

**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 アンギオキヤス (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。アンギオキヤ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ヤスの外筒内に、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 -リン酸 3 カルシウム -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 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: 82µg/ml) とデキサメタゾン (Dex: 50nM) 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 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、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剥離した後、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。-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 . ノ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。-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に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

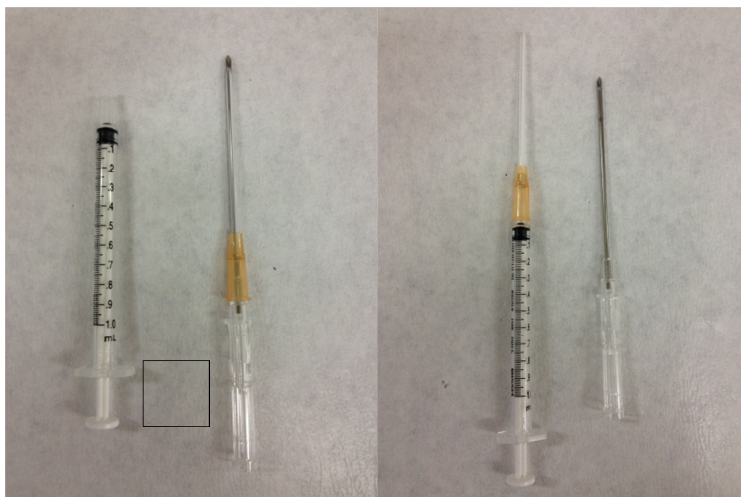
G . 参考文献

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.

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

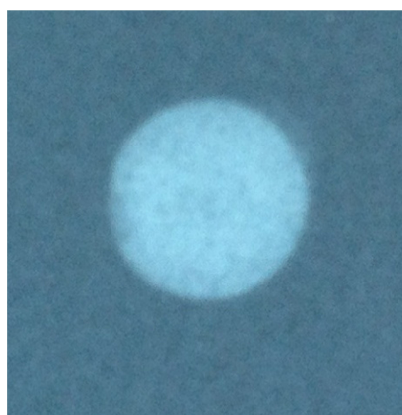


図2 摘出した人工骨のレントゲン写真

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）

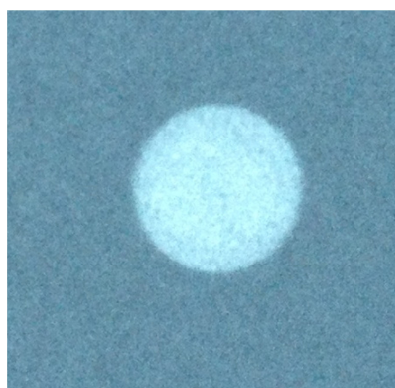


(Dex 10nM)

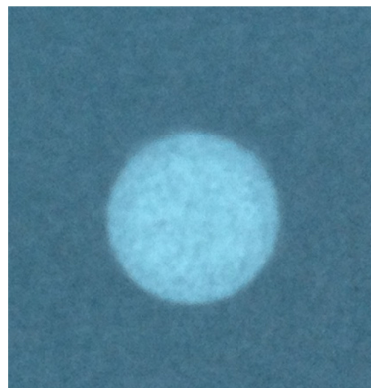


(Dex 100nM)

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)

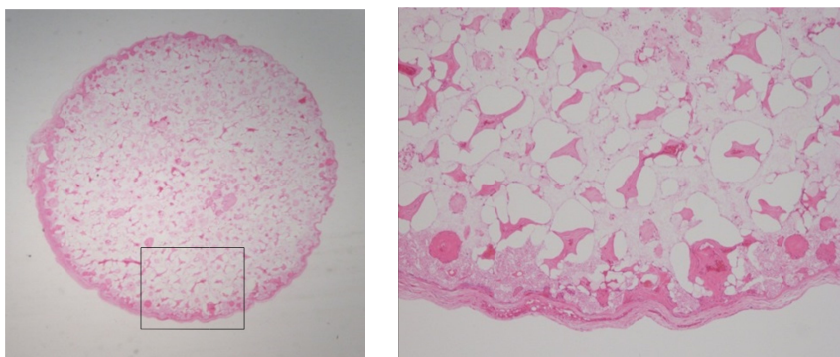


(Dex 100nM)

