

**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**

ヒト骨髄間葉系幹細胞を用いた骨形成細胞シート作製の培養条件の検討

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 赤羽 学 奈良県立医科大学 健康政策医学講座 准教授

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

骨髄間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cells; MSCs) は、デキサメサゾン、アスコルビン酸、グリセロリン酸を添加した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。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、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、その骨形性能を検証してきた。本研究課題では、将来の臨床応用を見据えた研究として、ヒト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培養条件の検討を行った。

本研究では、2種類のヒト細胞を用いて研究を行った。一つは、市販のヒト骨髄間葉系幹細胞である Lonza 社のヒト骨髄間葉系幹細胞であり、もう一つは患者から同意のもとに提供を受けた骨髄細胞である。まず、Lonza 社のヒト骨髄間葉系幹細胞を用いて、ヒト細胞の培養に適した条件の検討を行い、その後骨形成細胞シート作製条件の検討を行った。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も十分骨形成が得られることが明らかとなった。細胞シート作製時に骨芽細胞へと分化を誘導するが、それに用いるデキサメサゾン濃度も従来動物実験で用いていた濃度よりも少ないもの（デキサメサゾン濃度：10nM）で骨形成マーカーであるオステオカルシン分泌量の増加が見られた。以上のことから、ヒト骨髄間葉系幹細胞を用いて硬組織再生を目指す際の細胞シート作製（骨芽細胞シート）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。

この条件で作製したヒト骨芽細胞シートを免疫不全動物（ヌードラット）に移植したところ、明らかな新生骨形成が見られた。今後はより大きな細胞シートを作製して細胞シート移植時に特徴的な骨形成パターンが見られるかの検討も必要であると考えられる。また、今回の検討では人工骨に組み合わせて生体に移植したが、偽関節部への骨芽細胞シートのみ移植（スキャフォールドフリーでの骨芽細胞シート移植）でも骨形成が得られるか、壊死骨と組み合わせた場合にも十分な新生骨形成が得られるかなどの検討も必要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、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。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、培養骨髄細胞と人工骨

を組み合わせた「培養人工骨」の作製方法を報告してきた^{4,5}。さらに、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、その骨形成能を検証してきた⁶⁻⁸。

H24 年度の本研究課題では、将来の臨床応用を見据えた研究として、ヒト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培養条件の検討を行った。

B . 研究方法

B . 1 . ヒト骨髄間葉系細胞

本研究では、2 種類のヒト細胞を用いて研究を行った。一つは、市販のヒト骨髄間葉系幹細胞である Lonza 社の細胞であり、もう一つは手術患者から同意のもとに提供を受けた骨髄細胞である。

本研究課題で用いた Lonza 社の市販ヒト骨髄細胞は、20 歳の女性の細胞であり、2010 年 8 月に凍結保存された細胞 (PT-2501、0F3853) である。

また患者から提供された細胞は、後で述べるような倫理的配慮を行い、奈良県立医科大学倫理委員会であらかじめ承認を得たうえで、患者に目的を説明し同意を得た方から手術中に採取した骨髄細胞である。

B . 2 . 細胞シート作製条件の検討 (*in vitro* での検討)

まず、Lonza のヒト骨髄間葉系幹細胞を用いて、ヒト細胞の培養に適した条件の検討を行った。その後、骨形成細胞シート作製条件の検討を行った。

動物モデルにおける細胞シート作製は、 1×10^4 細胞/cm² の細胞密度で播種した細胞を通常用いる培養ディッシュ (35mm ディッシュ; 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する。

本研究では、培養に用いるディッシュの種類やスクレーパーは動物実験と同じものを使用することとし、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 (10nM あるいは 100nM) をそれぞれの組み合わせで検討し、細胞シート作製に適した条件を見出すこととした ($n = 4$)。

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⁸。

B . 3 . 細胞シート作製条件の検討 (*in vivo* での検討)

In vitro で検討した 2 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 -リン酸 3 カルシウム -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、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。図 1 に実験条件の組み合わせを示す。

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た ($n = 4$)。ヌードラットは 7 週齢の雄を使用した。図 2 にヌードラットへの移植のモデル図を示す。

移植後 2 か月で標本を摘出し、組織学的および生化学的に骨形成量を評価した。

B . 4 . 細胞シートの骨形成能の評価 (*in vitro* での検討)

