

厚生労働科学研究費補助金
(再生医療実用化研究事業)

難治性骨折（偽関節）に対するヒト骨髄細胞シート
を用いた低侵襲治療手技の開発に関する研究

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 上羽 智之
(奈良県立医科大学 整形外科学講座)

平成26(2014)年3月

目次

・総括研究報告

1. 難治性骨折(偽関節)に対するヒト骨髄細胞シートを用いた低侵襲治療手技の開発に関する研究 上羽智之

A. 研究目的	1-1
B. 研究方法	1-2
1. 細胞シート作製条件の詳細な検討	1-2
2. 注入型骨移植法 (ヒト骨形成細胞シート注入による人工骨への骨形成能の付与)	1-2
3. ノ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	1-2
4. 細胞シート注入を行ったノ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	1-3
5. ヒツジ骨形成細胞シートの骨形成評価	1-3
6. 倫理面での配慮	1-3
C. 研究結果	1-3
1. 細胞シート作製条件の詳細検討結果	1-3
2. 注入型骨移植法による人工骨への骨形成能の付与の結果	1-4
3. ノ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の結果	1-4
D. 考察	1-4
E. 研究発表	1-5
F. 知的財産の出願・登録状況	1-6
G. 参考文献	1-7

・分担研究報告

2. ヒト骨髄間葉系幹細胞を用いた細胞シート作製条件の追加検討 上羽智之

A. 研究目的	2-1
B. 研究方法	2-1
1. ヒト骨髄細胞	2-1
2. 細胞シート作製条件の検討 (in vitro での検討)	2-2
3. 細胞シート作製条件の検討 (in vitro での検討)	2-2
4. 細胞シートの骨形成能の評価 (in vitro での検討)	2-2
5. 移植標本の骨形成能の評価	2-2
6. 測定結果の統計学的検討	2-3
7. 倫理面での配慮	2-3

C.	研究結果	2-3
1.	in vitro での細胞シート作製条件の検討結果	2-3
2.	生体内での細胞シートの骨形成能の検討結果 (組織像)	2-3
3.	細胞シートの骨形成能の生化学的検討結果	2-3
D.	培養条件の検討結果	2-4
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	2-4
E.	考察	2-4
F.	研究発表	2-5
G.	知的財産の出願・登録状況	2-5
H.	参考文献	2-5
I.	図	2-6

3. 偽関節モデルにおける骨形成細胞シート注入移植による骨形成および骨癒合促進

清水隆昌

A.	研究目的	3-1
B.	研究方法	3-2
1.	ヒト骨形成細胞シートの作製方法	3-2
2.	注入型骨移植法による人工骨への骨形成能の付与	3-2
3.	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	3-2
4.	倫理面での配慮	3-2
C.	研究結果	3-3
1.	注入型骨移植法による人工骨への骨形成能の評価 (組織像)	3-3
2.	注入型骨移植法による人工骨への骨形成能の評価 (生化学的評価)	3-3
3.	注入型骨移植法によるヌードラット大腿骨偽関節部への 骨形成能の評価	3-3
D.	考察	3-3
E.	研究発表	3-4
F.	知的財産の出願・登録状況	3-4
G.	参考文献	3-4
H.	図	3-6

4. 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

森田有亮

A.	研究目的	4-1
----	------	-----

B.	研究方法	4-1
1.	ラット大腿骨を用いた力学試験方法	4-1
2.	偽関節モデルの作製	4-2
3.	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	4-2
4.	μ CT に撮影による偽関節の評価方法	4-2
5.	力学試験結果の統計学的検討	4-2
6.	倫理面での配慮	4-2
C.	研究結果	4-3
1.	μ CT 撮影による評価結果	4-3
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力学的評価の結果	4-3
D.	考察	4-3
E.	結論	4-3
F.	研究発表	4-3
G.	知的財産の出願・登録状況	4-4
H.	参考文献図	4-4
I.	図	4-5

5.	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	赤羽学
A.	研究目的	5-1
B.	研究方法	5-1
1.	ヒツジ骨髄間葉系細胞の培養	5-2
2.	ヒツジ骨形成細胞シート作製	5-2
3.	ヒツジ骨形成細胞シートの骨形成能の評価 (in vitro での検討)	5-2
4.	移植標本の骨形成能の評価	5-2
5.	測定結果の統計学的検討	5-2
6.	倫理面での配慮	5-2
C.	研究結果	5-2
1.	in vitro での細胞シート作製結果	5-2
2.	生体内での細胞シートの骨形成能の検討結果 (組織像)	5-3
3.	細胞シートの骨形成能の生化学検討結果	5-3
D.	考察	5-3
E.	結論	5-3
F.	研究発表	5-4
G.	知的財産の出願・登録状況	5-4
H.	参考文献	5-4
I.	図	5-6

. 研究発表に関する一覧表 6-1

. 研究発表に関する参考資料 7

代表者総括報告書

難治性骨折（偽関節）に対するヒト骨髄細胞シートを用いた低侵襲治療手技の開発に関する研究

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

本研究の目的は難治性骨折（偽関節症）に対する低侵襲治療法を確立することである。本研究課題では、我々が動物実験で確立してきた細胞シートを scaffold free で注入移植し新生骨形成を得る「注入型骨移植法」の手技を、将来ヒト骨髄細胞を用いて臨床例に応用できるように発展させるための基礎研究を行う。

一般的に、偽関節臨床例に対しては骨移植術と強固な再内固定が行われており、近年は低出力超音波法も併用され成績が向上している。しかし、中には長期間骨癒合が得られず日常生活に支障をきたす症例もある。低侵襲でしかも既存の治療法と併用できる新たな骨癒合促進手技が確立されれば、治療成績は飛躍的に向上するため、社会的ニーズは高い。

本研究の特色は、骨形成能をもつ細胞シートを偽関節部に注入移植し、骨癒合を促進させる点である。細胞シート注入は X 線透視下に偽関節部を確認し、scaffold free で行う（X 線透視下注入型骨移植）ため、scaffold による弊害がなく、低侵襲で既存の治療法にも併用できるため、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点で独創性が高い。

期待できる成果は、偽関節症の治療成績が飛躍的に向上し患者負担が軽減できる点である。本研究は、得られた成果を他疾患（骨壊死症や先天性下腿偽関節症等）にも応用できると考えられ、社会に還元できる運動器再生医療技術の早期臨床応用を目指す革新的治療技術開発を目指した研究である。

過年度は、ヒト骨髄細胞を用いて、細胞シート作製に適した培養条件を見つけ出すとともに、骨形成能を評価するために免疫不全動物（ヌードラット）の大腿骨偽関節モデルを確立したが、本年度はその偽関節モデルに対して、ヒト骨髄細胞シートを用いた X 線透視下注入型骨移植を行い、効果を検証した。合わせて、将来のヒト骨髄細胞シートの臨床応用を検討する上で重要な大動物（ヒツジ）を用いた実験も行って、大動物（ヒツジ）でも骨髄細胞から良好な骨形成能をもつ細胞シートが作製できることを確認した。

A . 研究目的

我々はこれまでに実施した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を作製する方法を考案している¹⁻³。本研究ではヒト MSC で作製した細胞シート移植で、難治性骨折（偽関節）の治療が可能であるか免疫不全動物を用いた実験や大動物を用いた実験で検証す

る。細胞シートを X 線透視下に偽関節部に注入し骨癒合を得る低侵襲な治療法を確立する。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」として報告している^{4,5}。

H24 年度の本研究課題では、ヒト骨髄細胞シートの効率的な作製方法を検討し、その骨形成能の評価するための免

疫不全動物モデル（大腿骨偽関節モデル）の作製を行った。

本年度はその偽関節モデルに対して、ヒト骨髄細胞シートを用いた X 線透視下注入型骨移植を行い、効果を検証した。合わせて、将来のヒト骨髄細胞シートの臨床応用を検討する上で重要な大動物（ヒツジ）を用いた実験も行って、大動物（ヒツジ）でも骨髄細胞から良好な骨形成能をもつ細胞シートが作製できることを確認した。

B . 研究方法

B . 1 . 細胞シート作製条件の詳細な検討

過年度は市販のヒト細胞を Lonza 社から購入し研究をおこなった。そこで、本年度は同意を得た患者から提供を受けたヒト骨髄細胞を用いてヒト骨形成細胞シート作製条件を過年度よりも詳細に検討した。

ヒト MSC を T75 フラスコ（75cm² culture flask, Falcon, BD）で 2 週間初期培養後、35mm 培養皿（Falcon 35-3001, BD）を用いてデキサメサゾン、アスコルビン酸添加培地で 14 日間培養した。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 あるいは 100 μ M の組み合わせで検討し、細胞シート作製に適した条件を過年度よりも詳細に検討した。アスコルビン酸添加量は従来通りの 82 μ g/ml とし、培養液の交換は 2 あるいは 3 日ごとに行った。

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。

次いで、*in vivo*での骨形成能の詳細な評価を行った。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 10・30・50・100nM の 4 種類で作製した。それぞれの細胞シートを人工骨（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。組み合わせ方は、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・人工骨複合体作り、複合体としてヌードラットの背部皮下に移植し、2 か月で標本を摘出し、組織学および生化学的に骨形成量を評価した。

B . 2 . 注入型骨移植法（ヒト骨形成細胞シート注入）による人工骨への骨形成能の付与

7 週齢ヌードラットを用いて、生体内でのヒト骨形成細胞シート注入移植による骨形成能の検討を行った。

あらかじめヌードラットの背部皮下へ移植しておいた人工骨（スーパーポア、直径 5mm・高さ 2mm の円盤状 -TCP : ペンタックス社）に対して、14G 注射針をつけた注射器を使用し、X 線透視下にヒト骨形成細胞シートを注入移植した。

注入移植後 1 か月で、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 -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おこなった。

B . 3 . 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

過年度に確立したヌードラットの大腿骨偽関節モデルを使用して細胞シート注入移植の効果を評価した。右大腿骨偽関

節部にスキャフォールドフリーで、X線透視下に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。術後レントゲン撮影し、骨癒合状態を評価するために組織像の確認を行った。

注入移植後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。

B.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1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。

・B.5. ヒツジ骨形成細胞シートの骨形成評価

大動物でもラットやラビット、ヒト骨髄細胞を用いた場合と同じく骨形成細胞シートが作製できるか、また生体移植後に骨形成が起こるかを検証するため、オスのヒツジを用いて実験を行った。

ヒツジ骨形成細胞シートを作製する条件は、播種細胞数を 0.2×10^4 細胞/cm²の細胞密度とし、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。

採取したヒツジ骨形成細胞シートと人工骨(スーパーポア、直径5mm・高さ2mmの円盤状-TCP:ペンタックス社)を組み合わせ、細胞シート・人工骨複合体を作ったのちに、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)。組み合わせ方はヒト骨形成細胞シート移植と同様の方法を用いた。

移植後2週で標本を摘出し、組織学的および生化学的に骨形成を評価した。

組織用の摘出標本は2日間ホルマリン固定し、数日間脱灰した後、-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.6. 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. 細胞シート作製条件の詳細検討結果

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 (osterix)・Runx2 の mRNA 発現量の結果を示す。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、ほぼ同等の mRNA 発現が見られた。

