

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24～25年度 総合研究報告書

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

・総合研究報告書

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. 市販ヒト骨髄間葉系幹細胞を用いた研究の方法	1-2
1. 市販ヒト骨髄間葉系幹細胞による骨形成細胞シート作製条件の検討	
2. ヒト骨形成細胞シート注入法の確立	
2. ノードラット大腿骨偽関節モデルの作製	1-3
3. 初期培養で得たヒト骨髄細胞を用いた研究	1-3
1. 初期培養で得たヒト骨髄細胞による骨形成細胞シート作製条件の検討	
2. ヒト骨形成細胞シート注入型骨移植法による人工骨への骨形成能の付与	
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移植	
4. ヒツジ骨髄細胞を用いた研究	1-4
1. ヒツジ骨形成細胞シートの作製	
2. ヒツジ骨形成細胞シートの骨形成能評価	
5. 倫理面での配慮	1-4
C. 研究結果	1-5
1. 市販ヒト骨髄間葉系幹細胞を用いた細胞シート作製条件	1-5
2. 細胞シート注入による骨形成の結果	1-5
3. ノードラット大腿骨偽関節モデルの確立	1-5
4. ヒト骨髄細胞の初期培養細胞を用いた骨形成細胞シート作製条件	1-5
5. 初期培養細胞で作製したヒト骨形成細胞シートの人工骨への注入	1-6
6. ノードラット大腿骨偽関節でのヒト骨形成細胞シートの骨形成能評価結果	1-6
7. ノードラット大腿骨偽関節へのヒト骨形成細胞シート注入による骨形成の結果	1-6
8. ヒツジ骨形成細胞シート作製結果	1-6
D. 考察	1-7
E. 研究発表	1-8
F. 知的財産の出願・登録状況	1-8
G. 参考文献	1-9
H. 図	1-11

1.	in vitro での細胞シート作製条件の検討結果	3-3
2.	生体内での細胞シートの骨形成能の検討結果 (組織像)	3-3
3.	細胞シートの骨形成能の生化学的検討結果	3-3
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	3-4
E.	考察	3-4
F.	研究発表	3-5
G.	知的財産の出願・登録状況	3-5
H.	参考文献	3-5
I.	図	3-7

4.	ヌードラット大腿骨偽関節モデルの確立	田中康仁
A.	研究目的	4-1
B.	研究方法	4-2
1.	ヌードラット偽関節モデルの作製	4-2
2.	移植標本の骨形成能の評価	4-2
3.	移植標本の骨形成能の評価	4-2
4.	3点曲げ力学的評価による偽関節の確認	4-2
C.	研究結果	4-3
1.	レントゲン画像による骨形成の経時的評価	4-3
2.	組織像	4-3
3.	力学試験結果	4-3
D.	考察	4-3
E.	研究発表	4-3
F.	知的財産の出願・登録状況	4-4
G.	参考文献	4-4
H.	図	4-6

5.	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	清水隆昌
A.	研究目的	5-1
B.	研究方法	5-2
1.	市販のヒト骨髄間葉系幹細胞を用いた研究の方法	5-2
1.	ヒト骨形成細胞シート注入法の検討	
2.	ヒト骨形成細胞シート注入法の検討	
3.	注入型骨移植法による人工骨への骨形成能の付与	

2.	ヒト骨髄初期培養細胞を用いた研究の方法	5-3
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	
2.	注入型骨移植法による人工骨への骨形成能の付与	
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	5-3
1.	ヌードラット偽関節モデルの作製	
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	
4.	倫理面での配慮	5-4
C.	研究結果	5-4
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	5-4
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	5-4
3.	ヌ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	5-4
D.	考察	5-4
E.	研究発表	5-5
F.	知的財産の出願・登録状況	5-5
G.	参考文献	5-5
H.	図	5-7

6. ヒト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方法の検討

森田有亮

A.	研究目的	6-1
B.	研究方法	6-1
1.	ラット大腿骨を用いた力学試験方法	6-2
2.	偽関節モデルの作製	6-2
3.	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	6-2
4.	μ CT撮影による偽関節の評価方法の検討	6-2
5.	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	6-2
6.	力学試験結果の統計学的検討	6-3
7.	倫理面での配慮	6-3
C.	研究結果	6-3
1.	偽関節モデルの μ CT撮影による評価結果	6-3
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 μ CT撮影による偽関節の評価結果	6-3
3.	偽関節モデルの3点曲げ試験による力学的評価の結果	6-3
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力学的評価の結果	6-3
D.	考察	6-4
E.	結論	6-4

F.	研究発表	6-4
G.	知的財産の出願・登録状況	6-4
H.	参考文献	6-4
I.	図	6-5

7. 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	7-1
B.	研究方法	7-1
1.	ヒツジ骨髄間葉系細胞の培養	7-2
2.	ヒツジ骨形成細胞シート作製	7-2
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)	7-2
4.	移植標本の骨形成能の評価	7-2
5.	測定結果の統計学的検討	7-2
6.	倫理面での配慮	7-2
C.	研究結果	7-2
1.	in vitro での細胞シート作製結果	7-2
2.	生体内での細胞シートの骨形成能の検討結果 (組織像)	7-3
3.	細胞シートの骨形成能の生化学検討結果	7-3
D.	考察	7-3
E.	結論	7-3
F.	研究発表	7-4
G.	知的財産の出願・登録状況	7-4
H.	参考文献	7-4
I.	図	7-6

.	研究発表に関する一覧表	8-1
---	-------------	-----

.	研究発表に関する参考資料	9
---	--------------	---

**厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）
総合研究報告書**

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骨形成細胞シートを 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た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。一般に偽関節治療は骨移植と強固な固定が必要であり、手術侵襲が大きいため患者の負担は大きい。また、骨癒合が得られるまでに長期を要する場合もあるため日常生活にも支障をきたす症例がある。低侵襲で早期に骨癒合が得られる手技が確立できれば偽関節治療の治療成績は向上する。

初年度は使用する細胞の条件を一定に保つことが重要であると判断し、市販（Lonza社）されているヒト骨髄間葉系幹細胞を用いて、ヒト骨髄間葉系幹細胞で骨形成細胞シート作製条件の検討をおこなった。また、ヌードラット大腿骨偽関節モデルの作製をおこなった。播種する細胞密度の検討では従来の動物実験で用いてきた細胞密度よりも少ない細胞数で骨形成が得られることが明らかとなった。デキサメタゾン濃度は10nMで播種する方が100nMで播種するよりオステオカルシン分泌量は多かった。

次年度は同意を得て採取した患者の骨髄細胞を用いて、細胞シート作製に適した培養条件を詳細に検討し、その骨形成能を免疫不全動物（ヌードラット）で確認した。また初年度に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、骨癒合促進効果を検証した。さらに大型動物であるヒツジを用いて細胞シートの作製と細胞シート移植による骨形成に関する実験を実施した。ヒト細胞シートの作製条件は市販の骨髄間葉系幹細胞と同様に $0.5 \times 10^4 \text{ cell/cm}^2$ で細胞を播種して作製しても十分骨形成が得られることが明らかとなった。デキサメタゾン濃度は高いほど骨形成マーカーの mRNA 発現が高かった。Western blotting 法では、デキサメタゾン濃度が低い方が細胞外基質の値が高いことが判明した。以上のことから、ヒト骨形成細胞シート作製条件は細胞播種濃度： $0.5 \times 10^4 \text{ cell/cm}^2$ 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判断した。この条件で作製した細胞シートを人工骨と組み合わせて皮下移植すると良好な骨形成が得られたが、ヌードラット大腿骨偽関節に直視下で移植あるいは、注入移植したところ、いずれも十分な骨癒合は得られなかった。その一方で、ヒツジ骨髄細胞で作製した細胞シートを人工骨と組み合わせて移植したモデルで十分な骨形成を得ることができたため、骨形成細胞シートによって骨形成を促進させることがヒトにおいても期待できる。

A．研究目的

我々はこれまで動物実験で骨髄間葉系幹細胞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。本研究ではヒト骨髄細胞で作製した細胞シートを用いて、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て検証した。本研究課題は、偽関節部に細胞シートを X 線透視下に注入移植し骨癒合を得られる低侵襲な手技を確立することである。そのために、初年度にヌードラット大腿骨に偽関節を安定的に作製する手技を確立し、次年度に偽関節部に細胞シートを注入することで骨形成が得られるかを検証した。

また、これまではラットやラビットでの動物実験で細胞シートの有用性について報告してきたが、大動物では実施していなかったため、ヒツジを用いて骨形成細胞シートの骨形成能評価に関する実験を行った。

B . 研究方法

B . 1 . 市販ヒト骨髄間葉系幹細胞を用いた研究の方法

B . 1 . 1 . 市販ヒト骨髄間葉系幹細胞による骨形成細胞シート作製条件の検討

本研究で使用した細胞は、Lonza 社で市販された 20 歳女性の骨髄間葉系幹細胞である。骨髄間葉系幹細胞を T75 フラスコ (75cm² culture flask, Falcon, BD) で 2 週間初期培養した後、2 次培養をおこないヒト骨形成細胞シートを作製した。

ヒト骨形成細胞シート作製における播種細胞密度とデキサメサゾン濃度の条件検索は 35 mm 培養皿 (35mm ディッシュ; Falcon 35-3001, BD) で検討した。細胞播種数は 1×10^4 cell/cm² あるいは 0.5×10^4 cell/cm²、デキサメサゾン濃度は 10nM あるいは 100nM の組み合わせで培養をおこなった。アスコルビン酸添

加量は 82 μg/ml とし培養液の交換は 2 ~ 3 日ごとにおこなった。骨形成能の評価を骨形成マーカーであるアルカリフォスファターゼ (ALP) 活性と培養液中の分泌オステオカルシン (OC) 量の定量をおこなった。また ALP と OC の mRNA 発現をリアルタイム PCR 法で定量した。

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

B . 1 . 2 . ヒト骨形成細胞シート注入法の確立

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、生体内の骨形成の検討を行った。移植した人工骨に 100mm ディッシュ (100mm ディッシュ; Falcon, BD) で作製したヒト細胞シートを注入移植した。さらに 60 mm 培養皿で作製した細胞シートを 1 つの人工骨に対して 2 枚注入移植した。注入法は 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 の PBS を注射器で吸引し細胞シートと混和させた。14G アンギオキャスを注射器に装着しヌードラット背部皮下へ刺入する。アンギオキャ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した。

移植後 2 カ月で標本を摘出しレントゲンと組織で骨形成を評価した。

B . 2 . ノードラット大腿骨偽関節モデルの作製

ヒト骨形成細胞シートの偽関節部における骨形成能評価のために、12 週齢の雄ノードラット (Fischer344 ラット ; F344/N Jcl-rnu/rnu) を用いて大腿骨偽関節モデルを確立した。

右大腿外側に皮膚切開し大腿骨に進出し、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剝離後、大腿骨から全周性に切除する。さらに大腿骨骨髓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。健側の大腿骨を対照群とし、比較検討を行った。評価はレントゲン、組織学および力学的に行った。

B . 3 . 初期培養で得たヒト骨髓細胞を用いた研究

B . 3 . 1 . 初期培養で得たヒト骨髓細胞による骨形成細胞シート作製条件の検討

平成 25 年度の研究では、27 歳女性の腸骨より採取した骨髓細胞を使用し、前年度に市販ヒト骨髓細胞で得られた細胞シート作製の条件を詳細に確認した。T75 フラスコ (75cm² culture flask, Falcon, BD) で 2 週間初期培養後、35 mm 培養皿 (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 (10・30・50・100nM) をそれぞれの組み合わせで前年度よりも詳細に検討し、細胞シート作製に適した条件を検索した。

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。

In vitro で検討した 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、ノ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、100 mm 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。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・人工骨複合体をノ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。

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

B . 3 . 2 . ヒト骨形成細胞シート注入型骨移植法による人工骨への骨形成能の付与

7 週齢ノードラット背部皮下へあらかじめ移植した人工骨 (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) に対して、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 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 量を測定した。

B . 3 . 3 . ヌ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移植

初年度は、12 週齢ヌードラット偽関節モデルの偽関節部に細胞シート移植をおこない、偽関節部における市販ヒト骨髄細胞から作製したヒト骨形成細胞シートの骨形成能の評価をおこなった。

偽関節部を直視下に、大腿骨を挟んで前後に 1 枚ずつヒト骨形成細胞シートの移植をおこなった。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に 12 週で大腿骨を摘出し H-E 染色による組織学的評価をおこなった (n=2)。力学的評価として 3 点曲げ試験をおこなった (n=4)。

次年度は、12 週齢ヌードラット大腿骨偽関節にスキャフォールドフリーで初期培養細胞から作製したヒト骨形成細胞シートの注入移植をおこい、偽関節の経過を観察した。

注入方法は大腿骨を挟んで前後に 1 枚ずつ注入した。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に 12 週で大腿骨を摘出し H-E 染色による組織学的評価をおこなった (n=2)。力学的評価として 3 点曲げ試験をおこなった (n=4)。

B . 4 . ヒツジ骨髄細胞を用いた研究

B . 4 . 1 . ヒツジ骨形成細胞シートの作製

2 歳オスヒツジの上腕骨頭より骨髄細胞を採取し、初期培養後、10 cm 培養皿に細胞播種濃度： 0.2×10^4 cell/cm² デキサメタゾン濃度：50 nM、アスコルビン酸濃度：82 μg/ml で 6 日間培養し細胞シートを作製した。培養液の交換は 2 あるいは 3 日ごとにおこなった。

B . 4 . 2 . ヒツジ骨形成細胞シートの骨形成能評価

ヒツジ骨形成細胞シートで人工骨 (-TCP:スーパーポア) 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)。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。

摘出標本を 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、アルカリフォスファターゼ (ALP) 活性の測定をおこなった。

B . 5 . 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細胞シートは免疫不全動物へ移植して、生体内での骨形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 . 市販ヒト骨髓間葉系幹細胞を用いた細胞シート作製条件

In vitro で細胞シートを作製時のデキサメサゾン濃度を 10nM と 100nM とを比較すると、デキサメサゾン 10nM のほうが 100nM よりもオステオカルシン分泌量が多い。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。

In vivo で β -TCP と細胞シートを組み合わせた組織像では、デキサメサゾンの濃度によらず、いずれも良好な骨形成が見られた(図1)。

抽出した β -TCP と細胞シートの組み合わせでは、 β -TCP 単独で移植したものより ALP およびオステオカルシンのいずれも高値を示した。デキサメサゾンの濃度で比較すると 10nM で作製した細胞シートとの組み合わせのほうが 100nM で作製した細胞シートとの組み合わせより高い値を示した。

以上により培養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。

図 2 に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人工骨に組み合わせ移植することやスキャフォールドフリーで移植することも可能であるため、ハンドリングは容易であった。

C . 2 . 細胞シート注入による骨形成の結果

細胞播種密度を $0.5 \times 10^4 \text{cell/cm}^2$ とし、デキサメサゾンの濃度による骨形

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。また、10 cm 培養皿や 6 cm 培養皿で作製した細胞シートを注入移植しても、人工骨内に良好な骨形成が認められた(図3)。

しかし、抽出した β -TCP のレントゲン像では、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は明らかでなかった。

C . 3 . ヌードラット大腿骨偽関節モデルの確立

経時的なレントゲン像で、偽関節群は術後 12 週まで骨性架橋は認められなかった。組織像でもレントゲン像と同様に偽関節群は骨折部の骨性架橋を認めなかった。骨折部には繊維性組織が介在しており、骨切り後 12 週では骨切り部の皮質骨の萎縮を認めた。

また μCT 画像でも骨切り部周囲に新生骨を認めず、骨切り部の骨癒合を認めなかった。

3 点曲げ試験による力学試験では、偽関節の最大曲げ荷重は健側群と比べて有意に低かった。以上によりヌードラットの大腿骨に安定して偽関節を作製する手技を確立できた。

C . 4 . ヒト骨髓細胞の初期培養細胞を用いた骨形成細胞シート作製条件

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 量はデキサメサ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) 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 では、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 50nM の方が高かった。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く、ハンドリングが容易であろうと推測できた。

人工骨に細胞シートを組み合わせヌードラット大腿骨皮下へ移植後 2 カ月で摘出した組織像ではいずれの条件でも人工骨内に骨形成が認められたが、デキサメタゾン濃度が高い方が良好な骨形成が認められた (図 4)。人工骨と細胞シートを組み合わせ 2 か月後摘出したサンプルの mRNA 量は人工骨単独群より有意に高値であり、デキサメタゾン濃度が高いほうが高値であった。