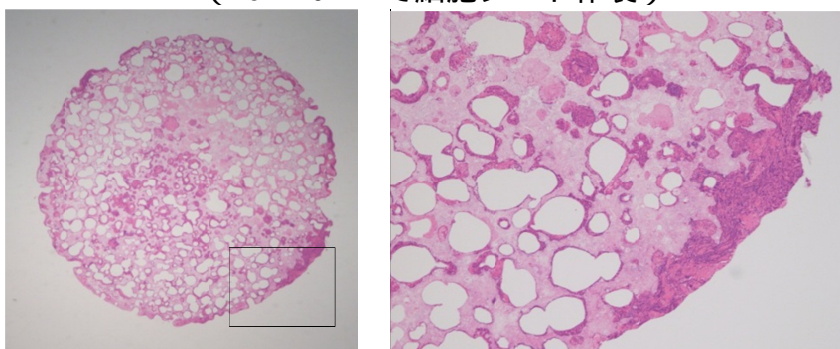
Dex : デキサメサゾン濃度を示す

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

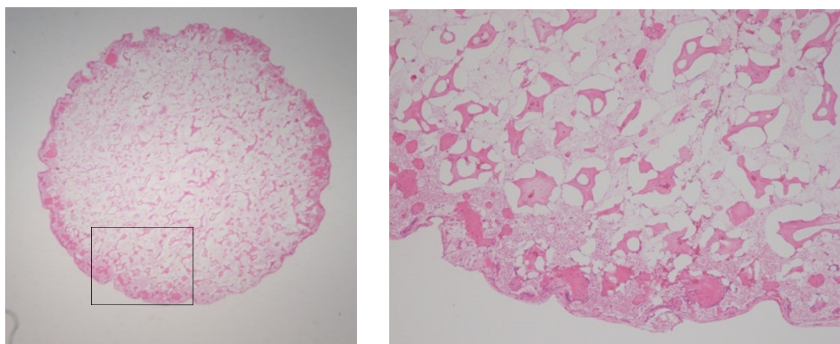


(Dex 10 nM で細胞シート作製)

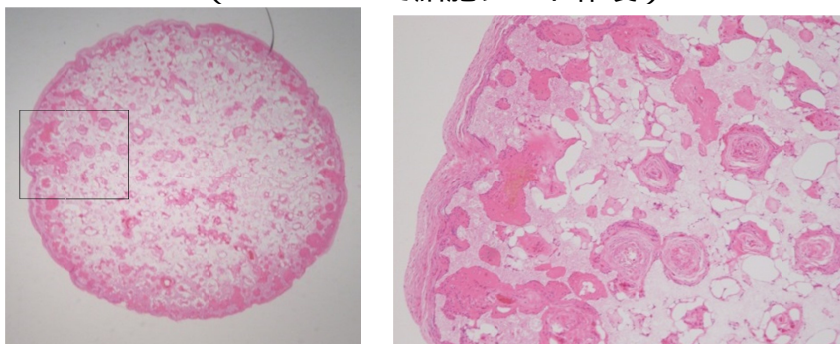


(Dex 100nM で細胞シート作製)

