

分担研究報告書

ヒト骨髄初期培養細胞を用いた細胞シート作製条件の追加検討

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

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、その骨形成能を検証してきた。平成 24 年度に市販のヒト MSC (Lonza 社) を使用して、効率よく細胞シートを作製する条件を検討すると同時に、患者から提供された骨髄細胞でも細胞シートが作製できることを確認した。本研究では、引き続き患者から提供された骨髄細胞で安定して骨形成細胞シートができるか、さらに細かい条件設定で検証をおこなった。

播種する細胞密度の検討では、昨年度と同様に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な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は高い濃度であるほど骨形成マーカーの分泌量の増加が見られた。細胞外基質はデキサメサゾンの濃度が低い方が高値であった。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 (ヒト骨形成細胞シート) 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: 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。

この条件で作製したヒト骨形成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。

A . 研究目的

骨髄間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cells; MSCs) は多分化能を有し、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¹⁻⁴。

我々はこれまでに、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、その骨形成能を検討してきた⁵⁻⁹。

当該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、患者から提供された骨髄細胞を用いて、骨形成細胞シートを作製する培養条件の検討を

詳細に追加して行った。

B . 研究方法

B . 1 . ヒト骨髄細胞

本研究では、手術患者から同意のもとに提供を受けた骨髄細胞を用いて研究をおこなった。

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、ヒト細胞の培養に適した条件の検討を行った。その後、細胞シート作製条件の検討を行った。本研究で使用したヒト骨髄細胞は27歳女性の腸骨より採取した骨髄細胞である。

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骨形成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を10・30・50・100nM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⁶。

図1に実験条件の組み合わせを示す。

B . 3 .細胞シート作製条件の検討(*in vivo* での検討)

骨形成細胞シートは、*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10・30・50・100nMの4種類で作製した。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 -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。

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。

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、骨形成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形成細胞シートの骨形成能を評価した。

骨形成マーカーであるアルカリフォスファターゼ(ALP)・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。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)。

細胞外基質の評価(collagen type1・laminin)を行うためそれぞれの培養条件で培養した細胞からタンパク抽出を行い、電気泳動後western blottingをおこなった。

B . 5 .移植標本の骨形成能の評価

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

B . 6 . 倫理面での配慮

本研究では、手術患者から同意を得て提供を受けた骨髄細胞で研究をおこなった。

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 Consent) 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 2 に、*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・Runx2 の mRNA 量の結果を示す。ALP・BMP2・SP7・Runx2 の発現はデキサ

メタ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: デキサメタゾン、アスコルビン酸、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 1×10^4 cell/cm² と 0.5×10^4 cell/cm² 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 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 50 nM の方が高かった (図 3)。

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かったため、ハンドリングが容易であろうと推測できた。

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 4 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 0.5×10^4 cell/cm² とすると選択していたので、デキサメタゾン濃度による骨形成の差を比較した。組織像からは 10 nM では一部のみ人工骨内に骨形成を認めたが、デキサメタゾン濃度が高い方が人工骨内に良好な骨形成が認められた。

C . 3 . 細胞シートの骨形成能の生化学的検討結果

図 5 に移植後 2 カ月で摘出したサンプルの ALP・オステオカルシン・BMP2・SP7・Runx2 の mRNA 発現量の結果を示す。

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 mRNA 発現量は高かった。このことから β -TCP・骨形成細胞シート群で複合体内に骨形成が認められていると考えられた。mRNA 発現量は濃度が高

いデキサメタゾンで作製したシートとの組み合わせの方が高い傾向であった。BMP2 と Runx2 はデキサメタゾン濃度を 50nM と 100nM で作製した細胞シートは 10nM・30nM で作製した細胞シートより有意に高値であった。

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

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。

過年度に行った培養条件の検討と異なるヒト細胞を用いて実験を行ったが、培養条件としては同様であった。

E . 考察

平成 24 年度は市販の骨髄間葉系幹細胞を用いて骨形成細胞シート作製の培養条件の検討をおこなったところ、ラットなどの実験動物や市販の骨髄間葉系幹細胞の条件と異なることが判明した。今年度はより臨床に近い形での詳細な検討を行うために、患者から同意を得て採取した骨髄細胞を用いて細胞シートを作る条件を再度詳細に検討したところ、ヒト骨髄細胞から骨形成細胞シートを作るために好ましいと考えられる培養条件は平成 24 年度に得られた結果と異なり、細胞播種密度を $0.5 \times 10^4 \text{cell/cm}^2$ 、デキサメタゾン濃度を 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判明した。

今回の検討ではデキサメタゾン濃度を 4 つの条件で設定し骨形成能をリアルタイム PCR 法で検討すると、*In vitro*

ではデキサメタゾン濃度を高くすれば骨形成能は高くなることが判明した。また細胞外基質の評価として western blotting 法を用いて確認したところ、デキサメタゾン濃度を 100nM とすると laminin が他の条件と比較して低値となった。実際、デキサメタゾン濃度を 100nM で細胞シートを作製しスクレーパーで培養皿周囲からはがす時に比較的容易に破れてしまい、その取扱いが難しかった。