以上により培養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。

C . 5 . 初期培養細胞で作製したヒト骨形成細胞シートの人工骨への注入

注入移植後 1 か月目に摘出した -TCP の組織像では人工骨内に骨形成を認めた。

摘出した標本のリアルタイム PCR 法による mRNA は -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) は統計学的に有意に高値であった。

C . 6 . ヌードラット大腿骨偽関節でのヒト骨形成細胞シートの骨形成能評価結果

経時的なレントゲン像で、偽関節部

は術後 12 週まで骨性架橋は認められなかった。組織像でもレントゲン像と同様に偽関節部は骨性架橋を認めず、線維性組織が介在していた。3 点曲げ試験による力学試験では、細胞シートを移植した群と偽関節モデルでは、偽関節の最大曲げ荷重に差は認められなかった。

C . 7 . ヌードラット大腿骨偽関節へのヒト骨形成細胞シート注入による骨形成の結果

大腿骨偽関節部に細胞シートを注入移植したが経時的なレントゲンでは偽関節部を架橋する骨形成は認めなかった。注入後 12 週の組織像でも偽関節部に線維組織の介在を認めた。力学試験でもシート注入群は偽関節群と比較して差は認めなかった。

C . 8 . ヒツジ骨形成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く、ヒツジ骨形成細胞シート作製は 6 日間程度で可能であった。

分化にかか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、培養皿を表面加工されたもの (プライマリア Falcon, BD, USA) にすれば可能であることが明らかとなった。デキサメタゾン濃度は、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 デキサメタ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。生化学的評価では、-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の細胞を用いて、骨形成能を有する「骨形成細胞シート」を作製し、その有用性を報告してきた。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報告している⁴⁻⁹。

本研究では、ヒト骨髄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とは異なる条件であることが判明した。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ヌードラットに移植したところ人工骨内に骨形成が見られた。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。また、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ため、注射針の径を大きくするなど注入方法について、今後検討する必要があると考える。

より臨床にそったかたちで検討するため、患者腸骨より採取したヒト骨髄細胞を用いた実験もおこなった。骨形成細胞シートを作製する条件では、デキサメタゾン濃度が高いほど骨形成マーカーは高い値を示したが、細胞外基質はデキサメタゾン濃度が低い方が高値を示した。これは実際の取り扱いでもデキサメタゾン濃度が高い方が破損しやすくハンドリングが困難であった。

市販の細胞である骨髄間葉系幹細胞と患者腸骨より採取した骨髄細胞から骨形成細胞シート作製条件は異なっていた。患者腸骨から採取した骨髄細胞には様々な分化した細胞が含まれていることも関係している可能性がある。決定した条件で細胞シートを作製し、大腿骨偽関節部に直視下・注入の方法で移植をおこなったが偽関節部に骨癒合は得られなかった。原因としては細胞シートの骨形成能が偽関節部を癒合させるほどの骨形成能を有していない可能性が考えられる。また、免疫不全動物を使っているために、偽関節部での骨形成機構がうまく働いていない可能性もある。偽関節部を骨癒合させるには、細胞シートの枚数を増やして移植したり、骨形成能を高めるために新たに何らかの骨形成因子を加えたりする必要があると考える。

その一方で、ヒツジを用いた実験ではヒツジ骨形成細胞による骨形成が確認できた。ヒツジを用いた大動物実験は、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、プライマリア培養皿を使用すれば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、使用する培養皿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組織学および生化学的評価で、十分な骨形成が確認できたため、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。

本研究課題によって、将来のヒト骨形成細胞シートの臨床応用への有用な

成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

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 老齡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健骨孔間治療の促進 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

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 . 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

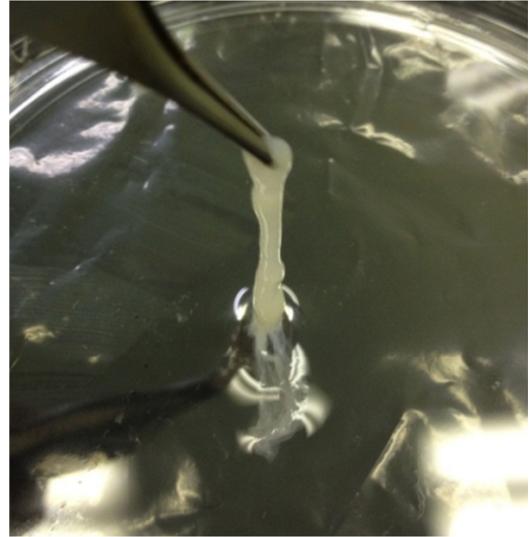
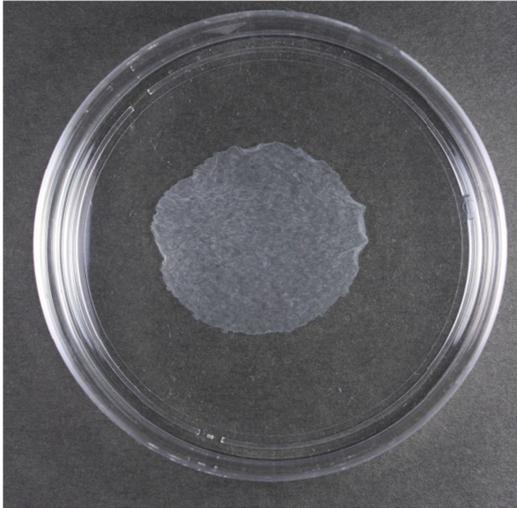
なし

H . 参考文献

1. 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. 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.
7. Manabu Akahane, Tomoyuki Ueha, Yoshiko Dohi, Takamasa Shimizu, Yasuaki Tohma, Akira Kido, Kenji Kawate, Tomoaki Imamura,

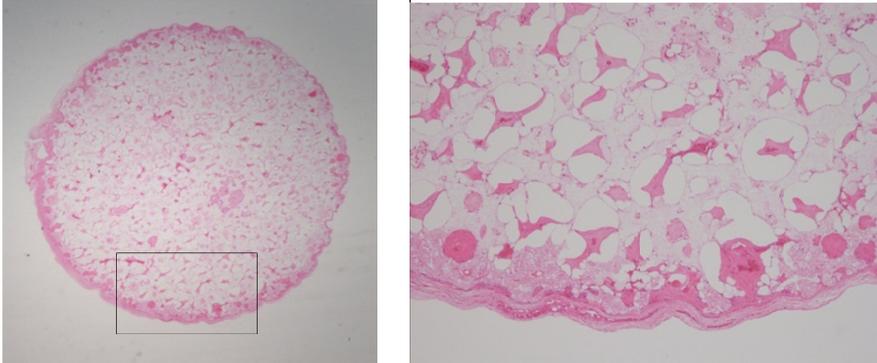
- Yasuhito Tanaka. Secretory osteocalcin as a non-destructive osteogenic marker of tissue engineered bone. *J Orthop Sci.* 2011 Sep;16(5):622-628.
8. M.Akahane, T.Ueha, T.Shimizu, Yusuke Inagaki, Akira Kido, Tomoaki Imamura, Kenji Kawate, Yasuhito Tanaka. Increased osteogenesis with hydroxyapatite constructs combined with serially-passaged bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cell Discovery* 2, 133-140, 2012.
9. 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 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

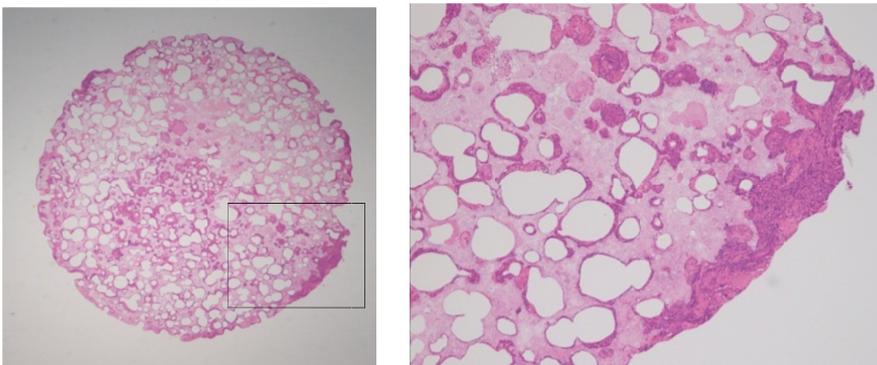


・ 図2 注入移植による細胞シートの骨形成能の検討結果（組織像）

A 100mm細胞シートを注入した人工骨の組織像

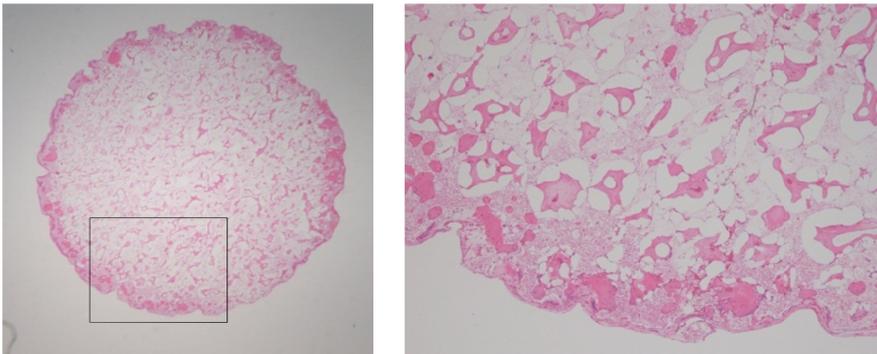


(Dex 10 nM で細胞シート作製)

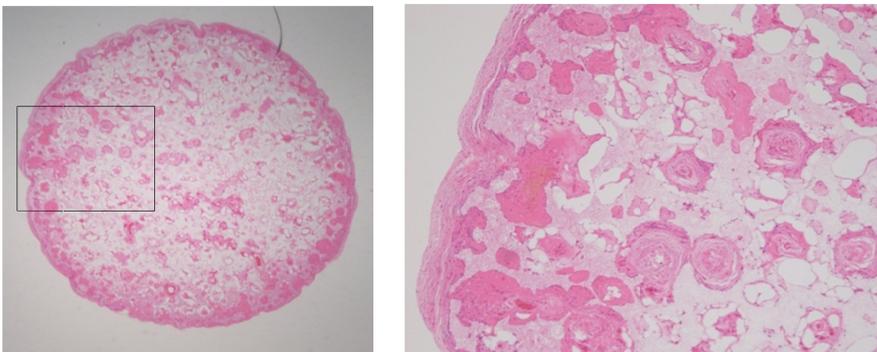


(Dex 100nM で細胞シート作製)

B 60mm細胞シートを注入した人工骨の組織像



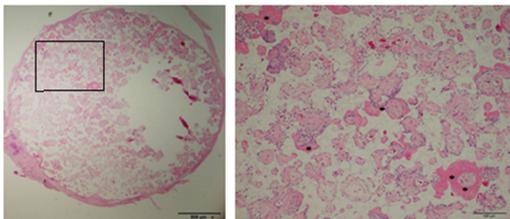
(Dex 10 nM で細胞シート作製)



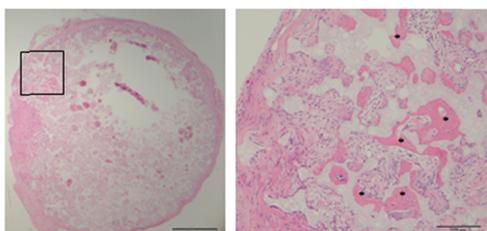
(Dex 100nM で細胞シート作製)

図3 生体内での細胞シートの骨形成能の検討結果（組織像）

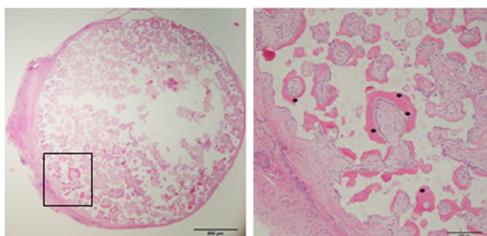
Dex:10nM



Dex:30nM



Dex:50nM



Dex:100nM

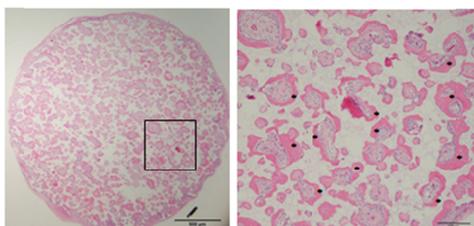
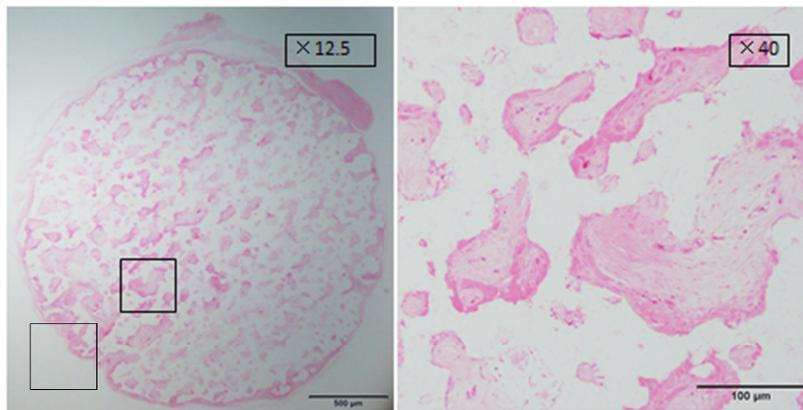


図4 注入型移植法による人工骨への骨形成の評価（組織像）



**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量の定量を行った。

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量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、小畠康宣、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、小畠康宣、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、小畠康宣、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、小畠康宣、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