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、それぞれの mRNA 発現量はほぼ同じ傾向であった。

以上の結果から、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: 50 nM、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、得られた至適な培養条件としては同様であった。

C . 2 . 注入型骨移植法による人工骨への骨形成能の付与の結果

ヒト骨形成細胞シートを人工骨に対して注入移植後 1 カ月で摘出したサンプルの組織像では、人工骨内に良好な骨形成が確認できた。注入したヒト骨形成細胞シートによる新生骨形成であると考えられる。

-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 発現量は統計学的に有意に高値であった。このことから、細胞シートを皮下に移植した人工骨に注入移植した場合でも、注入型骨移植による骨形成が認められていると考えられた。

C . 3 . 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の結果

ヌードラット大腿骨偽関節モデルに対し、ヒト骨形成細胞シートの注入移植した後に経時的に撮影したレントゲン像では、術後 12 週まで偽関節部には明らかな骨形成や骨癒合の所見は得られなかった。

術後 12 週で摘出した大腿骨の組織像でも、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、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、注入による移植で異所性に骨形成を認め、また皮下に移植した人工骨へ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、ラットを用いた動物実験で報告している^{4,5}。

本研究では、ヒト骨髄間葉系幹細胞を用いて骨形成細胞シートを作る条件を前年度よりも詳細に検討した。前年度は市販のヒト骨髄細胞を使用した実験であったのに対し、本年度は同意を得た患者から提供を受けたヒト骨髄細胞を用いて詳細に検討した点が異なる。将来の臨床応用を考えるうえで、実際に患者から提供された骨髄細胞を用いて詳細に検討したことは、重要な結果と言える。

者から提供された骨髄細胞を用いて詳細に検討した条件で作製した細胞シートをあらかじめヌードラットの皮下に移植しておいた人工骨に注入移植すると、人工骨内部に明らかな骨形成が認められた。しかし、いずれもラットなど実験動物で見られた人工骨周囲の骨形成は認められなかった。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。注入という行為がヒト細胞シート自体にダメージを与えてしまうために、細胞活性が低下している可能性がある。今後は、注射針を用いた注入方法以外に、専用のデバイスを作製し、径を大きくするなど注入時に細胞シートにダメージを与えない新たな方法について検討する必要があると考える。

本年度は大動物での検証も必須であると考え、ヒツジの骨髄細胞から作製した骨形成細胞シートを用いた実験も並行して行った。組織切片で、十分な量の骨形成が確認できた。

これまで小動物での検証が中心で研究を進めてきたが、本研究結果を総合すると、ヒトや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、人工骨と組み合わせて移植する場合だけでなく、注入移植を行った場合でも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 . 研究発表

1 . 論文発表

なし

2 . 学会発表

1 Kenichi Nakano, Keiichi Murata, Takamasa Shimizu, Manabu Akahane, Shohei Omokawa, Yasuhito Tanaka. Osteogenesis of Vascularized Tissue-Engineered Bone Scaffold The68th Annual Meeting of the American Society for

Surgery of the Hand 2013/10/3-5
San Francisco, USA

2 中野健一、村田景一、清水隆昌、上羽智之、吉良務、赤羽学、面川庄平、川手健次、田中康仁 血管柄付き人工骨への血管誘導能および骨形成能の付与 - 骨芽細胞シートを用いて - 第33回整形外科バイオマテリアル研究会 2013/12/7 奈良ホテル(奈良)

3 中野健一、村田景一、清水隆昌、赤羽学、小島康宣、仲西康顕、吉良務、大西正宣、面川庄平、川手健次、田中康仁

血管柄付き人工骨作製における骨芽細胞シートの有用性 第20回奈良・横浜・京都バイオメカカンファレンス 2013/12/21

奈良県立医科大学(奈良)

4 吉良務、赤羽学、清水隆昌、中野健一、小泉宗久、川手健次、田中康仁

簡便な細胞シートの保存および輸送条件の検討 第33回整形外科バイオマテリアル研究会 2013/12/7

奈良ホテル(奈良)

5 倉知彦、赤羽学、清水隆昌、加藤優喜、森田有亮、上羽智之、内原好信、藤間保晶、川手健次、田中康仁

凍結保存骨髄間葉系幹細胞由来細胞シートの注入移植による骨形成能の評価 第28回日本整形外科学会基礎学術集会 2013/10/17-18

幕張メッセ、国際会議場(千葉)

6 清水隆昌、赤羽学、森田有亮、上羽智之、稲垣有佐、面川庄平、村田景一、小島康宣、藤間保晶、川手健次、田中康仁

大腿骨偽関節に対する骨芽細胞シートによる治療 第28回日本整形外科学会基礎学術集会 2013/10/17-18 幕張メッセ、国

際会議場（千葉）

7 赤羽学、清水隆昌、上羽智之、
稲垣有佐、倉知彦、内原好信、中野健
一、藤間保晶、川手健次、今村知明、
田中康仁

簡便な細胞シート輸送条件の
検討 第 28 回日本整形外科学会基礎
学術集会 2013/10/17-18 幕張メ
ッセ、国際会議場（千葉）

8 吉良務、清水隆昌、赤羽学、面
川庄平、小嶋康宣、村田景一、中野健
一、仲西康顕、藤間保晶、川手健次、
田中康仁

間葉系幹細胞シートの皮弁に
対する影響の検討 第 28 回日本整
形外科学会基礎学術集会
2013/10/17-18 幕張メッセ、国
際会議場（千葉）

9 中野健一、村田景一、清水隆昌、
上羽智之、吉良務、赤羽学、面川庄平、
川手健次、田中康仁

血管柄付き人工骨作製におけ
る骨芽細胞シートの有用性 第 28 回
日本整形外科学会基礎学術集会
2013/10/17-18 幕張メッセ、国
際会議場（千葉）

10 稲垣有佐、赤羽学、上松耕太、
藤間保晶、小川宗宏、上羽智之、清水
隆昌、田中寿典、川手健次、田中康仁
骨髄間葉系幹細胞の骨形成に
対する低酸素環境の影響 第 28 回
日本整形外科学会基礎学術集会
2013/10/17-18 幕張メッセ、国
際会議場（千葉）

11 内原好信、赤羽学、森田有亮、
中崎真太郎、上羽智之、清水隆昌、倉
知彦、藤間保晶、川手健次、田中康仁
培養骨芽細胞シートによる放
射線照射自家処理骨の骨形成 第 28 回

日本整形外科学会基礎学術集会
2013/10/17-18 幕張メッセ、国
際会議場（千葉）

12 赤羽学、清水隆昌、面川庄平、
今村知明、田中康仁

細胞シート輸送をめざした保
存条件の検討 第 56 回日本手外科学会
学術集会 2013/4/18-19 神戸国
際会議場
（兵庫）

13 中野健一、村田景一、赤羽学、
面川庄平、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 56 回
日本手外科学会学術集会
2013/4/18-19 神戸国際会議
場
（兵庫）

14 稲垣有佐、上松耕太、赤羽学、
小川宗宏、川手健次、田中康仁

骨形成細胞シートによる家兔
移植腱骨孔間治癒の促進 第 120
回中部日本整形外科災害外科学会・学
術集会 2013/4/5-6 ホテルアバロ
ーム紀の国（和歌山）

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

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 and 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.

分担研究報告書

ヒト骨髄間葉系細胞を用いた細胞シート作製条件の追加検討

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

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: $50 \mu\text{M}$ 、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 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 $1 \times 10^4 \text{ cell/cm}^2$ と $0.5 \times 10^4 \text{ cell/cm}^2$ 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 $0.5 \times 10^4 \text{ cell/cm}^2$ 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 50 nM と 100 nM で作製した細胞シートは 10 nM・30 nM で作製した細胞シートより有意に高値であった。

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: $0.5 \times 10^4 \text{cell/cm}^2$ 、デキサメタゾン濃度: 50 nM、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 50 nM、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 100 nM 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 100 nM 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 50 nM 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 50 nM と決定した。

昨年度の実験ではデキサメタゾン濃度を 10 nM と 100 nM 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、細胞の中には様々に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みで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 β -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