B 60mm細胞シートを注入した人工骨の組織像



(Dex 10 nM 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）

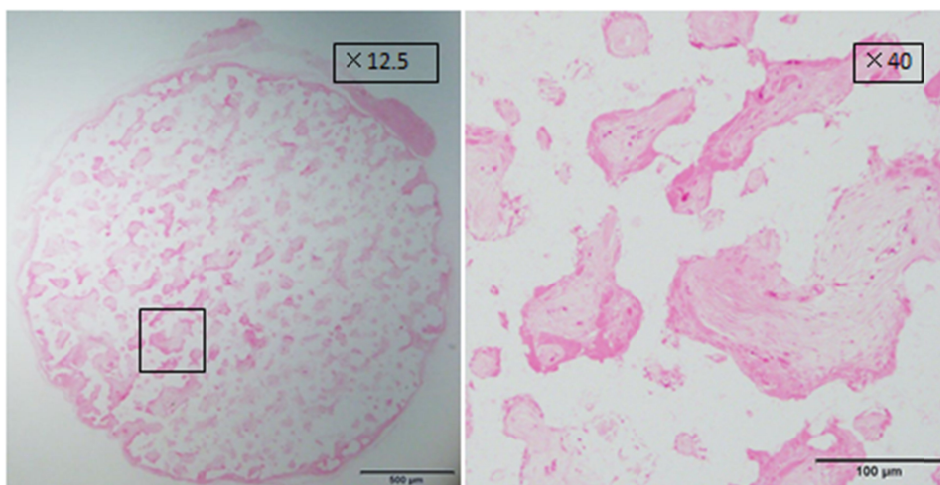