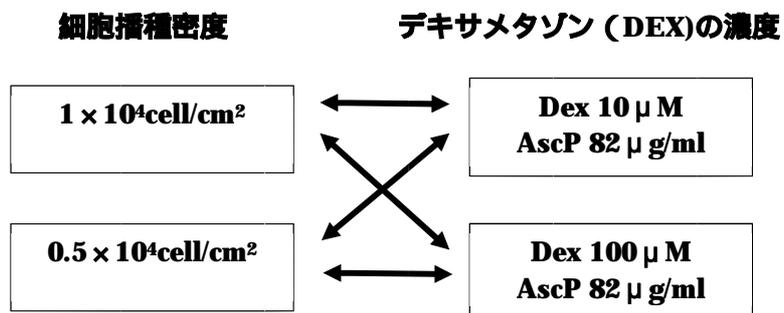


図2 ノードラットへの移植実験のイメージ図

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

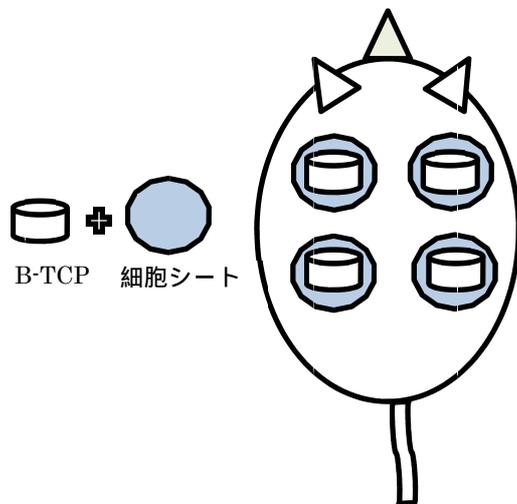


図3 ヒト骨髄間葉系幹細胞から作製したヒト骨形成細胞シート

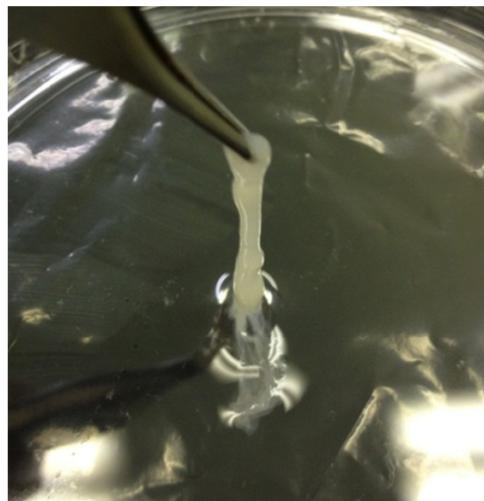
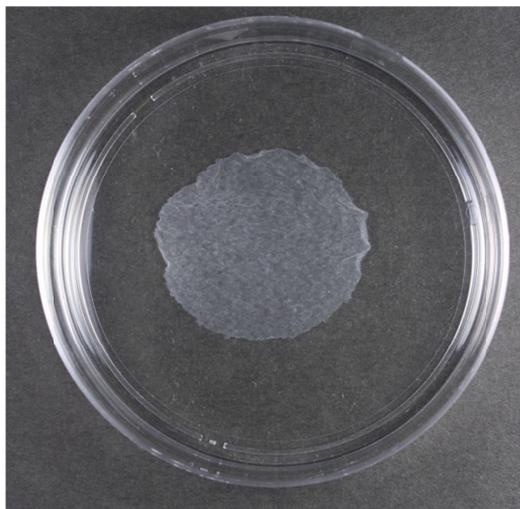
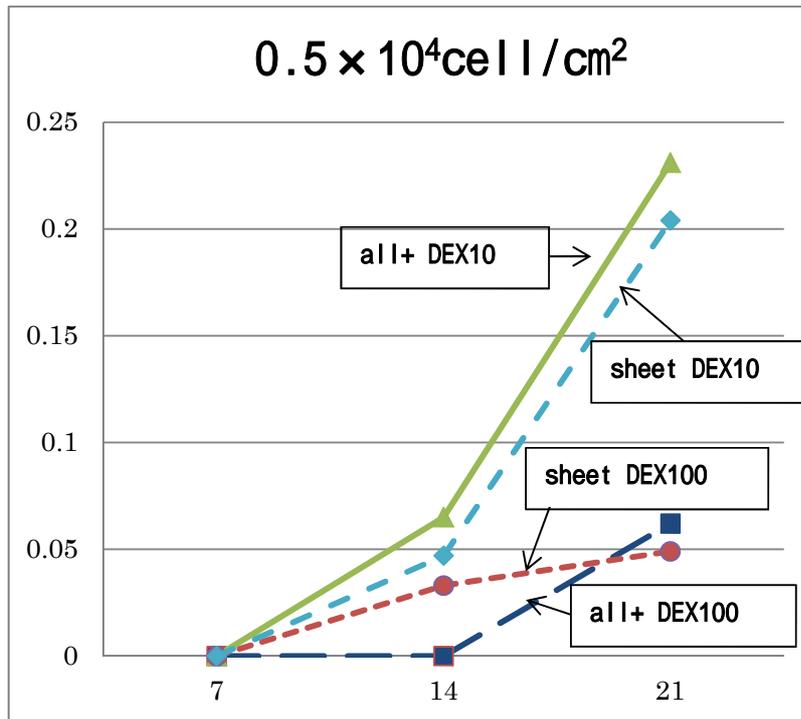
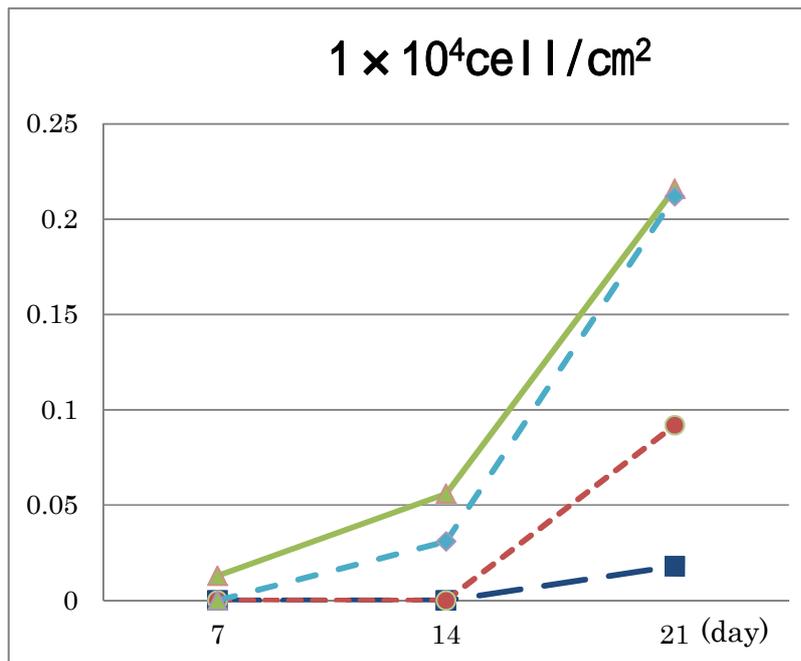


図4 分泌オステオカルシン量の経時的変化 (*In vitro*)

A. 低細胞密度での播種



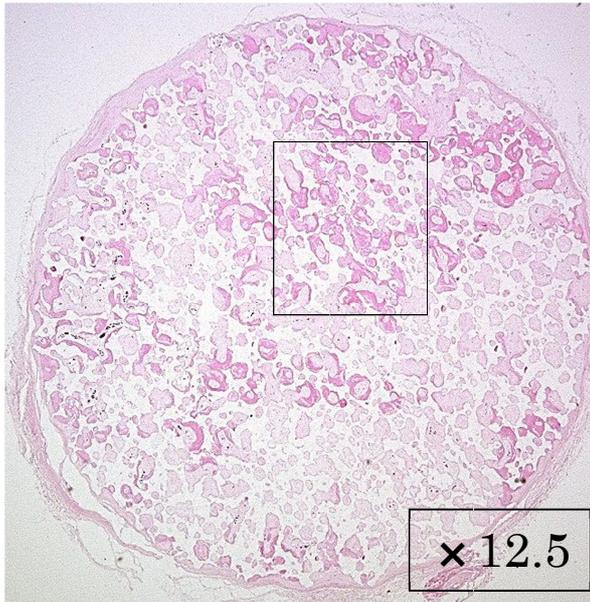
B. 高細胞密度での播種



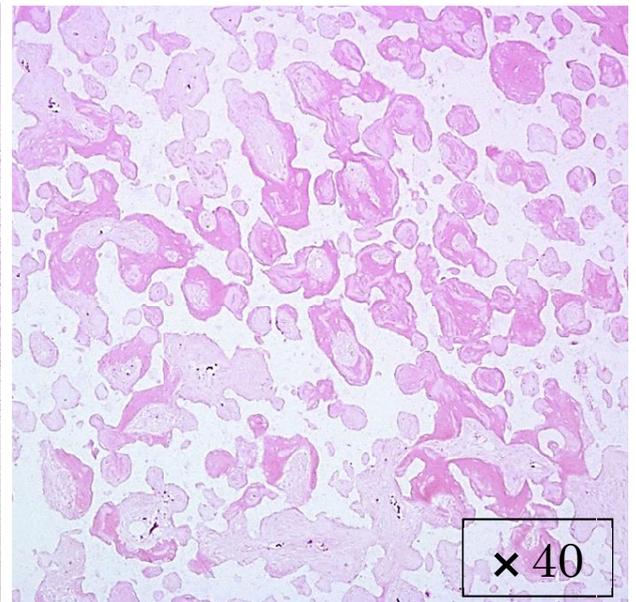
all+ : DEX+ AscP+ GP、
 sheet: DEX+ AscP (骨芽細胞シート)
 DEX10: デキサメサゾン 10 μM 、
 DEX 100 : デキサメサゾン 100 μM

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）

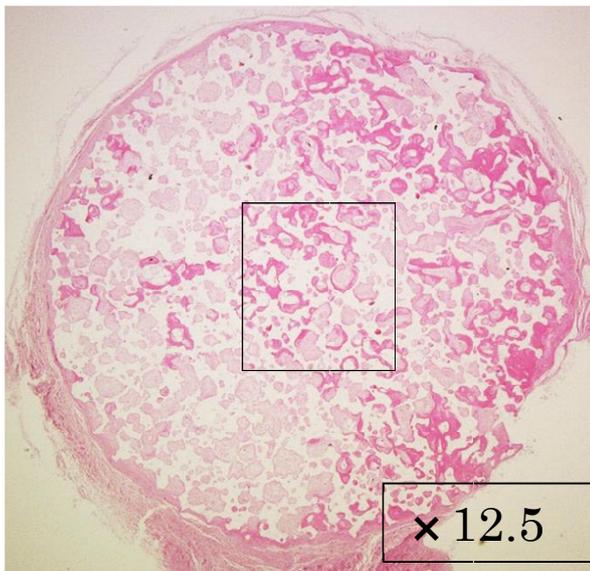
A. デキサメサゾン：10nM



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

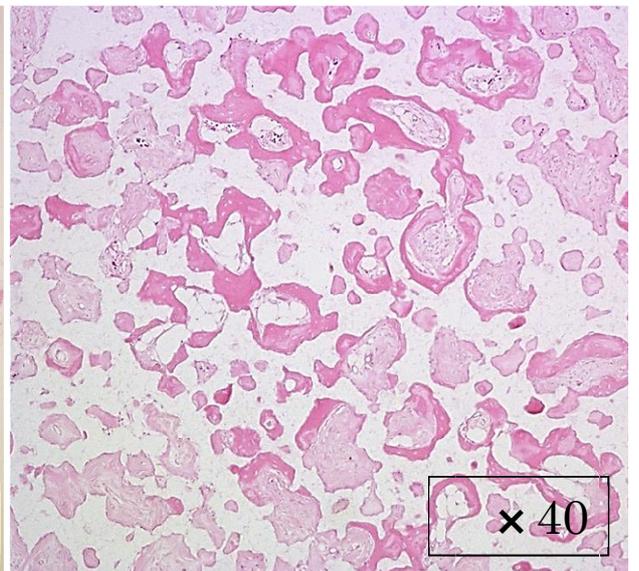
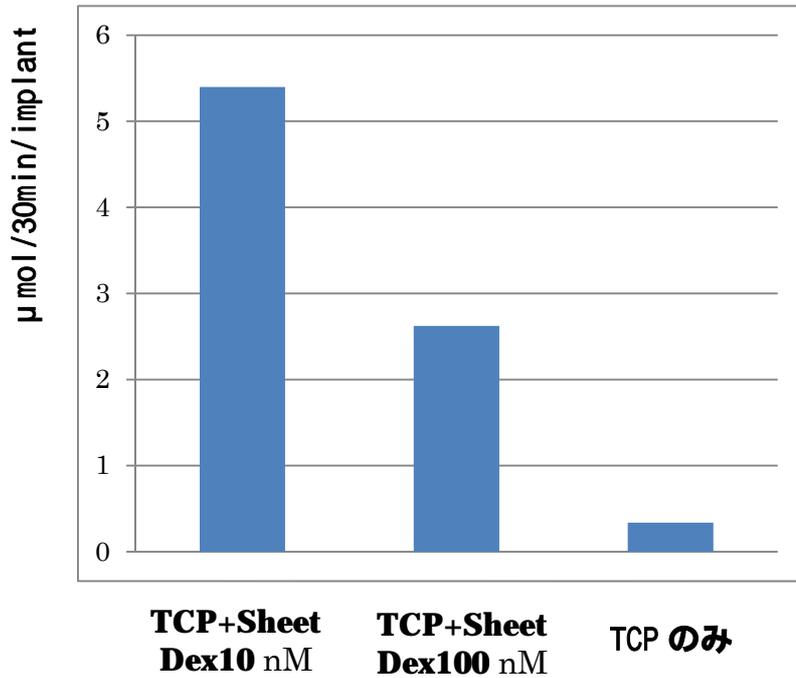
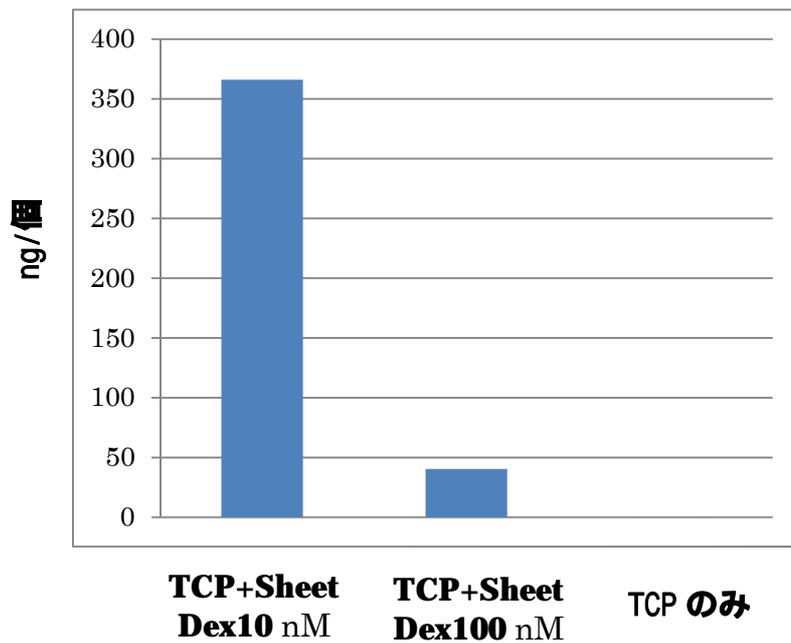


図6 生体内での細胞シートの骨形成能の検討結果（生化学的評価）

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



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、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 $1 \times 10^4 \text{ cell/cm}^2$ 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 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