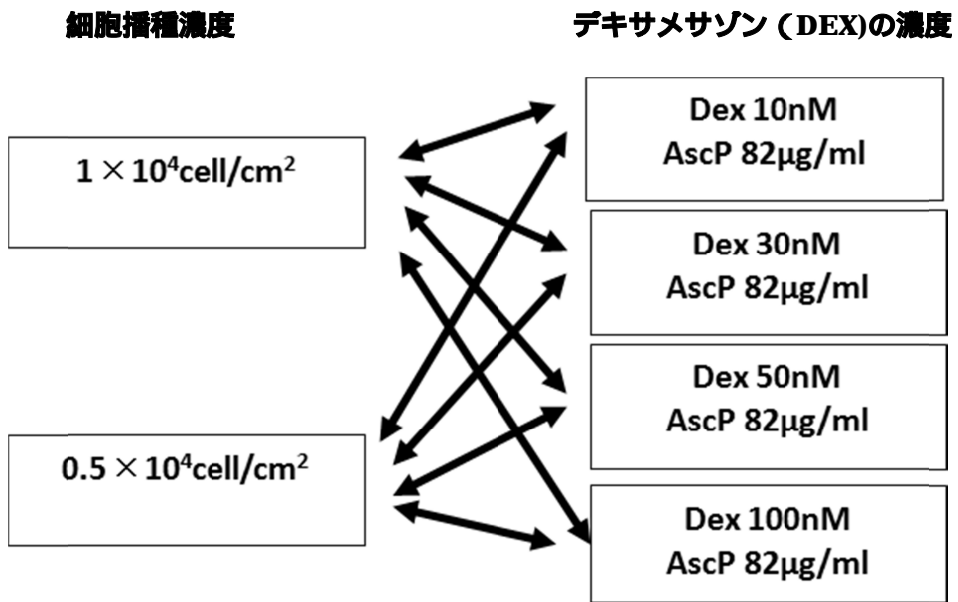
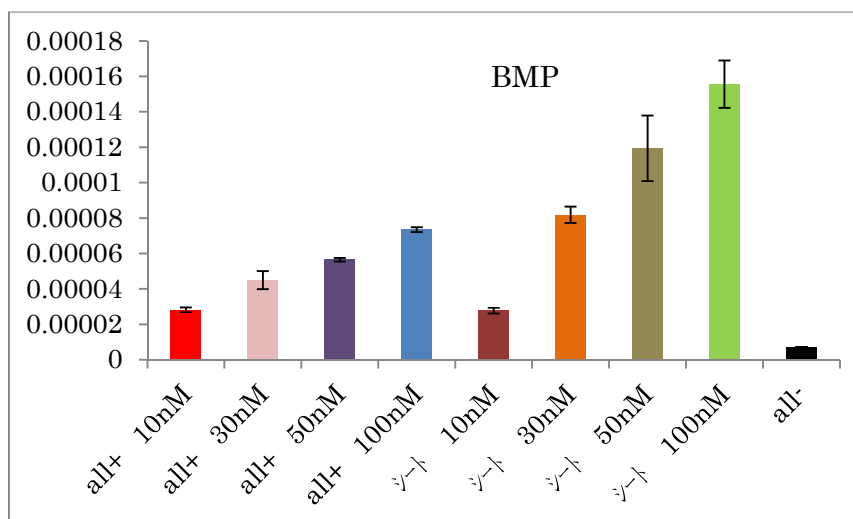
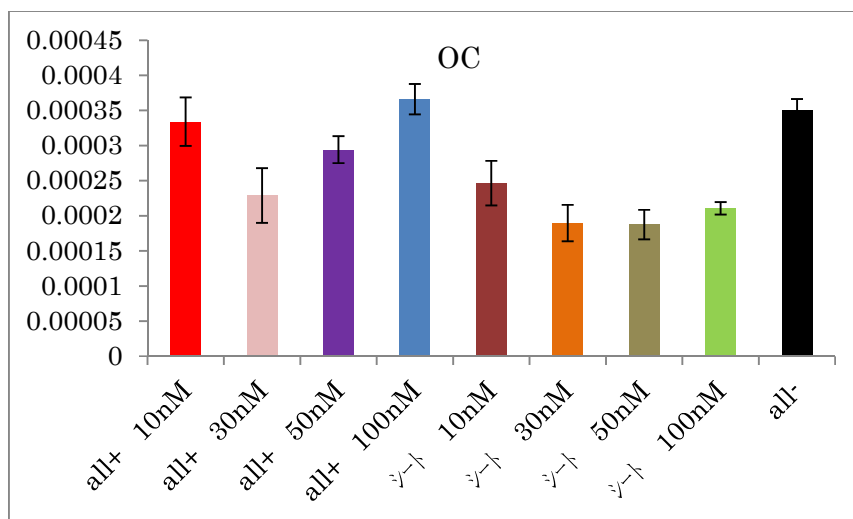
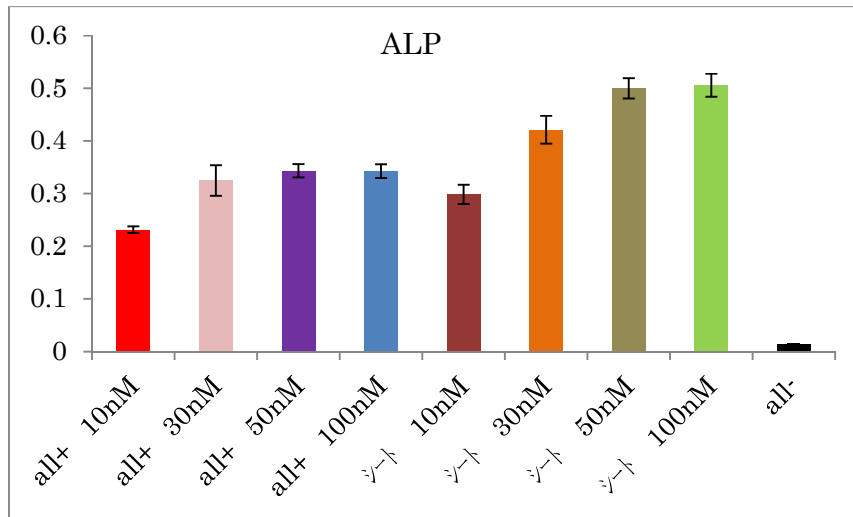
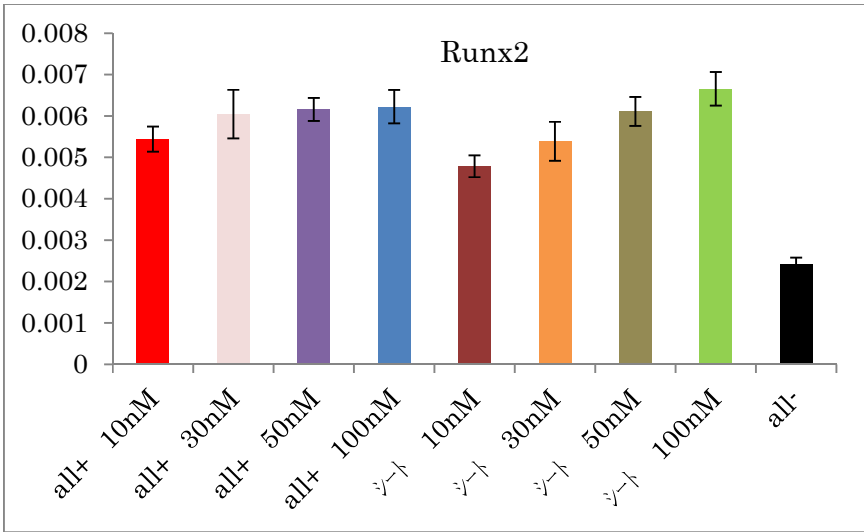
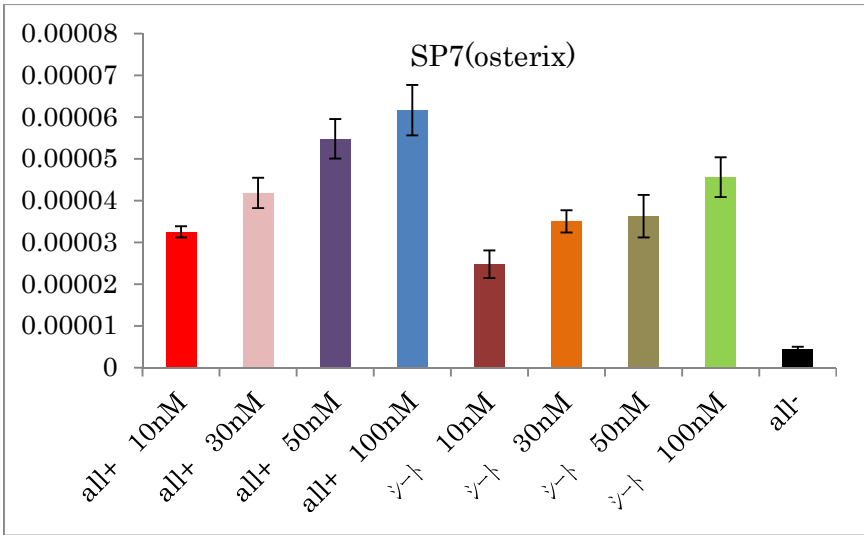


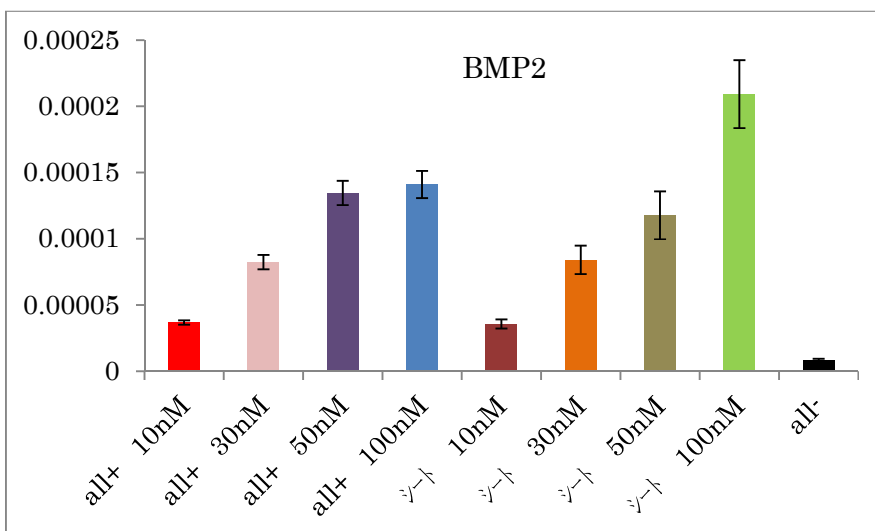
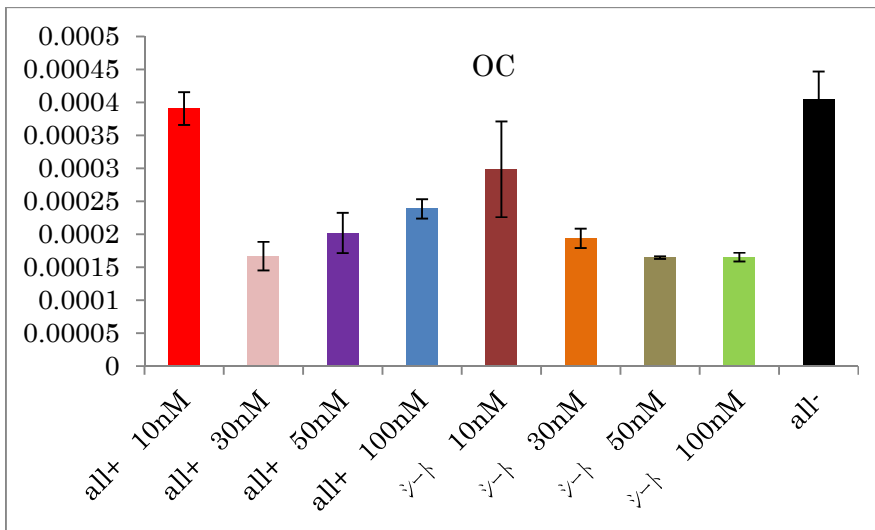
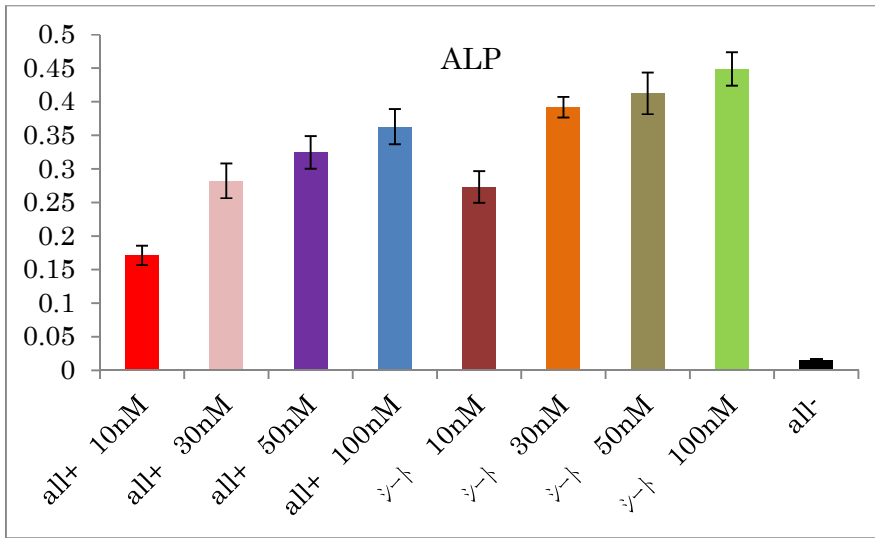
図2 骨形成マーカーの遺伝子発現量 (In vitro)