本研究における細胞シート移植の目的は硬組織再生であるため、骨形性能が高いことが目的にかなうものであると考え、*in vitro* でそれぞれの培養条件で作製した骨芽細胞シートの骨形性能を評価した。

骨形成マーカーであるアルカリフォスファターゼ (ALP) とオステオカルシンの mRNA 発現をリアルタイム PCR で定量し、さらに培養液中の分泌オステオカルシンの定量を行った。

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 : Rn00564931 m1, OC : Rn01455285 g1, GAPDH : Rn99999916 s1)。

分泌オステオカルシンの定量は、ELISA キット (Rat Osteocalcin ELISA Kit DS; DS Pharma Biomedical Co., Ltd) を使用して定量した。

B . 5 . 移植標本の骨形性能の評価

移植後 2 か月で標本を摘出し、組織学的および生化学的に骨形成量を評価した。

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、アルカリフォスファターゼ (ALP) 活性の測定とオステオカルシン含有量の測定を行った。

B . 6 . 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、

ANOVA テストを行い、その後の検定を Bonferoni で実施し各群の比較を行った。p < 0.05 で統計学的有意差の検定を行った。

B . 7 . 倫理面での配慮

本研究では、2 種類のヒト骨髄細胞を用いた研究を行った。一つは市販されているヒト骨髄間葉系幹細胞であるが、もう一つは手術患者から提供を受けた骨髄細胞である。

患者から提供を受けるヒト細胞を用いた研究に関しては、本学の倫理委員会に申請し承認をうけた後に行った。研究に協力していただく方々に骨髄細胞採取方法やその合併症などについての十分な説明を行い、理解していただいた上での書面による同意を得ており (インフォームドコンセント)、協力者の人権や個人情報の取り扱いおよび提供していただいた細胞を扱う上での生命倫理には十分に慎重に配慮した。

なお本研究課題では、作製した骨形成細胞シートはヌードラットに移植してその骨形成能を評価するため、骨髄細胞の提供に協力していただいた患者自身に何らかの健康被害をもたらすことはない。

C . 研究結果

C . 1 . *in vitro* での細胞シート作製条件の検討結果

図 3 にヒト骨髄間葉系幹細胞を用いて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スキャフォールドフリーで移植することも可能である。

図 4 に、*in vitro* でのそれぞれの培養条件下で測定された分泌オステオカルシンの経時的結果を示す。デキサメサゾン濃度を 10nM と 100nM を比較する

と、デキサメサゾン 10nMの方が100nMよりもオステオカルシン分泌量が多い。通常の骨分化誘導を行った群(デキサメサゾン、アスコルビン酸、グリセロリン酸添加培地での培養)とほぼ同等量のオステオカルシンが測定されていた。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、オステオカルシンの増加する傾向はほぼ同じであった。

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5に、移植後2カ月で摘出したサンプルの組織像を示す。*In vitro*で細胞播種密度を $0.5 \times 10^4 \text{cell/cm}^2$ とすると選択していたので、デキサメサゾン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。

C. 3. 細胞シートの骨形成能の生化学的検討結果

図6に移植後2カ月で摘出したサンプルのアルカリフォスファターゼ(ALP)活性の測定とオステオカルシン含有量測定結果を示す。

-TCPのみを移植した対照群に比べて、デキサメサゾン濃度を10nMと100nMで作製した骨形成細胞シートを組み合わせた-TCPのアルカリフォスファターゼ活性値は統計学的に有意に高かった。このことから両群で複合体内に骨形成が認められていると考えられた。しかし、デキサメサゾン濃度を10nMで作製した骨形成細胞シートを-TCPに組み合わせた群のほうが、デキサメサゾン濃度100nMで作製したシート群に比べてアルカリフォスファターゼ活性値は高かった。

オステオカルシン含有量も、アルカリフォスファターゼ活性値と同様の傾向を示したが、デキサメサゾン濃度を10nMと100nMの比較では、その差はさらに大きくなっていた。

D. 培養条件の検討結果

D. 1. 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

以上のことから、ヒト骨髄間葉系幹細胞を用いて硬組織再生を目指す際の細胞シート作製(骨形成細胞シート)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。

患者から同意のもとに提供された骨髄細胞を用いた研究でもLonza社の細胞を使用した場合とほぼ同様の結果が得られた。

E. 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、その骨形成能を報告してきた⁶⁻⁸。培養細胞の浮遊液を人工骨に組み合わせた「培養人工骨」は、生体に移植すると4週間には人工骨気孔内に新生骨形成が見られる。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る。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⁷。