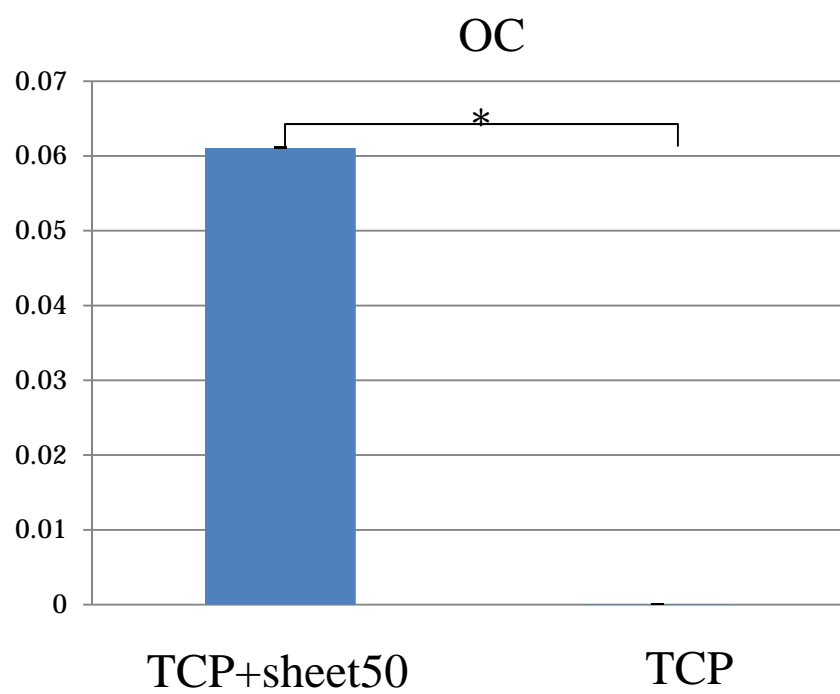
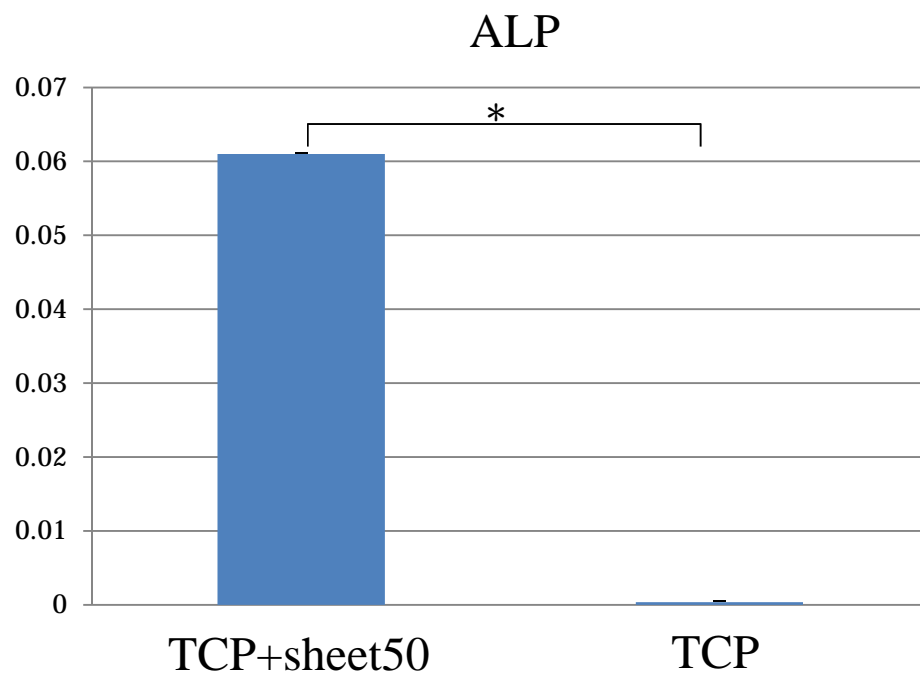
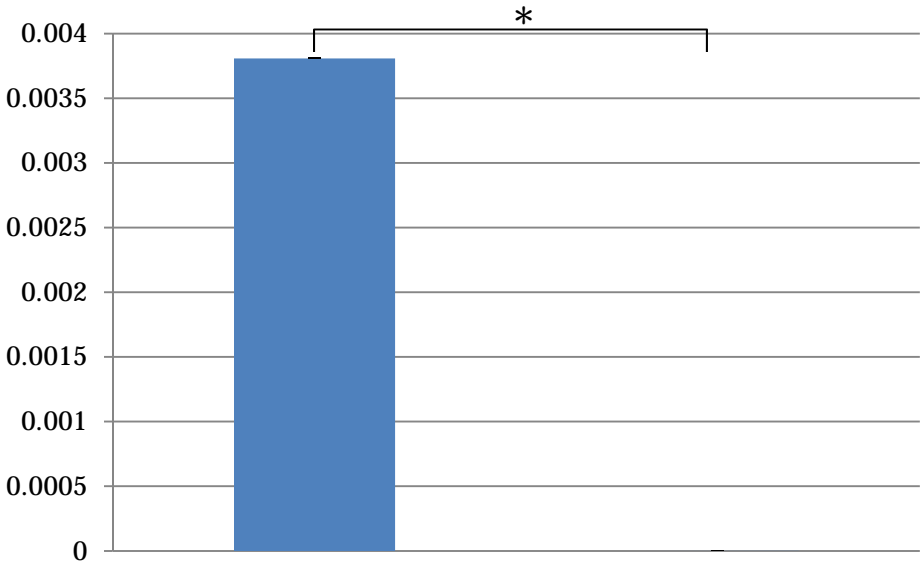