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





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



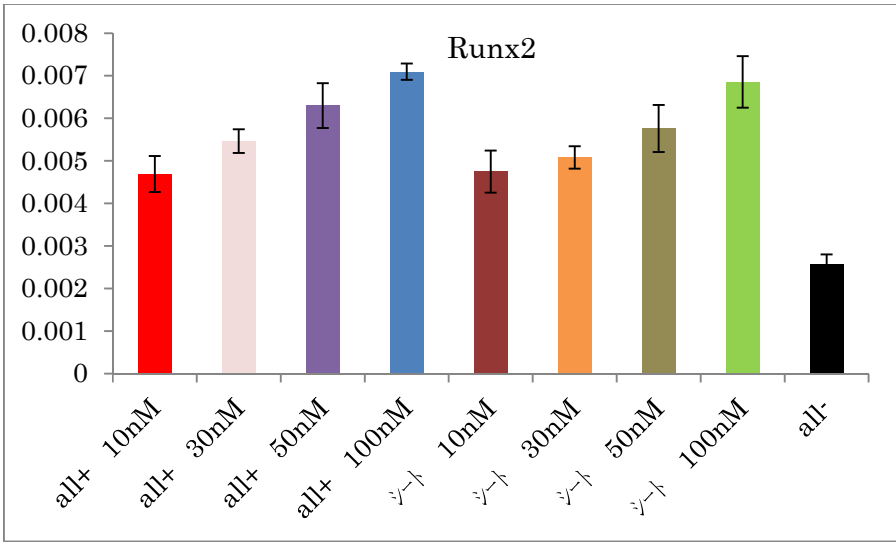
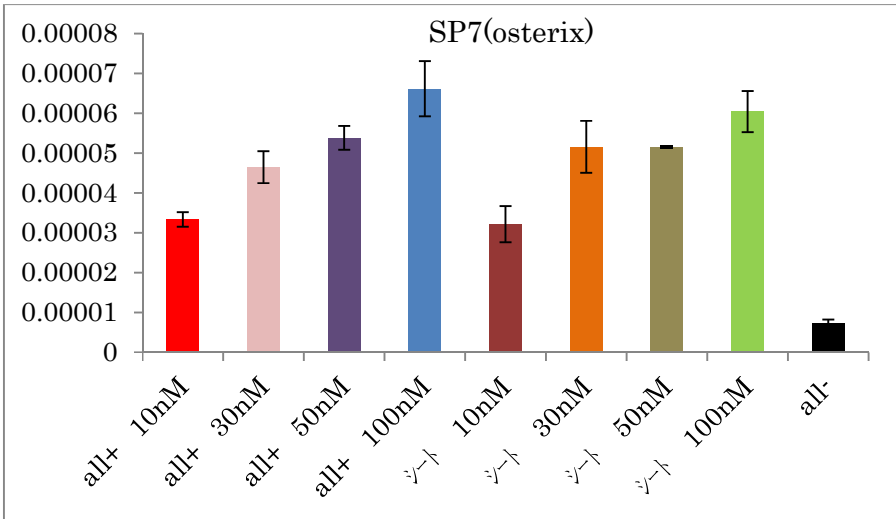
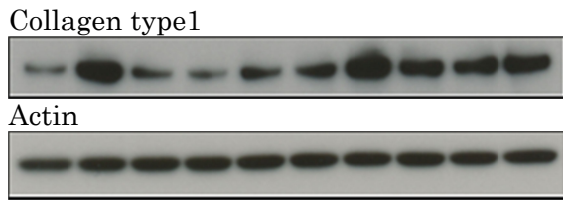
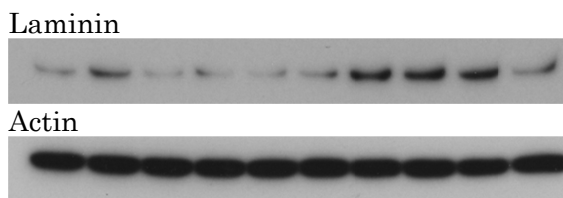
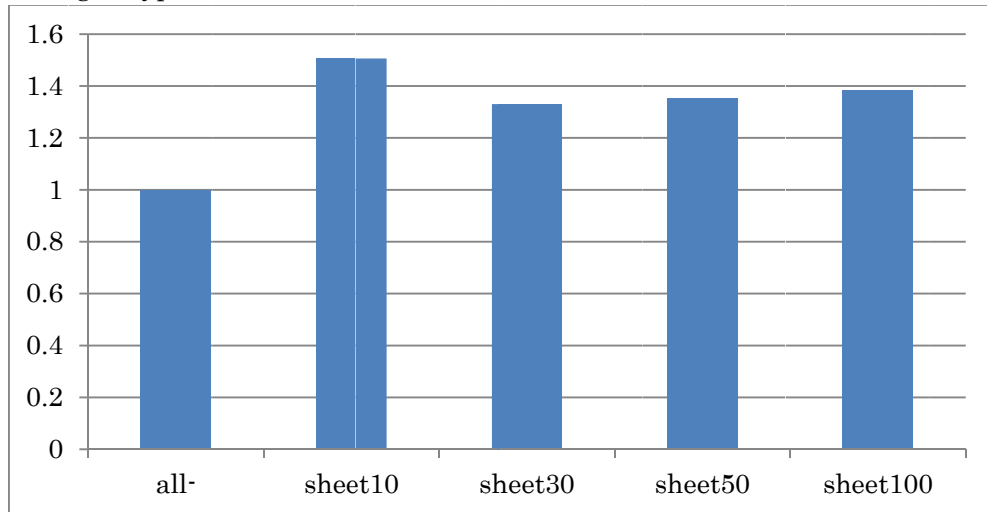


図3 細胞外基質の発現量の評価 (Western blotting)



Collagen type 1 発現量 (actin で補正)



Laminin 発現量 (actin で補正)

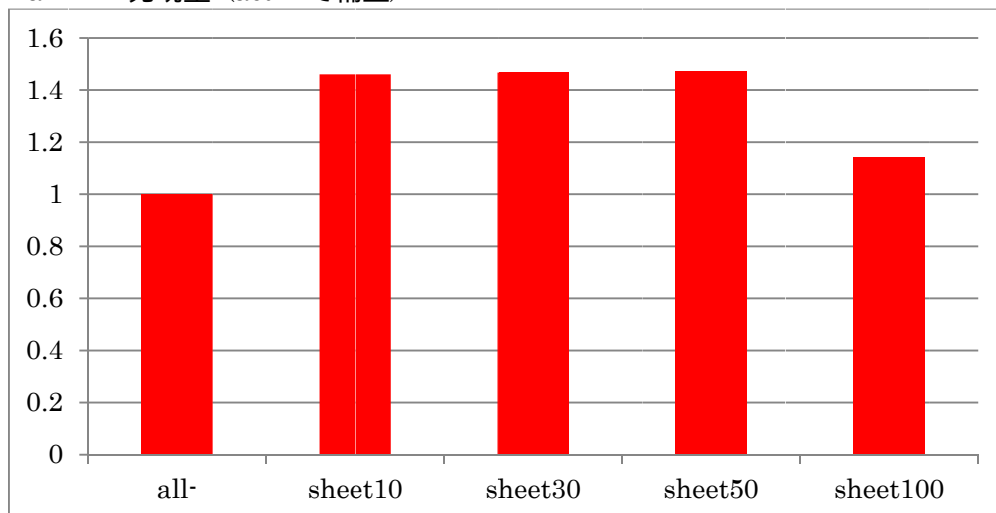
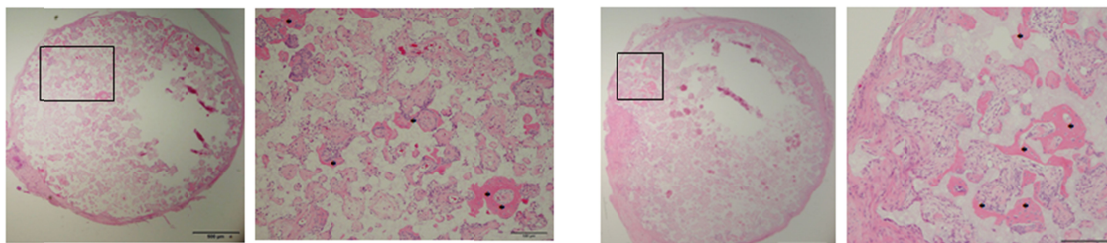