今回、本研究で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又

ドラットに移植したところ、明らかな骨形成が人工骨内に認められた。我々はこれまでにヒト骨髄間葉系幹細胞の浮遊液を人工骨に組み合わせて免疫不全動物に移植し骨形成を評価したことがあるが、その標本に比べても骨形成量は多い印象であった。これは細胞シートを組み合わせたことが浮遊液を組み合わせたことよりもより多くの細胞を人工骨に搭載できることによると考えられる。

しかし、本研究で得られた組織像では人工骨気孔内の骨形成所見だけであり、人工骨表面での骨形成は見られなかった。これは、本研究では100mmディッシュを用いて作製した骨形成細胞シート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

今後、人工骨に搭載する細胞量を増やすことで、従来の骨形成細胞シート移植後の骨形成の特徴がみられるかの検討は必要であると考えられる。あるいは、複数の顆粒状人工骨をヒト骨芽細胞シートで包み込むようなモデルで人工骨間を骨性に架橋できるかを評価するモデルも検討する。

しかし、通常よりも少ない細胞数でも十分な骨形成が見られたことは、硬組織再生における骨形成細胞シートの有用性を示すものであるとも言える。

次年度は、100mmディッシュも使用し、これまでの動物実験で得られていた特徴的な骨形成がヒト骨形成細胞シートでも起こるかの検討は必要であると考えられる。さらに、一般的な細胞シートの作製方法である温度応答性培養ディッシュを使用して、本研究で得られた結果と同様の結果が得られるかの検討は今後必要であろうと考える。我々が用いた細胞シート作製法はスクレーパーを使用する機械的な採取方法

であるため、採取時の細胞に対するダメージがあることも懸念される。温度応答性ディッシュを使用する場合でも、培養中に骨芽細胞への分化を誘導するステップは重要であろうと推測する。つまり、機械的に細胞シートを採取するか温度応答性ディッシュを利用して採取するかだけでなく、ヒト骨髄間葉系幹細胞を分化させずに細胞シートを作るか分化誘導を行う培養条件で細胞シートを作製するかが非常に重要であろうと考える。この点は、今後検討を要する点である。

また、今回の検討では人工骨に組み合わせて生体に移植したが、偽関節部への骨形成細胞シートのための移植でも骨形成が得られるか、壊死骨と組み合わせた場合にも十分な新生骨形成が得られるかなどの検討も必要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

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 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13-14日 パシフィコ横浜

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. 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.
2. 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.
 3. 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.
 4. Kawate K, Yajima H, Ohgushi H, et al. Tissue-engineered approach for the treatment of steroid-induced osteonecrosis of the femoral head: transplantation of autologous mesenchymal stem cells cultured with β -tricalcium phosphate ceramics and free vascularized fibula. *Artif Organs* 30: 960-962, 2006.
 5. 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.
 6. 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.
 7. 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.
 8. 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

