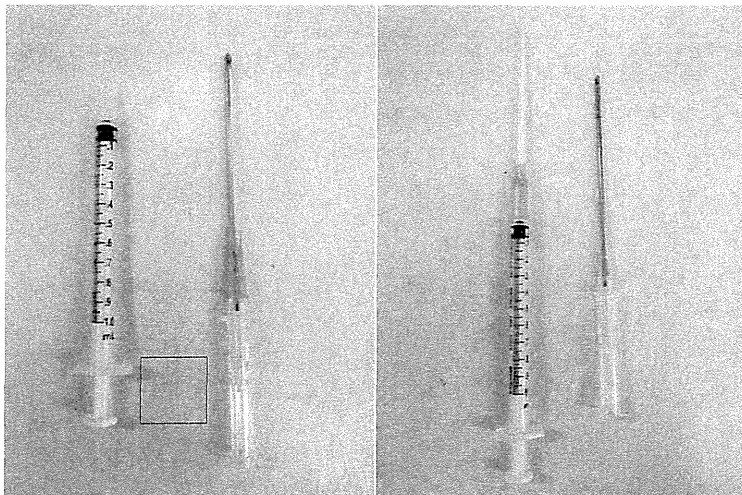


3. 上羽智之、赤羽学、重松秀樹、内原好信、清水隆昌、城戸顕、藤間保晶、川手健次、今村知明、田中康仁 培養細胞シートを用いた培養人工骨の骨形成 Orthopaedic Ceramic Implants 2009, 29:15-18
4. Manabu Akahane, Hideki Shigematsu, Mika Tadokoro, Tomoyuki Ueha, Tomohiro Matsumoto, Yasuaki Tohma, Akira Kido, Tomoaki Imamura and6. Yasuhito Tanaka : Scaffold-free cell injection results 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.

図1 ノードラットへ骨形成細胞シート注入移植法

A 骨形成細胞シートの注入に使用した注射針とシリンジ

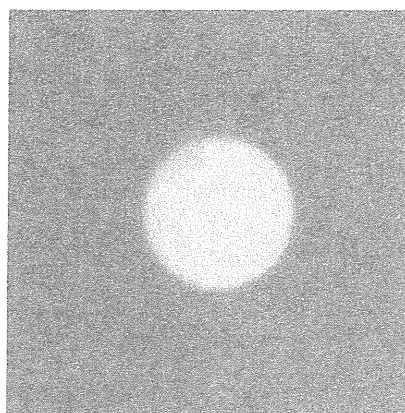


B ノードラットの背部皮下への注入

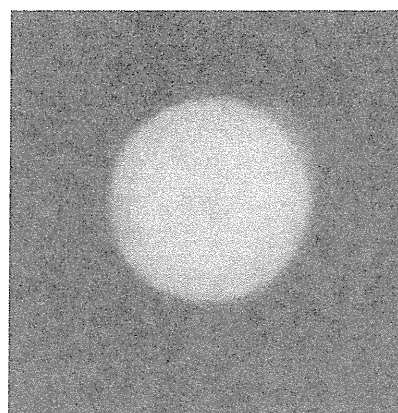


図2 摘出した人工骨のレントゲン写真

A 注入型骨移植を行った摘出人工骨 (10 cm培養皿で細胞シート作製)

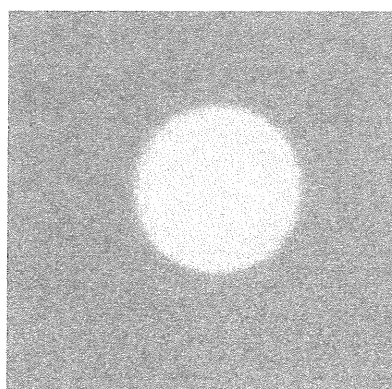


(Dex 10nM)

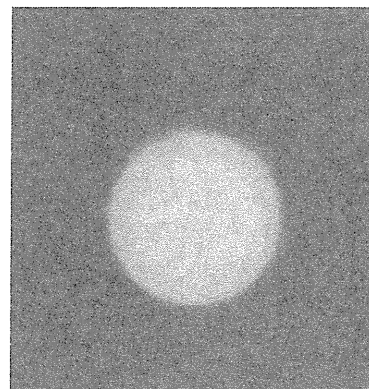


(Dex 100nM)