図4 生体内での細胞シートの骨形成能の検討結果（組織像）

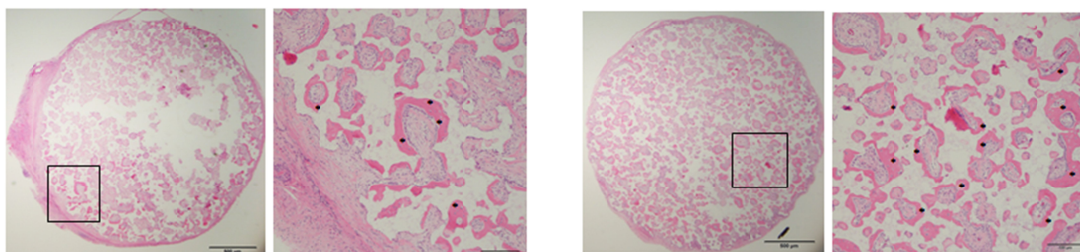
Dex:10nM

Dex:30nM



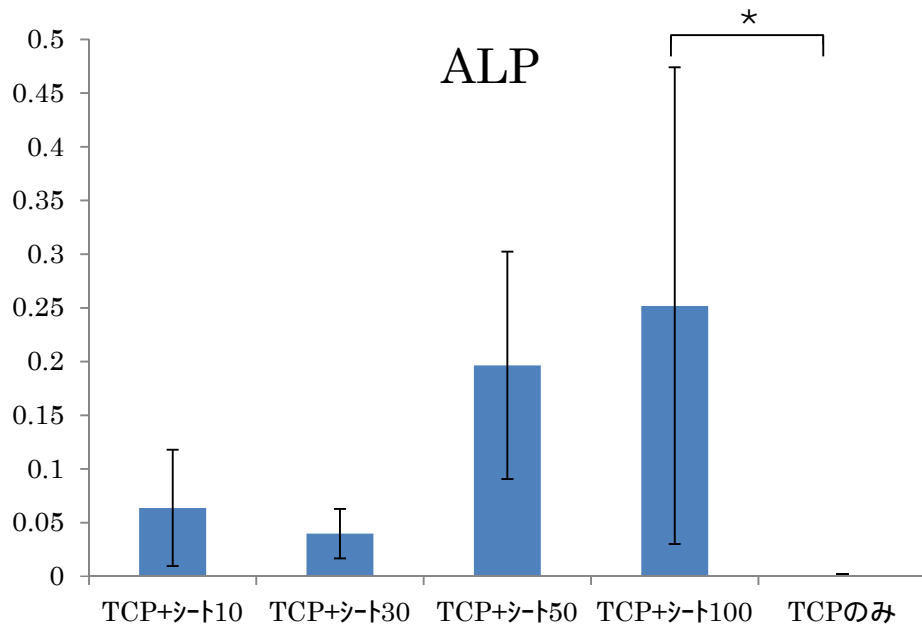
Dex:50nM

Dex:100nM

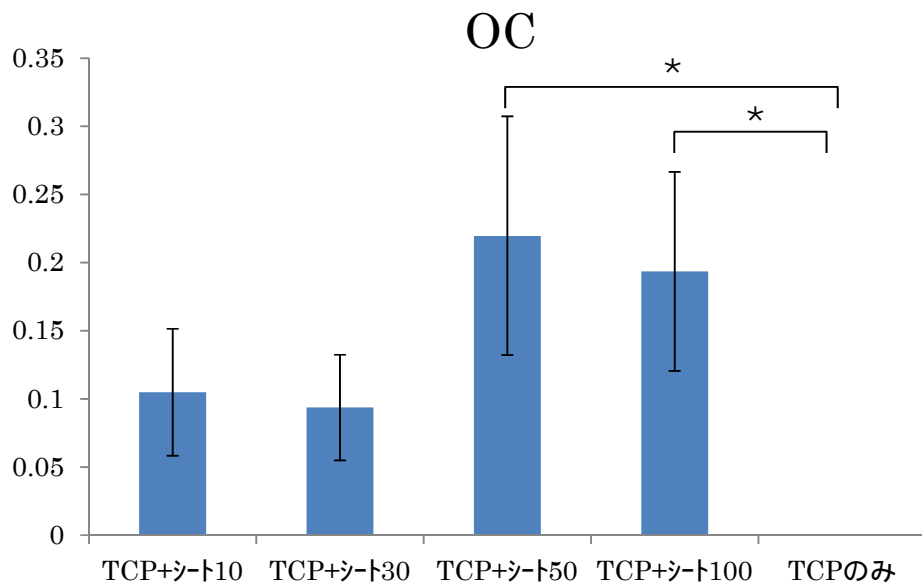


Dex: デキサメサゾン濃度

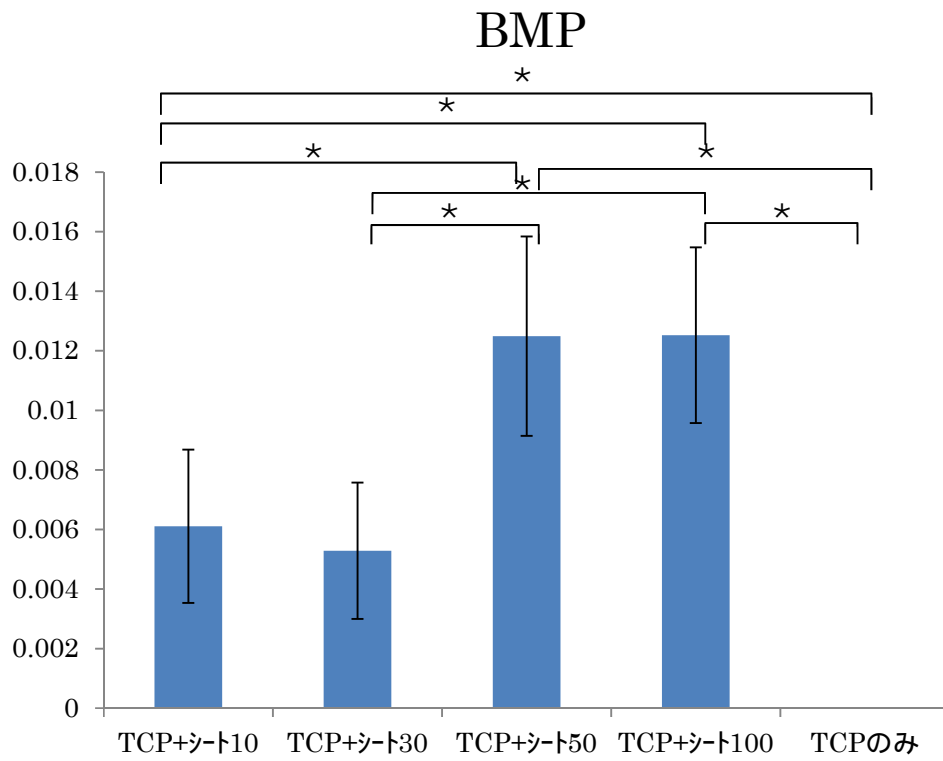
図5 骨形成マーカー発現量 (*In vivo*)



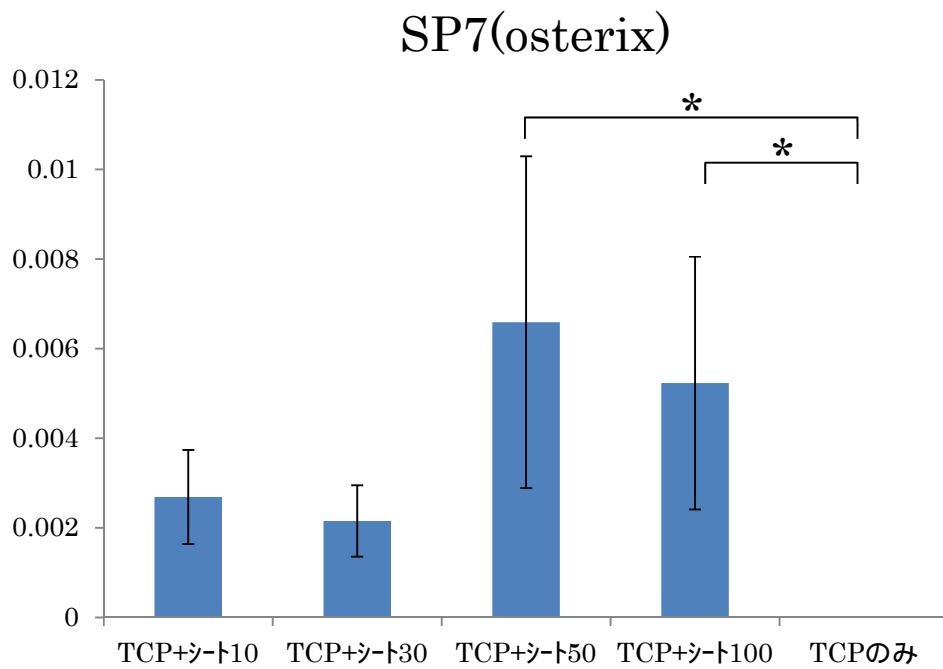
n=4 *P<0.05



n=4 *P<0.05

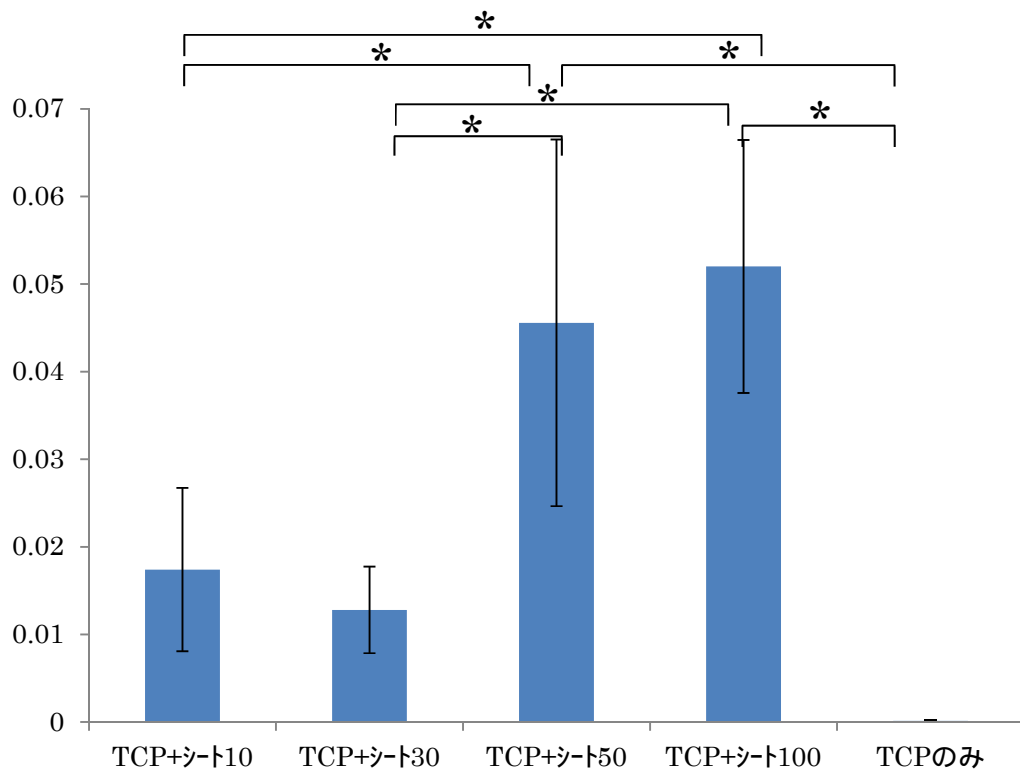


n=4 *P<0.05



n=4 *P<0.05

Runx2



n=4 *P<0.05

分担研究報告書

偽関節モデルにおける骨形成細胞シート注入移植による骨形成および骨癒合促進

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、患者から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の注入で、生体内で骨形成が得られるか検証した。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細胞シートを注入し、新生骨形成が得られるかを組織学的に観察するとともに、1 か月後に摘出し生化学的にも評価をおこなった。組織標本では、人工骨の気孔内に骨形成を認め、リアルタイム PCR 法でも骨形成マーカーの mRNA 発現量が、人工骨単独で移植した群と比べるとシートを注入した群で上昇していた。以上のことから、ヒト骨形成細胞シート注入による「注入型骨移植法」が、ラット等の動物細胞と同様に可能であることが示された。

本研究では、過年度に確立したヌードラット大腿骨偽関節モデルを用い、注射器で偽関節部へ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レントゲン評価に加え、12 週間後に大腿骨を摘出し組織学的に評価した。レントゲンでは明らかな骨癒合は得られず、組織学的にも偽関節部に軟部組織が介在し骨癒合は得られなかった。今回の検討では、人工骨へヒト細胞シートを注入移植し骨形成を認めたが、偽関節部への scaffold free でのヒト骨形成細胞シート注入移植では骨形成および骨癒合は得られなかった。今後は、骨癒合が得られなかった原因として細胞シート自体の問題であるのか、ヒト細胞を免疫不全動物に移植したモデルの問題であるのか検討する必要がある。

A . 研究目的

我々はこれまでに、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、皮下に移植した人工骨へ注射器を使って注入することで骨形成が得られるかを検証し、ヒトでも注入型骨移植が可能であることを明らかにする。

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

得られるかを検証する。また平成 24 年度確立したヌードラット大腿骨偽関節モデルに細胞シートを注入移植し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 . 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骨髓細胞は、38 歳男性の腸骨より採取した骨髓細胞である。細胞シート作製は、本研究の分担研究の一つとして検討をおこない決定した条件で作製した。

骨髓細胞を 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 (AsaP: 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 . 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、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、14G 注射針をつけた注射器を使用しヒト骨形成細胞シートを注入移植した。

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

-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への細胞シート注入移植

過年度に確立したヌードラットの大腿骨偽関節モデルを使用して細胞シート注入移植の効果を評価した。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髓細胞を使用しておこなった。本研究では、ヒト骨髓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 . 注入型骨移植法による人工骨への骨形成能の評価（組織像）

図 1 に移植後 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。注入した骨形成細胞シートによる新生骨形成であると考えられる。

C . 2 . 注入型移植法による人工骨への骨形成能の評価（生化学的評価）

図 2 に移植後 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 発現量は統計学的に有意に高値であった。このことから、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、人工骨に骨形成が認められていると考えられた。

C . 3 . 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評価

図 3 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 4 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ることも報告している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（ β -TCP）周囲に注入し、人工骨気孔内に骨形成が見られた。また、骨形成能の評価として、リアルタイム PCR 法による mRNA 発現量を定量評価した。 β -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。つまり、細胞シートの注入移植により人工骨に骨形成能を付与することができたことから、ヒト骨形成細胞シートを用いた「注入型骨移植」は可能であると考えられた。