図1 培養条件の検討の組み合わせ

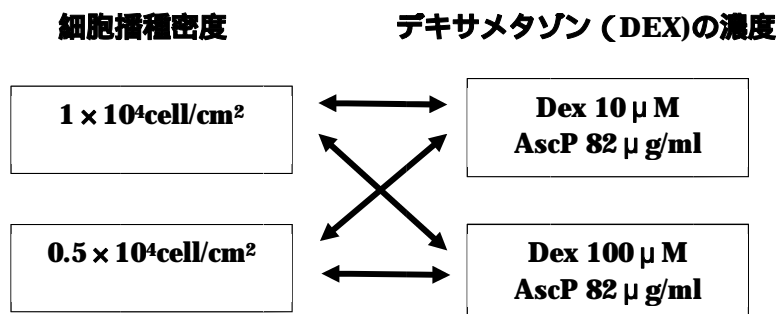


図2 ノードラットへの移植実験のイメージ図

-TCP (PENTAX)にヒト細胞シートをラップし7週齢ノードラット背部皮下へ移植

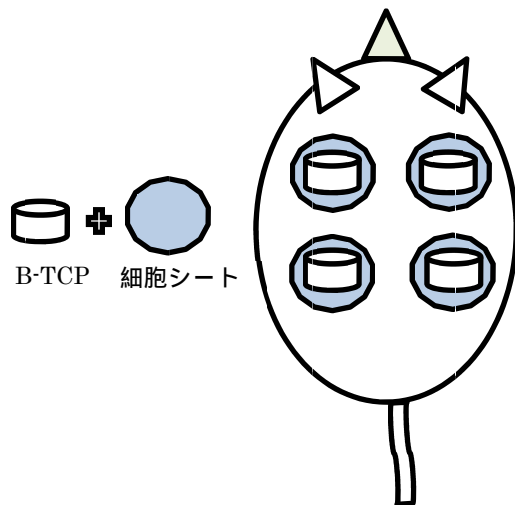


図3 ヒト骨髄間葉系幹細胞から作製したヒト骨形成細胞シート

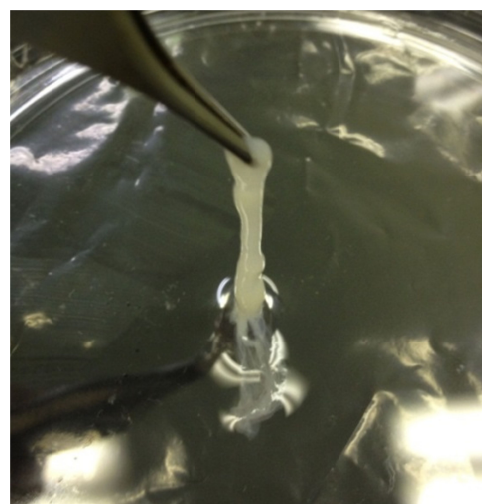
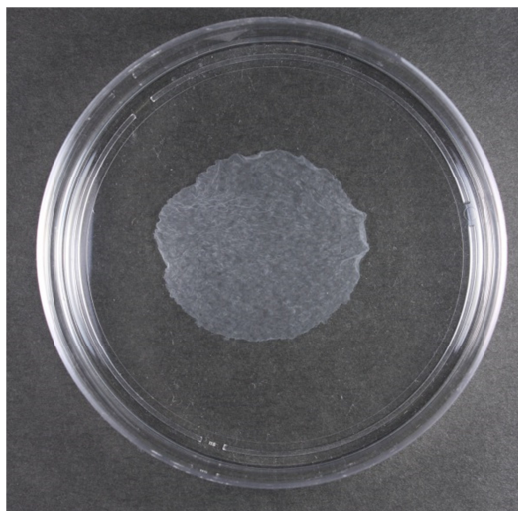
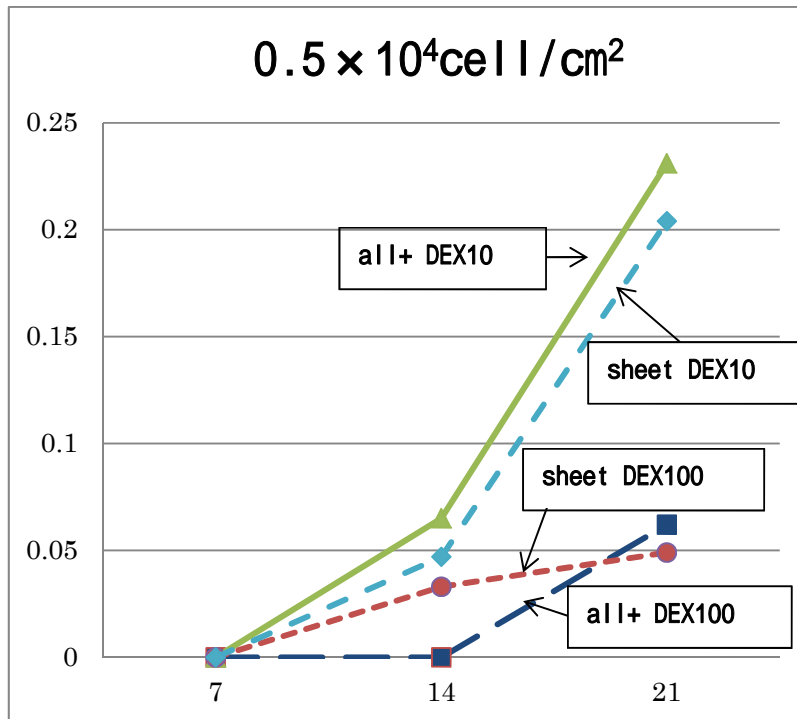
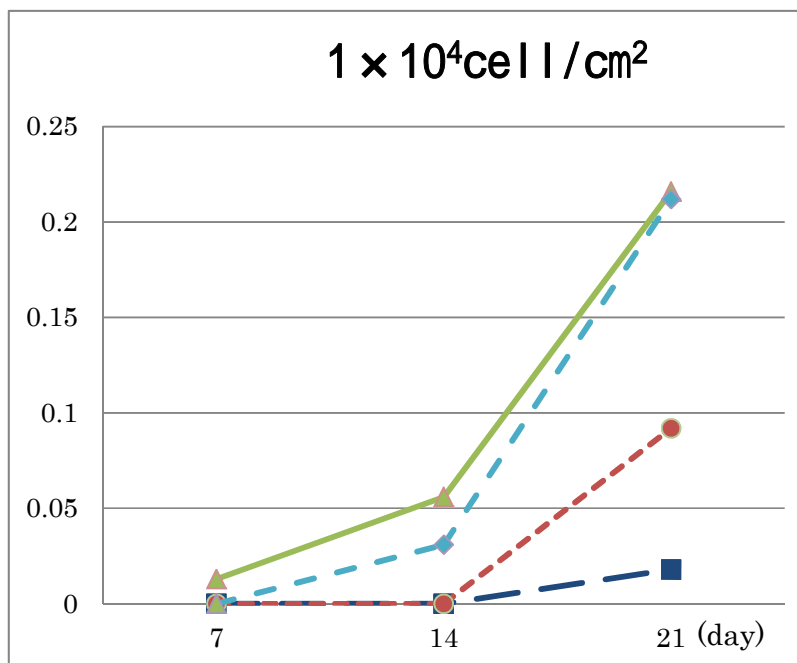


