨を対照群とし、両群 n=12 で比較検討を行った。

B.2. 移植標本の骨形性能の評価

術後 4、8、12 週でレントゲン画像を撮影し、継時的に骨形成の状態を観察した。

B.3. 移植標本の骨形性能の評価

骨癒合状態を評価するため、組織像も継時的に評価した。摘出標本は 2 日間ホルマリン固定し、数日間脱灰した後、骨折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 (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。

B.4. 3点曲げ力学的評価による偽関節の確認

分担研究者・森田が作製したラット用の専用ジグを使用し、評価を行った。

C. 研究結果

C.1. レントゲン画像による骨形成の経時的評価

図 2 に経時的なレントゲン像の結果を示す。偽関節群では、レントゲン画像で骨切り部周囲にわずかな仮骨形成を認めるものの、術後 12 週まで骨性架橋を認めなかった。

C.2. 組織像

図 3 に、骨切後 4、8、12 週で摘出した大腿骨の組織像を示す。X 線画像と同様に、偽関節群で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 週では骨切部の皮質骨の萎縮を認めた。

これらは、偽関節の組織像と一致した所見であった。

C.3. 力学試験結果

正常大腿骨に比べて、有意にその強度は失われており、レントゲン結果や組織像の結果と同じく、偽関節であることが明らかであった。

D. 考察

骨折の治療法は近年進歩し、骨癒合率は比較的に向いているが、現在においても骨癒合を得られず偽関節となる症例が少なからず存在する。偽関節に陥ると、痛みのため患者の ADL は低下し、それに伴い QOL が非常に損なわれる。

偽関節に対する治療は、骨折部に介在する癒痕組織を切除した後、骨折部に生じた骨欠損の大きさに合わせて海綿骨移植が行われるが、一度生物学的活性を失い偽関節に陥ると、living bone ではない海綿骨移植のみでは骨癒合を得られない可能性が高まる。このような状態に陥ると、複数回の手術を行っても骨癒合が得られず、骨折部周囲の組織は損傷され、感染などの合併症併発も危惧される。骨折部を骨形成能が残存している部位まで切除および搔爬を行うと、大きな骨欠損が生じる。

一般的に、骨欠損部が 6cm 以上を超えると海綿骨移植では骨癒合が得られにくいとされ、このような場合は living bone である血管柄付き骨移植術などが必要となり、手技的に難易度が増すことになる。このような状況に陥る前に、新しい方法で、骨折部または偽関節部の骨癒合が得られれば、患者の ADL 改善につながり、臨床上も非常に有用性が高い。

本研究では、ヒト骨形成細胞シートの臨

床応用を視野に入れた研究をするために、臨床に近い偽関節モデルをヌードラットの大腿骨で作製し、今後のヒト細胞を用いた研究を効率よく進めるための基礎研究を目的としている。生物学的活性を有したヒト由来の骨芽細胞シートを注入し、偽関節部位の骨癒合が得られるかを検討するための偽関節モデルである為、偽関節モデル作製後、自然経過で骨癒合が起こらず、ある程度の経過観察期間(本研究では骨切り後 12 週間)に、確実に偽関節となるモデルを作製することを目的とする。

今回の実験から、確実にヌードラット大腿骨偽関節が作製できる方法が確立できた。この偽関節モデルを使用することで、ヒト骨芽細胞シート移植による骨癒合の効果を評価することができると考えられ、ヒト骨芽細胞によって骨癒合を得られることを証明することが可能となると考えられる。

本研究で我々が確立したモデルは、骨膜の熱処理の代わりに、大腿骨周囲の骨膜および筋肉組織を広範囲に切除し、さらに大腿骨骨髓を搔爬することで偽関節を作ることが可能であった。骨膜の熱処理をせず、骨癒合に影響を与える MSCs を効果的に除去することで、高い再現性をもって偽関節作製が可能であった。我々の作製したヌードラット大腿骨偽関節が、今後の偽関節の治療法開発に有用であると考えられた。

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 冷凍保存骨髓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
老齡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 2
012 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

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

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 201
2 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、城戸顕、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 13-1
4 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