細胞播種密度は $0.5 \times 10^4 \text{cell/cm}^2$ と $1.0 \times 10^4 \text{cell/cm}^2$ で比較すると骨形成能に大きな差は認めなかったため、より少ない細胞数で培養可能な $0.5 \times 10^4 \text{cell/cm}^2$ の細胞密度での播種が良いと判断した。

細胞播種密度を $0.5 \times 10^4 \text{cell/cm}^2$ として 4 つのデキサメタゾン濃度で作製した細胞シートと人工骨を組み合わせヌードラット皮下へ移植したところ、生体内でも生体外 (*In vitro*) と同様の傾向を示しデキサメタゾン濃度が高い方が骨形成能は高い値を示した。細胞シートのハンドリングのしやすさはデキサメタゾン濃度が 50nM 以下では容易に破れることはなく取扱いが容易であるため、骨形成能を考慮し最終的にデキサメタゾン濃度を 50nM と決定した。

昨年度の実験ではデキサメタゾン濃度を 10nM と 100nM の 2 条件だけであったので、今年度は条件をさらに細かく設定した。また市販の細胞は純粋な骨髄間葉系幹細胞であるが、患者から採取した細胞は骨髄細胞であり、細胞の中には様々な分化した細胞が存在していると考えられ、これらも条件決定に影響を与えた可能性がある。

患者から採取した骨髄細胞から間葉系幹細胞を抽出し培養をおこなう方が良いかは議論のあるところだが、今回使用した実験モデルはより実際の臨床にそくしたものであると思われる。

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

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. 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. 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 -tricalcium phosphate ceramics and free vascularized fibula. Artif Organs 30: 960-962, 2006.

3. 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.
4. 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
5. 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.
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. 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. 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, 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 培養条件の検討の組み合わせ