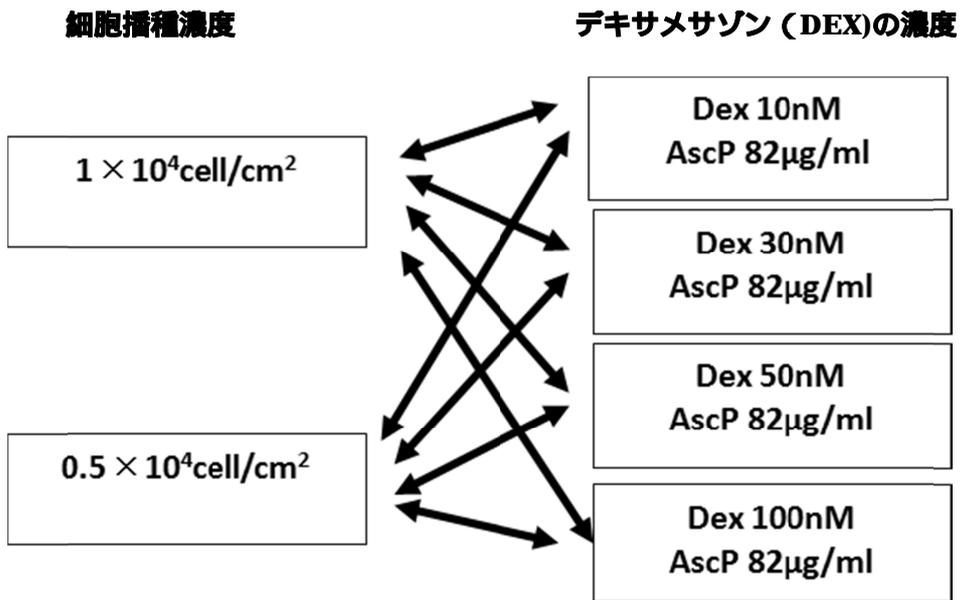
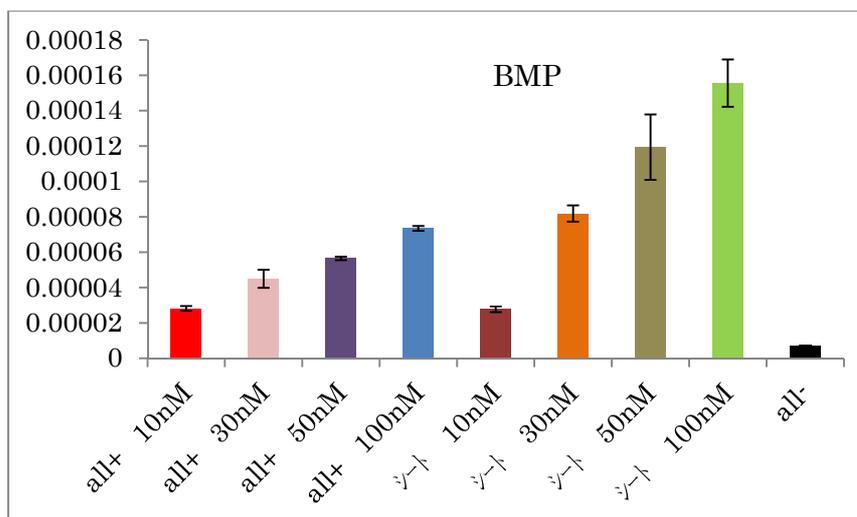
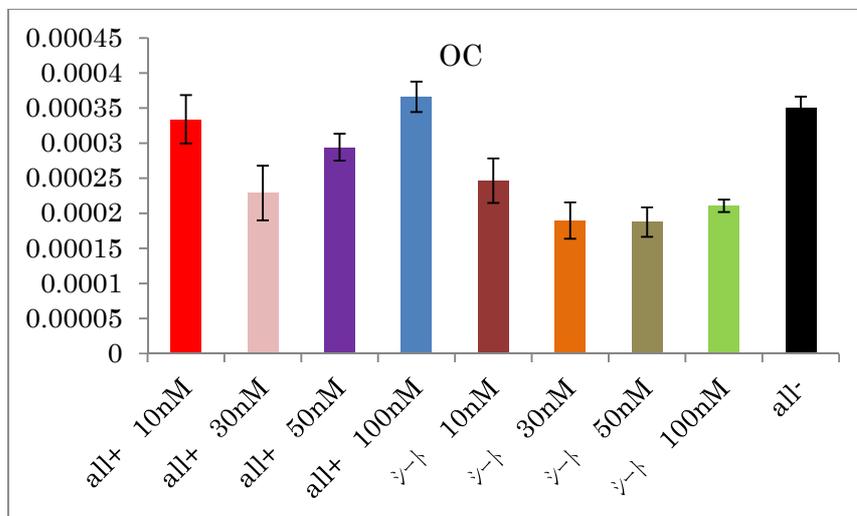
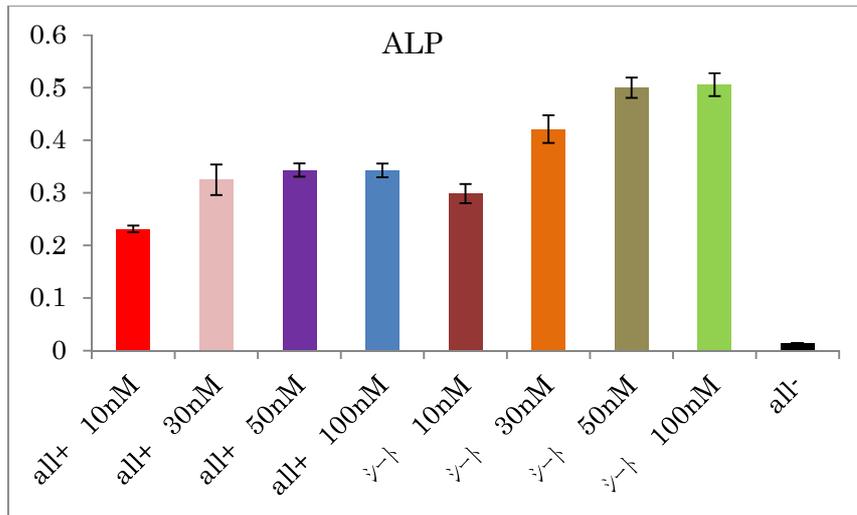
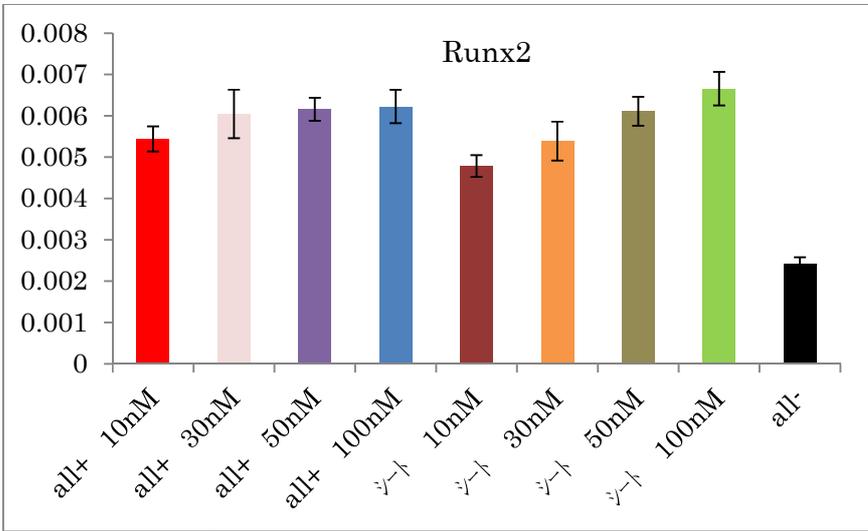
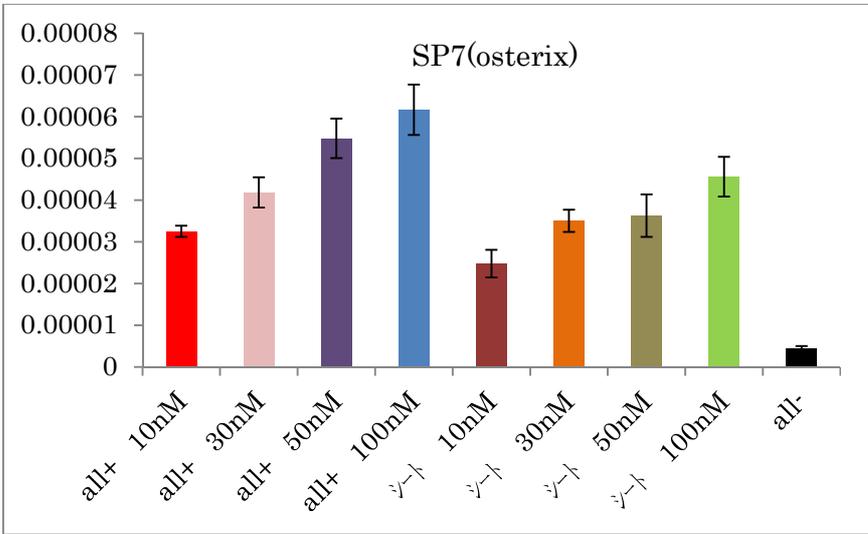


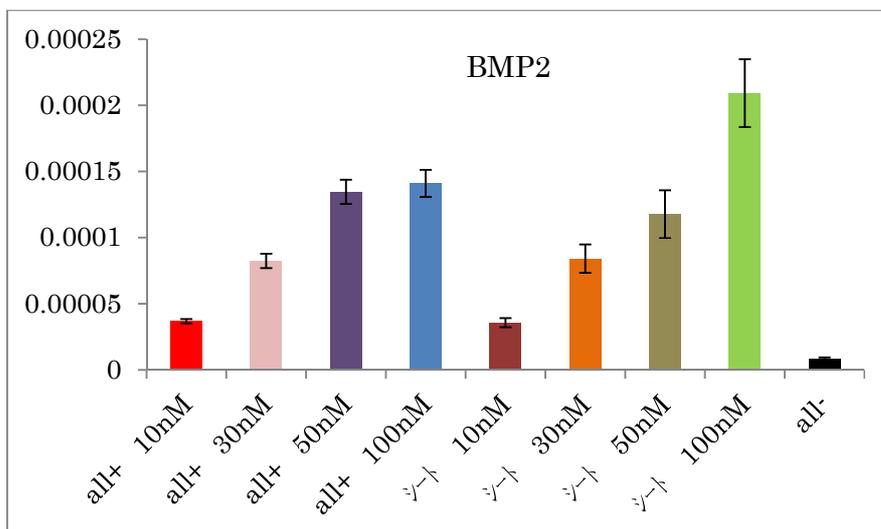
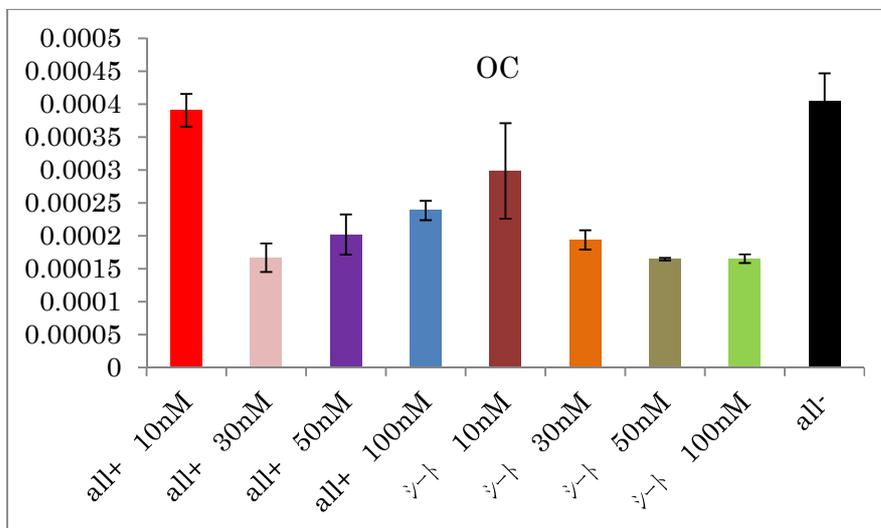
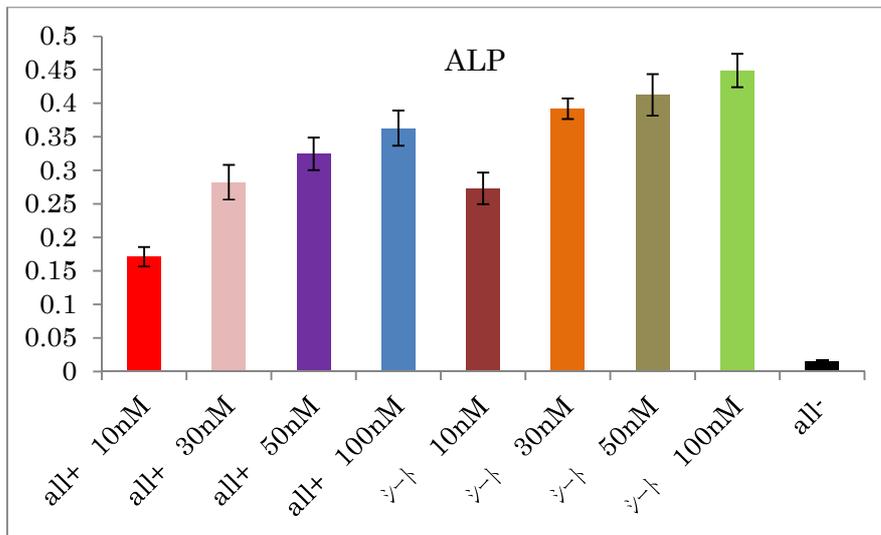
図2 骨形成マーカーの遺伝子発現量 (In vitro)

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





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



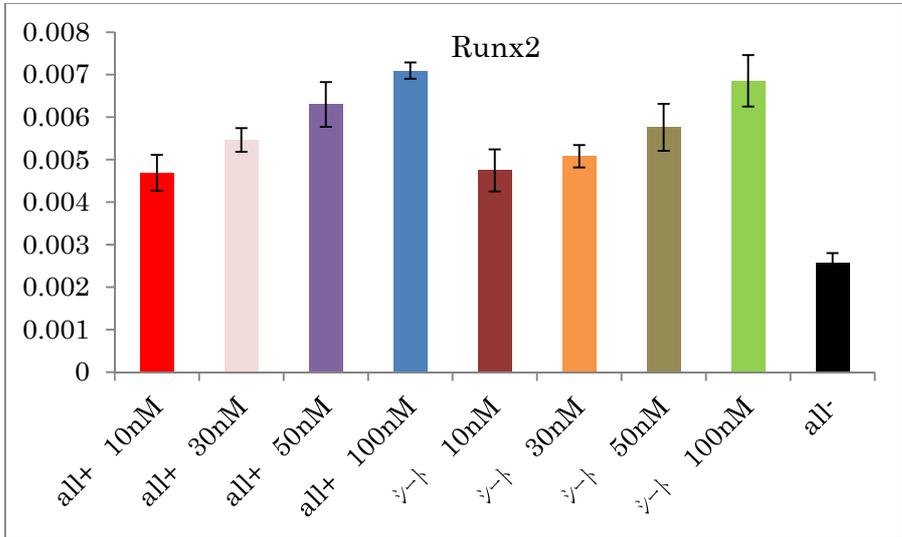
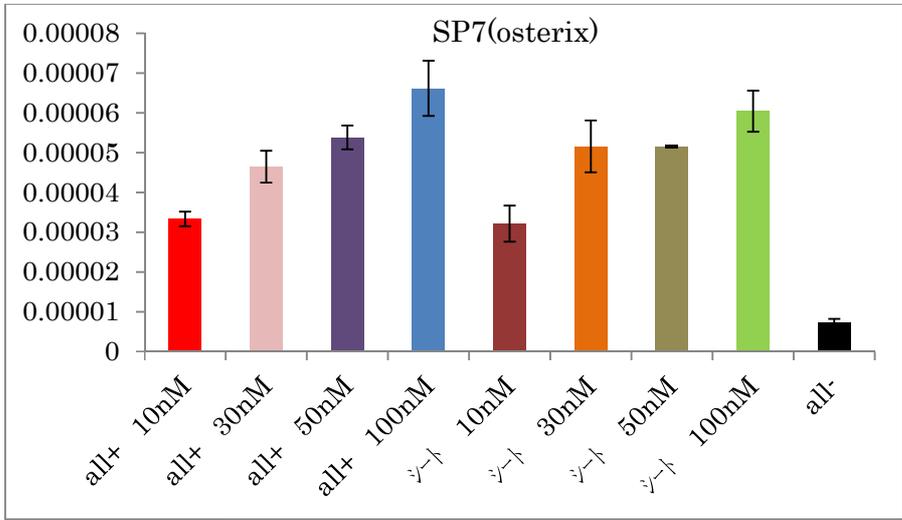
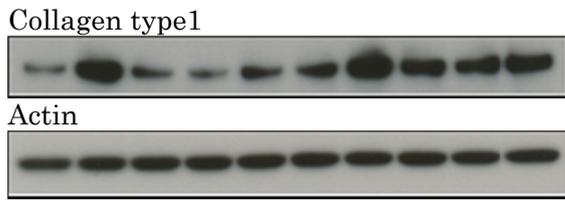
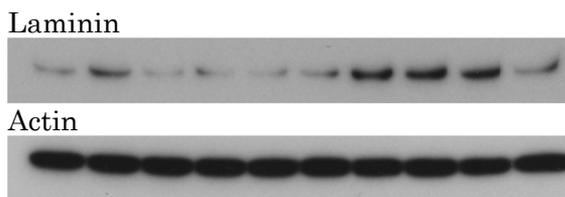
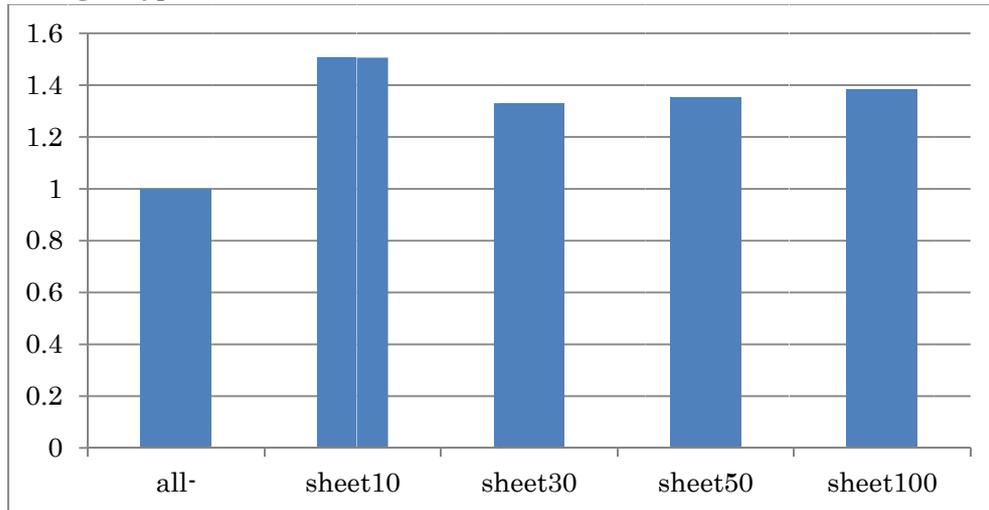


図3 細胞外基質の発現量の評価 (Western blotting)



Collagen type 1 発現量 (actin で補正)