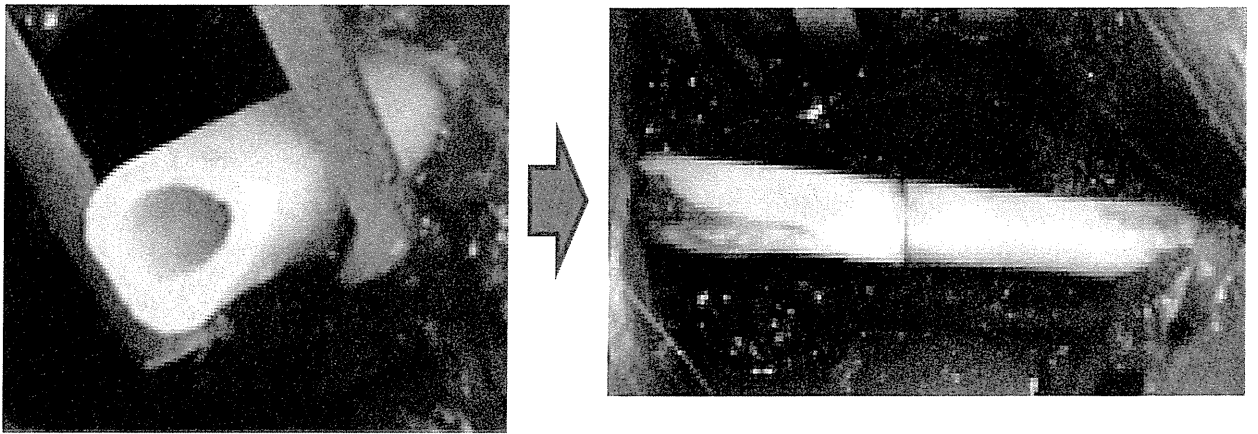
なし

G. 参考文献

1. Kokubu T, Hak DJ, Hazelwood SJ, Reddi AH. Development of an atrophic nonunion model and comparison to a closed healing fracture in rat femur. J Orthop Res. 2003 May;21:503-10.
2. Iwaki A, Jingushi S, Oda Y, Izumi T, Shida JI, Tsuneyoshi M, et al. Localization and quantification of proliferating cells during rat fracture repair: detection of

- proliferating cell nuclear antigen by immunohistochemistry. *J Bone Miner Res* 1997;12:96-102.
3. Malizos KN, Papatheodorou LK. The healing potential of the periosteum. Molecular aspects. *Injury* 2005;36(Suppl 3):S13-9.
 4. Baksh D, Song L, Tuan RS. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J Cell Mol Med* 2004;8:301-16.
 5. Eghbali-Fatourehchi GZ, Lamsam J, Fraser D, Nagel D, Riggs BL, Khosla S. Circulating osteoblast-lineage cells in humans. *N Engl J Med* 2005;352:1959-66.
 6. Rumi MN, Deol GS, Singapuri KP, Pellegrini Jr VD. The origin of osteoprogenitor cells responsible for heterotopic ossification following hip surgery: an animal model in the rabbit. *J Orthop Res* 2005;23:34-40.