B 注入型骨移植を行った摘出人工骨 (6cm 培養皿で細胞シート作製)



(Dex 10nM)

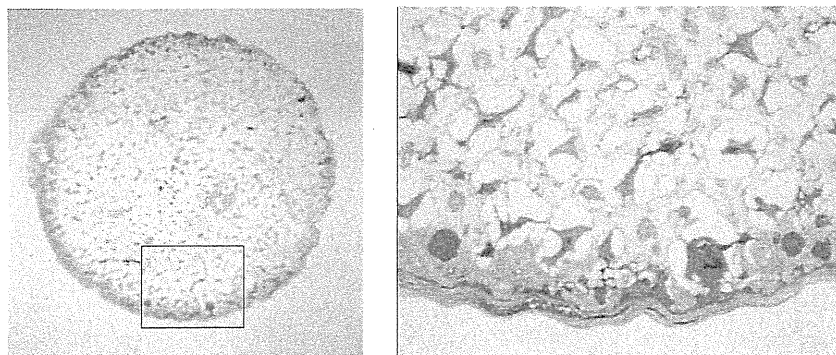


(Dex 100nM)

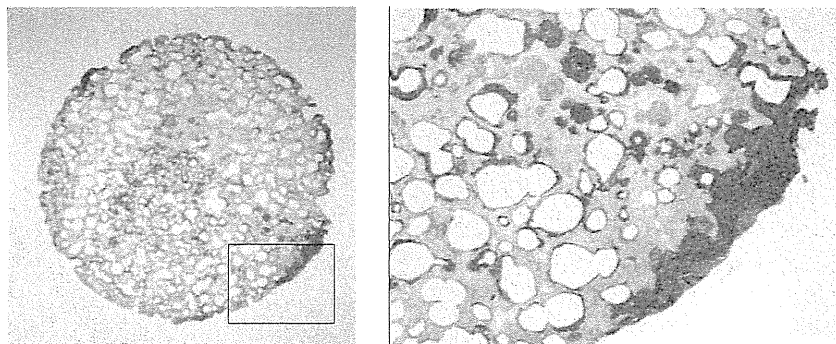
Dex : デキサメサゾン濃度を示す

図3 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

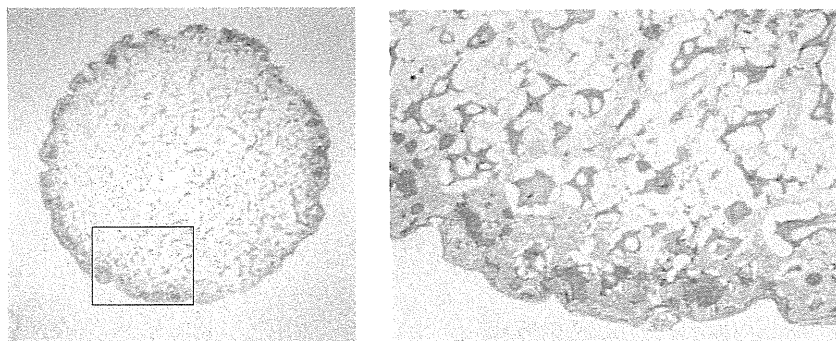


(Dex 10nMで細胞シート作製)

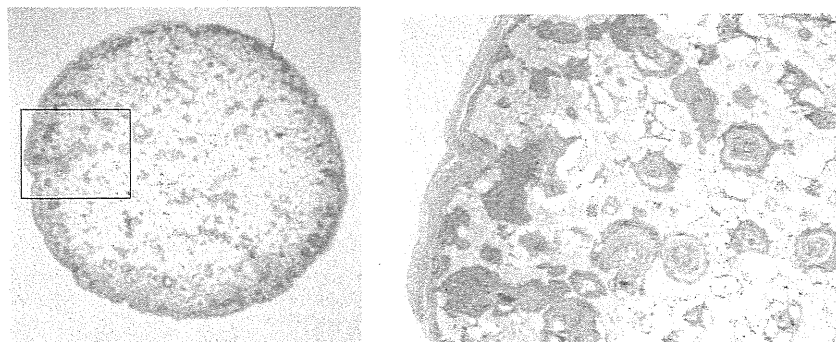


(Dex 100nMで細胞シート作製)