Laminin 発現量 (actin で補正)

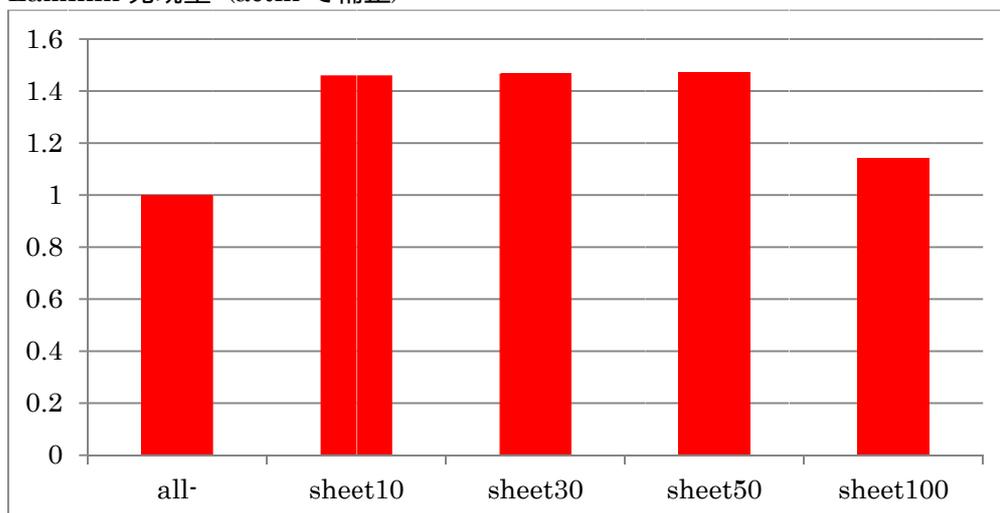
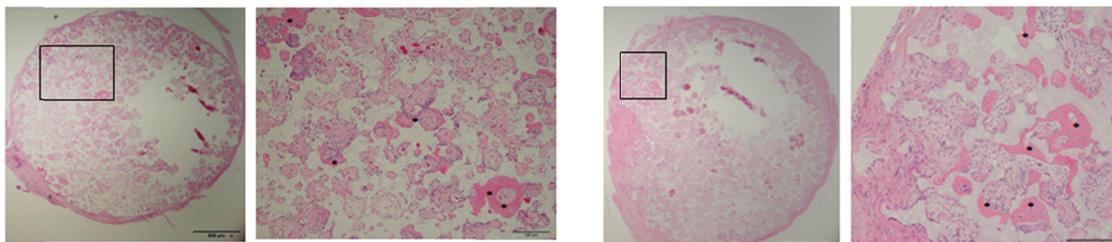


図4 生体内での細胞シートの骨形成能の検討結果（組織像）

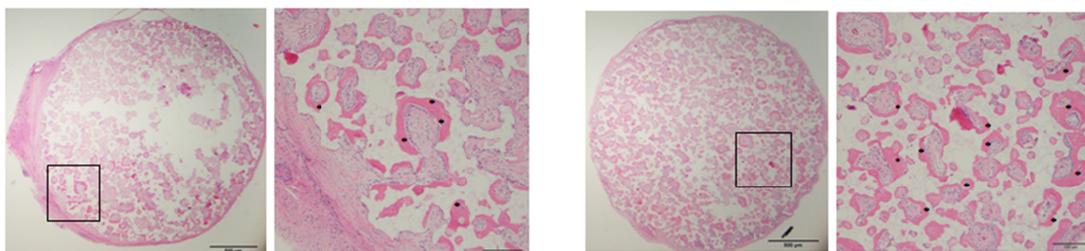
Dex:10nM

Dex:30nM



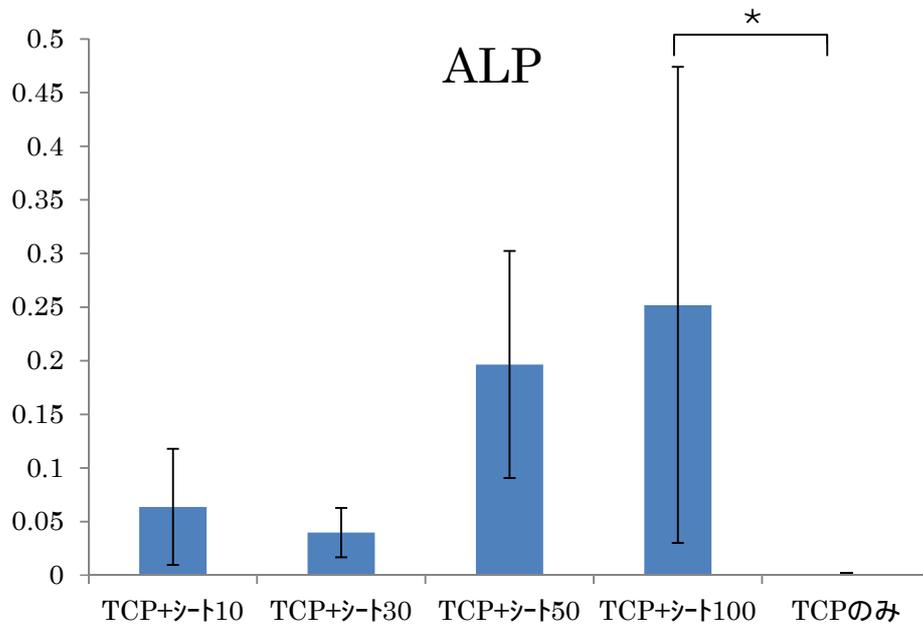
Dex:50nM

Dex:100nM

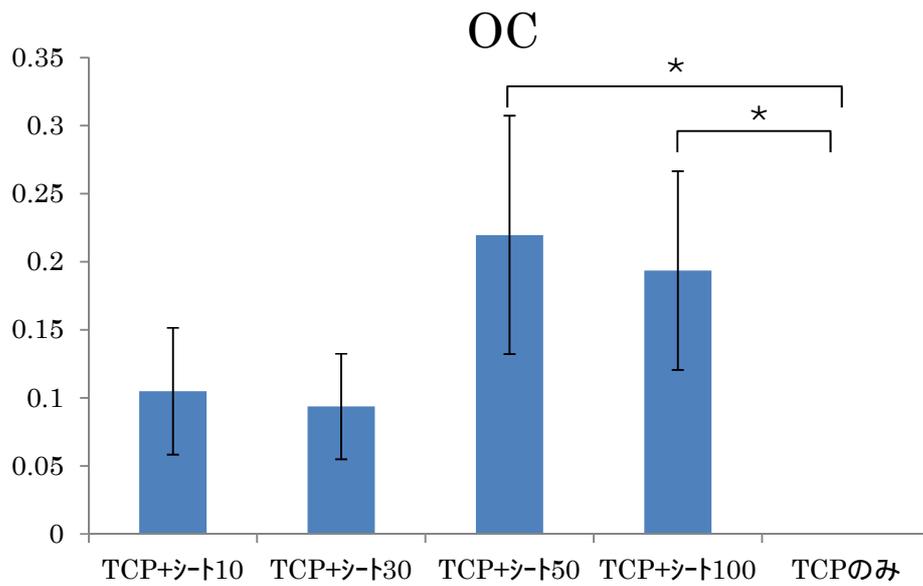


Dex: デキサメサゾン濃度

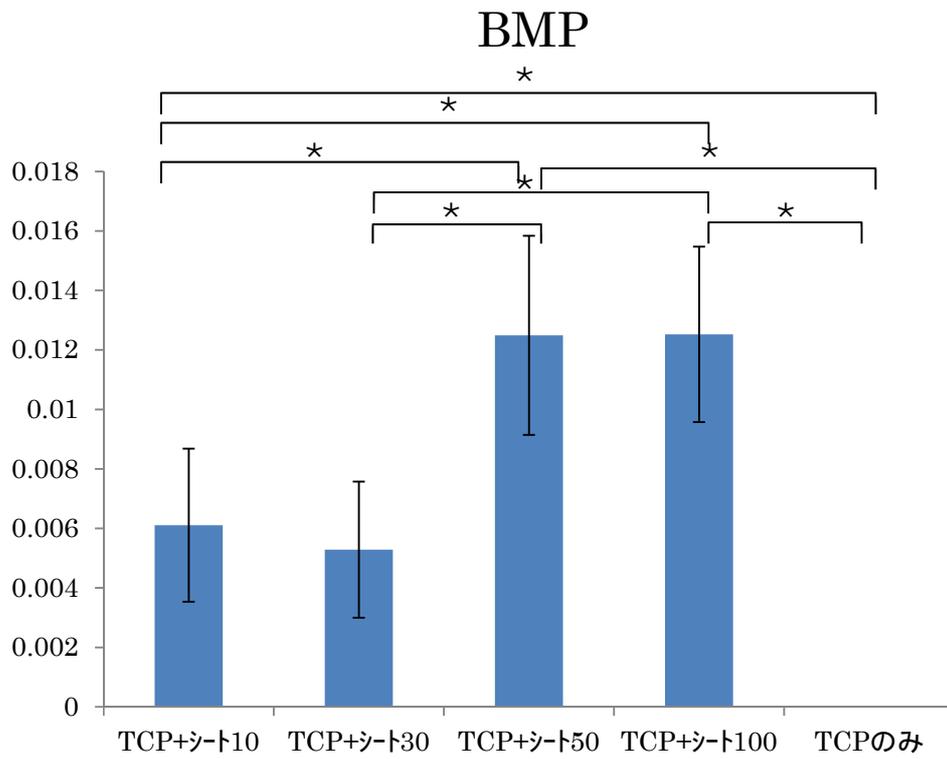
図5 骨形成マーカー発現量 (*In vivo*)



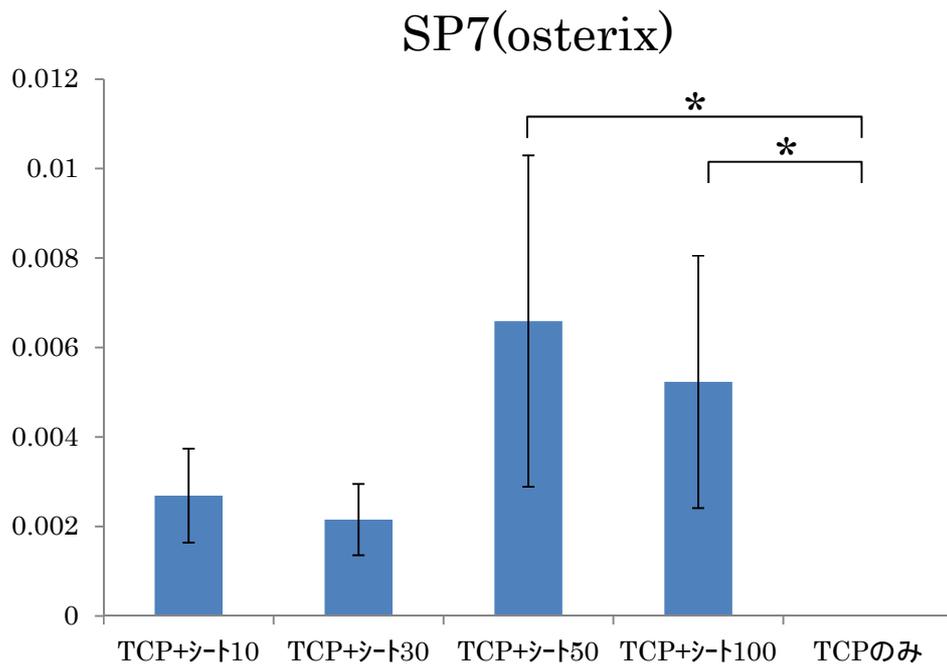
n=4 *P<0.05



n=4 *P<0.05

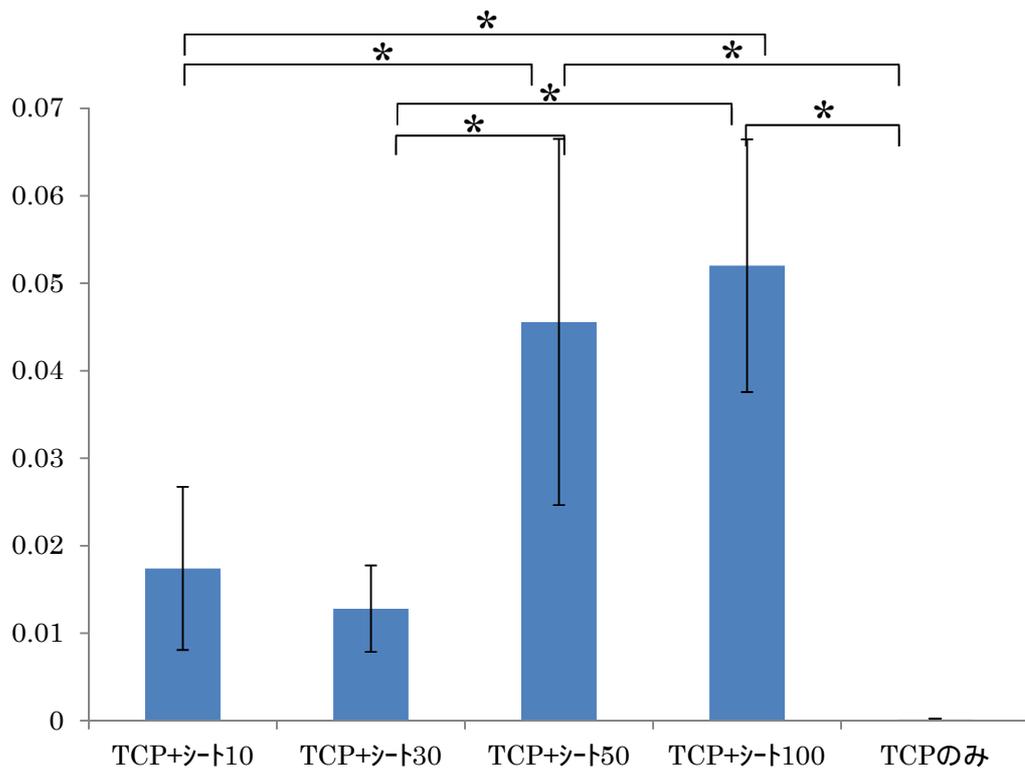


n=4 *P<0.05



n=4 *P<0.05

Runx2



n=4 *P<0.05

**厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）
研究代表者分・分担研究報告書**

ヌードラット大腿骨偽関節モデルの確立

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 清水隆昌 奈良県立医科大学 整形外科 医員

研究要旨

骨折の治療法は近年進歩し、骨癒合率は比較的に向上しているが、現在においても骨癒合を得られず偽関節となる症例が少なからず存在する。偽関節に陥ると、痛みのため患者の ADL は低下し、それに伴い QOL が非常に損なわれる。

偽関節に対する治療は、骨折部に介在する癒痕組織を切除した後、骨折部に生じた骨欠損の大きさに合わせて海綿骨移植が行われるが、一度生物学的活性を失い偽関節に陥ると、living bone ではない海綿骨移植のみでは骨癒合を得られない可能性が高まる。このような状態に陥ると、複数回の手術を行っても骨癒合が得られず、骨折部周囲の組織は損傷され、感染などの合併症併発も危惧される。骨折部を骨形成能が残存している部位まで切除および搔爬を行うと、大きな骨欠損が生じる。

一般的に、骨欠損部が 6cm 以上を超えると海綿骨移植では骨癒合が得られにくいとされ、このような場合は living bone である血管柄付き骨移植術などが必要となり、手技的に難易度が増すことになる。このような状況に陥る前に、新しい方法で、骨折部または偽関節部の骨癒合が得られれば、患者の ADL 改善につながり、临床上も非常に有用性が高い。

本研究では、ヒト骨形成細胞シートの臨床応用を視野に入れた研究をするために、臨床に近い偽関節モデルをヌードラットの大腿骨で作製し、今後のヒト細胞を用いた研究を効率よく進めるための基礎研究を目的としている。生物学的活性を有したヒト由来の骨形成細胞シートを注入し、偽関節部位の骨癒合が得られるかを検討するための偽関節モデルである為、偽関節モデル作製後、自然経過で骨癒合が起こらず、ある程度の経過観察期間(本研究では骨切り後 12 週間)に、確実に偽関節となるモデルを作製することを目的とする。