図1 大腿骨偽関節モデルの作製



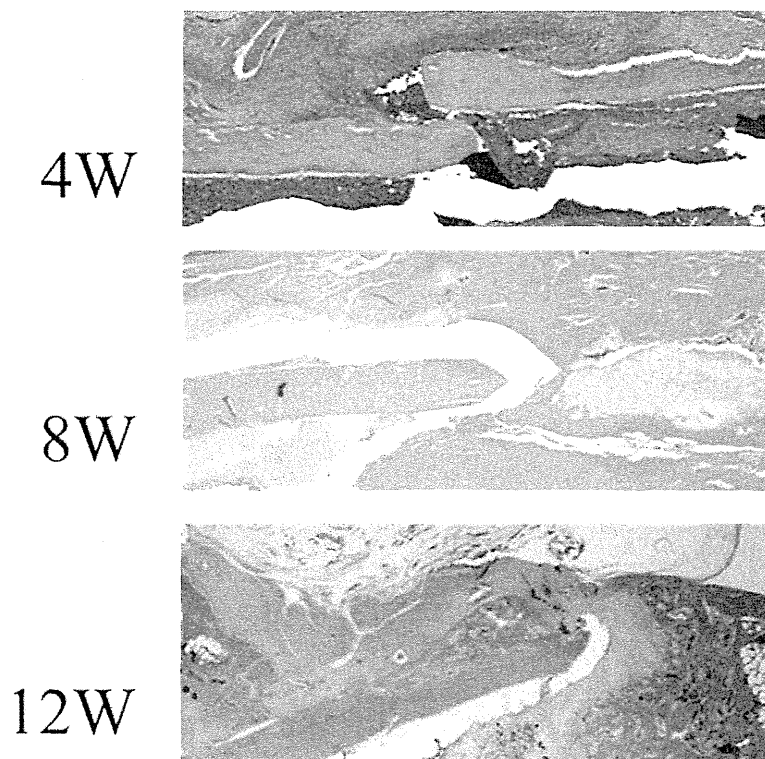
大腿骨の周囲の骨膜を可及的に切除し、さらに髓腔内を搔把・洗浄する。その後、骨髓腔内に鋼線を入れて髓内固定を行う。骨膜の切除だけでなく、髓腔内の搔把・洗浄を十分に行うことが確実な偽関節モデル作製のポイントであることが分かった。

図2 経時的レントゲン撮影による骨折部の状態の評価



12週経過しても骨折部に骨癒合は見られなかった。組織像や力学試験結果からも骨癒合が得られていない結果であり、偽関節と判断した。

図3 経時的な骨折部の組織像



骨癒合は得られておらず、軟部組織の介在が確認された。

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

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

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。

本研究ではまず最初に、市販のヒト骨髄間葉系幹細胞 (Human Mesenchymal stem cells; hMSCs) を用いて骨形成細胞シート作製の培養条件を確立し、注入移植したヒト細胞シートが生体内で骨形成が得られるかどうかを検証した。ラットを用いた動物実験で注入による細胞シートの移植法は確立しているため、これと同様の手技でヒト細胞でも可能か検討した。次に、患者の同意のもとに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が、市販のヒト骨髄細胞と同様に、生体内で骨形成が得られるかどうかを検証した。

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ヒト骨形成細胞シートを注入し骨形成が得られるかを組織学的、生化学的に評価をおこなったところ、人工骨の気孔内に良好な骨形成を認めた。リアルタイム PCR 法で骨形成マーカーの mRNA 発現量を定量すると、人工骨単独で移植した群 (対照群) と比べ骨形成細胞シートを注入した群が有意に骨形成マーカーの上昇が見られた。ヒト骨形成細胞シート注入による「注入型骨移植法」が、動物細胞と同様に可能であると判明した。

つづいてヒト細胞シートの臨床応用を視野に入れた研究のため、偽関節モデルをヌードラットの大腿骨で作製し、細胞シートを注入することにより骨癒合が得られるかを検討した。今回の実験から確実にヌードラット偽関節が作製できる方法が確立された。ヌードラット大腿骨偽関節モデルは本研究における分担研究として実施し確立されたものを用いた。注射器で偽関節部へヒト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にレントゲン評価をおこない、12 週間後大腿骨を摘出し組織学的に検討した。今回の検討では、偽関節部への注入移植では骨形成および骨癒合は得られなかったが、人工骨へ注入移植で骨形成を認めたため、注入型骨移植は可能であることが判明した。

A. 研究目的

我々はこれまでに、ラットやラビ

ットなどの動物実験により、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（骨形成細胞シート）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 で注入移植し、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、最初に市販ヒト MSC で作製したヒト骨形成細胞シートが注入移植後に生体内で新生骨を形成するのか検討する。続いて患者から提供を受けた骨髄細胞で骨形成細胞シートを作製し、生体内で骨形成能を有するのかを検証する。

注入後の骨形成に関しては、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討し、さらにヌードラット大腿骨偽関節モデルの大腿骨偽関節部に注入移植することで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. 市販のヒト骨髄間葉系幹細胞を用いた研究の方法