しかし、ヌードラット偽関節モデルに細胞シート注入移植をおこなっても、レントゲンおよび組織学的に骨形成および骨癒合は確認できなかった。これは様々な要因が考えられる。注入という行為がヒト細胞シート自体にダメージを与えたため、細胞活性の低下をきたし偽関節という厳しい環境下で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。今回偽関節に対して 2 枚の細胞シートを注入移植したが、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あるか

と思われる。ヌードラットは免疫不全動物のため炎症系サイトカインの発現が抑制されている。そのため、骨形成にも少なからず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ため、免疫不全動物に作製した偽関節部という局所環境が細胞シートを用いた移植モデルとして好ましくなかったのかもしれない。

今後、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、骨形成細胞シートを用いた「注入型骨移植」に併用できる手技の検討も必要と考える。

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

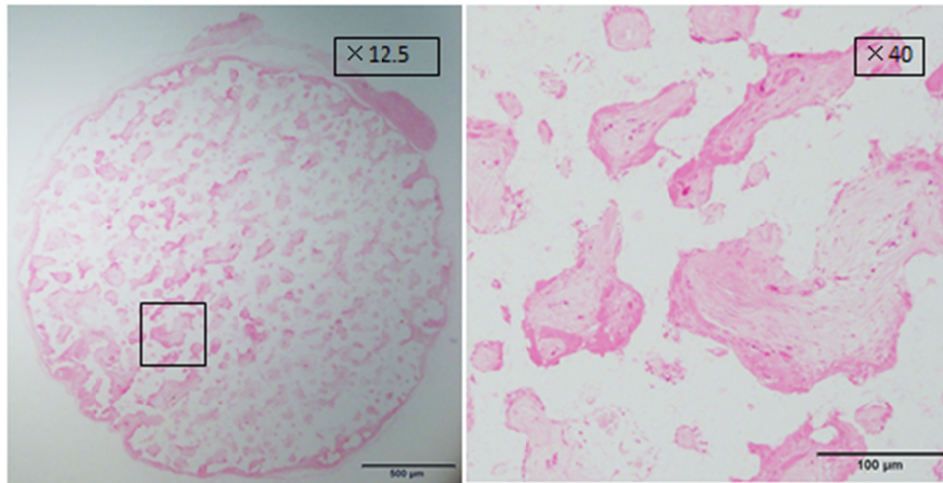
G . 参考文献

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 and 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.
6. M.Akahane, T.Ueha, T.Shimizu, Yusuke Inagaki, Akira Kido, Tomoaki Imamura, Kenji Kawate,

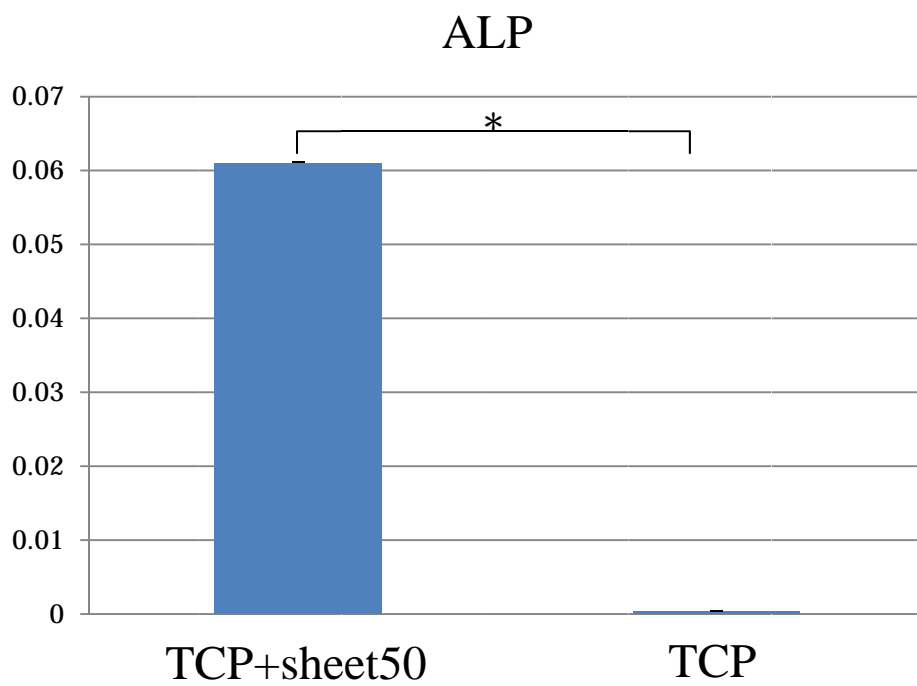
Yasuhito Tanaka. Increased osteogenesis with hydroxyapatite constructs combined with serially-passaged bone7.

marrow-derived mesenchymal stem cells. Stem Cell Discovery 2, 133-140, 2012.

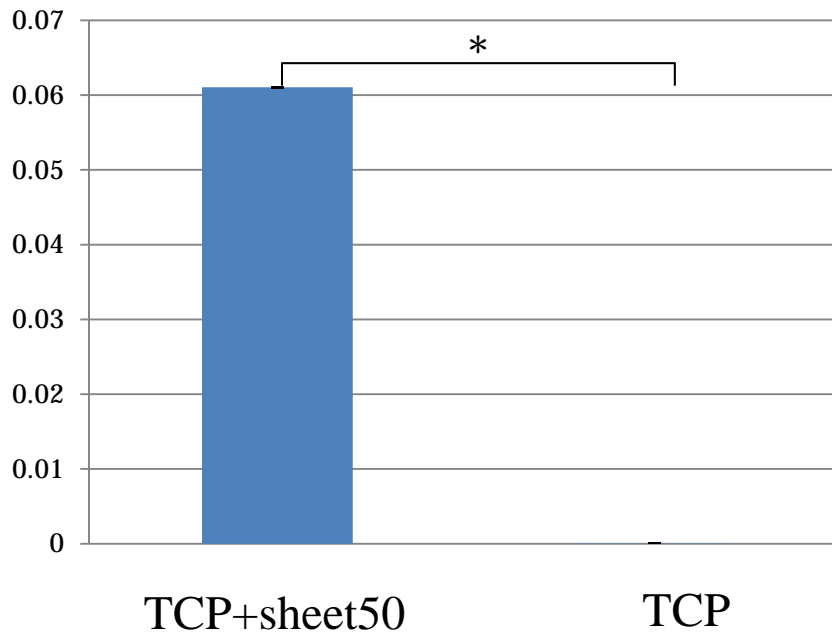
・ 図 1 注入型移植法による人工骨への骨形成能付与の評価結果（組織像）



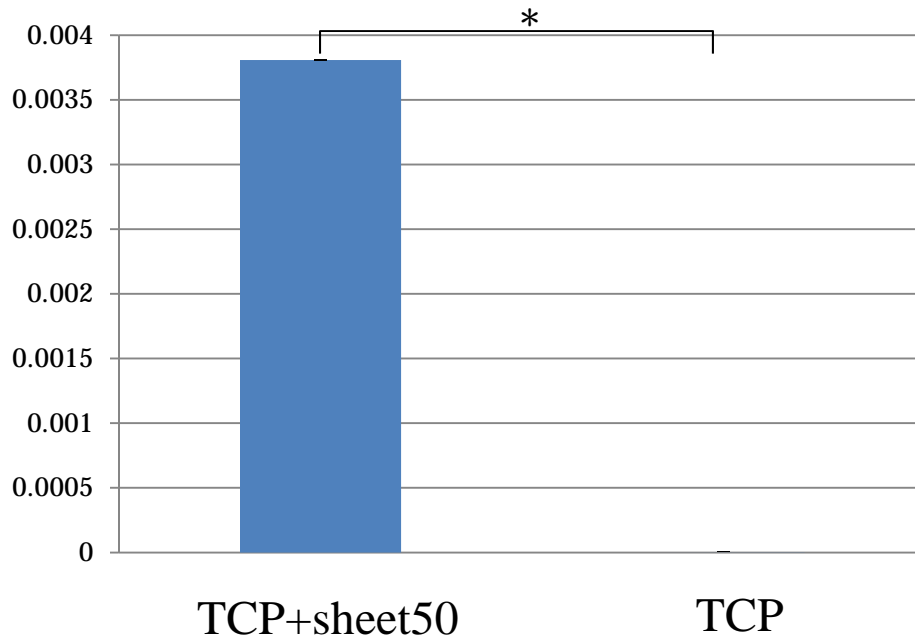
・ 図 2 注入型移植法による人工骨への骨形成能付与の評価結果（生化学的）

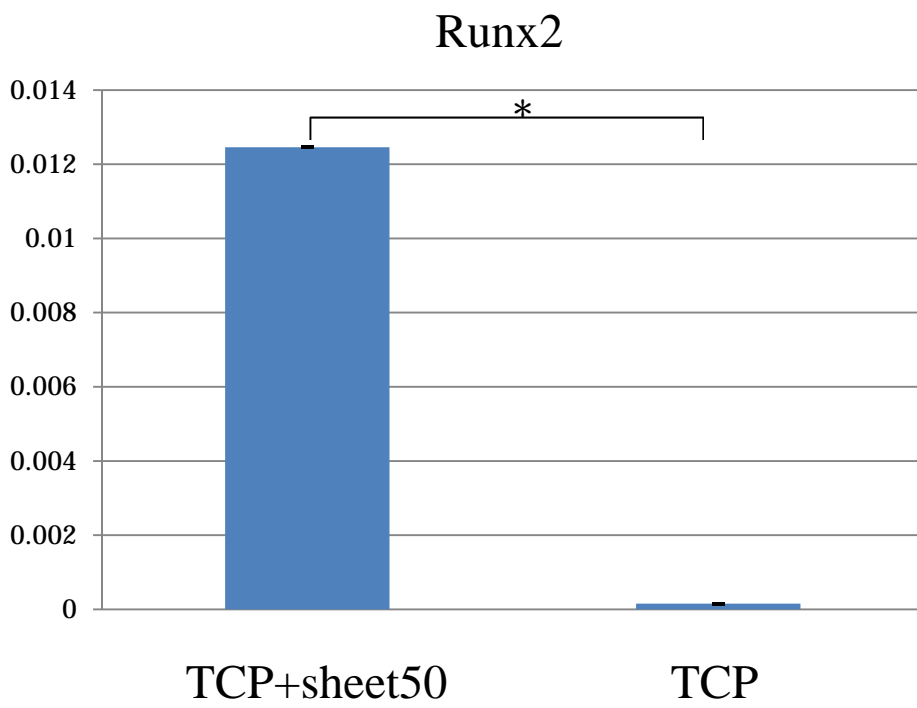
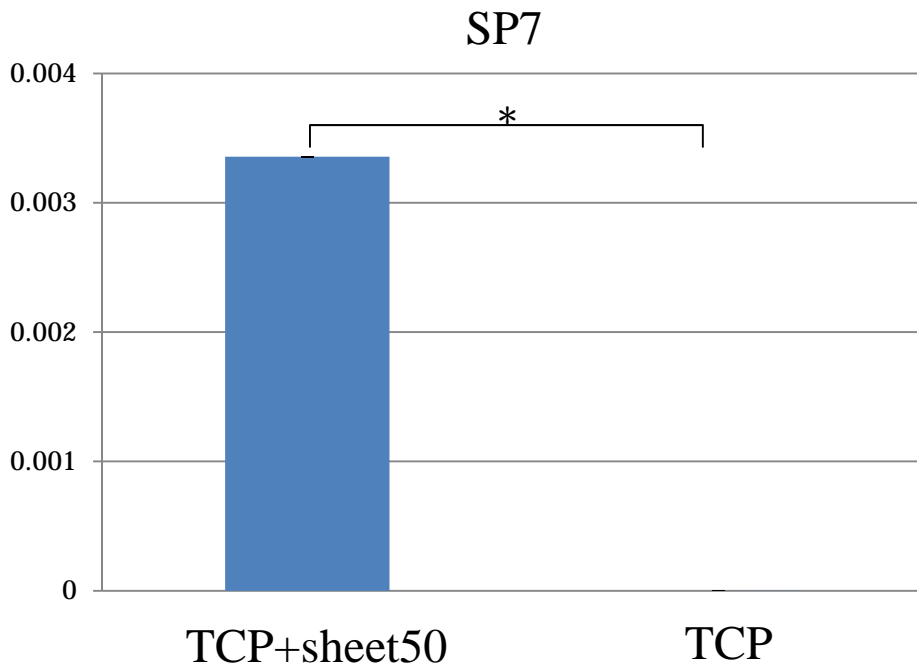