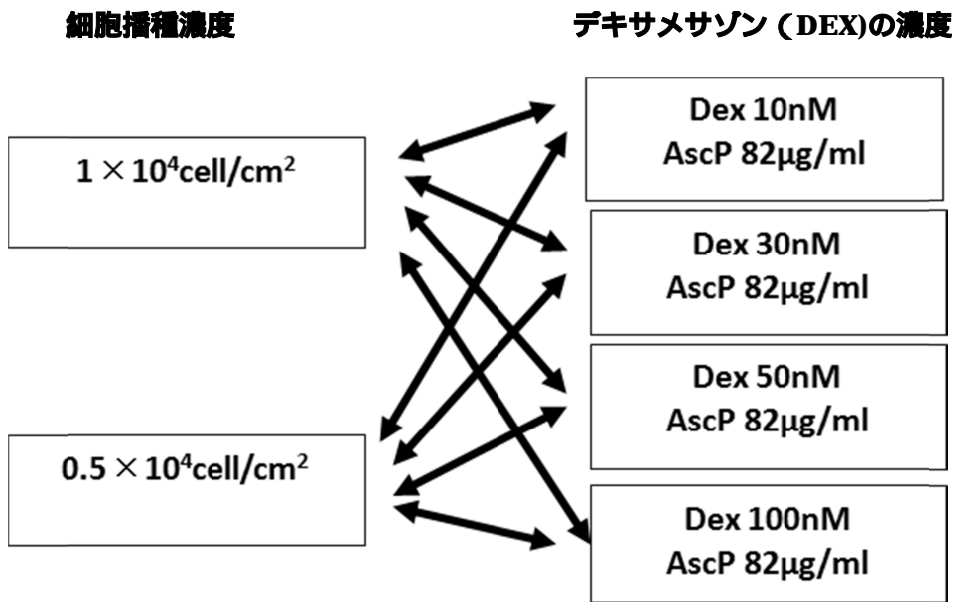
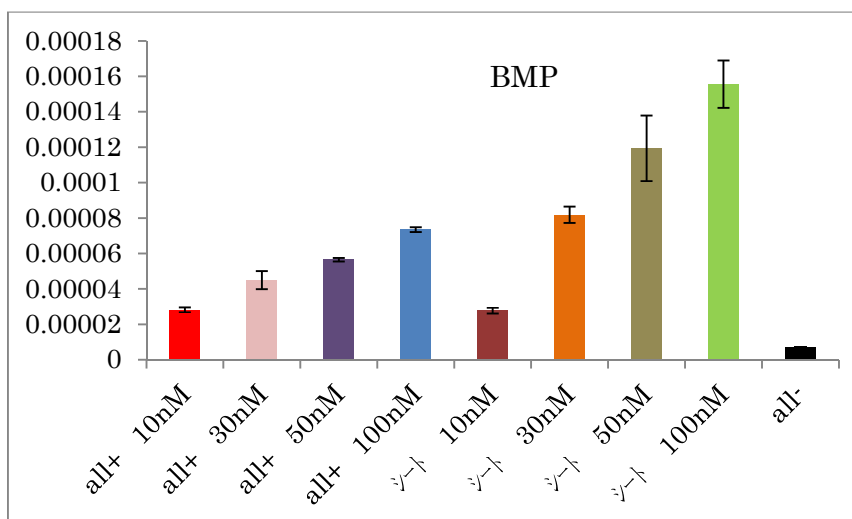
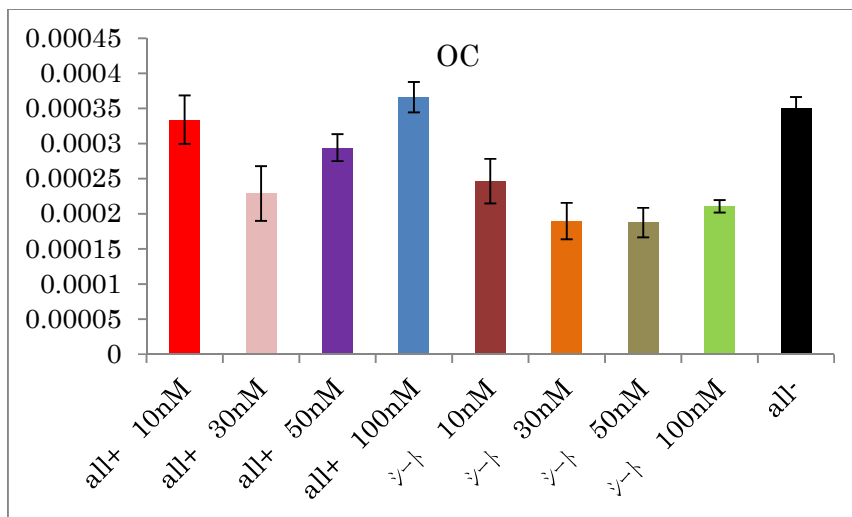
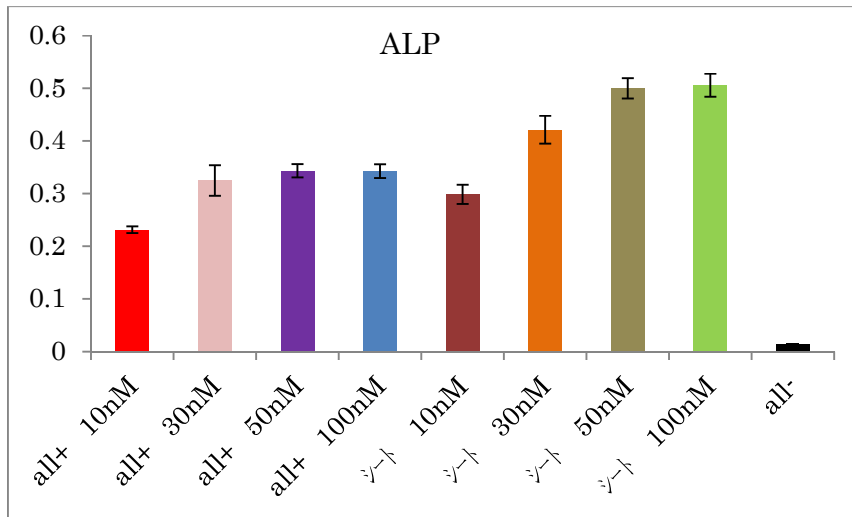
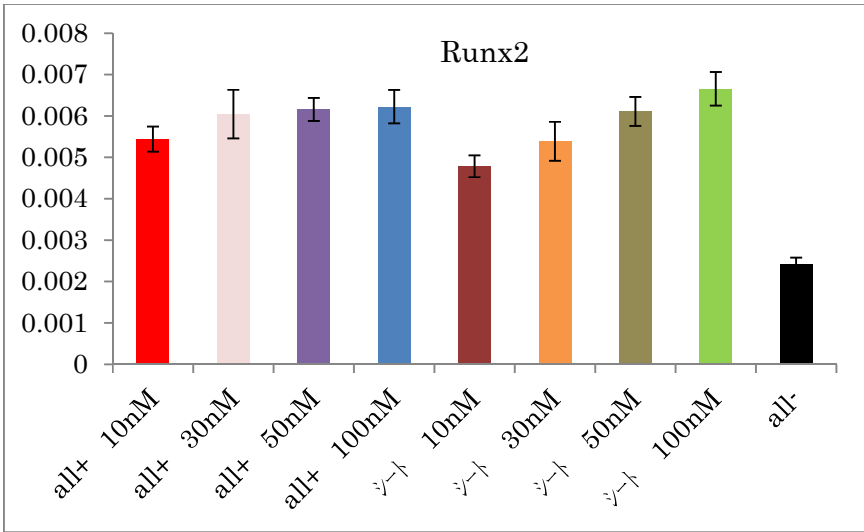
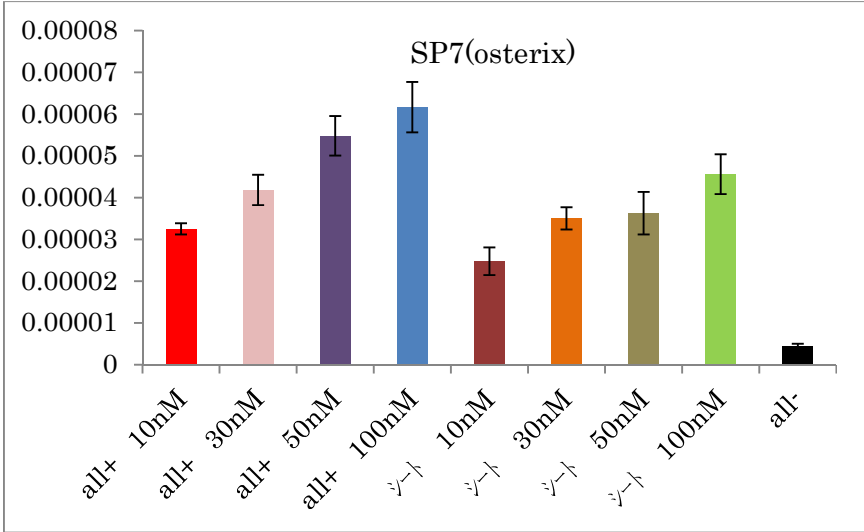