B. 1. 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 MSC は、Lonza 社から購入した市販のヒト骨髄細胞である。ヒト MSC を T75 フラスコ (75cm² culture flask, Falcon, BD) で2週間初期培養後、6cm 培養皿 (60 mm ディッシュ; Falcon 35-3002, BD) と 10 cm 培養皿 (100 mm ディッシュ; Falcon 35-3003, BD) にそれぞれ 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 (VC:82μg/ml) とデキサメタゾン (Dex) を添加し培養を行った。Dex の濃度は、10 nM と 100 nM の2種類の条件とした。3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. 1. 2. ヒト骨形成細胞シート注入法の検討

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 PBS (Gibco, Invitrogen, USA) 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 (内径 1.73 mm 外径 2.1 mm 内針 16G) を注射器に装着し、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する。

図1は、外筒だけ皮膚に刺したまま残したアンギオキャスの外筒内に、注射器を装着しヒト骨形成細胞シートを注入する際の写真である。細胞シートがシリンジ内にとどまることがあるので、PBS を混和させることで、注入するヒト骨形成細胞シートを余ることなく押し出す効果がある。

B. 1. 3. 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、10 cm 培養皿で作製したヒト骨形成細胞シートを注入移植した。さらに 6cm 培養皿で作製したヒト骨形成細胞シートを、1つの人工骨に対して2枚注入移

植した。

移植後 2 カ月で標本を摘出し 2 日間ホルマリン固定し、2 日間脱灰後 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、組織学のおよびレントゲン撮影によって骨形成を評価した。

B. 2. ヒト骨髄初期培養細胞を用いた研究の方法

B. 2. 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

本研究で使用したヒト骨髄細胞は、同意のもとに 38 歳男性の腸骨より採取した骨髄細胞である。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 (VC: 82 μ g/ml) とデキサメタゾン (Dex: 50 nM) 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. 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 2 mm 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、注射器を使用し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 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を用いた研究の方法

B. 3. 1. ヌードラット偽関節モデルの作製

本研究では、12 週齢の雄ヌードラット (Fischer344 ラット; F344/N Jcl-rnu/rnu) を用いた。

右大腿外側に皮膚切開し大腿骨に進入した。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した後、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 0.8 mm) を用いた髓内釘固定を行い、これを偽関節群とした。

B. 3. 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

12 週齢ヌードラット偽関節モデルの右大腿骨偽関節部にスキャ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から作製した細胞シート注入の結果

移植後 2 か月目に摘出した人工骨をレントゲン撮影した。レントゲンでは、人工骨はその輪郭がはっきりとしているものの、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像は明らかではなかった (図 2)。

市販ヒト骨髄間葉系幹細胞から作製した細胞シートの注入移植 4 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 (図 3)。

C. 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

同意を得て採取した患者骨髄より作

製した細胞シートの注入移植 4 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 (図 4)。

図 5 に患者骨髄より作製した細胞シートの注入移植後 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 量は統計学的に有意に高値であった。このことから、ヒト骨形成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、人工骨に骨形成能を付与できた。

C. 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

図 6 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 7 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たことを報告している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周囲に注入し、人工骨気孔内に骨形成が見ら

れた。しかし、人工骨表面には骨形成は見られなかった。また、骨形成能の評価として、リアルタイム PCR 法による mRNA 発現量を測定した。 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。このことより、細胞シートを注入移植することのより人工骨に骨形成能を付与することができると考えられた。

ヌードラットの大腿骨偽関節にヒト骨形成細胞シートを注射器を用いて注入移植したが、レントゲンおよび組織学的に骨癒合は確認できなかった。皮下にあらかじめ移植していた人工骨周囲にも骨形成はみられなかった。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、細胞活性の低下を招いたため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。今回人工骨周囲には1枚、偽関節に対して2枚の細胞シートを注入移植したが、1~2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考えられる。本研究で用いたレシピエントは免疫不全動物であるヌードラットのため炎症系サイトカインの発現が抑制されているおり、骨形成に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。しかし、人工骨周囲や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が必要と考える。

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.