

**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 (-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、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。

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

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。全身麻酔下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 15 ml 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。

0.2×10^4 細胞/cm² 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 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⁴⁻⁷。

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 10 cm 培養ディッシュで、生化学的評価用の細胞シートは 6 cm 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いため、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。

-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 -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⁴⁻¹⁰。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

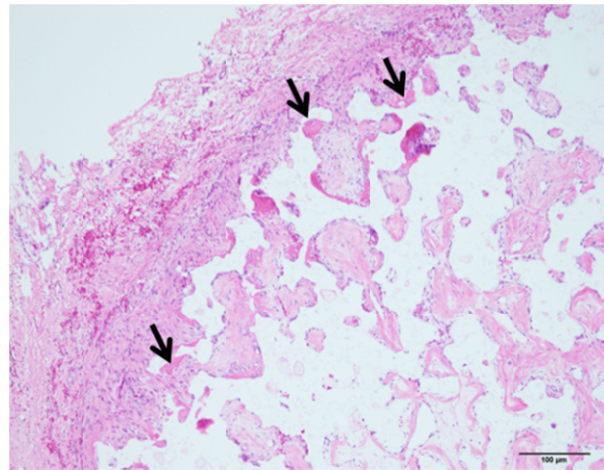
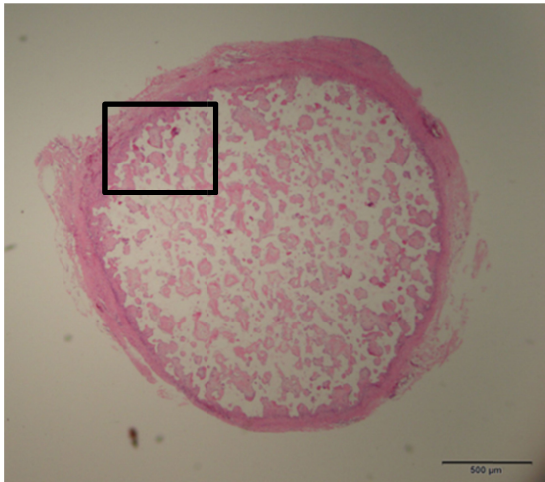
- Ohgushi H, Dohi Y, Katuda T, et al. In vitro bone formation by rat marrow cell culture. *J Biomed Mater Res* 32: 333-340, 1996.
- Ohgushi, H. and Caplan, A.I. (1999) Stem cell technology and bioceramics: From cell to gene engineering. *Journal of Biomedical Materials Research*, 48,913-927.
- Sonal, 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
- 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, 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.
 10. 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 生体内での細胞シートの骨形成能の検討結果（組織像）

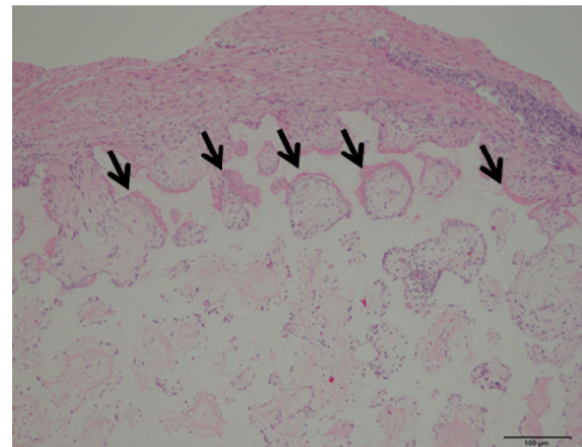
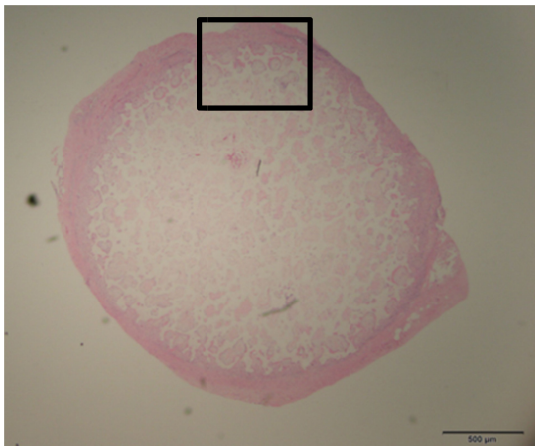
A. デキサメサゾン：10nM