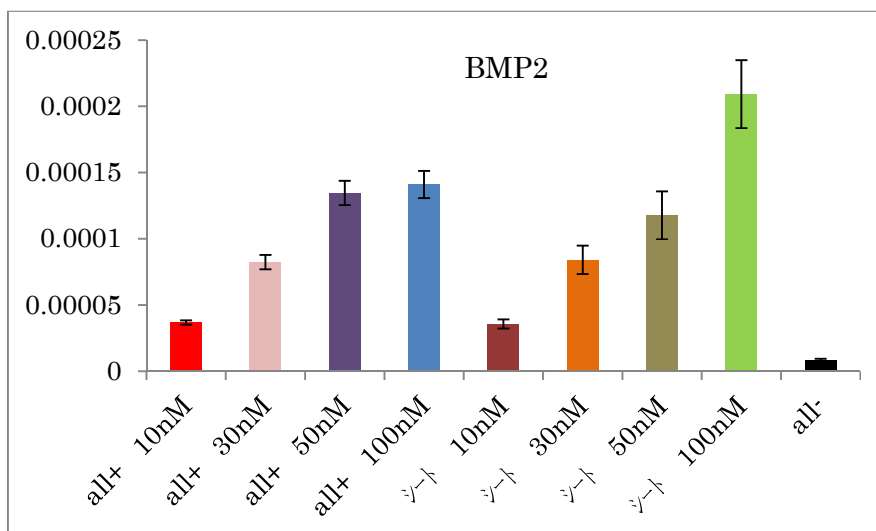
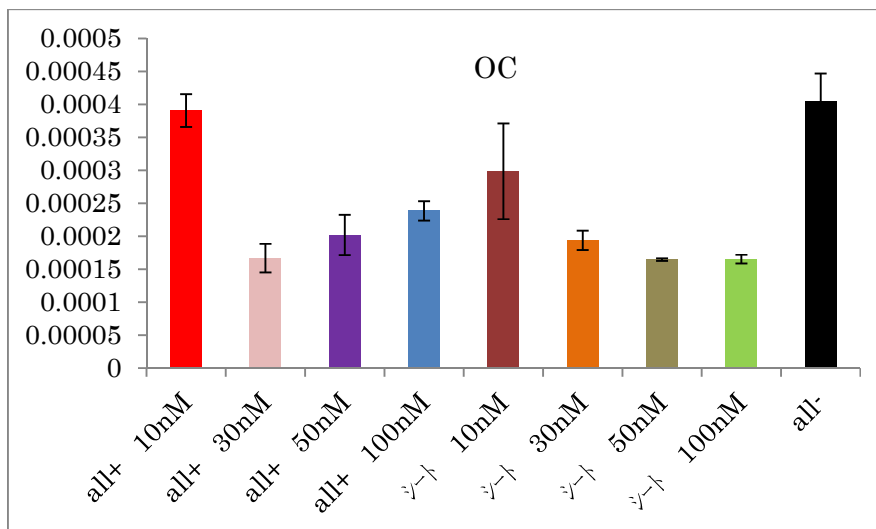
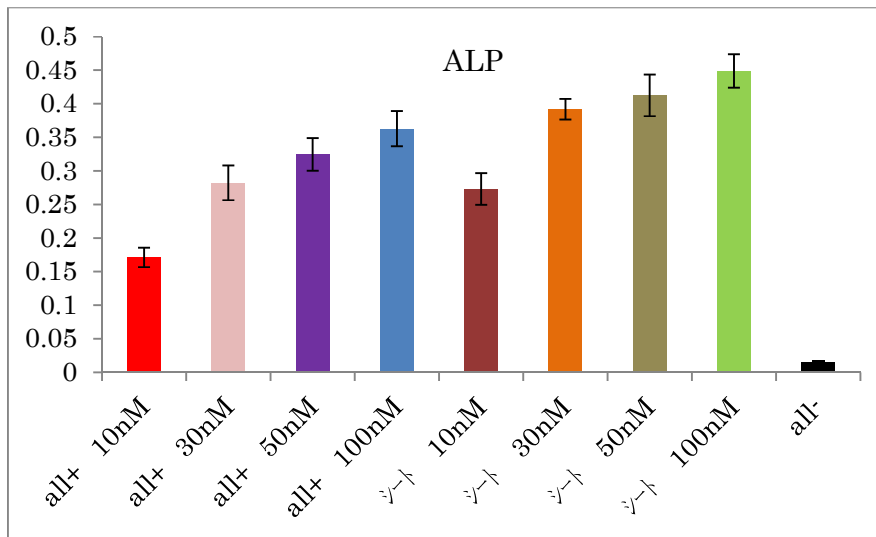
図2 骨形成マーカーの遺伝子発現量 (In vitro)