図4 分泌オステオカルシン量の経時的変化 (*In vitro*)

A. 低細胞密度での播種



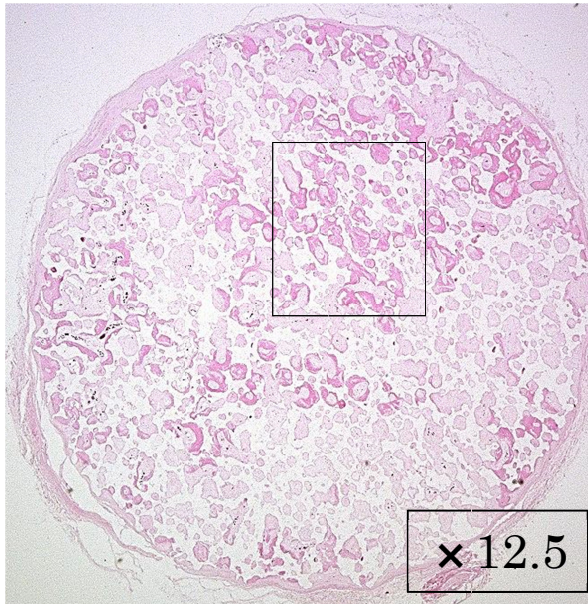
B. 高細胞密度での播種



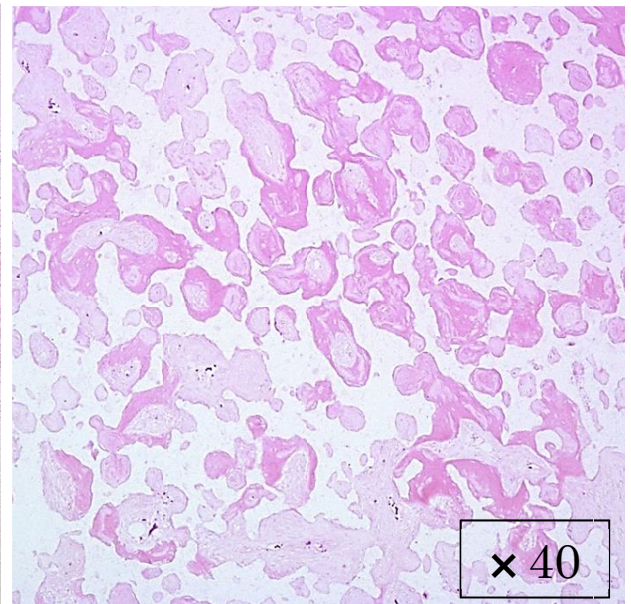
all+ : DEX+ AscP+ GP、
 sheet: DEX+ AscP (骨芽細胞シート)
 DEX10: デキサメサゾン 10 μM、
 DEX 100 : デキサメサゾン 100 μM