今回の実験から、確実にヌードラット大腿骨偽関節が作製できる方法が確立できた。この偽関節モデルを使用することで、ヒト骨芽細胞シート移植による骨癒合の効果を評価することができると考えられ、ヒト骨形成細胞によって骨癒合を得られることを証明することが可能となると考えられる。

A. 研究目的

これまでも実験動物を用いた偽関節モデルは報告されている。しかし、中・大型の動物が主であり、ラットにおける偽関節モデルは必ずしも十分なものが確立されているとは言えない。ヒト骨髄細胞を用いて、硬組織再生の研究、特に偽関節も

モデルに対する骨癒合の研究を進めるうえで、免疫不全動物であるヌードラットの偽関節モデルは重要である。ヌードマウスやスキッドマウスも免疫不全動物として広く用いられているが、大腿骨は非常に小さく、骨折や骨壊死のモデルを研究する上では扱いにくい。そこで、本研究では通常のラットとほぼ同じサイズで免疫不全動物

であるヌードラットを用いて大腿骨の偽関節モデルを作製することを目的として、実験を行った。

ラット大腿骨偽関節モデルは様々なものが報告されているが、髄内釘を用いた方法は簡便で有用性が高い。偽関節を作製するために骨折部の骨膜の熱処理が一般的に行われているが¹、個体間で均一な骨膜の熱処理を行うことは手技的に困難である。また、骨折治癒には周囲の間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cells; MSCs) が骨芽細胞などに分化し骨癒合を促す必要があるが²、この MSCs の供給源として、骨膜³、骨髄⁴、周囲の筋肉⁵、周囲の血管⁶などが挙げられる。

骨膜のみを処理するモデルでは、骨膜を除くその他の部位から MSCs が供給される可能性が存在するため、骨折部が経過によって確実に偽関節となるとは言い難く、また実際の臨床で遭遇する骨形成能を失った偽関節にならない可能性も考えられる。

今回我々は、骨膜を熱処理する代わりに、骨膜と周囲の筋肉組織を含めて広範囲に骨折部の軟部組織を切除したうえ、さらに大腿骨骨髄の搔爬を追加する骨折部を作製することで、簡便で再現性の高いヌードラット大腿骨偽関節モデルの作製を行った。

B. 研究方法

B.1. ニュードラット偽関節モデルの作製

本研究では、11 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剝離した後、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) を用いた髄内釘固定を行い、これを偽関節群とした (図 1)。

一方、健側の大腿骨を対照群とし、両群 n=12 で比較検討を行った。

B.2. 移植標本の骨形性能の評価

術後 4、8、12 週でレントゲン画像を撮影し、継時的に骨形成の状態を観察した。

B.3. 移植標本の骨形性能の評価

骨癒合状態を評価するため、組織像も継時的に評価した。摘出標本は 2 日間ホルマリン固定し、数日間脱灰した後、骨折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 (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。

B.4. 3点曲げ力学的評価による偽関節の確認

分担研究者・森田が作製したラット用の専用ジグを使用し、評価を行った。

C. 研究結果

C.1. レントゲン画像による骨形成の経時的評価

図 2 に経時的なレントゲン像の結果を示す。偽関節群では、レントゲン画像で骨切り部周囲にわずかな仮骨形成を認めるものの、術後 12 週まで骨性架橋を認めなかった。

C.2. 組織像

図 3 に、骨切後 4、8、12 週で摘出した大腿骨の組織像を示す。X 線画像と同様に、偽関節群では骨折部の骨性架橋を認

めなかった。骨折部には繊維性組織が介在しており、骨切り後 12 週では骨切部の皮質骨の萎縮を認めた。

これらは、偽関節の組織像と一致した所見であった。

C.3. 力学試験結果

正常大腿骨に比べて、有意にその強度は失われており、レントゲン結果や組織像の結果と同じく、偽関節であることが明らかであった。

D. 考察

骨折の治療法は近年進歩し、骨癒合率は比較的に向いているが、現在においても骨癒合を得られず偽関節となる症例が少なからず存在する。偽関節に陥ると、痛みのため患者の ADL は低下し、それに伴い QOL が非常に損なわれる。

偽関節に対する治療は、骨折部に介在する癒痕組織を切除した後、骨折部に生じた骨欠損の大きさに合わせて海綿骨移植が行われるが、一度生物学的活性を失い偽関節に陥ると、living bone ではない海綿骨移植のみでは骨癒合を得られない可能性が高まる。このような状態に陥ると、複数回の手術を行っても骨癒合が得られず、骨折部周囲の組織は損傷され、感染などの合併症併発も危惧される。骨折部を骨形成能が残存している部位まで切除および搔爬を行うと、大きな骨欠損が生じる。

一般的に、骨欠損部が 6cm 以上を超えると海綿骨移植では骨癒合が得られにくいとされ、このような場合は living bone である血管柄付き骨移植術などが必要となり、手技的に難易度が増すことになる。このような状況に陥る前に、新しい方法で、骨折部または偽関節部の骨癒合が得られれば、患者の ADL 改善につながり、臨床上も非常に有用性が高い。

本研究では、ヒト骨形成細胞シートの臨

床応用を視野に入れた研究をするために、臨床に近い偽関節モデルをヌードラットの大腿骨で作製し、今後のヒト細胞を用いた研究を効率よく進めるための基礎研究を目的としている。生物学的活性を有したヒト由来の骨芽細胞シートを注入し、偽関節部位の骨癒合が得られるかを検討するための偽関節モデルである為、偽関節モデル作製後、自然経過で骨癒合が起こらず、ある程度の経過観察期間(本研究では骨切り後 12 週間)に、確実に偽関節となるモデルを作製することを目的とする。

今回の実験から、確実にヌードラット大腿骨偽関節が作製できる方法が確立できた。この偽関節モデルを使用することで、ヒト骨芽細胞シート移植による骨癒合の効果を評価することができると考えられ、ヒト骨芽細胞によって骨癒合を得られることを証明することが可能となると考えられる。

本研究で我々が確立したモデルは、骨膜の熱処理の代わりに、大腿骨周囲の骨膜および筋肉組織を広範囲に切除し、さらに大腿骨骨髄を搔爬することで偽関節を作ることが可能であった。骨膜の熱処理をせず、骨癒合に影響を与える MSCs を効果的に除去することで、高い再現性をもって偽関節作製が可能であった。我々の作製したヌードラット大腿骨偽関節が、今後の偽関節の治療法開発に有用であると考えられた。

E. 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、小畠康宣、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
老齡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

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

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

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

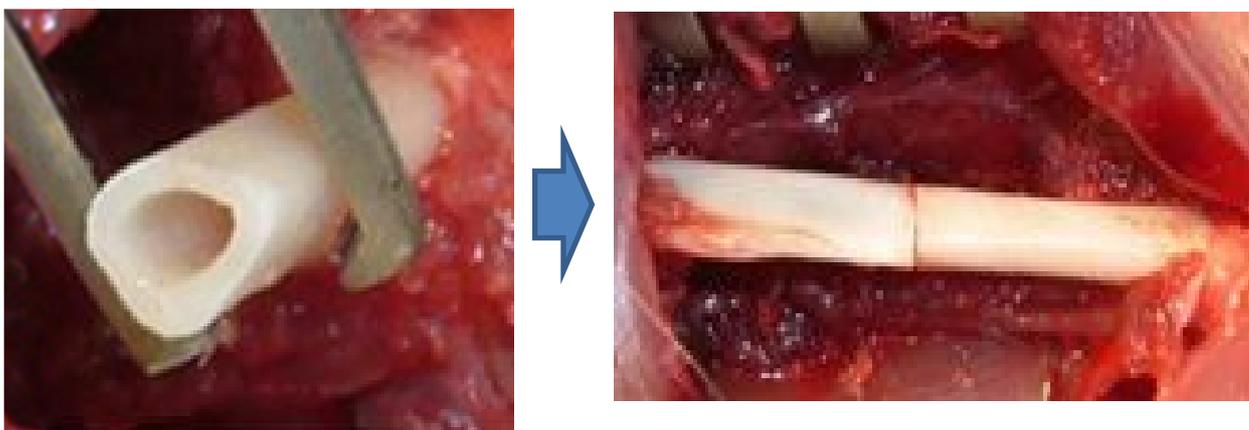
なし

G. 参考文献

1. Kokubu T, Hak DJ, Hazelwood SJ, Reddi AH. Development of an atrophic nonunion model and comparison to a closed healing fracture in rat femur. J Orthop Res. 2003 May;21:503-10.
2. Iwaki A, Jingushi S, Oda Y, Izumi T, Shida JI, Tsuneyoshi M, et al. Localization and quantification of proliferating cells during rat fracture repair: detection of

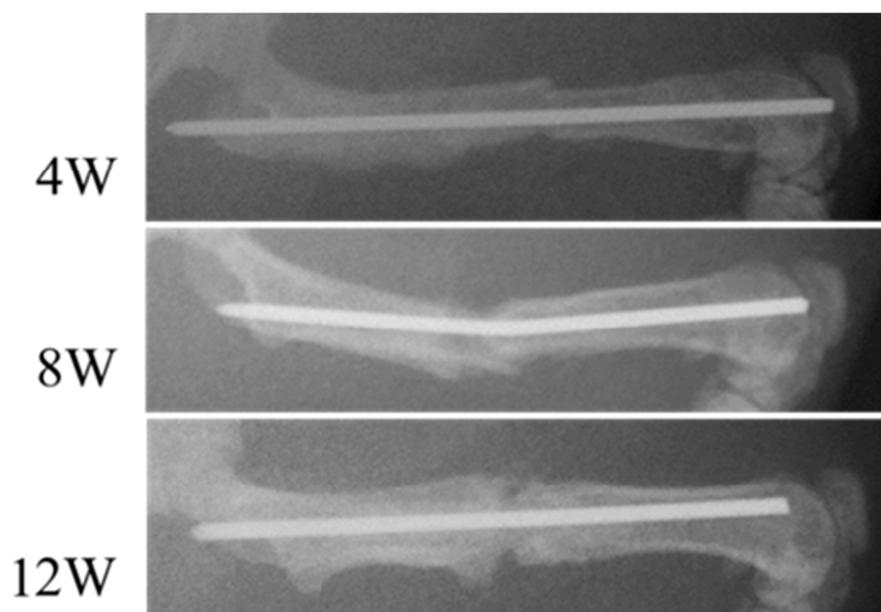
- proliferating cell nuclear antigen by immunohistochemistry. *J Bone Miner Res* 1997;12:96-102.
3. Malizos KN, Papatheodorou LK. The healing potential of the periosteum. Molecular aspects. *Injury* 2005;36(Suppl 3):S13-9.
 4. Baksh D, Song L, Tuan RS. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J Cell Mol Med* 2004;8:301-16.
 5. Eghbali-Fatourehchi GZ, Lamsam J, Fraser D, Nagel D, Riggs BL, Khosla S. Circulating osteoblast-lineage cells in humans. *N Engl J Med* 2005;352:1959-66.
 6. Rumi MN, Deol GS, Singapuri KP, Pellegrini Jr VD. The origin of osteoprogenitor cells responsible for heterotopic ossification following hip surgery: an animal model in the rabbit. *J Orthop Res* 2005;23:34-40.

図1 大腿骨偽関節モデルの作製



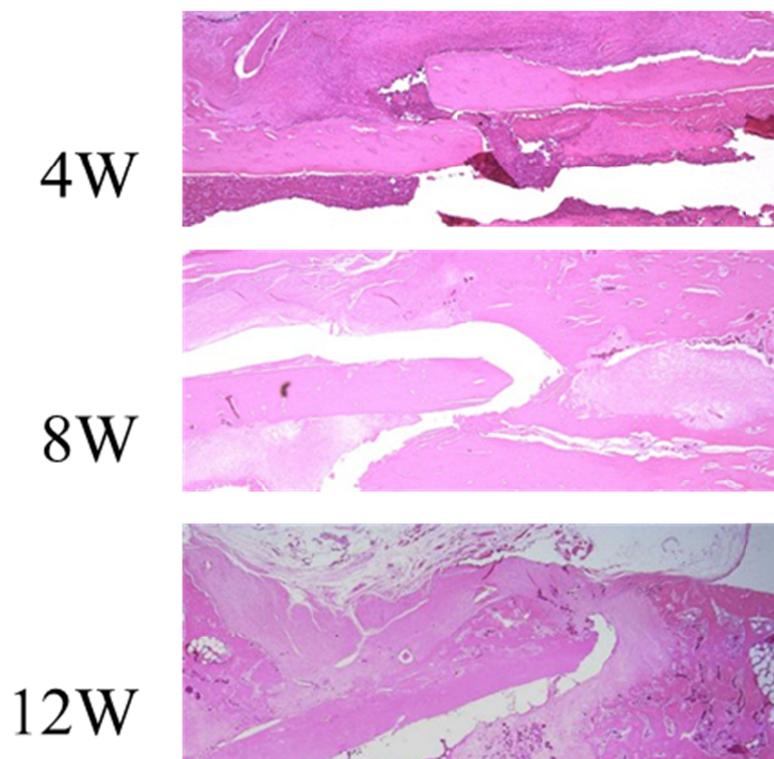
大腿骨の周囲の骨膜を可及的に切除し、さらに髓腔内を搔把・洗浄する。その後、骨髓腔内に鋼線を入れて髓内固定を行う。骨膜の切除だけでなく、髓腔内の搔把・洗浄を十分に行うことが確実な偽関節モデル作製のポイントであることが分かった。

図2 経時的レントゲン撮影による骨折部の状態の評価



12週経過しても骨折部に骨癒合は見られなかった。組織像や力学試験結果からも骨癒合が得られていない結果であり、偽関節と判断した。

図3 経時的な骨折部の組織像



骨癒合は得られておらず、軟部組織の介在が確認された。

**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

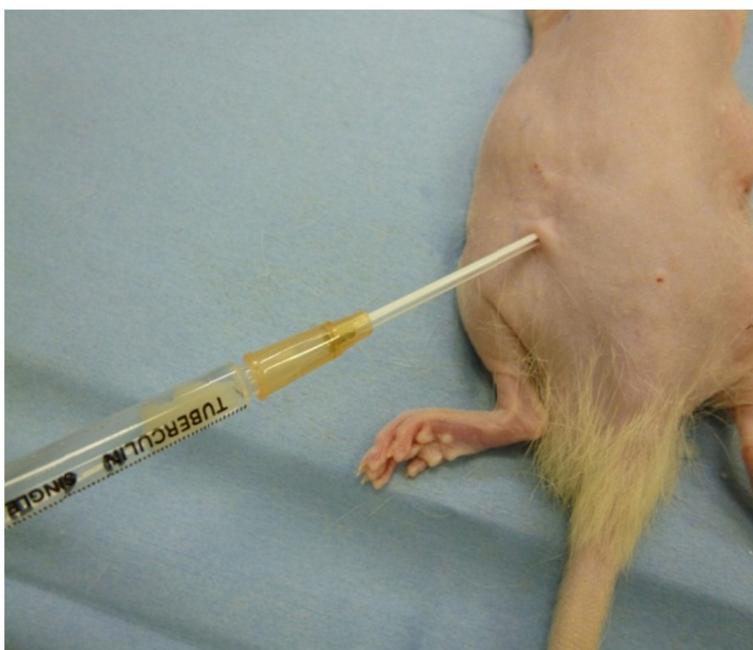


図2 摘出した人工骨のレントゲン写真

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)

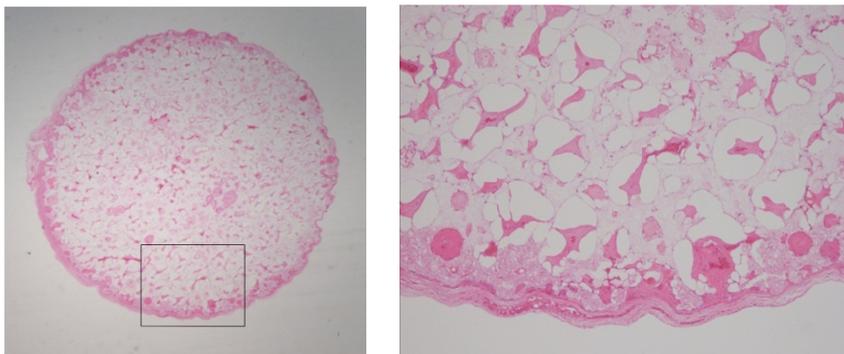


(Dex 100nM)