● 細胞播種濃度 $0.5 \times 10^4 \text{cell/cm}^2$ (n=4)





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



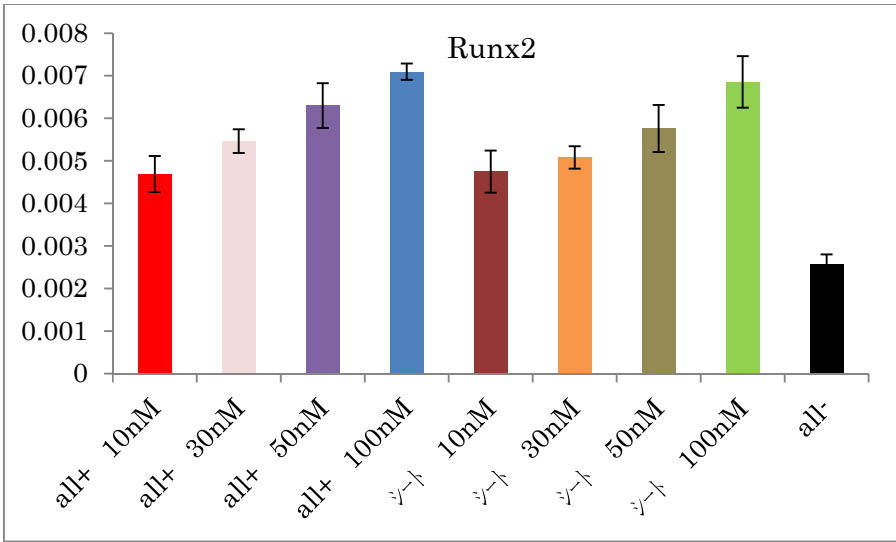
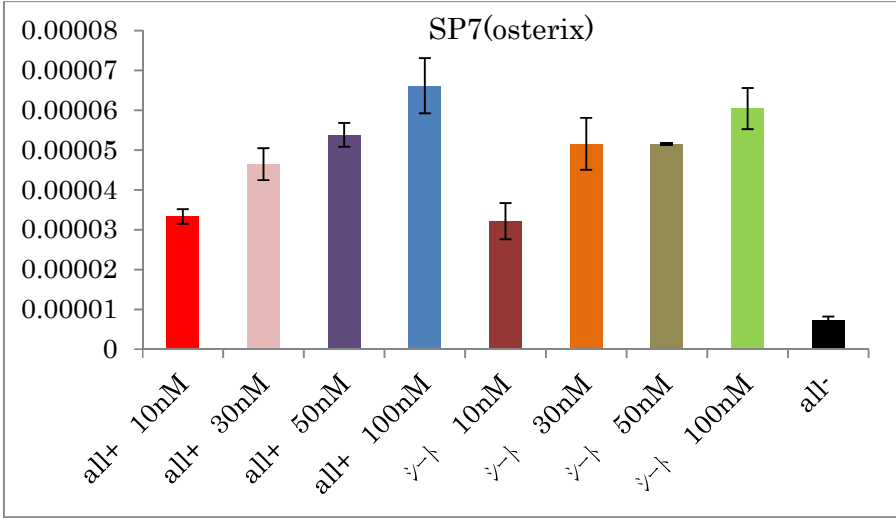
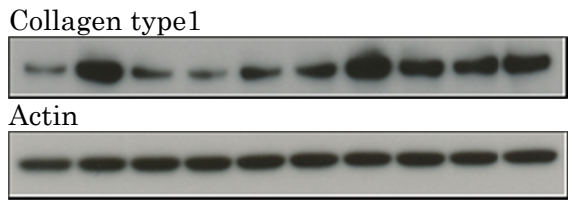
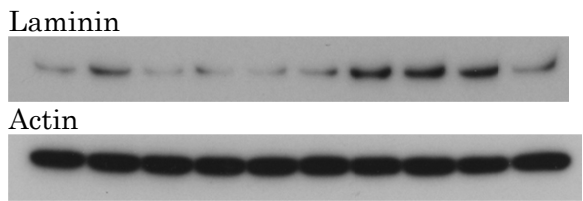
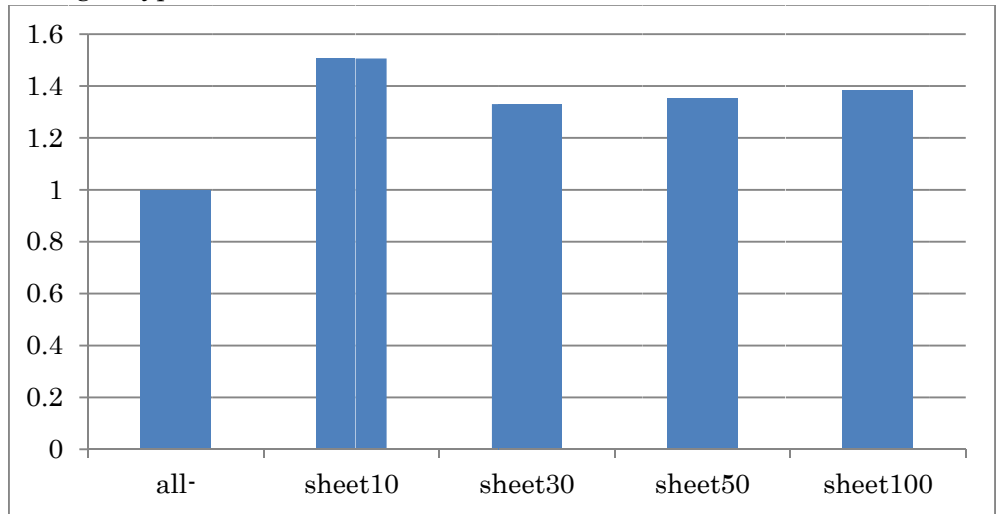