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 4 ヒト骨髄初期培養細胞を使用して作製したヒト骨形成細胞シートの注入型移植法による人工骨への骨形成の評価（組織像）

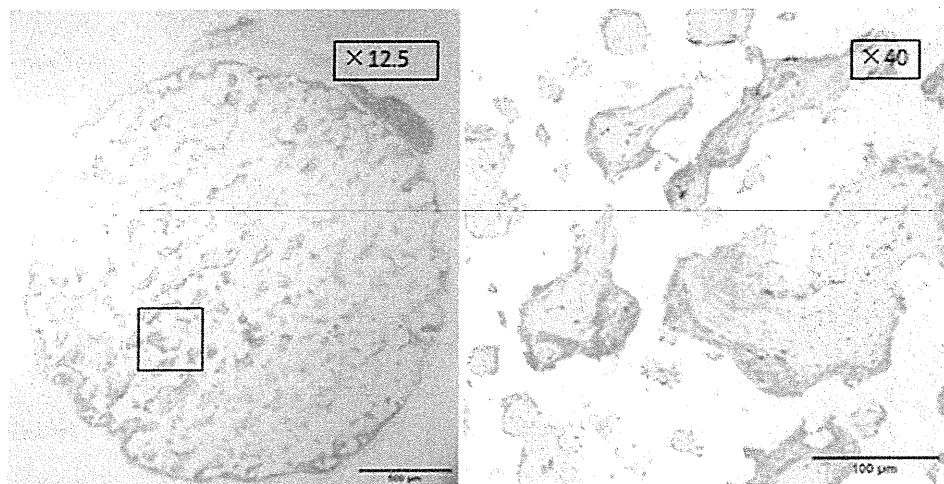