左図の枠内の拡大写真

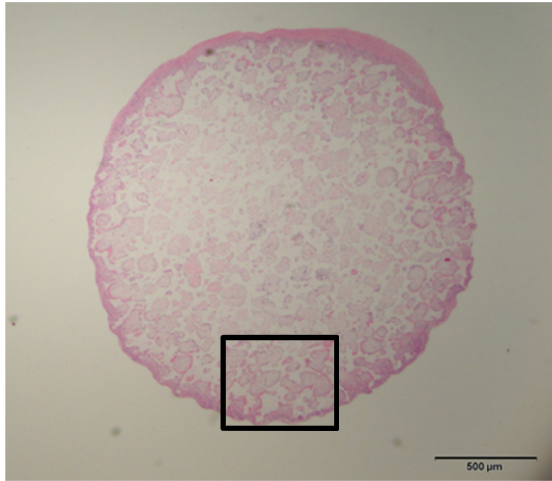


B. デキサメサゾン：30nM

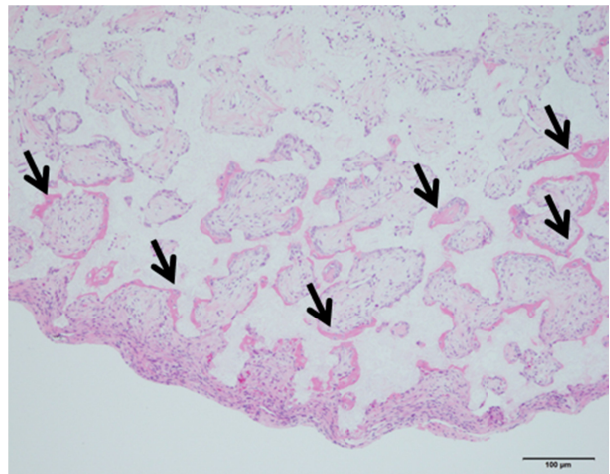
左図の枠内の拡大写真



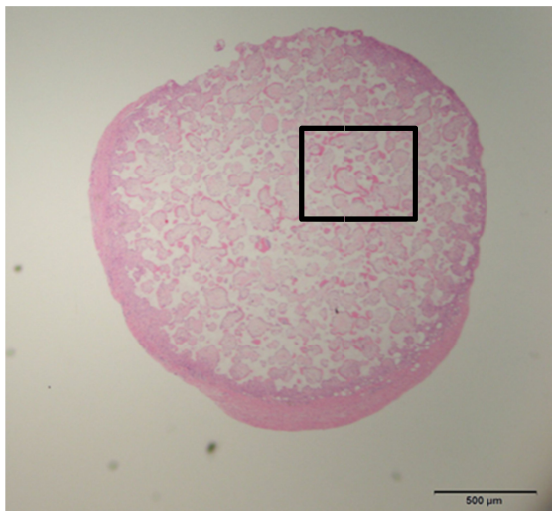
C. デキサメサゾン : 50nM



左図の枠内の拡大写真



D. デキサメサゾン : 100nM



左図の枠内の拡大写真

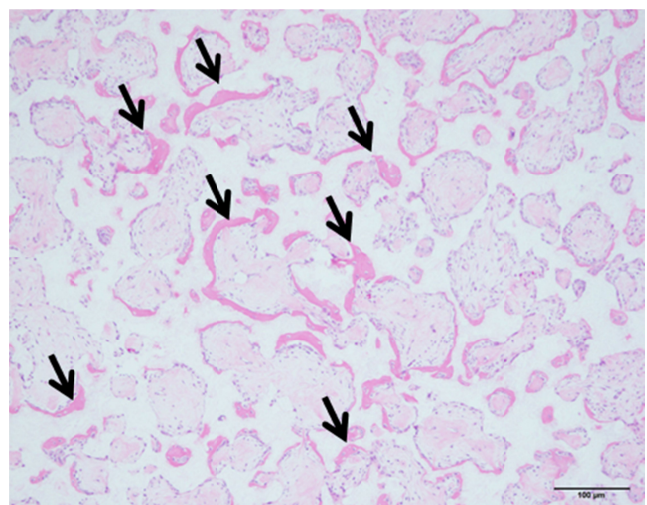


図2 生体内での細胞シートの骨形成能の検討結果（生化学的評価）

アルカリフォスファターゼ活性