図3 細胞外基質の発現量の評価 (Western blotting)



Collagen type 1 発現量 (actin で補正)



Laminin 発現量 (actin で補正)

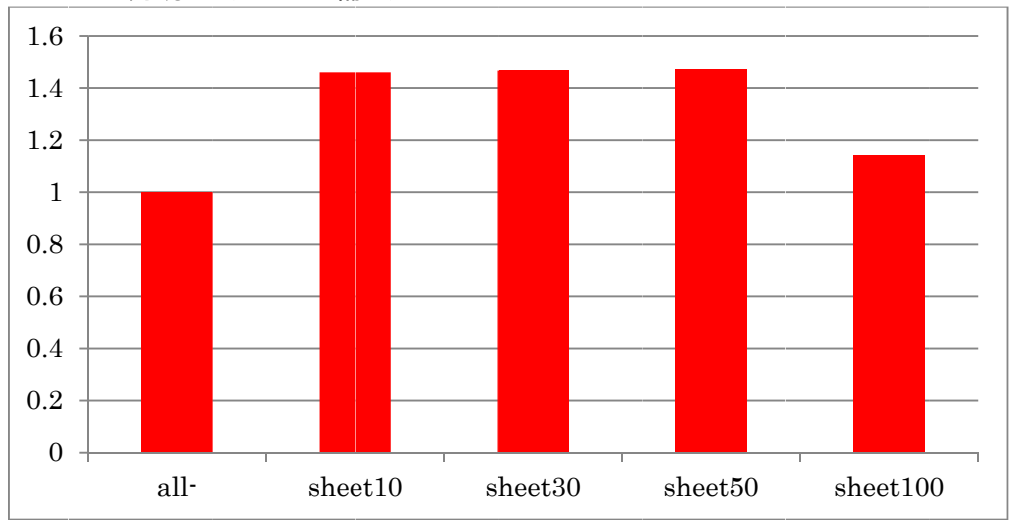
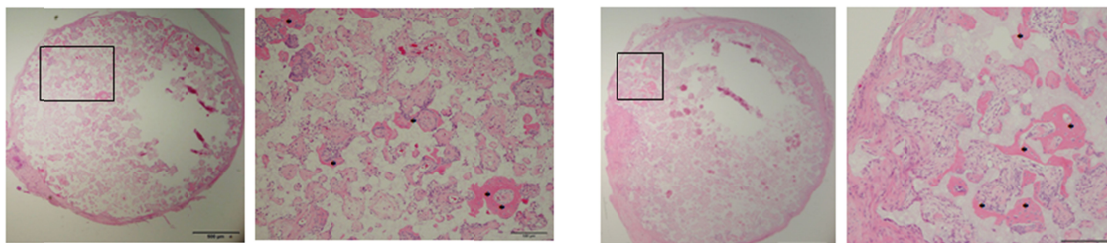