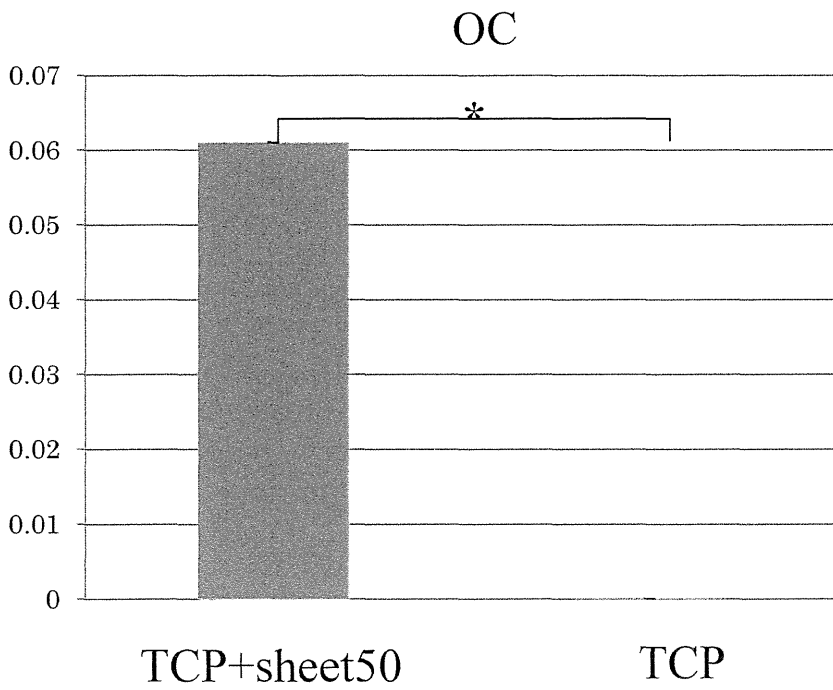
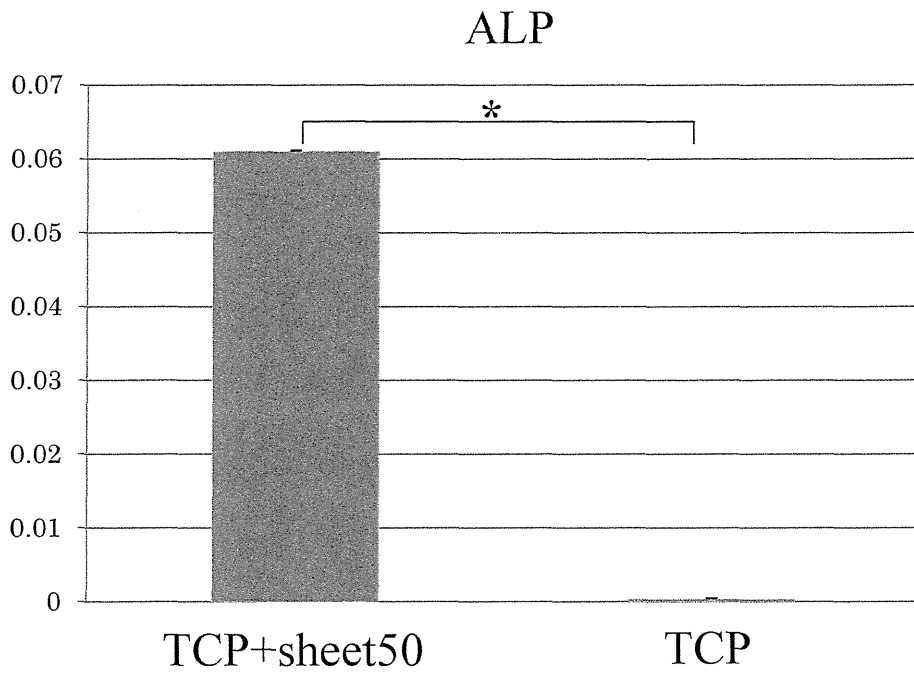
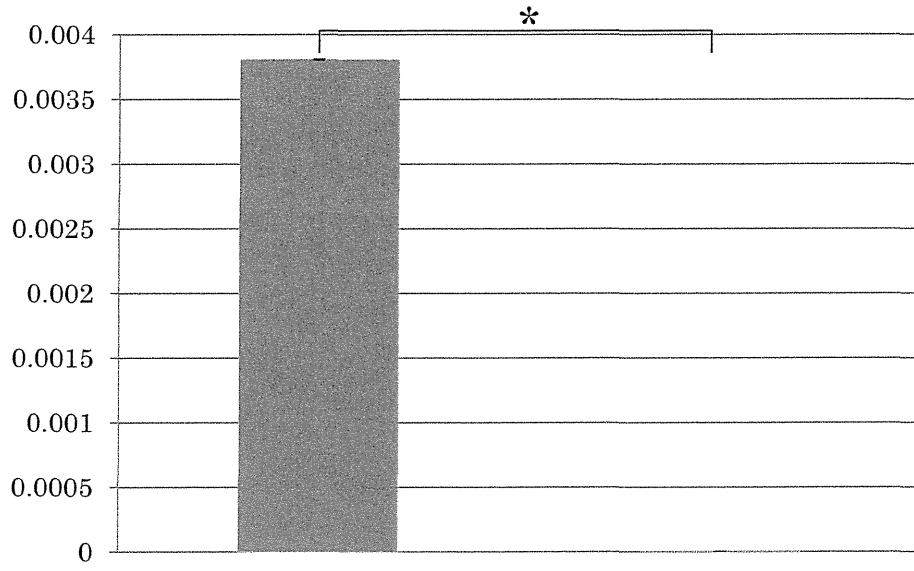