OC

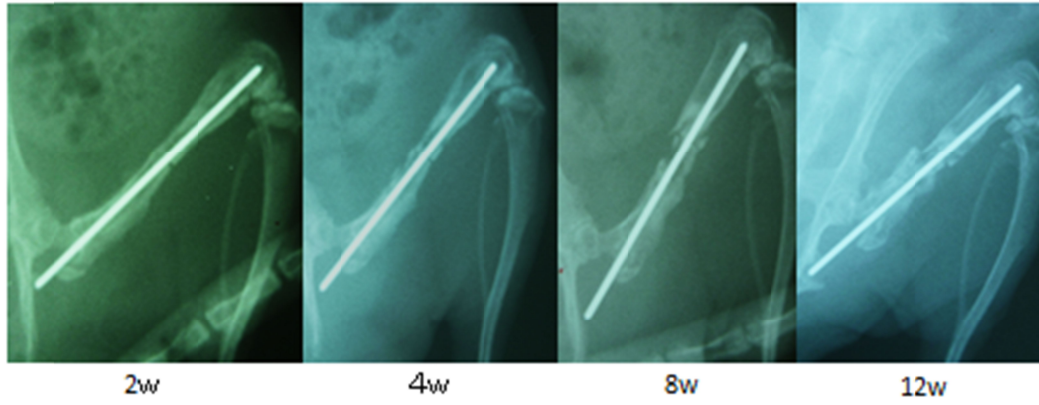


BMP2

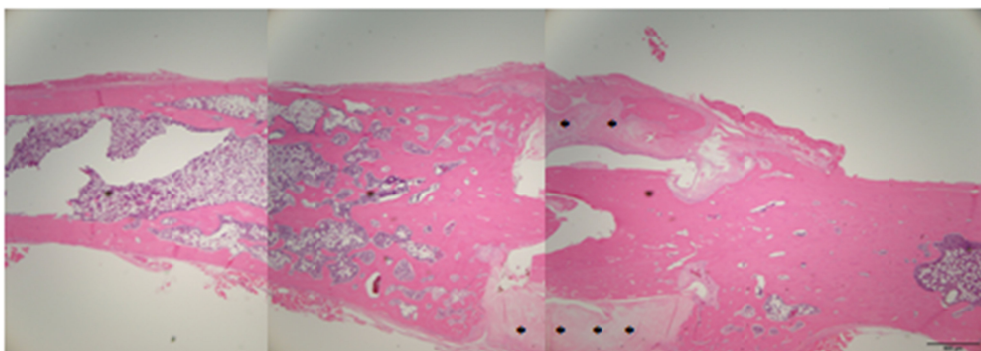




・ 図3 ノードラット大腿骨偽関節部における注入型骨移植のレントゲン結果



・ 図4 ノードラット大腿骨偽関節部における注入型骨移植の組織像



・ 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。μCT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^{1,2}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。

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. 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1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って、注入群とオープン群とを比較した。

B.4. μ CT撮影による偽関節の評価方法

X線 μ 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 μ 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、注入群とオープン群とを比較した。

X線 μ CT撮影の結果を加味することで偽関節モデルにおける骨切り部での骨癒合が明確に確認できる。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. 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.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 . μ CT 撮影による評価結果

図2に注入群の μ 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 . 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力学的評価の結果

図3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 ± 0.36 Nであり、注入群の最大曲げ荷重は 0.86 ± 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 ± 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

μ 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

μ 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 専用ジグによる3点曲げ試験(力学的評価)

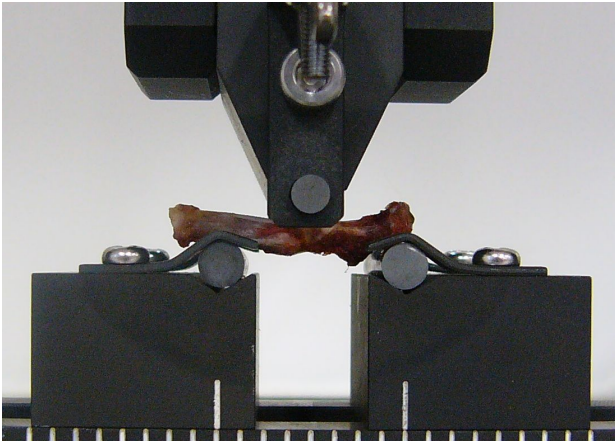
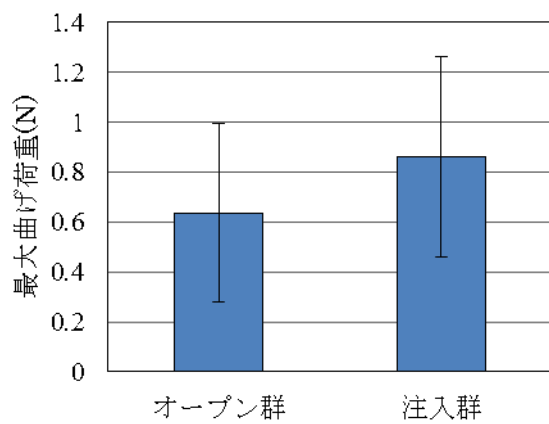


図2 注入群の μ CT画像



図3 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 (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; 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。

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ので、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皿では 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

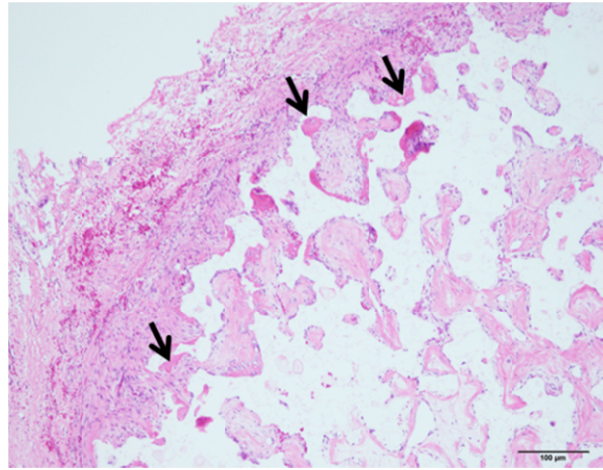
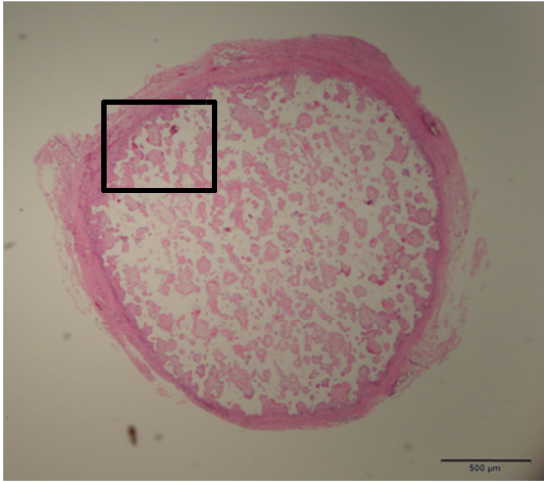
1. Ohgushi H, Dohi Y, Katuda T, et al. In vitro bone formation by rat marrow cell culture. *J Biomed Mater Res* 32: 333-340, 1996.
2. Ohgushi, H. and Caplan, A.I. (1999) Stem cell technology and bioceramics: From cell to gene engineering. *Journal of Biomedical Materials Research*, 48,913-927.
3. Sonal, 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, 2012.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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
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, 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性能の検討結果（組織像）

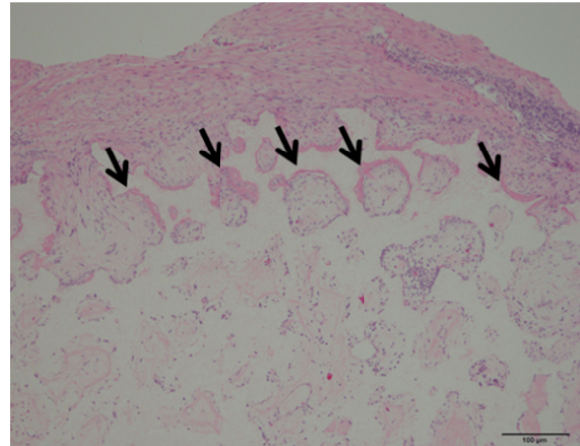
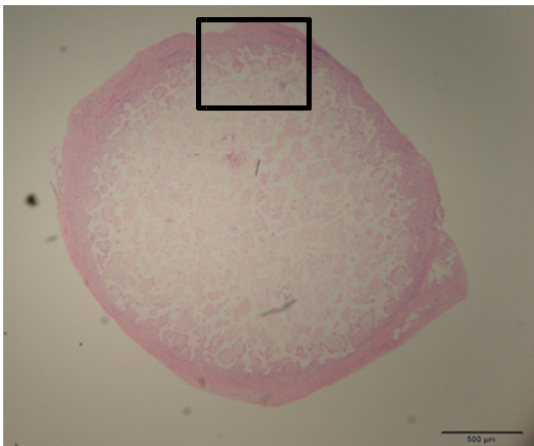
A. デキサメサゾン：10nM