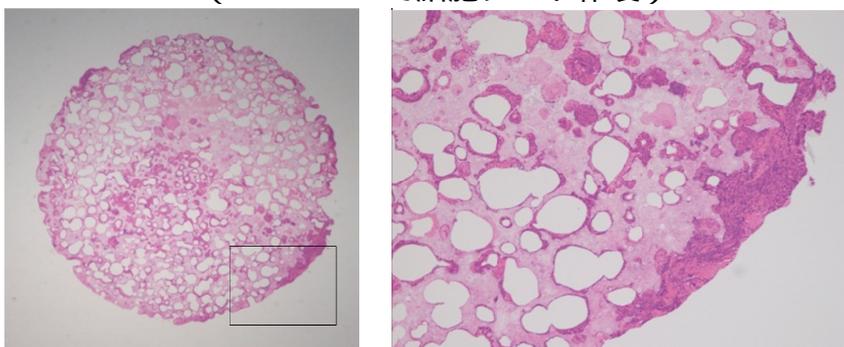
Dex : デキサメサゾン濃度を示す

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

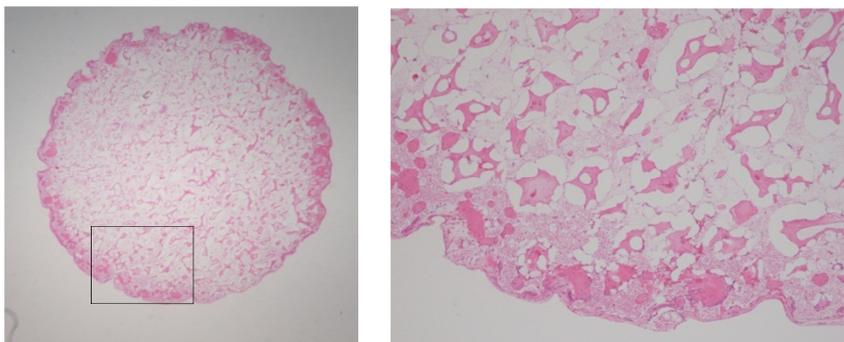


(Dex 10 nM で細胞シート作製)

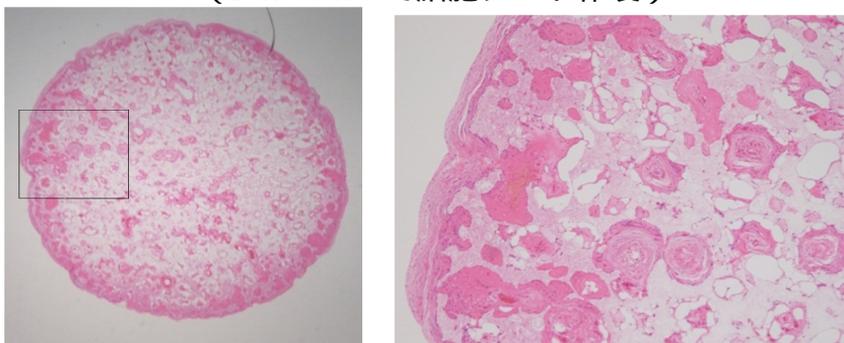


(Dex 100nM で細胞シート作製)

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 ヒト骨髓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）

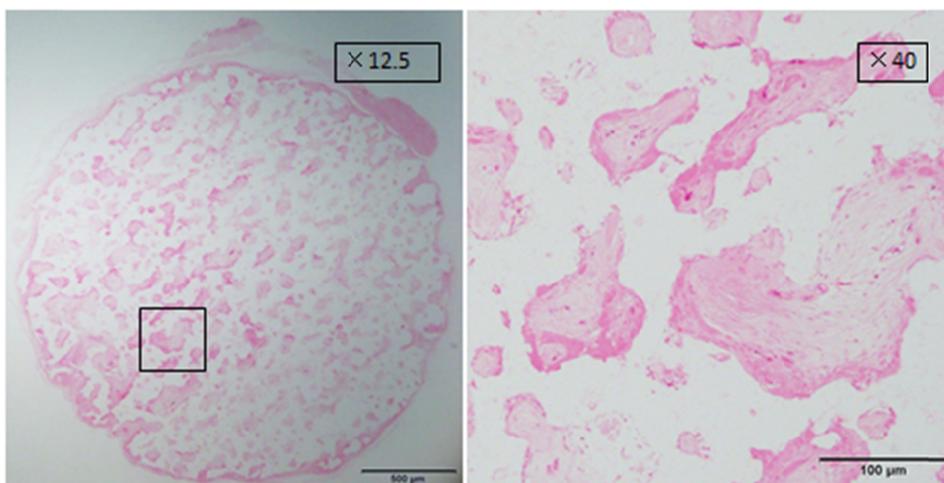
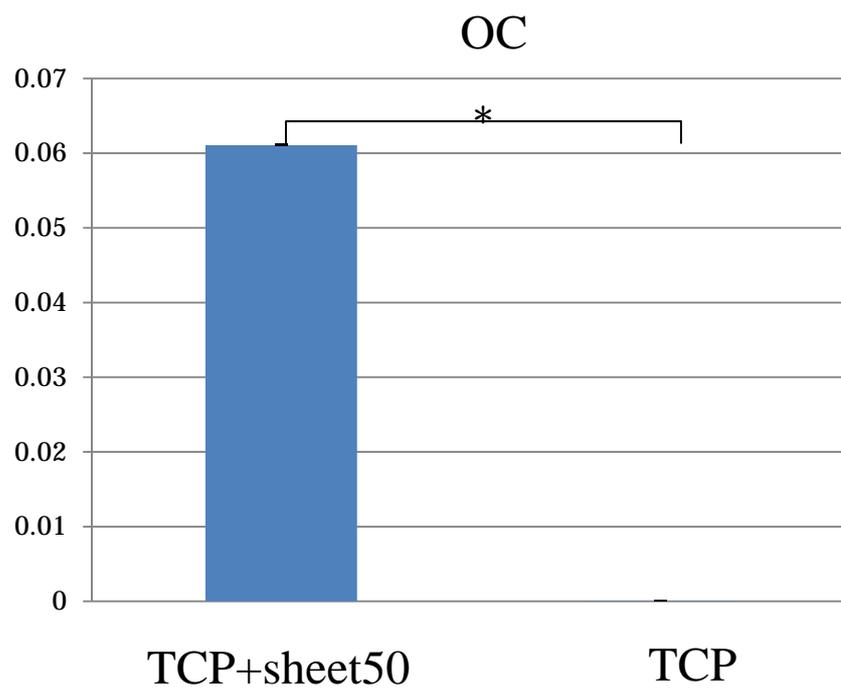
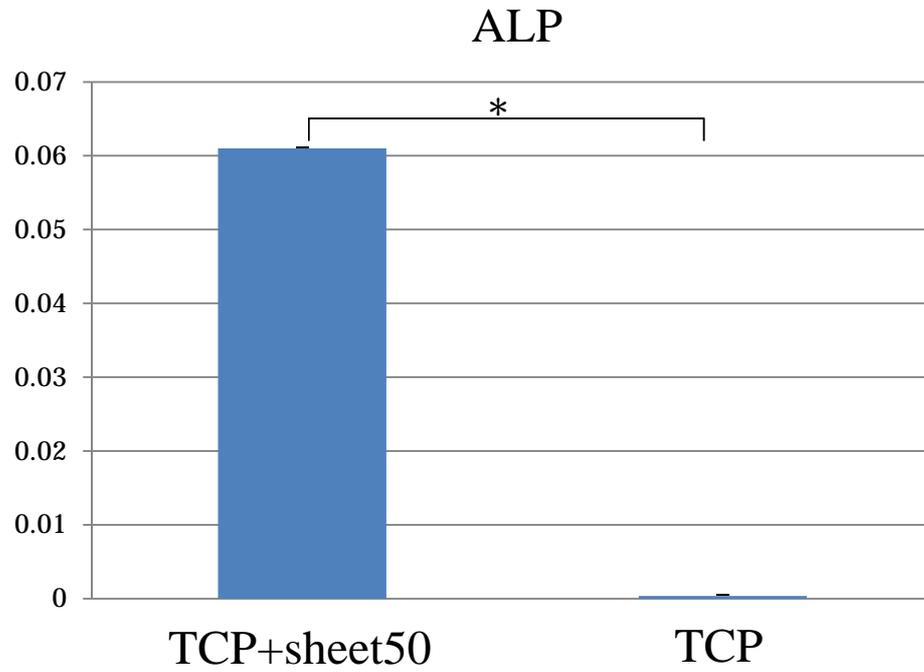
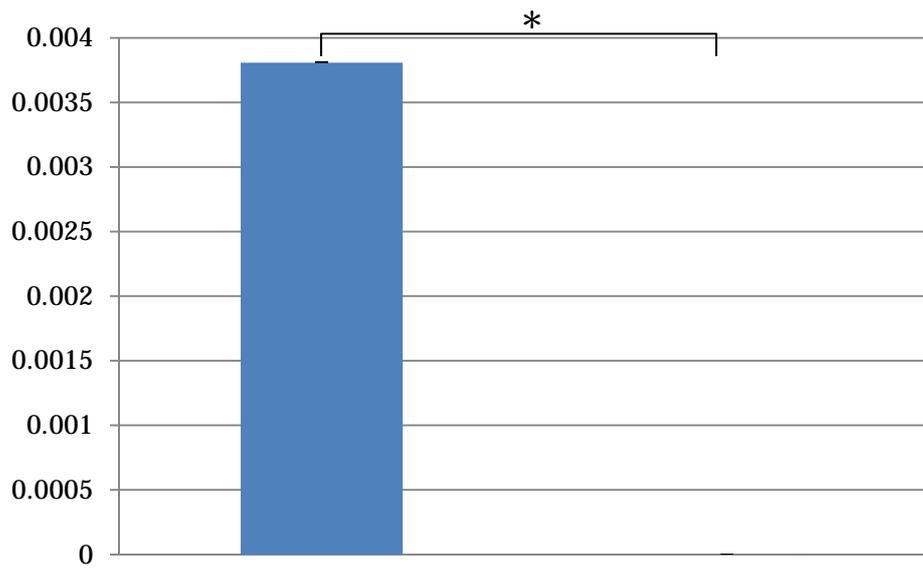


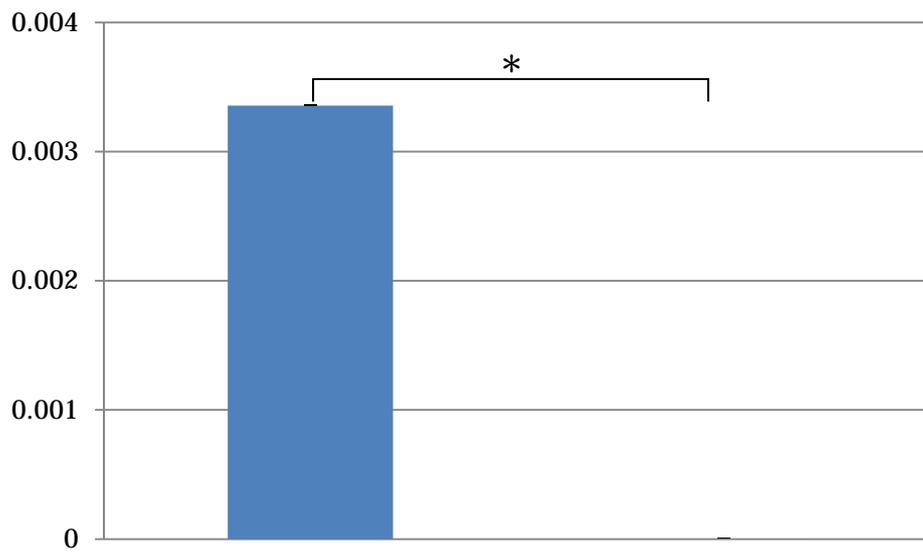
図5 注入型移植法による人工骨への骨形成の評価（生化学的）



BMP2



SP7



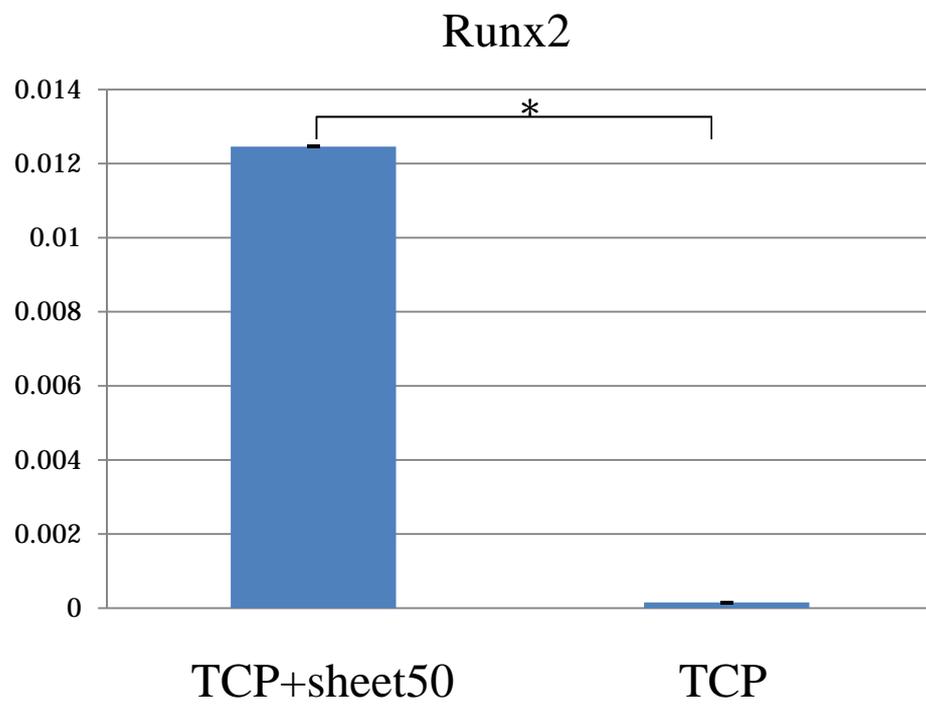


図6 注入型移植法によるヌードラット大腿骨偽関節部への骨形成能のレントゲン評価

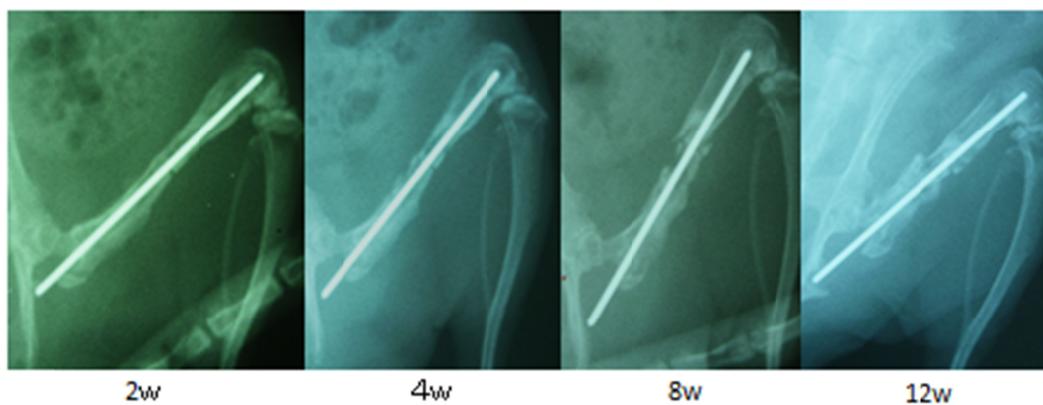
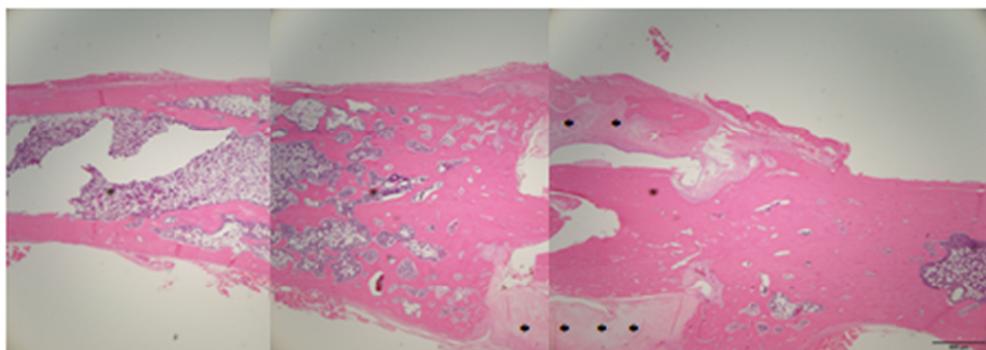