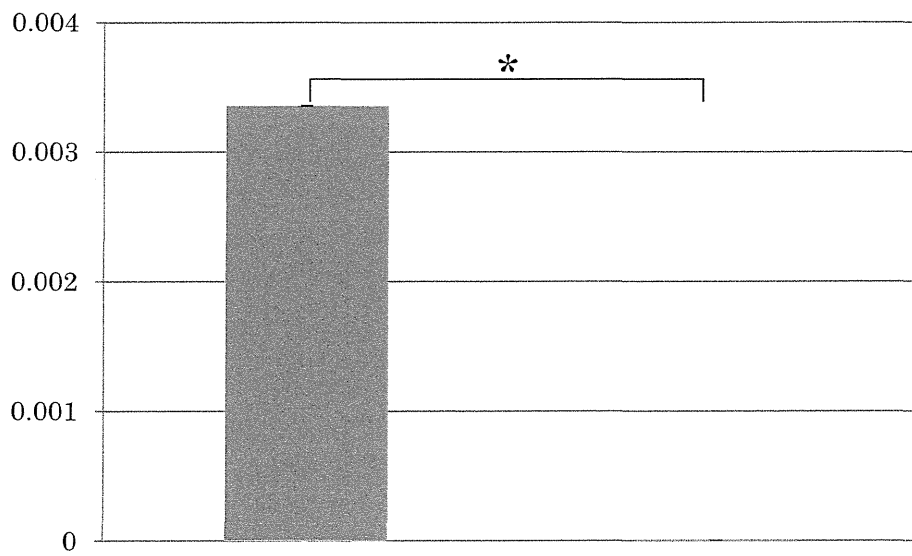
図5 注入型移植法による人工骨への骨形成の評価（生化学的）



### BMP2



### SP7



# Runx2

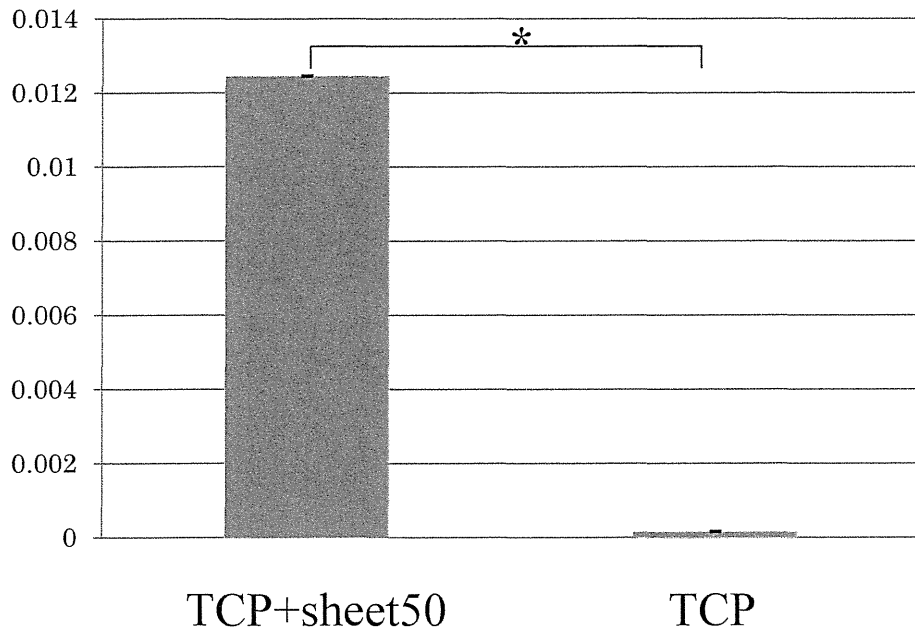




図6 注入型移植法によるヌードラット大腿骨偽関節部への骨形成能のレントゲン評価

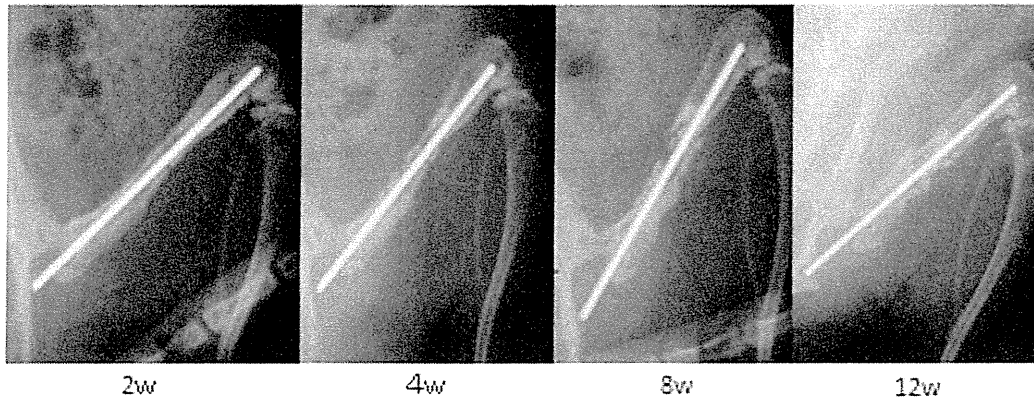
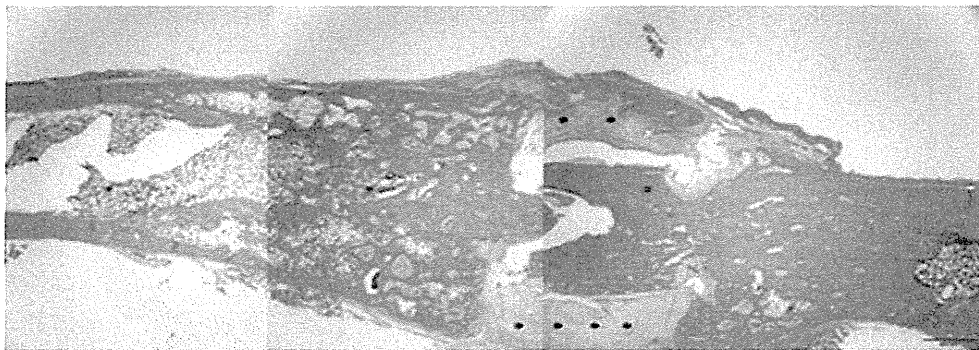