図5 生体内での細胞シートの骨形成能の検討結果（組織像）

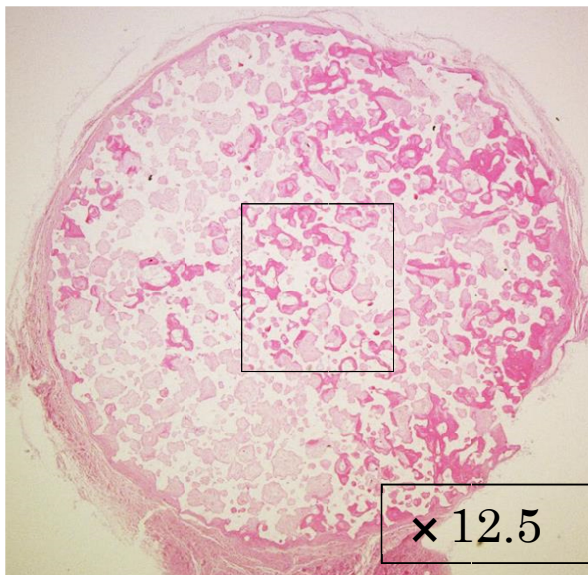
A. デキサメサゾン：10nM



B. 左図の枠内の拡大写真



C. デキサメサゾン：100nM



D. 左図の枠内の拡大写真

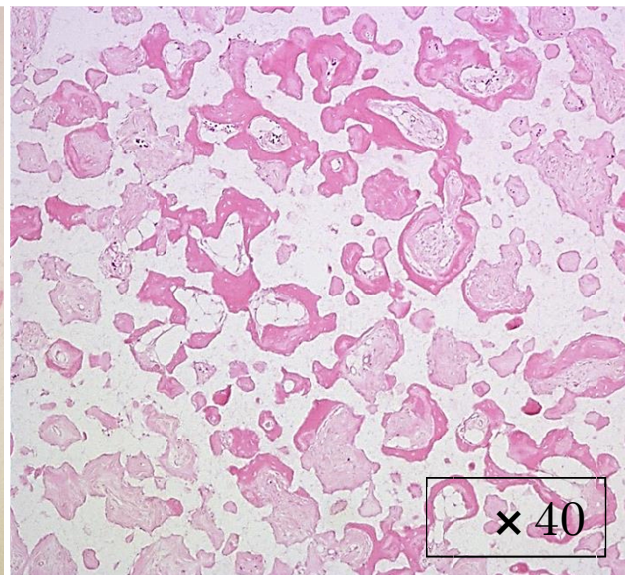
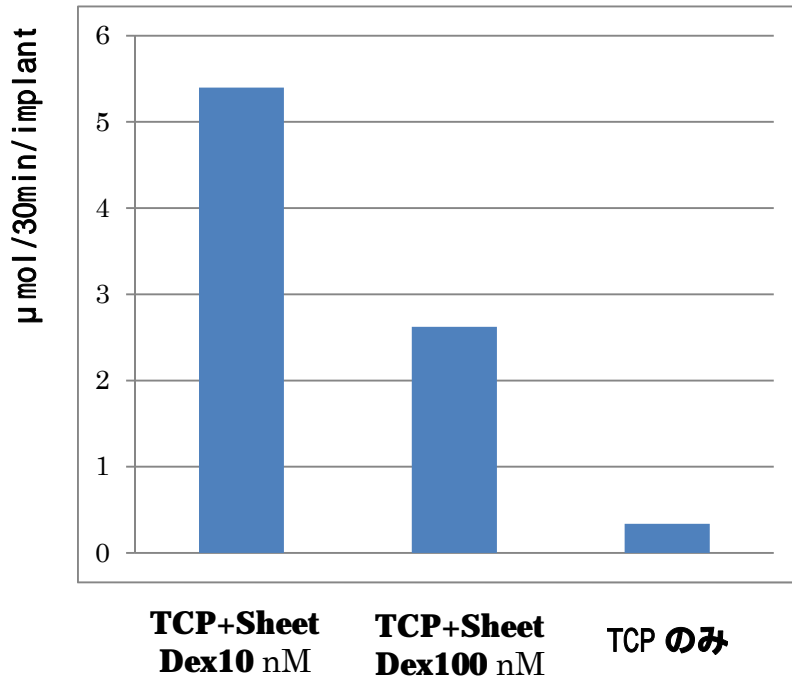


図6 生体内での細胞シートの骨形成能の検討結果（生化学的評価）

A. アルカリフォスファターゼ活性



B. オステオカルシン含有量