図7 注入型移植法によるヌードラット大腿骨偽関節部への骨形成能の組織学的評価



• 軟部組織の介在

**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(図1)。

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 - 3. ニュー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正常大腿骨と比べて低下している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2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。

健側の正常大腿骨の曲げ破壊時の最大曲げ荷重によって、健側(正常大腿骨)群と偽関節群とを比較した。

B. 4. μ CT撮影による偽関節の評価方法の検討

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、偽関節群と健側群を比較した。

X線 μ CT撮影の結果を加味することで作製したモデルが偽関節モデルであることが確認できる。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. 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2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

て、注入群とオープン群とを比較した。

B . 6 . 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 . 7 . 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 . 偽関節モデルの μ CT 撮影による評価結果

図3に偽関節群の μ CT画像を示す。偽関節モデルにおいては、術後12週においても骨切り部周囲の新生骨形成を認めず、骨切り部の骨癒合を認めなかった。

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 μ CT 撮影による偽関節の評価結果

図4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 . 3 . 偽関節モデルの3点曲げ試験による力学的評価の結果

図5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。健側群の最大曲げ荷重は 136.0 ± 14.4 Nであり、偽関節群の最大曲げ荷重は 71.1 ± 21.2 Nであった。また、偽関節の最大曲げ荷重は健側群の値と比べて有意に低かった ($p < 0.01$)。

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。

C . 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力学的評価の結果

図6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

μCT 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

μCT 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 ヌードラットにおける偽関節モデルの作製

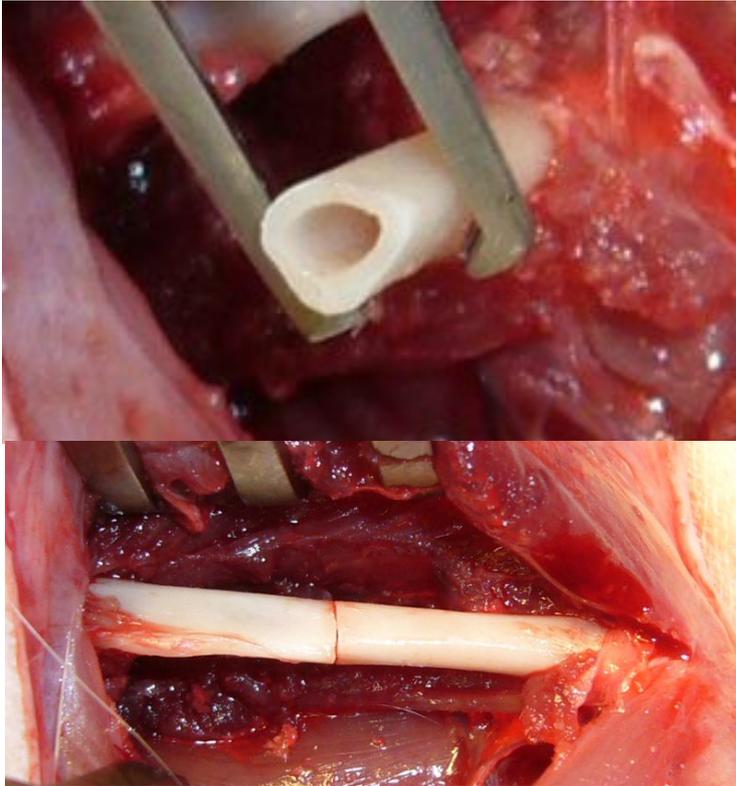


図 2 専用ジグによる 3 点曲げ試験（力学的評価）

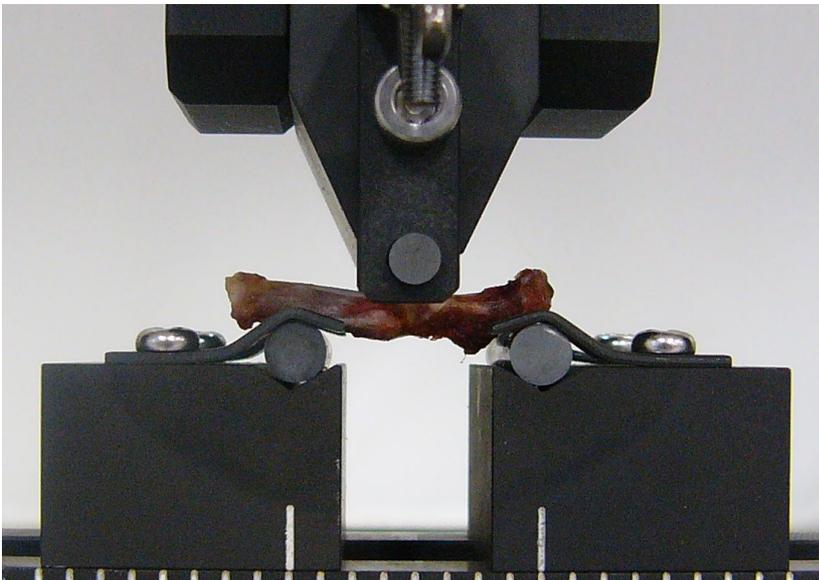


図3 偽関節群の μ CT画像



図4 注入群の μ CT画像



図5 3点曲げ試験の結果

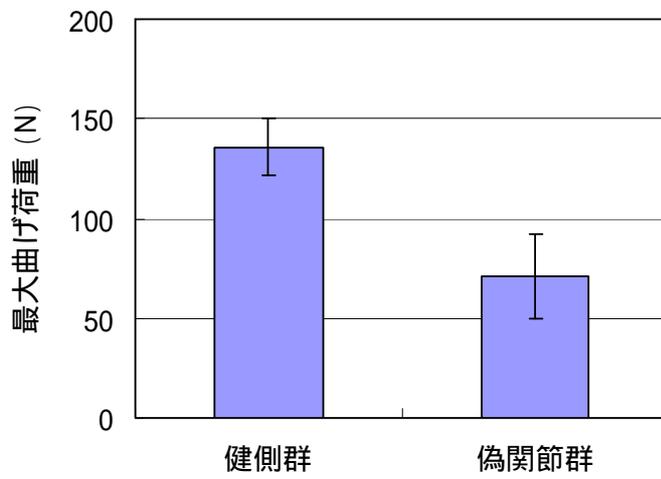
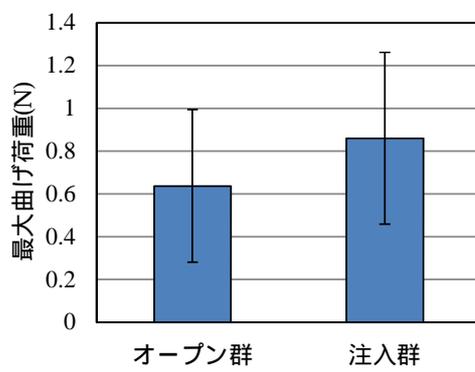


図6 3点曲げ試験の結果



**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) 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15ml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82µg/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10cm培養ディッシュで、生化学的評価用の細胞シートは6cm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

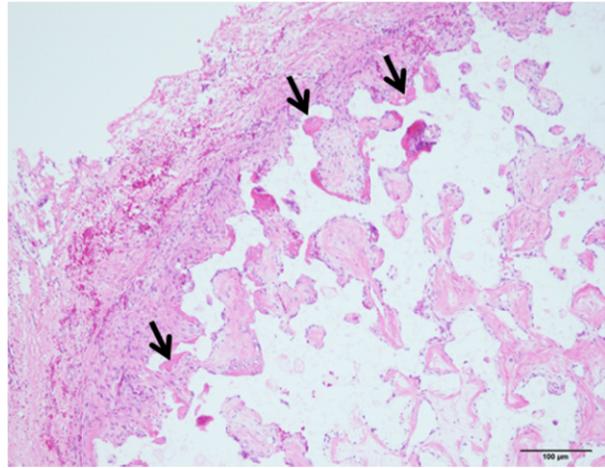
- Ohgushi H, Dohi Y, Katuda T, et al. In vitro bone formation by rat marrow cell culture. *J Biomed Mater Res* 32: 333-340, 1996.
- Ohgushi, H. and Caplan, A.I. (1999) Stem cell technology and bioceramics: From cell to gene engineering. *Journal of Biomedical Materials Research*, 48,913-927.
- Sonal, 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）

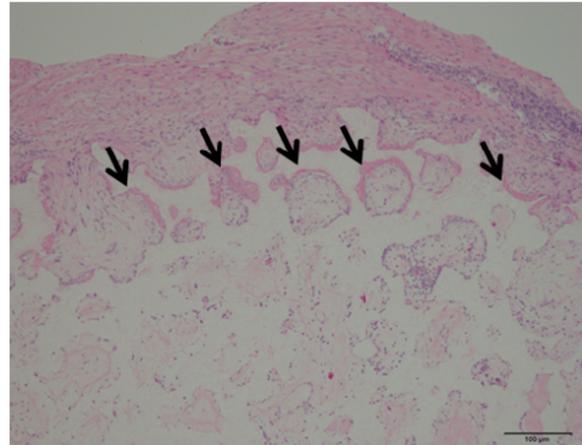
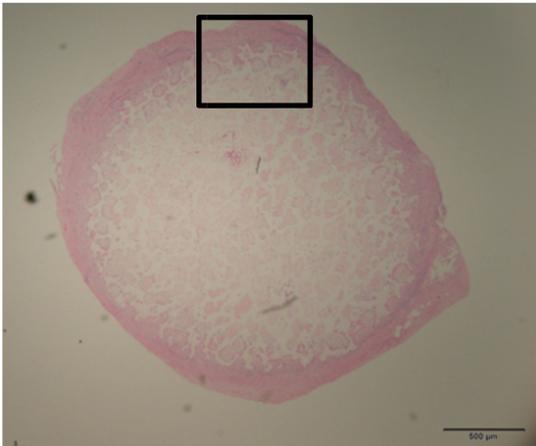
A. デキサメサゾン：10nM

左図の枠内の拡大写真

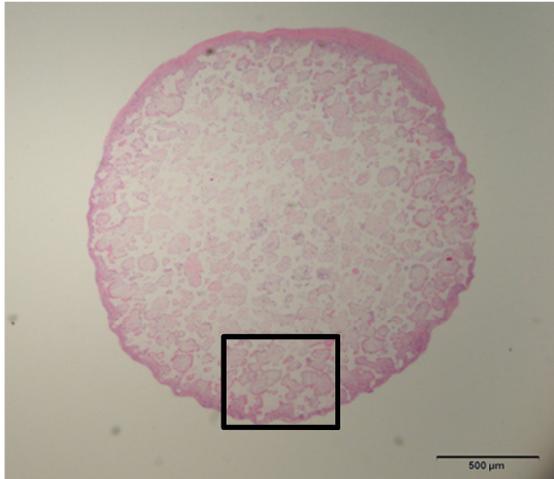


B. デキサメサゾン：30nM

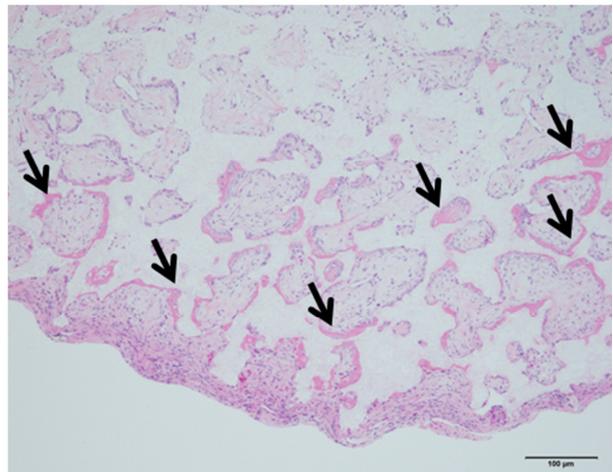
左図の枠内の拡大写真



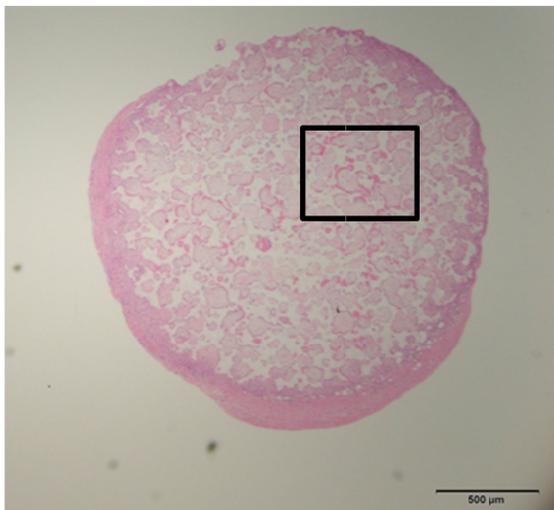
C. デキサメサゾン : 50nM



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

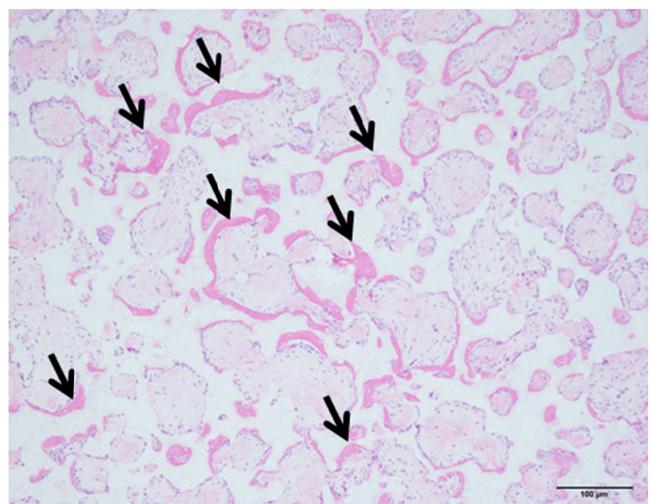
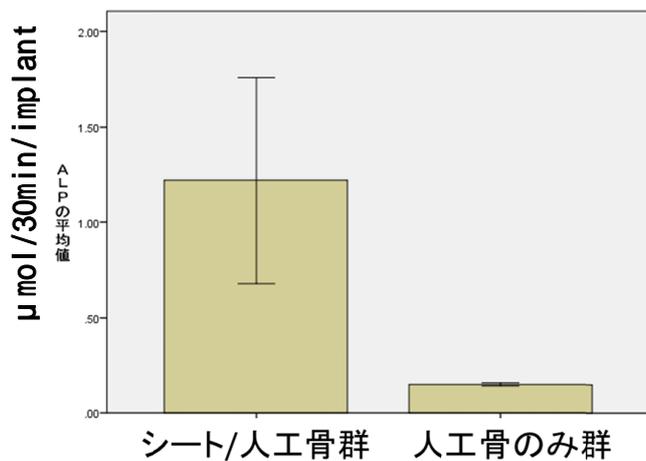


図2 生体内での細胞シートの骨形成能の検討結果（生化学的評価）

アルカリフォスファターゼ活性



研究発表に関する一覧表

	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

	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兎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腓骨孔間治癒の促進	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）
19	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	2012/12/01	東京慈恵会医科大学（東京）
20	上羽智之、赤羽学、清水隆昌、中野健一、倉知彦、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	2012/12/01	東京慈恵会医科大学（東京）
21	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	2012/12/01	東京慈恵会医科大学（東京）
22	谷掛洋平、中島弘司、林宏治、加藤宣伸、藤間保晶、大串始、	Fibronectin をコートした TCP の骨形	第 27 回日本整形外科学会基礎学術集会	2012/10/26-27	名古屋国際会議場（名古屋）

	土肥祥子、赤羽学、高澤伸、川手健次、田中康仁	成能			
23	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	2012/10/26-27	名古屋国際会議場（名古屋）
24	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	2012/10/26-27	名古屋国際会議場（名古屋）
25	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	2012/10/26-27	名古屋国際会議場（名古屋）
26	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健骨孔間治療の促進	第27回日本整形外科学会基礎学術集会	2012/10/26-27	名古屋国際会議場（名古屋）
27	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	2012/10/26-27	名古屋国際会議場（名古屋）
28	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	2010/06/13-14	パシフィコ横浜（横浜）

・ 研究発表に関する参考資料

添付資料参照