図4 生体内での細胞シートの骨形成能の検討結果（組織像）

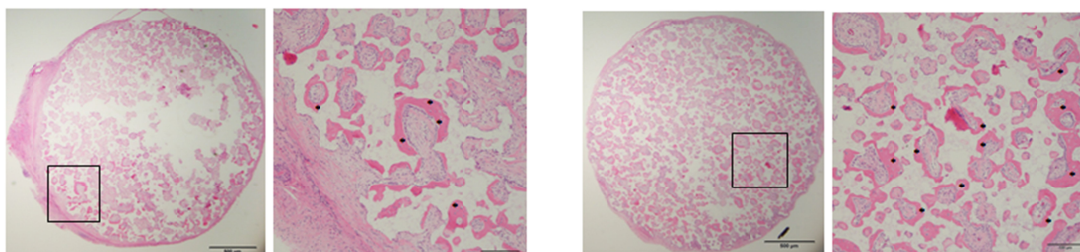
Dex:10nM

Dex:30nM



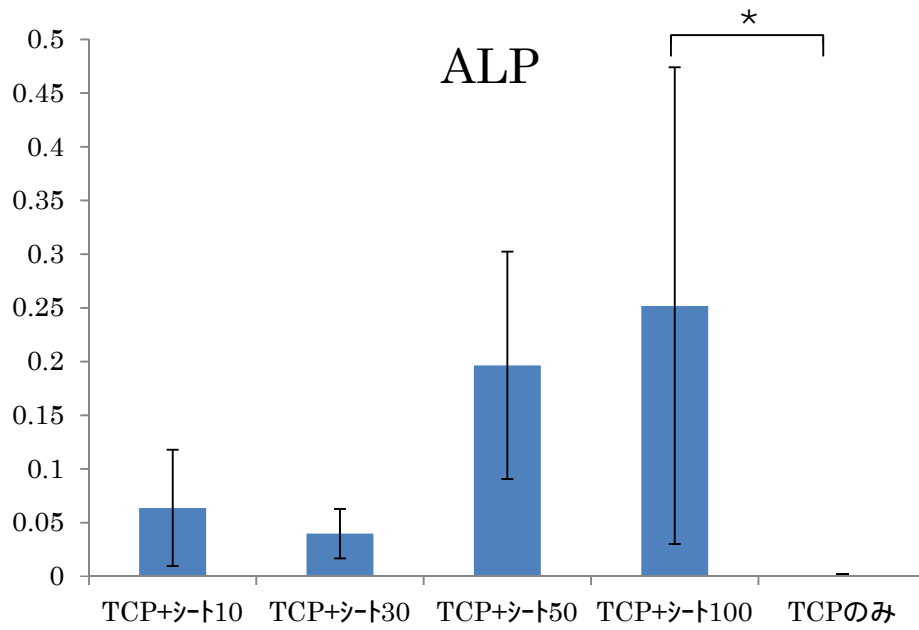
Dex:50nM

Dex:100nM

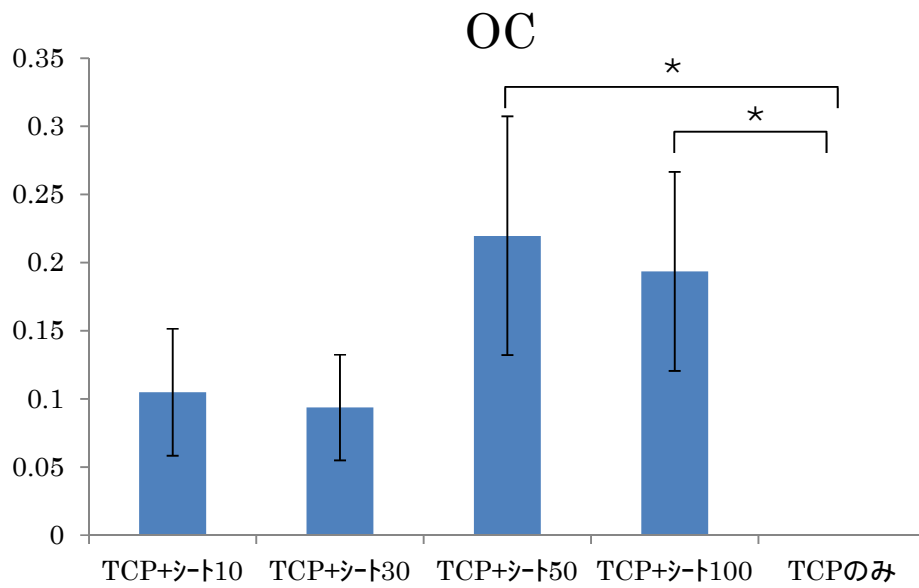


Dex: デキサメサゾン濃度

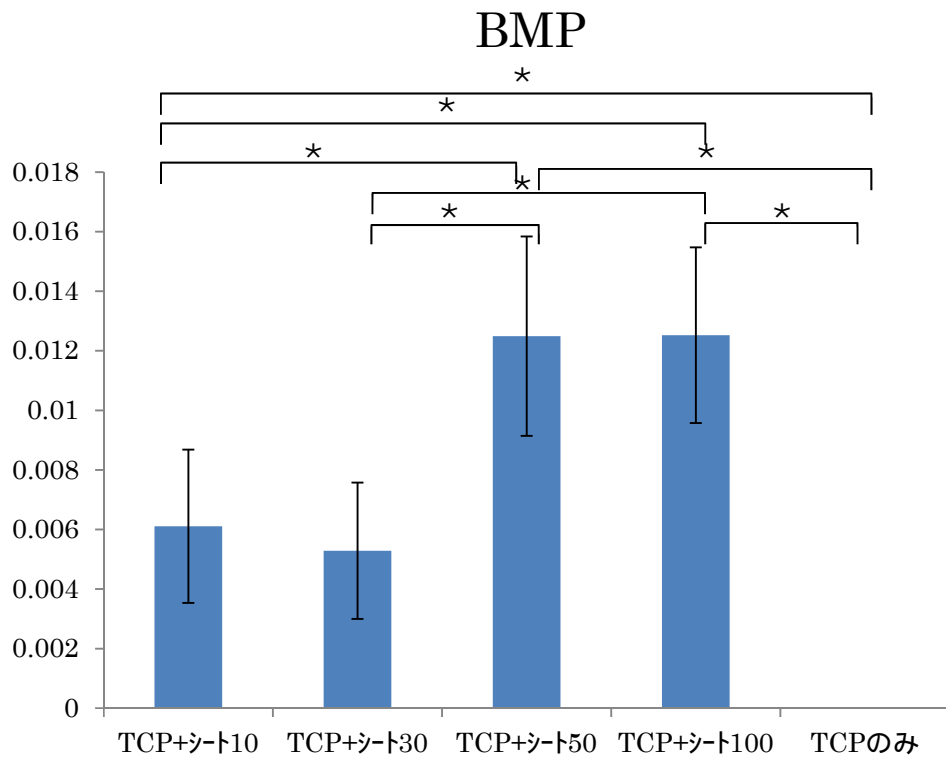
図5 骨形成マーカー発現量 (*In vivo*)