図7 注入型移植法によるヌードラット大腿骨偽関節部への骨形成能の組織学的評価



・ 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。 $\mu$ 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<sup>1,2</sup>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 (図 1)。

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. 3-3. 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

偽関節部の力学的強度が正常大腿骨と比べて低下している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 2 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。

健側の正常大腿骨の曲げ破壊時の最大曲げ荷重によって、健側 (正常大腿骨) 群と偽関節群とを比較した。

### B. 4. $\mu$ CT 撮影による偽関節の評価方法の検討

X 線  $\mu$ 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  $\mu$ 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、偽関節群と健側群を比較した。

X 線  $\mu$ CT 撮影の結果を加味することで作製したモデルが偽関節モデルであることが確認できる。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. 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 2 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

て、注入群とオープン群とを比較した。

## B. 6. 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. 7. 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髓細胞を扱うものではない。

## C. 研究結果

### C. 1. 偽関節モデルの $\mu$ CT撮影による評価結果

図3に偽関節群の $\mu$ CT画像を示す。偽関節モデルにおいては、術後12週においても骨切り部周囲の新生骨形成を認めず、骨切り部の骨癒合を認めなかった。

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 $\mu$ CT撮影による偽関節の評価結果

図4に注入群の $\mu$ 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. 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

図5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。健側群の最大曲げ荷重は $136.0 \pm 14.4$  Nであり、偽関節群の最大曲げ荷重は $71.1 \pm 21.2$  Nであった。また、偽関節の最大曲げ荷重は健側群の値と比べて有意に低かった ( $p < 0.01$ )。

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。

### C. 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

図6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 $0.64 \pm 0.36$  Nであり、注入群の最大曲げ荷重は $0.86 \pm 0.40$  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 $136.0 \pm 14.4$  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。