左図の枠内の拡大写真



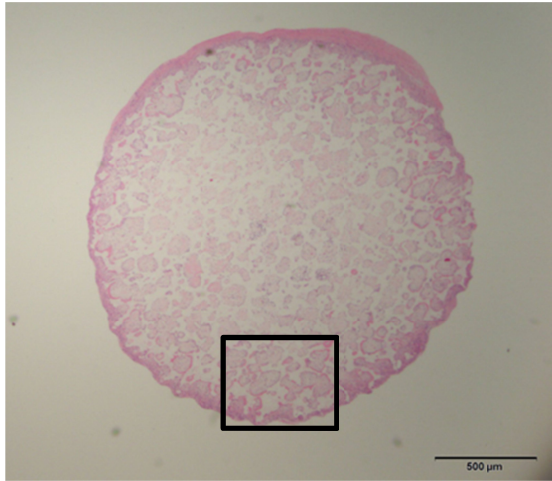
B. デキサメサゾン：30nM

左図の枠内の拡大写真

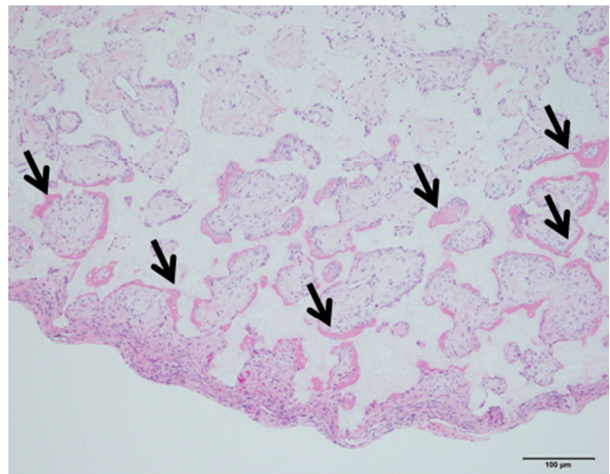


矢印は新生骨を示す

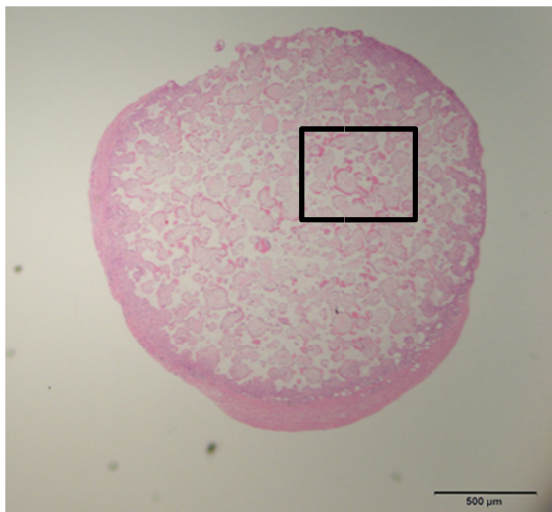
C. デキサメサゾン : 50nM



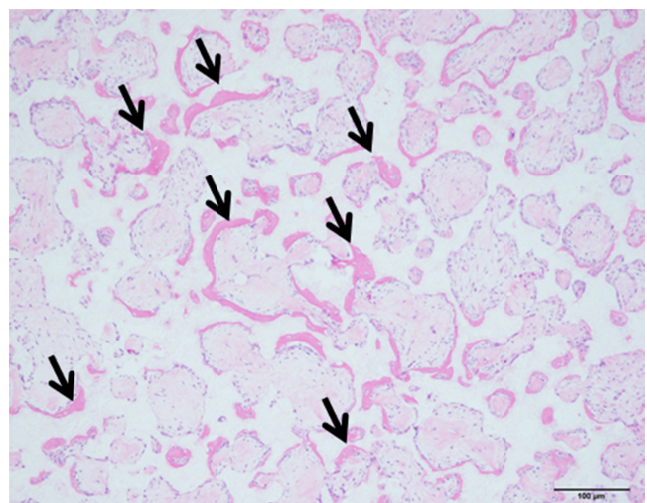
左図の枠内の拡大写真



D. デキサメサゾン : 100nM



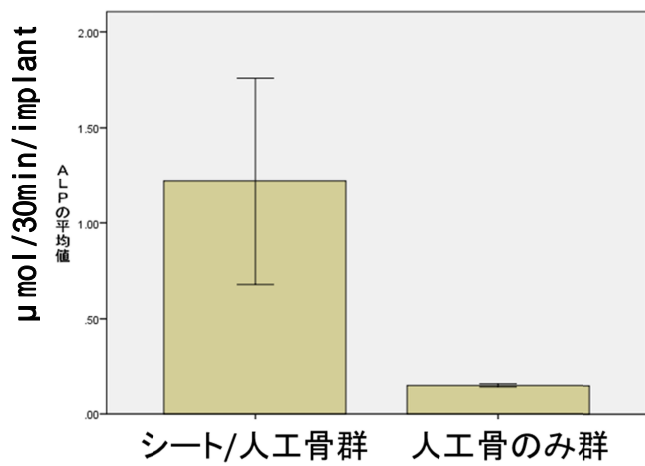
左図の枠内の拡大写真



矢印は新生骨を示す

図2 生体内での細胞シートの骨形性能の検討結果（生化学的評価）

アルカリフォスファターゼ活性



・ 研究発表に関する一覧表

・ 論文

	発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	頁	出版年
1	Yusuke Inagaki, Kota Uematsu, Manabu Akahane, Yusuke Morita, Munehiro Ogawa, Tomoyuki Ueha, Takamasa Shimizu, Tomohiko Kura, Kenji Kawate and Yasuhito Tanaka.	Osteogenic Matrix Cell Sheet Transplantation Enhances Early Tendon Graft to Bone Tunnel Healing in Rabbits.	BioMed Research International	84292	8	2013
2	T . Shimizu, M. Akahane, T. Ueha, A. Kido, S. Omokawa, Y. Kobata, K. Murata, K. Kawate, Y. Tanaka.	Osteogenesis of cryopreserved osteogenic matrix cell sheets.	Cryobiology.	66 (3)	326-332.	2013
3	Manabu Akahane, Tomoyuki Ueha, Takamasa 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(4)	133-140	2012
4	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	55 巻、11 号	1289-1292	2012

・ 学会発表

	発表者氏名	演題	学会名	日付	場所
1	Kenichi Nakano, Keiichi Murata, Takamasa Shimizu, Manabu Akahane, Shohei Omokawa, Yasuhito Tanaka.	Osteogenesis of Vascularized Tissue-Engineered Bone Scaffold	The 68th Annual Meeting of the American Society for Surgery of the Hand	2013/10/3-5	San Francisco, USA

2	中野健一、村田景一、清水隆昌、上羽智之、吉良務、赤羽学、面川庄平、川手健次、田中康仁	血管柄付き人工骨への血管誘導能および骨形成能の付与-骨芽細胞シートを用いて-	第33回整形外科バイオマテリアル研究会	2013/12/7	奈良ホテル(奈良)
3	中野健一、村田景一、清水隆昌、赤羽学、小島康宣、仲西康顕、吉良務、大西正宣、面川庄平、川手健次、田中康仁	血管柄付き人工骨作製における骨芽細胞シートの有用性	第20回奈良・横浜・京都バイオメカカンファレンス	2013/12/21	奈良県立医科大学(奈良)
4	吉良務、赤羽学、清水隆昌、中野健一、小泉宗久、川手健次、田中康仁	簡便な細胞シートの保存および輸送条件の検討	第33回整形外科バイオマテリアル研究会	2013/12/7	奈良ホテル(奈良)
5	倉知彦、赤羽学、清水隆昌、加藤優喜、森田有亮、上羽智之、内原好信、藤間保晶、川手健次、田中康仁	凍結保存骨髄間葉系幹細胞由来細胞シートの注入移植による骨形成能の評価	第28回日本整形外科学会基礎学術集会	2013/10/17-18	幕張メッセ、国際会議場(千葉)
6	清水隆昌、赤羽学、森田有亮、上羽智之、稲垣有佐、面川庄平、村田景一、小島康宣、藤間保晶、川手健次、田中康仁	大腿骨偽関節に対する骨芽細胞シートによる治療	第28回日本整形外科学会基礎学術集会	2013/10/17-18	幕張メッセ、国際会議場(千葉)
7	赤羽学、清水隆昌、上羽智之、稲垣有佐、倉知彦、内原好信、中野健一、藤間保晶、川手健次、今村知明、田中康仁	簡便な細胞シートの輸送条件の検討	第28回日本整形外科学会基礎学術集会	2013/10/17-18	幕張メッセ、国際会議場(千葉)

8	吉良務、清水隆昌、赤羽学、面川庄平、小畠康宣、村田景一、中野健一、仲西康顕、藤間保晶、川手健次、田中康仁	間葉系幹細胞シートへの皮弁に対する影響の検討	第28回日本整形外科学会基礎学術集会	2013/10/17-18	幕張メッセ、国際会議場（千葉）
9	中野健一、村田景一、清水隆昌、上羽智之、吉良務、赤羽学、面川庄平、川手健次、田中康仁	血管柄付き人工骨作製における骨芽細胞シートの有用性	第28回日本整形外科学会基礎学術集会	2013/10/17-18	幕張メッセ、国際会議場（千葉）
10	稲垣有佐、赤羽学、上松耕太、藤間保晶、小川宗宏、上羽智之、清水隆昌、田中寿典、川手健次、田中康仁	骨髄間葉系幹細胞の骨形成に対する低酸素環境の影響	第28回日本整形外科学会基礎学術集会	2013/10/17-18	幕張メッセ、国際会議場（千葉）
11	内原好信、赤羽学、森田有亮、中崎真太郎、上羽智之、清水隆昌、倉知彦、藤間保晶、川手健次、田中康仁	培養骨芽細胞シートによる放射線照射自家処理骨の骨形成	第28回日本整形外科学会基礎学術集会	2013/10/17-18	幕張メッセ、国際会議場（千葉）
12	赤羽学、清水隆昌、面川庄平、今村知明、田中康仁	細胞シート輸送をめざした保存条件の検討	第56回日本手外科学会学術集会	2013/4/18-19	神戸国際会議場（兵庫）
13	中野健一、村田景一、赤羽学、面川庄平、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56回日本手外科学会学術集会	2013/4/18-19	神戸国際会議場（兵庫）
14	稲垣有佐、上松耕太、赤羽学、小川宗宏、川手健次、田中康仁	骨形成細胞シートによる家兔移植腱骨孔間治癒の促進	第120回中部日本整形外科災害外科学会・学術集会	2013/4/5-6	ホテルアバローム紀の国（和歌山）

15	倉知彦、赤羽学、清水隆昌、藤間保晶、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注入移植による骨形成能の評価	第 120 回中部日本整形外科災害外科学会・学術集会	2013/4/5-6	ホテルアバローム紀の国（和歌山）
16	稲垣有佐、上松耕太、赤羽学、森田有亮、藤間保晶、小川宗宏、上羽智之、清水隆昌、倉知彦、川手健次、田中康仁	骨形成細胞シートによる移植腱骨孔間治癒の促進	第 19 回横浜・京都・奈良バイオメカニクスカンファレンス	2012/12/22	奈良県立医科大学（奈良）
17	藤間保晶、大串始、土肥祥子、谷掛洋平、岩田栄一郎、高澤伸、赤羽学、田中康仁	再生医療技術による組織構築～薬剤を用いた骨移植法の基礎的研究～成能の評価	第 19 回横浜・京都・奈良バイオメカニクスカンファレンス	2012/12/22	奈良県立医科大学（奈良）
18	倉知彦、赤羽学、清水隆昌、上羽智之、内原好信、藤間保晶、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による骨形成能の評価	第 19 回横浜・京都・奈良バイオメカニクスカンファレンス	2012/12/22	奈良県立医科大学（奈良）

・ 研究発表に関する参考資料

添付資料参照