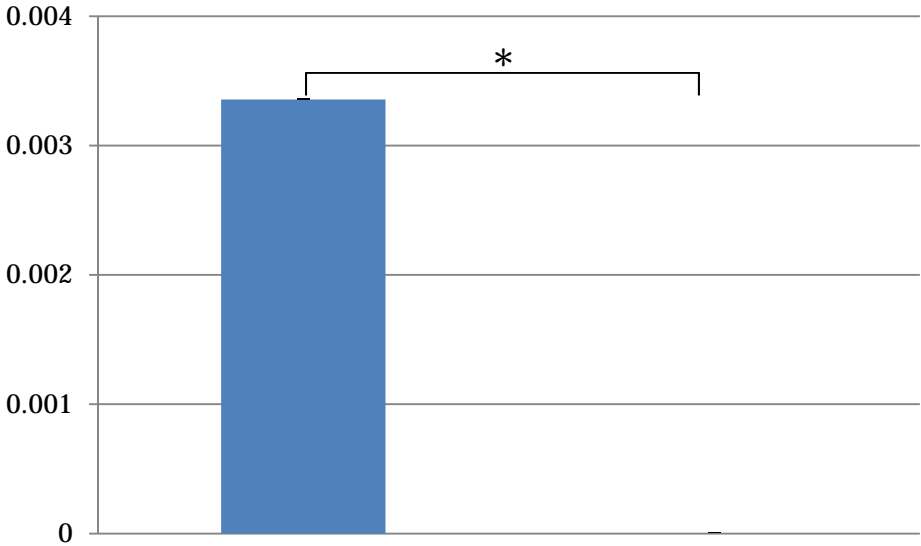
図5 注入型移植法による人工骨への骨形成の評価（生化学的）



BMP2



SP7



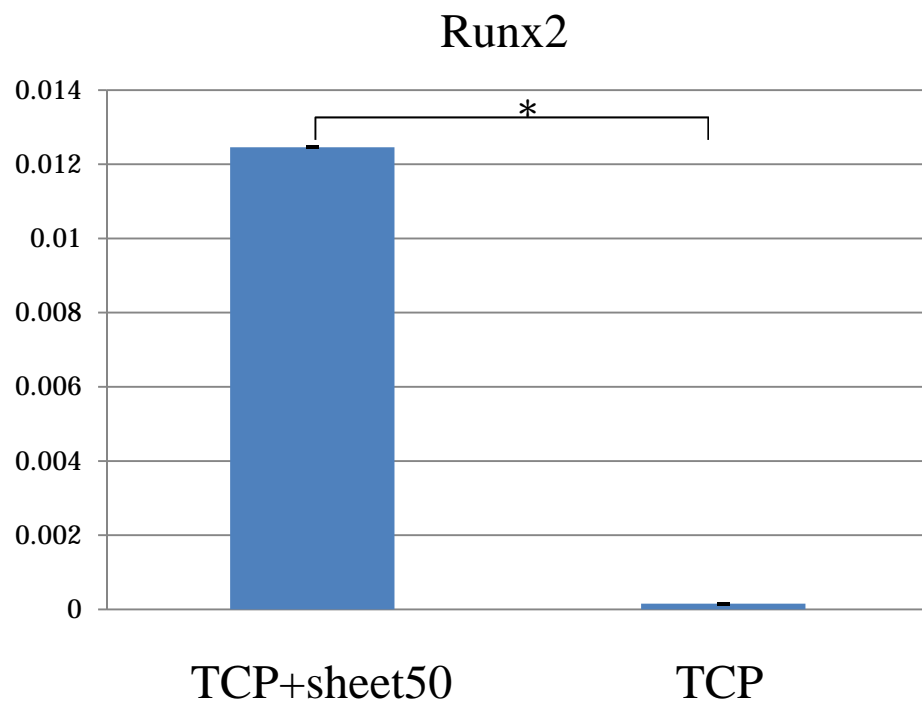


図6 注入型移植法によるヌードラット大腿骨偽関節部への骨形成能のレントゲン評価

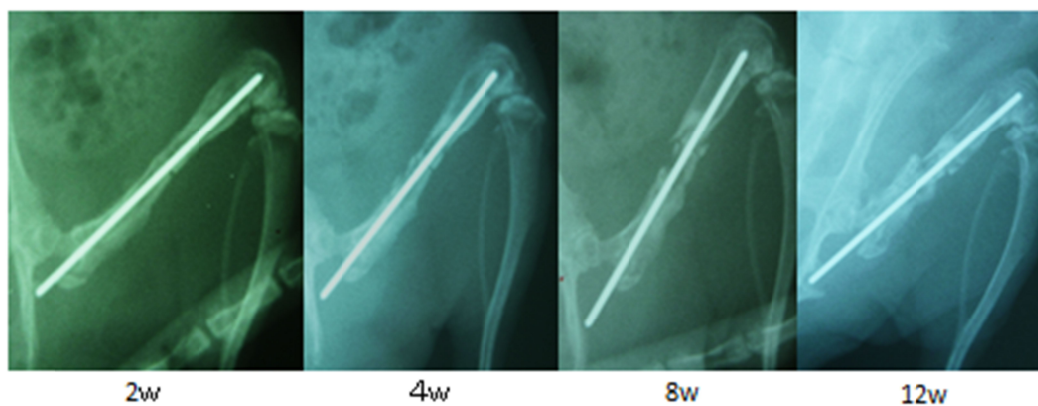
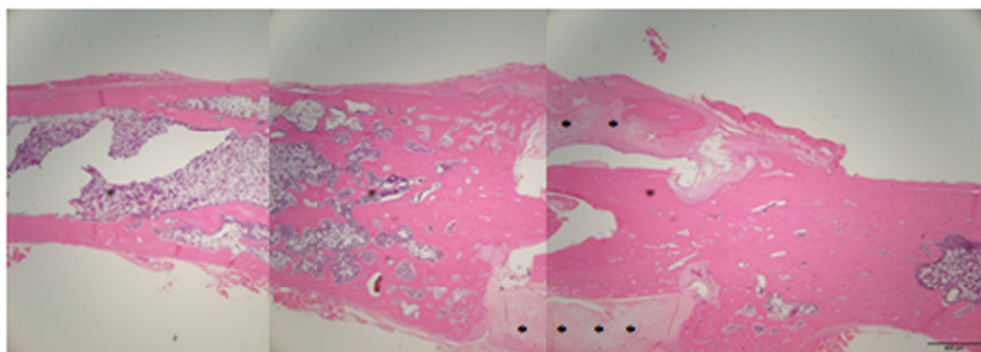


図7 注入型移植法によるヌードラット大腿骨偽関節部への骨形成能の組織学的評価



• 軟部組織の介在