本研究の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

$\mu$ 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

$\mu$ 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 ヌードラットにおける偽関節モデルの作製

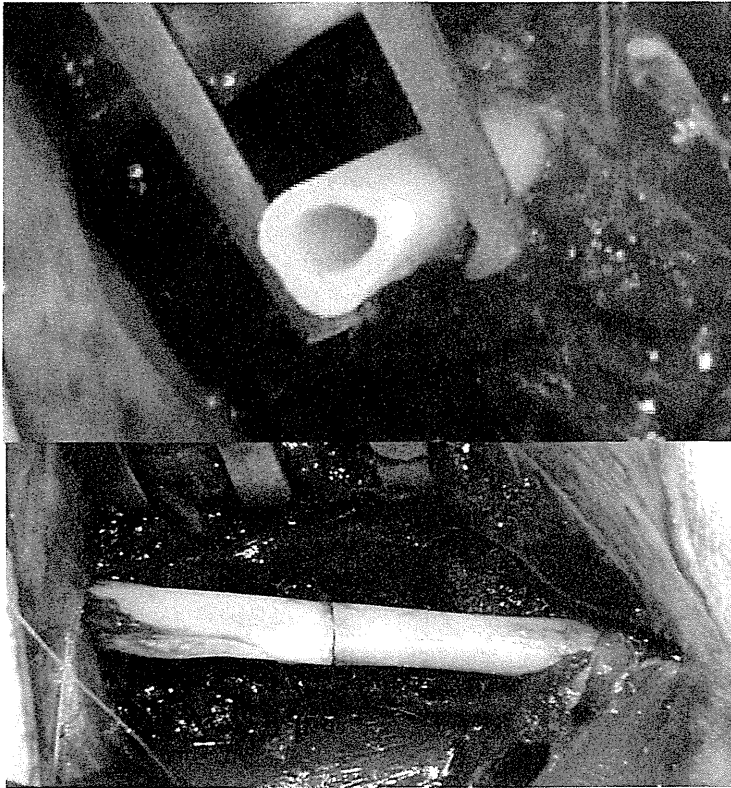


図2 専用ジグによる3点曲げ試験（力学的評価）

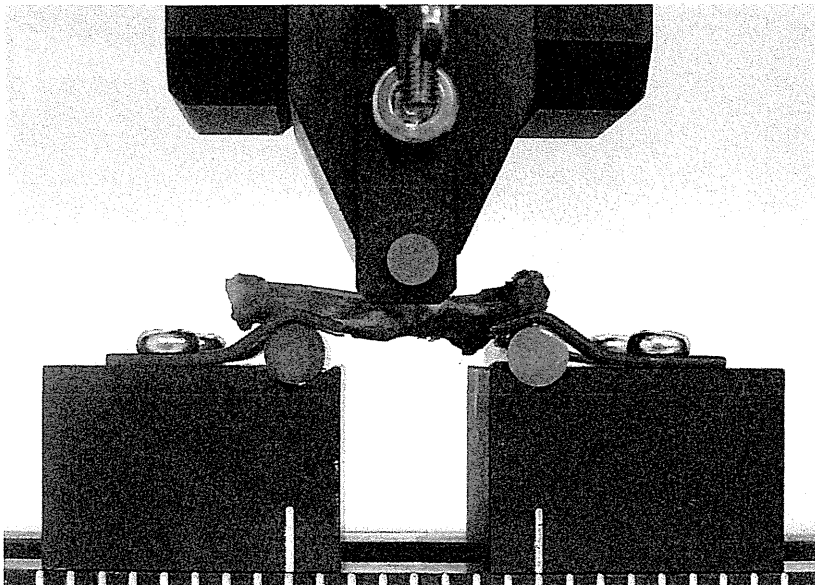


図3 偽関節群の $\mu$ CT画像



図4 注入群の $\mu$ CT画像



図5 3点曲げ試験の結果

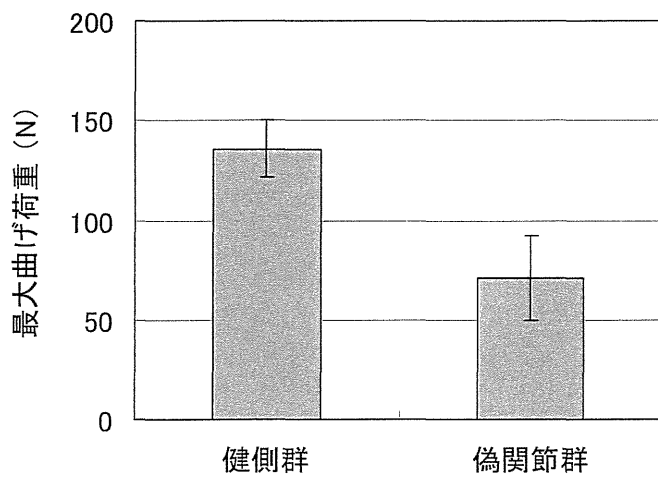
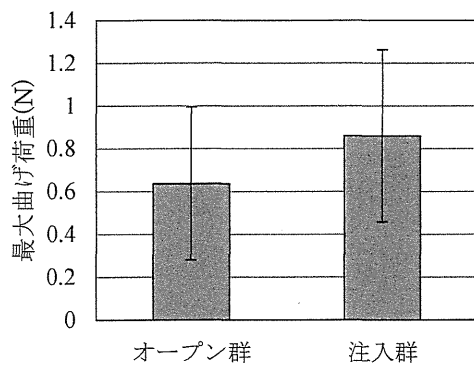


図6 3点曲げ試験の結果





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 ( $\beta$ -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) 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、 $\beta$ 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>1-3</sup>。

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15ml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。

$0.2 \times 10^4$ 細胞/cm<sup>2</sup>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>4,7</sup>。

## 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10cm培養ディッシュで、生化学的評価用の細胞シートは6cm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、組織学の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と、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。

$\beta$ -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 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<sup>4-10</sup>。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ディッシュでは 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