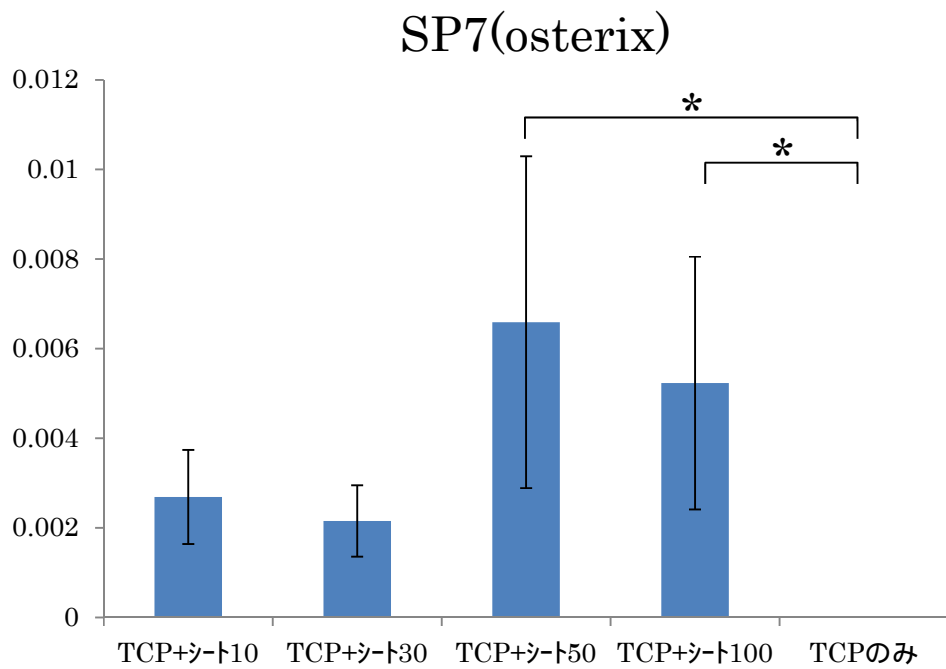
n=4 *P<0.05



n=4 *P<0.05

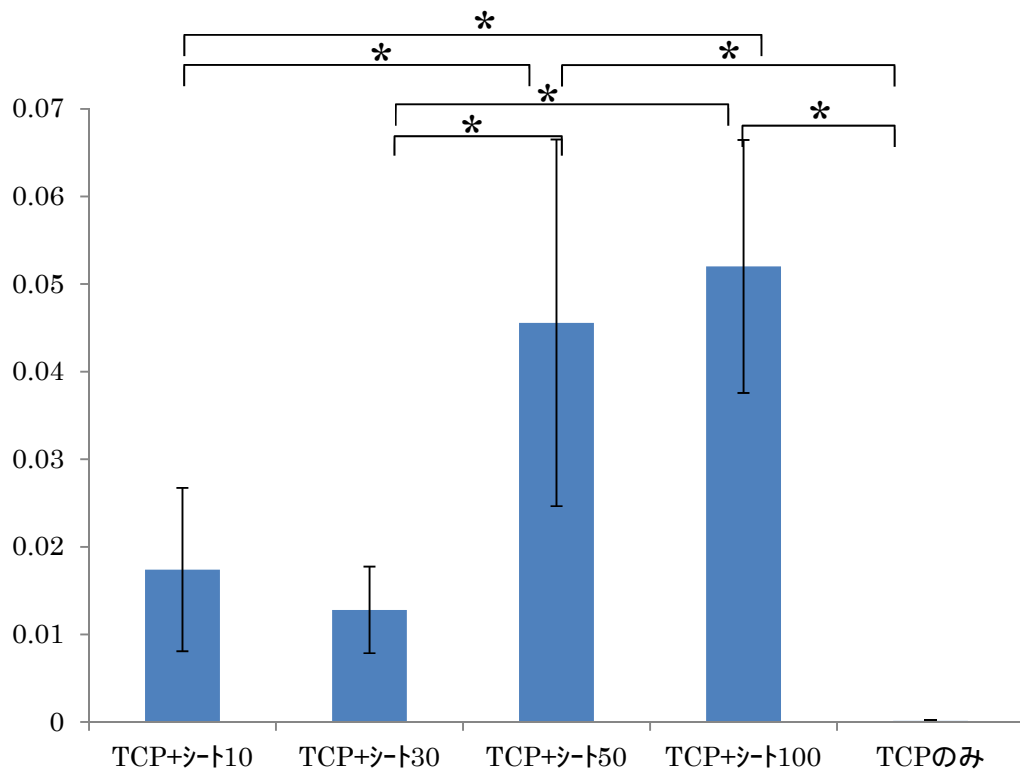


n=4 *P<0.05



n=4 *P<0.05

Runx2



n=4 *P<0.05